

Identyfikacja bliźniąt monozygotycznych w dobie sekwencjonowania nowej generacji

dr hab. Aleksander Masny¹

ORCID 0000-0002-6230-120X

podkom. Bożena Wysocka²

ORCID 0009-0009-7297-1336

¹ Uprzednio: Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji, obecnie: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego, Państwowy Zakład Higieny BIP

² Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji, bozena.wysocka@policja.gov.pl

Streszczenie

Bliźnięta monozygotyczne stanowią wyzwanie dla kryminalistyki ze względu na brak standaryzowanych narzędzi do ich różnicowania w obrębie pary, utrudniający lub uniemożliwiający sądowi ustalenie, które z bliźniąt jest sprawcą przestępstwa. Pojawienie się technologii sekwencjonowania nowej generacji, sekwencjonowania całogenomowego oraz analiz epigenomu ludzkiego otworzyło drogę do identyfikacji bliźniąt monozygotycznych w celach kryminalistycznych. Kwestią otwartą pozostaje odsetek bliźniąt monozygotycznych, który można różnicować, oraz poziom wiarygodności uzyskanych wyników. Dowody uzyskane za pomocą sekwencjonowania całogenomowego, w sprawach dotyczących identyfikacji bliźniąt monozygotycznych, budzą wątpliwości sądów. Wraz z nowymi technologiami pojawiają się szereg pytań odnośnie do ich parametrów: siły różnicowania, poziomu wiarygodności wyniku, sposobów walidacji metod oraz zagadnień natury prawnej. Nowe technologie identyfikacji bliźniąt wymagają dostosowania do wymagań stawianych metodom kryminalistycznym: weryfikacji, walidacji i standaryzacji tych metod oraz jednolitego podejścia do interpretacji wyników, aby mogły być powszechnie stosowane w kryminalistyce i uznawane przez sądy za wiarygodne dowody.

Słowa kluczowe: bliźnięta monozygotyczne, sekwencjonowanie, sekwencjonowanie nowej generacji, analiza epigenomu, identyfikacja genetyczna bliźniąt

Wstęp

Na początku XXI wieku stwierdzono, że bliźnięta monozygotyczne nie muszą mieć identycznych genomów i mogą w ich DNA występować mutacje, które nastąpiły po podziale zygoty i/lub utworzeniu dwóch niezależnych embryonów (Van Dongen et al., 2012). Zakres zróżnicowania genomu w obrębie par bliźniąt monozygotycznych pozostawał wówczas słabo zbadany, jednak zakładano, że rozwój technologii sekwencjonowania całogenomowego (ang. *whole genome sequencing*, WGS) powinien przyczynić się do lepszego zrozumienia różnic pomiędzy bliźniętami, szczególnie w kontekście ich zróżnicowanej zapadalności na choroby, zarówno zakaźne, jak i niezakaźne (Van Dongen et al., 2012). Niedawno potwierdzono powyższe przypuszczenia. Przy zastosowaniu całogenomowego sekwencjonowania udowodniono, że u bliźniąt monozygotycznych można wykryć mutacje, które powstały jeszcze na etapie zygoty (Jonsson et al., 2021). Jednak zmienność genetyczna nie jest jedynym źródłem informacji o różnicach w genomach ludzi. Niemal 50 lat temu postulowano, że ekspresja genów oraz zależny od niej fenotyp mogą być regulowane za pomocą mechanizmów epigenetycznych (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975).

W drugiej dekadzie XXI wieku zgromadzono znaczną wiedzę na temat metylacji genomu ludzkiego i potwierdziły się przypuszczenia odnośnie do wpływu metylacji cytozyny w DNA (określanej też jako piętno genetyczne lub genomowe) na ekspresję genów i różnicowanie komórek. Uznano, że piętno epigenetyczne jest przekazywane potomstwu (Jones, 2012), niemniej są również w tej kwestii wątpliwości co do zakresu tego zjawiska u ludzi w porównaniu do innych kręgowców (Horsthemke, 2018). Zawansowane badania lokalizacji metylowanych cytozyn w genomie, określonych jako piąta zasada (Lister & Ecker, 2009), ze względu na wpływ na funkcjonowanie genów i dziedziczność imprintingu, stały się możliwe dzięki wynalezieniu technologii konwersji bisulfitowej DNA (Frommer et al., 1992) oraz rozwojowi technologii sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) (Lister & Ecker, 2009). Wspomniana powyżej konwersja bisulfitowa pozwala dokonać konwersji wszystkich niemetylowanych cytozyn w genomie do uracylu (Hayatsu, 2008). Powyższa konwersja pozwala ustalić, które cytozyny były metylowane w niemodyfikowanym DNA, ponieważ tylko te cytozyny nie ulegną konwersji do uracylu. Metody sekwencjonowania nowej generacji umożliwiają nie tylko analizę całych genomów lub licznej reprezentacji ich fragmentów, ale również detekcję metylacji cytozyn w DNA poddanym odpowiedniej procedurze, np. konwersji bisulfitowej. Badanie statusu metylacji poszczególnych cytozyn w genomie pozwoliło różnicować identyczne sekwencje DNA ze względu na stan, a nawet poziom ich metylacji. Uzyskano nowy, poza sekwencją DNA, poziom różnicowania DNA organizmów (Lister & Ecker, 2009). Status metylacji DNA ulega dynamicznym zmianom na etapie rozwoju płodowego i różnicowania komórek. Zmiany wzoru i poziomu metylacji cytozyn w genomie zachodzą w sposób ciągły w trakcie życia organizmów (Dor & Cedar, 2018). Również proces demetylacji cytozyn jest intensywnie badany, a jego mechanizmy są dobrze opisane (Seethy et al., 2021). Ponieważ metylacja ma wpływ na ekspresję genów, ma wpływ również na fenotyp (Kukla-Bartoszek et al., 2019). Poziom metylacji DNA zmienia się z wiekiem (Horvath & Raj, 2018; Ryan et al., 2020), zależy od sposobu żywienia (Cavalli & Heard, 2019), przebytych chorób zakaźnych (Fitzgerald et al., 2021). W przebiegu chorób nowotworowych poziom i wzory metylacji są zaburzone w całym genomie (Klutstein et al., 2016). Badania epigenomu znalazły się w obszarze zainteresowań kryminalistyki, ponieważ zarówno wzory, jak i poziom metylacji mogą służyć do określania cech fenotypowych i wieku (Kukla-Bartoszek et al., 2019; Pośpiech et al., 2020; Spólnicka et al., 2018; Zbieć-Piekarska et al., 2015), a osoby posiadające identyczne sekwencje badanych regionów DNA mogą się różnić wzorem metylacji cytozyn w tych regionach. Celem niniejszego opracowania jest zaprezentowanie obecnego stanu wiedzy i perspektyw wykorzystania technologii NGS w badaniach genomów oraz epigenomów bliźniąt monozygotycznych w zastosowaniach kryminalistycznych.

Badania genomów bliźniąt

Identyfikacja bliźniąt monozygotycznych dla celów dochodzeniowo śledczych i procesowych stanowi problem dla organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości. Również ustalenie ojcostwa jest trudne w przypadku bliźniąt monozygotycznych. Na całym świecie opisywane są przypadki, w których nie można ustalić, które z pary bliźniąt dokonało danego czynu, pozostawiło ślady biologiczne lub było ojcem. Analiza krótkich powtórzeń tandemowych (ang. *short tandem repeats*, STR), złoty standard identyfikacji osób, jest zazwyczaj nieskuteczna w przypadku bliźniąt monozygotycznych (Turrina et al., 2021; Vidaki et al., 2017). Opisano przypadek, w którym jedno z pary bliźniąt posiadało mutację (insercję) w regionach STR, która pozwoliła na odróżnienie go od drugiego bliźnięcia z pary (L. F. Wang et al., 2015), wystąpienie takiego zdarzenia jest niezwykle mało prawdopodobne i z tego względu niezwykle rzadko obserwowane. Niezwykle niskie prawdopodobieństwo, często traktowane jako niemożliwość (Z. Wang et al., 2015), odróżnienia bliźniąt za pomocą badań profili STR, przy braku innych dowodów (Tvedebrink & Morling, 2015) skutkowało często ich długotrwałą bezkarnością w różnych sprawach, w tym kradzieży i gwałtu (Turrina et al., 2021). Znane są przypadki bliźniąt monozygotycznych, w których żadne z pary nie przyznawało się do przestępstwa, zaś badanie profili STR nie pozwalało zidentyfikować sprawcy. W takich sprawach sądy z reguły decydują na podstawie innych dowodów, o ile są one dostępne. Mogą to być wyniki analiz włókien z odzieży, jak w przypadku polskiej pary bliźniąt odmawiającej współpracy przy ustaleniu sprawcy wypadku (Szurek, 2022), lub zeznania świadków, jak w przypadku ustalenia ojcostwa lub gwałtu (Turrina et al., 2021). Niejednokrotnie, ze względu na zasadę domniemania niewinności, wskutek niemożności ustalenia przez sąd sprawcy na podstawie badań genetycznych profili STR oraz braku innych dowodów niż badania genetyczne sprawca może latami pozostawać bezkarny, tak jak w sprawie rozboju i gwałtu dokonanego w Bostonie w 2004 roku (Turrina et al., 2021). Zwrócono również uwagę na kolejny problem – liczba cięż bliźniaczych rośnie w związku z rosnącą liczbą procedur sztucznego zapłodnienia, co skutkuje częstszym pojawianiem się w bazach danych DNA profili STR, które nie są unikatowe dla jednej osoby (Tvedebrink & Morling, 2015). Ten ostatni problem ma szczególnie

duże znaczenie w przypadku osób adoptowanych, niemających świadomości istnienia bliźniaczego rodzeństwa (Tvedebrink & Morling, 2015). Zatem możliwe jest występowanie w bazach danych identycznych profili STR pochodzących od różnych bliźniąt z jednej pary (Tvedebrink & Morling, 2015).

Czy technologie sekwencjonowania nowej generacji skutecznie różnicują bliźnięta? Czy nadają się do zastosowań kryminalistycznych? Czy wyniki uzyskane za pomocą NGS mogą być dowodem w sądzie? Przegląd literatury pokazuje, że obecnie nie ma jednoznacznej odpowiedzi na żadne z trzech powyższych pytań. Tutaj warto wrócić do sprawy rozboju i gwałtu w Bostonie dokonanego przez jednego z pary bliźniąt jednojajowych McNair. Badania profili STR nie pozwalały ich odróżnić, a to w 2004 roku w zasadzie wyczerpywało możliwości identyfikacji osób na podstawie badań genetycznych. Wraz z rozwojem technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS) pojawiły się nowe możliwości i firma Eurofins wykazała obecność różnic w genomach bliźniąt McNair, pozwalających ustalić, który z nich był sprawcą. Poszukiwanie różnic odbywało się za pomocą ultragłębokiego NGS (ang. *ultra-deep next generation sequencing*), którego przydatność w różnicowaniu bliźniąt monozygotycznych w parze lub ustalenia ojcostwa jednego z pary bliźniąt udowodniono (Weber-Lehmann et al., 2014). Jednak sąd nie przyjął wyników badań firmy Eurofins jako wiarygodnego dowodu (Turrina et al., 2021), choć stwierdził, co następuje: „badania i analizy były oparte na ogólnie przyjętych zasadach naukowych i statystycznych” (oryg. „testing and analysis were based on generally accepted, scientific and statistical principles”). Powyższe pokazuje również, że dopóki nie będzie konsensusu odnośnie do sposobów walidacji i interpretacji wyników NGS, mogą one budzić wątpliwości sądów. Warto nadmienić, że koszt badań NGS w sprawie McNair wyniósł ponad 100 000 USD.

Zachodzi sytuacja, w której dowody z analiz profili STR, które z ogromnym prawdopodobieństwem nie różnicują bliźniąt monozygotycznych z dużym prawdopodobieństwem zostaną przyjęte przez sąd, zaś dowody z badań NGS pozwalające na różnicowanie bliźniąt jednojajowych w licznych sprawach nie zostały uznane za wiarygodne przez sądy (Rolf & Krawczak, 2021). Wyrok skazujący w przypadku braci McNair oparty był na zeznaniach świadka i nastąpił 14 lat po dokonaniu przestępstwa, pomimo przedstawienia dowodów w postaci wyników NGS różnicujących bliźnięta. W sprawie o ojcostwo w Brazylii wyniki badania profili STR potwierdzały, że dwaj bracia bliźniacy mieli identyczne profile STR i nie wykluczały ojcostwa żadnego z nich. Sąd, po ocenie całości materiału zgromadzonego w sprawie, w tym zeznań matki, nakazał obu braciom płacenie alimentów (Turrina et al., 2021). Z kolei w sprawie o ustalenie ojcostwa we Włoszech sąd uznał, że dopasowanie profilu STR wskazujące na ojcostwo jednego z bliźniaków nie jest dowodem potwierdzającym, że to zbadany bliźniak jest ojcem (Turrina et al., 2021). W przypadku obu wyżej cytowanych spraw, w których sądom zaprezentowano wyniki badań profili STR, ich wyniki zostały przyjęte jako wiarygodne, jednak ani nie wykluczały, ani nie potwierdzały ojcostwa wyłącznie jednego z pary bliźniąt, zaś sądy dokonały rozstrzygnięcia na podstawie innych dowodów i przesłanek. Poniżej przedstawione zostaną sposoby, w jakie sądy odnosiły się do dowodów wykorzystujących NGS. W sprawie gwałtu, w której (Yuan et al., 2020) – podobnie jak w sprawie braci McNair – jeden z pary bliźniąt był sprawcą gwałtu (jak później wykazano sprawcą czterech gwałtów), przyznał się do winy, lecz należało wykluczyć jego brata jako sprawcę. Zastosowano sekwencjonowanie całogenomowe, jednakże tylko wyniki sekwencjonowania genomu mitochondrialnego uznano za umożliwiające skuteczne różnicowanie i dalsze analizy DNA genomowego pominięto. W tym miejscu warto wspomnieć, że głębokość sekwencjonowania dla genomu mitochondrialnego wynosiła 2000, a co do zasady jest ona zwykle około 100 razy wyższa niż dla DNA genomowego (Davis et al., 2022). Średnia głębokość pokrycia sekwencjonowania może być zdefiniowana teoretycznie jako LN/G , gdzie L to długość odczytu, N to liczba odczytów, a G to długość genomu haploidalnego (Sims et al., 2014). W uproszczeniu można przyjąć, że daje nam to przybliżoną liczbę odczytów interesującej nas sekwencji, przy założeniu, że pokrycie (liczba razy, którą genom był zsekwencjonowany, podawana razem z procentową wartością wyrażającą, jak część całego genomu została zsekwencjonowana) było wysokie i badana sekwencja była wśród zsekwencjonowanych. Duże pokrycie i duża głębokość sekwencjonowania podnosi wiarygodność wyników i pozwala wykryć rzadkie warianty. Powyższe opisane zjawiska zachodziły w opisywanej sprawie, bliźnięta różniły się jedną mutacją w genie mitochondrialnym, wynikającą z heteroplazmii i występującą na poziomie 2,6% u jednego z pary bliźniąt (Yuan et al., 2020). Wiarygodność wyniku potwierdzono, stosując ukierunkowane sekwencjonowanie nowej generacji, czyli sekwencjonując region, w którym znajdowała się mutacja. Z sukcesem wykorzystano wyniki jako dowód w sądzie, jednak pozostaje wątpliwość, czy znalezienie jednej mutacji mitochondrialnej, w formie heteroplazmii na poziomie 2,6%, różniącej bliźnięta w parze jest raczej korzystnym zbiegiem okoliczności, czy też metodą pozwalającą rutynowo różnicować bliźnięta w parach. W literaturze opisano również różnicowanie, na podstawie wyników NGS genomu mitochondrialnego, w obrębie 6 par bliźniąt spośród 16, stwierdzono

jednak, że nie wszystkie wykryte różnice byłyby wiarygodnym dowodem w sądzie (Chen et al., 2020). Podobne zastrzeżenia sformułowano w innej pracy opisującej użycie sekwencjonowania genomów mitochondrialnych bliźniąt (Z. Wang et al., 2015). Autorzy obu powyższych prac (Chen et al., 2020; Z. Wang et al., 2015) wyrażają zbliżone opinie: różnicowanie bliźniąt jest możliwe na podstawie wyników NGS mitochondrialnego DNA, jednak część wykrytych różnic mogłaby stanowić niewystarczający dowód w sądzie. Obie grupy badawcze są zgodne, że badania powinny być prowadzone na identycznym materiale biologicznym od obu bliźniąt i wymagane byłyby dalsze prace, zanim NGS mitochondrialnego DNA będzie można rutynowo stosować w kryminalistyce (Chen et al., 2020; Z. Wang et al., 2015). Co do zasady, możliwe jest wykrywanie różnic również w DNA genomowym bliźniąt monozygotycznych z jednej pary (Jonsson et al., 2021). Średnia liczba mutacji powstałych w linii zarodkowej (które będą występowały w plemnikach i będą dziedziczone) wynosiła 5,2 na parę bliźniąt (Jonsson et al., 2021). Zbadano również mutacje somatyczne (badano krew i wymazy z jamy ustnej) u 381 par bliźniąt i 2 tripletów bliźniąt monozygotycznych; zidentyfikowano 39 par bliźniąt różniących się ponad 100 mutacjami i 38 par, w obrębie których nie wykryto żadnych różnic. Jednak gdy próg pokrycia podniesiono do z 38-krotnego do 100-krotnego, liczba par różniących się ponad 100 mutacjami spadła z 39 do 5. Z kolei pośród par, w obrębie których przy 38-krotnym pokryciu nie znaleziono żadnych różnic, to przy 100-krotnym pokryciu nie wykryto żadnych różnic w obrębie tylko 12 z tych 38 par (Jonsson et al., 2021). Zatem duży wpływ na oszacowanie liczby różnic mają parametry i użyte procedury NGS lub WGS. Ostatecznie oszacowano, że u 15% par bliźniąt można wykryć znaczącą liczbę mutacji charakterystycznych tylko dla jednego osobnika. Warto wspomnieć, że odsetek fałszywie pozytywnych różnic zależał od średniego pokrycia oraz metody weryfikacji i wahał się od 3% do 28%. Największą wiarygodność wyników w pracy Jonsson et al. (2021) uzyskano przy około 152-krotnym maksymalnym pokryciu, liczba fałszywie pozytywnych wyników różnicowania rosła przy niższym, 38-krotnym pokryciu. Powyższe wskazuje, że zastosowane podejście pozwala, co do zasady, udowodnić występowanie mutacji różniących bliźnięta w parze, jednak wymagałoby znaczących modyfikacji, by znaleźć zastosowanie w kryminalistyce. Znaczenie pokrycia w NGS obrazuje przypadek bliźniąt, które dopuściły się gwałtu, a ich odróżnienie było możliwe tylko na podstawie wyników sekwencjonowania DNA mitochondrialnego (Yuan et al., 2020), przy pokryciu 2000-krotnym, zaś niemożliwe przy 30-krotnym pokryciu w sekwencjonowaniu DNA genomowego.

W opracowaniu poświęconym możliwości zastosowania całogenomowego sekwencjonowania do analizy genomów bliźniąt monozygotycznych do celów kryminalistycznych (Rolf & Krawczak, 2021) zaprezentowano zestawienie przypadków użycia wyników WGS jako dowodu w sądzie. Powyższe zestawienie sugerowało, że sąd uznał dowód w 4 przypadkach na 6. Jeden z wyżej wspomnianych przypadków uznania dowodu był błędnie zaklasyfikowany jako dowód przyjęty przez sąd i dotyczył wspomnianej wcześniej sprawy braci McNair. W powyższej sprawie sąd uznał metodykę za prawidłową, lecz niespełniającą formalno-prawnych kryteriów pozwalających uznać dowód za wiarygodny (Rolf & Krawczak, 2021). W tym miejscu należy przypomnieć, że powodem nieuznania przez sąd wyników sekwencjonowania WGS wykonanego przez firmę Eurofins było to, że nigdy wcześniej nie wykorzystano kombinacji metod laboratoryjnych i statystycznych w dokładnie ten sam sposób, w dokładnie tym samym celu, czyli identyfikacji dawcy spermy, w obrębie pary braci bliźniaków monozygotycznych. Sąd podjął taką decyzję pomimo istnienia metod obliczenia ilorazu wiarygodności na podstawie wyników sekwencjonowania całogenomowego (Krawczak et al., 2018). Sąd nie kwestionował poprawności żadnego elementu procesu identyfikacji bliźniąt, przeprowadzonego z osobna. Ten przykład ilustruje, jak istotne jest stworzenie międzynarodowych standardów wykonywania i interpretacji wyników badań kryminalistycznych z użyciem technologii NGS i WGS, tak by były one akceptowane przez sądy jako wiarygodne dowody. W chwili pisania tego artykułu nie były dostępne rekomendacje uznanych międzynarodowych organizacji na temat WGS w kryminalistyce. W rekomendacjach ENFSI dotyczących baz danych (ENFSI, 2019) znajduje się następujące stwierdzenie: „Istotnym problemem dla zarządzających bazami danych DNA jest brak możliwości rozróżnienia dopasowania między bliźniętami jednojajowymi. Prowadzone są zarówno badania epigenetyczne, jak i sekwencjonowanie nowej generacji, ale ilości DNA, które są niezbędne do tych analiz, muszą zostać zmniejszone, aby umożliwić analizę śladów kryminalistycznych zawierających niewielkie ilości DNA.” (oryg. „A major issue for DNA database managers is that they cannot distinguish matches between monozygotic twins. Both epigenetic as well as next generation sequencing research is occurring, but the amounts of DNA which are necessary for these analyses must be reduced to enable analysis of forensic traces containing low amounts of DNA.”). Powyższe stwierdzenie ENFSI odnosi się do zastosowań wyników NGS i analiz epigenomu wyłącznie w kontekście zarządzania bazami danych profili DNA. Wnioski analiz epigenomu, opisane

w rekomendacji ENFSI, opierają się na literaturze sprzed ponad dekady (Li et al., 2011). Badania epigenomu oraz ich zastosowania w kryminalistyce są obecnie dużo bardziej zaawansowane, niż to opisano w literaturze (Li et al., 2011) cytowanej w dokumencie ENFSI (ENFSI, 2019).

Obszerny przegląd technologii kryminalistycznych wykorzystujących WGS i genomikę kryminalistyczną oraz związanych z nimi regulacji można znaleźć w dokumencie wydanym przez Komisję Europejską (Angers et al., 2021). Wspomniany Raport Techniczny Komisji Europejskiej (Angers et al., 2021) nie stanowi rekomendacji, jest to przegląd technologii i związanych z nimi zaleceń oraz regulacji prawnych.

Badania epigenomu bliźniąt

Jak wspomniano wcześniej, badania metylacji DNA są stosowane do oceny wieku zarówno chronologicznego, jak i biologicznego (Bell et al., 2019), cech fenotypowych, a nawet trybu życia (Ryan et al., 2020). Ze względu na większą zmienność wzorów i poziomów metylacji niż sekwencji DNA genomowego epigenom stał się interesującym obiektem badań w kontekście różnicowania bliźniąt w obrębie pary (Du et al., 2015, 2015; Li et al., 2013; Planterose Jiménez et al., 2021b; Vidaki et al., 2018; Zhang et al., 2015). Należy przyznać, że liczba różnic sekwencji DNA pomiędzy genomami bliźniąt jest niezwykle mała (Rolf & Krawczak, 2021), i z tego względu wielu autorów zwracało uwagę, iż badania epigenomu mogą pozwolić na uzyskanie większej siły różnicowania bliźniąt monozygotycznych w porównaniu do badań genomu (Du et al., 2015; Planterose Jiménez et al., 2021b; Vidaki et al., 2018; Zhang et al., 2015). Poszukiwano markerów epigenetycznych, które pozwalałyby na różnicowanie bliźniąt. Opisano identyfikację takich markerów i wykorzystanie ich do identyfikacji bliźniąt, z których panel PCR, wykorzystujący krzywe topnienia DNA do detekcji różnic pomiędzy bliźniętami (Marqueta-Gracia et al., 2018). Wyniki wspomnianej pracy zostały zakwestionowane i wykazano, że wnioski odnośnie do skuteczności różnicowania bliźniąt były nieuprawnione (Vidaki et al., 2018). Powyższy przykład podano, by zilustrować, jak ważna jest ostrożność w ocenie wiarygodności badań z zakresu różnicowania bliźniąt w dobie dynamicznego rozwoju tej dziedziny. Możliwość wynalezienia panelu markerów umożliwiającego różnicowanie bliźniąt została uznana za wymagającą wyjaśnienia (Vidaki et al., 2018). Warto przypomnieć, że w przypadku genomów bliźniąt monozygotycznych wykazano, że różniące je mutacje były unikatowe i zlokalizowane w różnych regionach genomu, u poszczególnych osób (Jonsson et al., 2021), zatem były specyficzne dla danego osobnika, a nie dla bliźniąt w ogóle. W odniesieniu do epigenomu sytuacja wydaje się przedstawiać podobnie, zgodnie z obecną wiedzą regiony genomu o dużym poziomie zmienności metylacji w populacji ludzkiej wykazują zmienność u bliźniąt monozygotycznych (Planterose Jiménez et al., 2021b). Nie są to zatem regiony genomu o dużej zmienności wzoru i poziomu metylacji charakterystyczne dla bliźniąt, tylko regiony genomu o dużej zmienności wzoru i poziomu metylacji w populacji ludzkiej w ogóle (Planterose Jiménez et al., 2021b). Za złoty standard badania statusu metylacji przyjmuje się całogenomowe sekwencjonowanie DNA po konwersji bisulfitowej (ang. *whole genome bisulfite sequencing*, WGBS) oraz mikromacierze metylacyjne firmy Illumina (Planterose Jiménez et al., 2021b). Podjęto próby zastosowania analizy epigenomu do różnicowania bliźniąt na podstawie śladu biologicznego z niedopałka (Vidaki et al., 2018). Użyto dwóch technologii, mianowicie mikromierzy Illumina 450K array oraz MethyLight quantitative PCR, jednak obie metody dawały rozbieżne wyniki w części badanych markerów, w materiale referencyjnym (Vidaki et al., 2018). Ponadto nie było możliwe zbadanie materiału ze śladu za pomocą mikromacierzy, ze względu na duże ilości DNA wymagane przez tę technologię.

Konkluzje autorów podsumowują ograniczenia użytych przez nich technologii oraz samych w sobie badań epigenomu w zastosowaniach kryminalistycznych (Vidaki et al., 2018). Obecnie nie wiadomo, jaka jest minimalna liczba cytozyn metylowanych różnicowo (markerów) niezbędna do uzyskania wiarygodnego różnicowania osób i jak ta liczba będzie się zmieniać w zależności od badanej tkanki (Vidaki et al., 2018). Technologia mikromierzy ze względu na wysokie wymagania odnośnie do ilości i jakości DNA nie nadaje się do analizy śladów, ponadto byłaby wymagana ocena składu komórkowego materiału biologicznego (oparta na wynikach analizy DNA) (Vidaki et al., 2018). Kolejnym problemem była kwestia normalizacji i analizy wyników uzyskanych na mikromacierzach Illumina 450K array w sposób pozwalający na wyeliminowanie artefaktów (Vidaki et al., 2018). Ostatnie z wymienionych zagadnień mogło być źródłem części problemów z analizą markerów epigenetycznych u bliźniąt.

Od lat z powodzeniem stosowano mikromacierze metylacyjne do oceny wieku ludzi, niemniej znane były ograniczenia tej technologii (Carmona et al., 2017; Logue et al., 2017; Maksimovic et al., 2015; Planterose Jiménez et al., 2021a; Price & Robinson, 2018). W ostatnim czasie okazało się, że sposób analizy wyników z mikromacierzy metylacyjnych powodował błędy w oszacowaniu poziomu metylacji – generował artefakty zaburzające przewidywanie wieku (Higgins-chen et al., 2022; Pang et al., 2022). Powyższe wnioski są spójne z obserwacjami

innych badaczy sugerujących, że metody ukierunkowanego sekwencjonowania mogą być bardziej adekwatne niż mikromacierze w różnicowaniu bliźniąt do celów kryminalistycznych, na podstawie wzorów metylacji DNA (Vidaki et al., 2018). Przewidywania wieku i cech fenotypowych prowadzono z powodzeniem z wykorzystaniem technologii ukierunkowanego sekwencjonowania nowej generacji (Freire-Aradas et al., 2020; Kukla-Bartoszek et al., 2019; Pośpiech et al., 2020; Spólnicka et al., 2018; Zbieć-Piekarska et al., 2015).

Niewątpliwie zmienność wzorów i poziomu metylacji ma większą potencjalną siłę dyskryminacji bliźniąt monozygotycznych niż zróżnicowanie genetyczne, ponieważ identyczne sekwencje DNA mogą się różnić poziomem i statusem metylacji cytozyn w porównywanych genomach. W ostatnim czasie znaleziono setki markerów różnicujących zarówno bliźnięta, jak i osoby niespokrewnione, które potencjalnie mogłyby w przyszłości służyć do celów kryminalistycznych (Planterose Jiménez et al., 2021b). Opracowano nową metodę wykrywania metylowanych cytozyn, opartą na enzymatycznej konwersji takich zasad. Metoda ta, określana jako TAPS (TET-assisted pyridine borane sequencing) (Liu et al., 2020; Siejka-Zielińska et al., 2021), wymaga mniejszej ilości DNA, co jest niezwykle ważne w zastosowaniach kryminalistycznych, i zapewne będzie w nich wykorzystana w przyszłości.

Podobnie jak w przypadku badań genomu, metody stosowane do badania zmienności epigenomu będą wymagały dostosowania do restrykcyjnych wymagań stawianych metodom kryminalistycznym. Należy przypuszczać, że w nieodległej przyszłości wejdą one do katalogu technik rutynowo stosowanych w kryminalistyce, będzie jednak to wymagało ich standaryzacji oraz stworzenia odpowiednich regulacji prawnych. W Polsce badania z zakresu kryminalistycznych zastosowań badania epigenomu są zaawansowane (Freire-Aradas et al., 2020; Kukla-Bartoszek et al., 2019; Pośpiech et al., 2020; Spólnicka et al., 2018; Zbieć-Piekarska et al., 2015). Obecnie w CLKP realizowany jest projekt EPIGENOM, nr DOB-BIO10/06/01/2019, w ramach którego prowadzone są między innymi badania z zakresu różnicowania bliźniąt monozygotycznych na podstawie zróżnicowania wzorów i poziomu metylacji genomowego DNA.

Bibliografia

1. Angers, A., Drabek, J., Fabbri, M., Petrillo, M., Querci, M., & European Commission. Joint Research Centre. (2021). *Whole genome sequencing and forensics genomics*. <https://doi.org/10.2760/864087>.
2. Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., Christensen, B. C., Gladyshev, V. N., Heijmans, B. T., Horvath, S., Ideker, T., Issa, J. P. J., Kelsey, K. T., Marioni, R. E., Reik, W., Relton, C. L., Schalkwyk, L. C., Teschendorff, A. E., Wagner, W., Zhang, K., Rakan, V. K. (2019). DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biology*, 20(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>.
3. Carmona, J. J., Accomando, W. P., Binder, A. M., Hutchinson, J. N., Pantano, L., Izzì, B., Just, A. C., Lin, X., Schwartz, J., Vokonas, P. S., Amr, S. S., Baccarelli, A. A., & Michels, K. B. (2017). Empirical comparison of reduced representation bisulfite sequencing and Infinium BeadChip reproducibility and coverage of DNA methylation in humans. *Npj Genomic Medicine*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0012-9>.
4. Cavalli, G., & Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571(7766), 489–499. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0>.
5. Chen, L., Wang, J., Tan, L., Lu, C., Fu, G., Fu, L., Zhang, X., Wang, Q., Ma, C., Cong, B., & Li, S. (2020). Highly accurate mtGenome haplotypes from long-read SMRT sequencing can distinguish between monozygotic twins. *Forensic Science International. Genetics*, 47(November 2019), 102306. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102306>.
6. Davis, R. L., Kumar, K. R., Puttick, C., Liang, C., Ahmad, K. E., Edema-Hildebrand, F., Park, J. S., Minoche, A. E., Gayevskiy, V., Mallawaarachchi, A. C., Christodoulou, J., Schofield, D., Dinger, M. E., Cowley, M. J., & Sue, C. M. (2022). Use of Whole-Genome Sequencing for Mitochondrial Disease Diagnosis. *Neurology*, 99(7), E730–E742. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000200745>.
7. Dor, Y., & Cedar, H. (2018). Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *The Lancet*, 392(10149), 777–786. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31268-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31268-6).
8. Du, Q., Zhu, G., Fu, G., Zhang, X., Fu, L., Li, S., & Cong, B. (2015). A Genome-Wide Scan of DNA Methylation Markers for Distinguishing Monozygotic Twins. *Twin Research and Human Genetics*, 18(6), 670–679. <https://doi.org/10.1017/thg.2015.73>.
9. ENFSI. (2019). *DNA Database Management. Review and Recommendations*. 1–85. https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/final_version_enfsi_2016_document_on_dna-database_management_0.pdf.

10. Fitzgerald, K. N., Hodges, R., Hanes, D., Stack, E., Cheishvili, D., Szyf, M., Henkel, J., Twedt, M. W., Giannopoulou, D., Herdell, J., Logan, S., & Bradley, R. (2021). Potential reversal of epigenetic age using a diet and lifestyle intervention: a pilot randomized clinical trial. *Aging, 13*(7), 9419–9432. <https://doi.org/10.18632/aging.202913>.
11. Freire-Aradas, A., Pośpiech, E., Aliferi, A., Girón-Santamaría, L., Mosquera-Miguel, A., Pisarek, A., Ambroa-Conde, A., Phillips, C., Casares de Cal, M. A., Gómez-Tato, A., Spólnicka, M., Woźniak, A., Álvarez-Dios, J., Ballard, D., Court, D. S., Branicki, W., Carracedo, Á., & Lareu, M. V. (2020). A Comparison of Forensic Age Prediction Models Using Data From Four DNA Methylation Technologies. *Frontiers in Genetics, 11*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00932>.
12. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>.
13. Hayatsu, H. (2008). Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis – A personal account. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences, 84*(8), 321–330. <https://doi.org/10.2183/pjab.84.321>.
14. Higgins-Chen, A. T., Thrush, K. L., Wang, Y., Minter, C. J., Kuo, P., Wang, M., Niimi, P., Sturm, G., Lin, J., Moore, A. Z., Bandinelli, S., Vinkers, C. H., Vermetten, E., & Rutten, B. P. F. (2022). A computational solution for bolstering reliability of epigenetic clocks: Implications for clinical trials and longitudinal tracking. *Nature Aging, 2*(7), 644–661. <https://doi.org/doi:10.1038/s43587-022-00248-2>.
15. Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science, 187*(4173), 226–232. <https://doi.org/10.1126/science.187.4173.226>.
16. Horsthemke, B. (2018). A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Nature Communications, 9*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05445-5>.
17. Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics, 19*(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>.
18. Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics, 13*(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>.
19. Jonsson, H., Magnusdottir, E., Eggertsson, H. P., Stefansson, O. A., Arnadottir, G. A., Eiriksson, O., Zink, F., Helgason, E. A., Jonsdottir, I., Gylfason, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Beyter, D., Steingrimsdottir, T., Norddahl, G. L., Magnusson, O. T., Masson, G., Halldorsson, B. V., Thorsteinsdottir, U., Helgason, A., Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., & Stefansson, K. (2021). Differences between germline genomes of monozygotic twins. *Nature Genetics, 53*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00755-1>.
20. Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., & Cedar, H. (2016). DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Research, 76*(12), 3446–3450. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3278>.
21. Krawczak, M., Budowle, B., Weber-Lehmann, J., & Rolf, B. (2018). Distinguishing genetically between the germ lines of male monozygotic twins. *PLoS Genetics, 14*(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007756>.
22. Kukla-Bartoszek, M., Pośpiech, E., Woźniak, A., Boroń, M., Karłowska-Pik, J., Teisseyre, P., Zubańska, M., Bronikowska, A., Grzybowski, T., Płoski, R., Spólnicka, M., & Branicki, W. (2019). DNA-based predictive models for the presence of freckles. *Forensic Science International: Genetics, 42*, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.07.012>.
23. Li, C., Zhang, S., Que, T., Li, L., & Zhao, S. (2011). Identical but not the same: The value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 3*(1), 337–338. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.09.031>.
24. Li, C., Zhao, S., Zhang, N., Zhang, S., & Hou, Y. (2013). Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins' blood samples. *Molecular Biology Reports, 40*(9), 5275–5280. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2627-y>.
25. Lister, R., & Ecker, J. R. (2009). Finding the fifth base: Genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Research, 19*(6), 959–966. <https://doi.org/10.1101/gr.083451.108>.
26. Liu, Y., Cheng, J., Siejka-Zielińska, P., Weldon, C., Roberts, H., Lopopolo, M., Magri, A., D'Arienzo, V., Harris, J. M., McKeating, J. A., & Song, C. X. (2020). Accurate targeted long-read DNA methylation and hydroxymethylation sequencing with TAPS. *Genome Biology, 21*(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-01969-6>.

27. Logue, M. W., Smith, A. K., Wolf, E. J., Maniates, H., Stone, A., Schichman, S. A., McGlinchey, R. E., Milberg, W., & Miller, M. W. (2017). The correlation of methylation levels measured using Illumina 450K and EPIC BeadChips in blood samples. *Epigenomics*, *9*(11), 1363–1371. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0078>.
28. Maksimovic, J., Gagnon-Bartsch, J. A., Speed, T. P., & Oshlack, A. (2015). Removing unwanted variation in a differential methylation analysis of Illumina Human Methylation 450 array data. *Nucleic Acids Research*, *43*(16). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv526>.
29. Marqueta-Gracia, J. J., Álvarez-Álvarez, M., Baeta, M., Palencia-Madrid, L., Prieto-Fernández, E., Ordoñana, J. R., & de Pancorbo, M. M. (2018). Differentially methylated CpG regions analyzed by PCR-high resolution melting for monozygotic twin pair discrimination. *Forensic Science International: Genetics*, *37*, e1–e5. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.013>.
30. Pang, A. P. S., Higgins-Chen, A. T., Comite, F., Raica, I., Arboleda, C., Went, H., Mendez, T., Schotsaert, M., Dwarka, V., Smith, R., Levine, M. E., Ndhlovu, L. C., & Corley, M. J. (2022). Longitudinal Study of DNA Methylation and Epigenetic Clocks Prior to and Following Test-Confirmed COVID-19 and mRNA Vaccination. *Frontiers in Genetics*, *13*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.819749>.
31. Planterose Jiménez, B., Kayser, M., & Vidaki, A. (2021a). Revisiting genetic artifacts on DNA methylation microarrays exposes novel biological implications. *Genome Biology*, *22*(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02484-y>.
32. Planterose Jiménez, B., Liu, F., Caliebe, A., Montiel González, D., Bell, J. T., Kayser, M., & Vidaki, A. (2021b). Equivalent DNA methylation variation between monozygotic co-twins and unrelated individuals reveals universal epigenetic inter-individual dissimilarity. *Genome Biology*, *22*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02223-9>.
33. Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., Karłowska-Pik, J., Zieliński, P., Woźniak, A., Boroń, M., Dąbrowski, M., Zubańska, M., Jarosz, A., Grzybowski, T., Płoski, R., Spólnicka, M., & Branicki, W. (2020). Exploring the possibility of predicting human head hair greying from DNA using whole-exome and targeted NGS data. *BMC Genomics*, *21*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06926-y>.
34. Price, E. M., & Robinson, W. P. (2018). Adjusting for batch effects in DNA methylation microarray data, a lesson learned. *Frontiers in Genetics*, *9*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00083>.
35. Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, *14*(1), 9–25. <https://doi.org/10.1159/000130315>.
36. Rolf, B., & Krawczak, M. (2021). The germlines of male monozygotic (MZ) twins: Very similar, but not identical. *Forensic Science International: Genetics*, *50*, 102408. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102408>.
37. Ryan, J., Wrigglesworth, J., Loong, J., Fransquet, P. D., & Woods, R. L. (2020). A systematic review and meta-analysis of environmental, lifestyle, and health factors associated with DNA methylation age. *Journals of Gerontology: Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *75*(3), 481–494. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz099>.
38. Seethy, A., Pethusamy, K., Chattopadhyay, I., Sah, R., Chopra, A., Dhar, R., & Karmakar, S. (2021). TETology: Epigenetic Mastermind in Action. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(6), 1701–1726. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03537-5>.
39. Siejka-Zielińska, P., Cheng, J., Jackson, F., Liu, Y., Soonawalla, Z., Reddy, S., Silva, M., Puta, L., McCain, M. V., Culver, E. L., Bekkali, N., Schuster-Böckler, B., Palamara, P. F., Mann, D., Reeves, H., Barnes, E., Sivakumar, S., & Song, C. X. (2021). Cell-free DNA TAPS provides multimodal information for early cancer detection. *Science Advances*, *7*(36). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh0534>.
40. Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, *15*(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>.
41. Spólnicka, M., Pośpiech, E., Adamczyk, J. G., Freire-Aradas, A., Peplowska, B., Zbieć-Piekarska, R., Makowska, Z., Pieta, A., Lareu, M. V., Phillips, C., Płoski, R., Zekanowski, C., & Branicki, W. (2018). Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers. *Aging*, *10*(2), 241–252. <https://doi.org/10.18632/aging.101385>.
42. Szurek R. (2022). Gorlice. Winny śmierci Angeliki. Karol F., jeden z bliźniaków, usłyszał wyrok sześciu lat więzienia. *Gorlice Nasze Miasto*, 4 maja. <https://gorlice.naszemiasto.pl/gorlice-winy-smierci-angeliki-karol-f-jeden-z-blizniakow/ar/c16-8802241>.

43. Turrina, S., Bortoletto, E., Giannini, G., & De Leo, D. (2021). Monozygotic twins: Identical or distinguishable for science and law? *Medicine, Science and the Law*, 61(1_suppl), 62–66. <https://doi.org/10.1177/0025802420922335>.
44. Tvedebrink, T., & Morling, N. (2015). Identical twins in forensic genetics – Epidemiology and risk based estimation of weight of evidence. *Science and Justice*, 55(6), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2015.07.001>.
45. Van Dongen, J., Slagboom, P. E., Draisma, H. H. M., Martin, N. G., & Boomsma, D. I. (2012). The continuing value of twin studies in the omics era. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 640–653. <https://doi.org/10.1038/nrg3243>.
46. Vidaki, A., Díez López, C., Carnero-Montoro, E., Ralf, A., Ward, K., Spector, T., Bell, J. T., & Kayser, M. (2017). Epigenetic discrimination of identical twins from blood under the forensic scenario. *Forensic Science International: Genetics*, 31, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.014>.
47. Vidaki, A., Kalamara, V., Carnero-Montoro, E., Spector, T. D., Bell, J. T., & Kayser, M. (2018). Investigating the epigenetic discrimination of identical twins using buccal swabs, saliva, and cigarette butts in the forensic setting. *Genes*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/genes9050252>.
48. Vidaki, A., Kayser, M., & Nothnagel, M. (2019). Unsupported claim of significant discrimination between monozygotic twins from multiple pairs based on three age-related DNA methylation markers. *Forensic Science International: Genetics*, 39, e1–e2. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.01.003>.
49. Wang, L. F., Yang, Y., Zhang, X. N., Quan, X. L., & Wu, Y. M. (2015). Tri-allelic pattern of short tandem repeats identifies the murderer among identical twins and suggests an embryonic mutational origin. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.01.010>.
50. Wang, Z., Zhu, R., Zhang, S., Bian, Y., Lu, D., & Li, C. (2015). Differentiating between monozygotic twins through next-generation mitochondrial genome sequencing. *Analytical Biochemistry*, 490, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.08.024>.
51. Weber-Lehmann, J., Schilling, E., Gradl, G., Richter, D. C., Wiehler, J., & Rolf, B. (2014). Finding the needle in the haystack: Differentiating „identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 9(1), 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.015>.
52. Yuan, L., Chen, X., Liu, Z., Liu, Q., Song, A., Bao, G., Wei, G., Zhang, S., Lu, J., & Wu, Y. (2020). Identification of the perpetrator among identical twins using next-generation sequencing technology: A case report. *Forensic Science International: Genetics*, 44, 102167. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102167>.
53. Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Z., Pałeczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., & Branicki, W. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>.
54. Zhang, N., Zhao, S., Zhang, S. H., Chen, J., Lu, D., Shen, M., & Li, C. (2015). Intra-monozygotic twin pair discordance and longitudinal variation of whole-genome scale DNA methylation in adults. *PLoS ONE*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135022>.