

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 genomie 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., Izzi, 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>.

Identification of monozygotic twins in the era of next-generation sequencing

Aleksander Masny, Ph.D.¹

ORCID 0000-0002-6230-120X

Bożena Wysocka², Second Lieutenant

ORCID0009-0009-7297-1336

¹ Previously: Central Forensic Laboratory of the Police, currently: National Institute of Public Health, National Institute of Hygiene

² Central Forensic Laboratory of the Police, bozena.wysocka@policja.gov.pl

Abstract

Monozygotic twins pose a challenge to forensic science due to the lack of standardized tools to differentiate them within a pair, and thus making it difficult or impossible for a court to determine which of the twins is the perpetrator of the crime. The advent of next-generation sequencing technologies, whole-genome sequencing, and analyses of the human epigenome, has opened the way to the identification of monozygotic twins for forensic purposes. The percentage of monozygotic twins that can be differentiated and the level of reliability of results remain an issue open for investigation. Identification of monozygotic twins through whole-genome sequencing raises doubts in the courts. New technologies raised a number of questions regarding the parameters: the power of differentiation, the level of reliability of the result, validation method and legal issues. New twin identification technologies require adapting to the requirements for forensic methods: verification, validation and standardization, as well as a uniform approach to the interpretation of results, so that they can be widely used in forensics and recognized by courts as reliable evidence.

Key words: monozygotic twins, next-generation sequencin, epigenome analysis, genetic identification of twins

Introduction

The studies conducted at the beginning of the 21st century found that monozygotic twins do not necessarily have identical genomes and may have mutations in their DNA that occurred after the division of the zygote and/or the formation of two independent embryos (Van Dongen et al., 2012). At that time, the extent of genome diversity within pairs of monozygotic twins remained poorly researched, but it was expected that the development of whole genome sequencing (WGS) technology should bring a better understanding of the differences between twins, especially in the context of their susceptibility to diseases, both infectious and non-infectious (Van Dongen et al., 2012). These assumptions were recently confirmed. Whole-genome sequencing was used to detect mutations that occurred at the zygote stage in monozygotic twins (Jonsson et al., 2021). However, genetic variation is not the only source of information about differences in human genomes. Almost 50 years ago, it was postulated that gene expression and the resultant phenotype could be regulated by epigenetic mechanisms (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975). In the second decade of the 21st century, significant knowledge about methylation of the human genome was collected, which confirmed the assumptions regarding the influence of cytosine methylation in DNA (also referred to as genetic or genomic imprinting) on gene expression and cell differentiation. It has been

recognized that epigenetic imprinting is transmitted to offspring (Jones, 2012), but there are also doubts about the extent of this phenomenon in humans compared to other vertebrates (Horsthemke, 2018). Advanced studies of the location of methylated cytosines, defined as the fifth base (Lister & Ecker, 2009), conducted due to their impact on gene functioning and the heredity of imprinting, became possible thanks to the invention of DNA bisulfite conversion technology (Frommer et al., 1992) and the development of next-generation sequencing (NGS) (Lister & Ecker, 2009). Bisulfite conversion allows for the conversion of all unmethylated cytosines to uracil (Hayatsu, 2008). This allows to determine which cytosines were methylated in unmodified DNA, because only these cytosines will not be converted to uracil. Next-generation sequencing methods enable not only the analysis of entire genomes or a large representation of their fragments, but also the detection of cytosine methylation in DNA subjected to an appropriate procedure, e.g. bisulfite conversion. The examination of the methylation status of cytosines in the genome allowed for the differentiation of identical DNA sequences based on this status and even for the assessment of the level of methylation. A new level of DNA differentiation was achieved, apart from the DNA sequence (Lister & Ecker, 2009). The DNA methylation status undergoes dynamic changes at the stage of foetal development and cell differentiation. Changes in the pattern and level of cytosine methylation in the genome occur continuously throughout life (Dor & Cedar, 2018). The process of cytosine demethylation is also intensively studied and its mechanisms are well described (Seethy et al., 2021). Because methylation affects gene expression, it also affects phenotype (Kukla-Bartoszek et al., 2019). The level of DNA methylation changes with age (Horvath & Raj, 2018; Ryan et al., 2020), depends on nutrition (Cavalli & Heard, 2019) and the history of infectious diseases (Fitzgerald et al., 2021). In cancer diseases, methylation levels and patterns are perturbed throughout the genome (Klutstein et al., 2016). Epigenome research has also become an area of interest in forensic science, as both patterns and levels of methylation can be used to determine phenotypic features and age (Kukla-Bartoszek et al., 2019; Pośpiech et al., 2020; Spólnicka et al., 2018; Zbieć-Piekarska et al., 2015). People with identical sequences of DNA regions may differ in the pattern of cytosine. The aim of this study is to present the current state of knowledge and prospects for the use of next-generation sequencing (NGS) technology in the study of genomes and epigenomes in monozygotic twins for forensic purposes.

Twin genome testing

Identification of monozygotic twins for investigative and trial purposes is a problem for prosecuting authorities and the system of justice. Determining paternity is also difficult in the case of monozygotic twins. All over the world, cases are reported in which it is impossible to determine which of a pair of twins committed a given act, left biological traces or was the father. Short tandem repeats (STR) analysis, which is the gold standard for identifying individuals, is typically ineffective in monozygotic twins (Turrina et al., 2021; Vidaki et al., 2017). There was a case in which one of a pair of twins had a mutation (insertion) in the STR regions that allowed it to be distinguished from the other twin in the pair (L. F. Wang et al., 2015). However, such an event is very unlikely and therefore extremely rare. The extremely low, often impossible, probability of distinguishing twins using STR profile tests (Z. Wang et al., 2015), in the absence of other evidence (Tvedebrink & Morling, 2015), frequently resulted in their long-term impunity, including cases of theft and rape (Turrina et al., 2021). There are cases of monozygotic twins in which neither of the pair admitted to the crime, and the examination of STR profiles did not allow to identify the perpetrator. In such cases, courts will usually decide on the basis of other evidence, if it is available. These may be the results of analyses of fibres from clothing, as in the case of a pair of Polish twins refusing to cooperate in identifying the perpetrator of an accident (Szurek, 2022), or witness testimony, as in the case of establishing paternity or finding a rapist (Turrina et al., 2021). Often, due to the principle of the presumption of innocence and the court's inability to identify the perpetrator based on genetic STR profiles and the lack of evidence other than genetic tests, the perpetrator may remain unpunished for years, as in the case of a robbery and rape committed in Boston in 2004 (Turrina et al. al., 2021). There is another problem - because of the increasing number of artificial insemination procedures, the number of twin pregnancies is growing, which results in more STR profiles in DNA databases that are not unique to one person (Tvedebrink & Morling, 2015). The problem is particularly important in the case of adopted people who are not aware of the existence of twin siblings (Tvedebrink & Morling, 2015). Therefore, it is possible for identical STR profiles from different twins from the same pair to appear in databases (Tvedebrink & Morling, 2015).

Are next-generation sequencing technologies effective at differentiating between twins? Are they suitable for forensic applications? Can NGS results be used as evidence in the court? A review of the literature shows no clear answer to any of these questions. Therefore, it is worth returning to the case of the robbery and rape in Boston

committed by one of the McNair monozygotic twins. The examination of STR profiles did not allow to distinguish the brothers, and in 2004 this basically exhausted the possibilities of identification based on genetic tests. With the development of NGS technology, new possibilities emerged. Eurofins demonstrated differences in the genomes of the McNair twins, allowing to determine the culprit. Differences were found using ultra-deep next generation sequencing, the usefulness of which in differentiating monozygotic twins or determining the paternity of one of a pair of twins has been proven (Weber-Lehmann et al., 2014). However, the court did not accept the Eurofins results as reliable evidence (Turrina et al., 2021), although it stated the following: “testing and analysis were based on generally accepted, scientific and statistical principles”. This also shows that until there is a consensus on how to validate and interpret NGS results, they may raise doubts in the courts. It is worth mentioning that in the McNair case the cost of NGS was over \$100,000.

Interestingly, evidence from analyses of STR profiles, which are highly unlikely to differentiate between monozygotic twins, is very likely to be accepted by the court, while in numerous cases evidence from NGS tests allowing for the differentiation of monozygotic twins has not been recognized as reliable by the court (Rolf & Krawczak, 2021). In the case of the McNair brothers, the conviction was based on the testimony of a witness and occurred 14 years after the crime, despite the presentation of NGS results distinguishing the twins. In a paternity case in Brazil, the results of STR profile confirmed that two twin brothers had identical STR profiles and the test did not exclude the paternity of either of them. After assessing all the material, including the mother's testimony, the court ordered both brothers to pay alimony (Turrina et al., 2021). In a paternity case in Italy, the court found that the STR profile indicating the paternity of one of the twins is not evidence confirming that the tested twin is the father (Turrina et al., 2021). In both cases, in which the results of STR profile tests were presented to the court, they were accepted as reliable, but they neither excluded nor confirmed the paternity of one of the pair of twins, and the court made their decisions based on other evidence and premises. Below, we outline the ways in which courts have addressed evidence based on NGS results. In a rape case (Yuan et al., 2020) in which, similarly to the case of the McNair brothers, one of the pair of twins was the perpetrator (later shown to be the perpetrator of four rapes), and pleaded guilty, his brother had to be excluded as the perpetrator. Whole-genome sequencing was used, however, only the results of mitochondrial genome sequencing were considered sufficient for effective differentiation and further analyses of genomic DNA were omitted. The sequencing depth for the mitochondrial genome was 2000, and, as a rule, it is usually about 100 times higher than for genomic DNA (Davis et al., 2022). The average depth of sequencing coverage can be theoretically defined as LN/G , where L is the read length, N is the number of reads, and G is the length of the haploid genome (Sims et al., 2014). In simple terms, this gives an approximate number of reads of the sequence of interest, assuming that the coverage (the number of times the genome was sequenced, together with percentage expressing what part of the genome was sequenced) was high and the examined sequence was among those sequenced. High coverage and high sequencing depth increase the reliability of results and allow the detection of rare variants. These phenomena occurred in this case; the twins differed in one mutation in the mitochondrial genome, resulting from heteroplasmy, occurring at a level of 2.6% in one of the pair of twins (Yuan et al., 2020). The reliability of the result was confirmed using targeted next-generation sequencing, i.e. sequencing the region where the mutation was located. The results were successfully used as evidence in court, but it remains questionable whether finding one mitochondrial mutation, in the form of heteroplasmy at the level of 2.6%, distinguishing twins in a pair, is a rather favourable coincidence, or a method that allows for routine differentiation. The literature also described differentiation based on NGS results of the mitochondrial genome within 6 out of 16 pairs of twins, but not all detected differences would be reliable evidence in court (Chen et al., 2020). Similar reservations were formulated in another paper describing the use of sequencing the mitochondrial genomes in twins (Z. Wang et al., 2015). The authors of both studies (Chen et al., 2020; Z. Wang et al., 2015) express similar opinions: differentiating twins is possible based on NGS results of mitochondrial DNA, but some of the differences could be insufficient evidence in court. Both research groups agree that studies should be conducted on identical biological material taken from both twins and further works would be required before NGS of mitochondrial DNA can be routinely used in forensics (Chen et al., 2020; Z. Wang et al., 2015). In principle, it is possible to detect differences also in the genomic DNA of monozygotic twins from one pair (Jonsson et al., 2021). The average number of germline mutations (present in sperm and inherited) was 5.2 per pair of twins (Jonsson et al., 2021). Somatic mutations were also tested (blood and oral swabs) in 381 pairs of twins and in 2 monozygotic twin triplets. There were 39 pairs of twins differing in more than 100 mutations, and 38 pairs in which no differences were detected. However, when the coverage threshold was increased from 38-fold to 100-fold, the number of pairs differing by more than 100 mutations dropped from 39 to 5.

In turn, among the pairs with no differences at 38-fold coverage, at 100-fold coverage no differences were detected only within 12 of 38 pairs (Jonsson et al., 2021). Therefore, the parameters and procedures used in NGS and WGS have a large impact on the estimation of the number of differences. Ultimately, it was found that a significant number of mutations specific for only one individual could be detected in 15% of twin pairs. The percentage of false positive differences depended on average coverage and verification method and ranged from 3% to 28%. The greatest reliability of results in the study conducted by Jonsson et al. (2021) was obtained at approximately 152x maximum coverage. The number of false positive differentiation results increased at lower – 38x coverage. This shows that this approach allows to indicate mutations that distinguish twins in a pair, but it would require significant modifications to be used in forensics. The importance of coverage in NGS is illustrated by the case of twins who had committed rape. Distinguishing them was only possible based on mitochondrial DNA sequencing (Yuan et al., 2020) at 2000-fold coverage, and impossible at 30-fold coverage using genomic DNA sequencing.

The research into the use of whole-genome sequencing to analyse the genomes of monozygotic twins for forensic purposes (Rolf & Krawczak, 2021) presented a list of WGS results applied as evidence in court. The summary reveals that the court accepted evidence in 4 out of 6 cases. One of these cases was incorrectly classified as evidence and accepted by the court. It concerned the previously mentioned case of the McNair brothers. In this case, the court found the methodology correct, but not meeting the formal and legal criteria allowing the evidence to be considered reliable (Rolf & Krawczak, 2021). It should be recalled that the reason the court did not recognize the results of Eurofins' WGS sequencing was that a combination of laboratory and statistical methods had never before been used in exactly the same way, for exactly the same purpose, i.e. the identification of a sperm donor within a pair of monozygotic twin brothers. The court made such a decision despite the existence of methods for calculating the likelihood ratio based on whole-genome sequencing (Krawczak et al., 2018). The court did not question the correctness of any element of the twin identification process, which was conducted separately. This example illustrates how important it is to create international standards for performing and interpreting the results of forensic examinations based on NGS and WGS technologies, so that they are accepted by courts as reliable evidence. At the time of writing this paper, no recommendations from recognized international organizations on WGS in forensics were available. The ENFSI database recommendations include the following statement: "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" (ENFSI, 2019). The above ENFSI statement applies to the use of NGS and epigenome analyses only in the context of managing DNA profile databases. The conclusions of the epigenome analyses described in the ENFSI recommendation are based on literature from over a decade ago (Li et al., 2011). Epigenome research and its applications in forensics are currently much more advanced than described in the literature (Li et al., 2011) cited in the ENFSI document.

A comprehensive overview of forensic technologies based on WGS, forensic genomics and related regulations can be found in a document issued by the European Commission. The Technical Report of the European Commission (Angers et al., 2021) is not a recommendation, but just a review of technologies, related recommendations and legal regulations.

Epigenome studies in twins

As mentioned earlier, DNA methylation tests are used to assess chronological and biological age (Bell et al., 2019), phenotypic traits, and even lifestyle (Ryan et al., 2020). Due to greater variability in methylation patterns and levels than in genomic DNA sequences, the epigenome has become an interesting object of research in the context of twin differentiation (Du et al., 2015; Li et al., 2013; Planterose Jiménez et al., 2021b; Vidaki et al., 2018; Zhang et al., 2015). The number of DNA sequence differences between the twins' genomes is extremely small (Rolf & Krawczak, 2021), and therefore many authors have pointed out that epigenome examinations may allow for greater power to differentiate monozygotic twins compared to genome tests (Du et al., 2015; Planterose Jiménez et al., 2021b; Vidaki et al., 2018; Zhang et al., 2015). Researchers were searching for epigenetic markers to differentiate twins. The identification of such markers and their use to identify twins has been described, including a PCR panel using DNA melting curves to detect differences between twins (Marqueta-Gracia et al., 2018). The results of the study were questioned and the conclusions regarding the effectiveness of twin differentiation were invalid (Vidaki et al., 2018). This example is given to illustrate how important it is to be careful in assessing the reliability of twin differentiation tests in the era of dynamic development of this field. The possibility of developing a panel of markers

to differentiate twins needs clarification (Vidaki et al., 2018). In genomes of monozygotic twins, the mutations that differentiated them were unique and located in different regions of the genome (Jonsson et al., 2021), therefore they were specific to a given individual, and not to twins in general. Similarly, with regard to the epigenome, regions of the genome with high levels of methylation variability in the human population show variability in monozygotic twins (Planterose Jiménez et al., 2021b). Therefore, these are not regions of the genome with high variability in the pattern and level of methylation typical of twins, but regions of the genome with high variability in the pattern and level of methylation in the human population in general (Planterose Jiménez et al., 2021b). The gold standards for testing methylation status are whole genome bisulfite sequencing (WGBS) and methylation microarrays from Illumina (Planterose Jiménez et al., 2021b). Attempts have been made to use epigenome analysis to differentiate twins based on the biological trace from a cigarette butt (Vidaki et al., 2018). Two technologies were applied, Illumina 450K microarrays and MethyLight quantitative PCR, but both methods gave divergent results for some of the markers in the reference material (Vidaki et al., 2018). Furthermore, it was not possible to examine the trace material using microarrays due to the large amounts of DNA required by this technology.

In conclusion, Vidaki et al. indicate the limitations of the technologies and epigenome research itself in forensic applications (2018). It is unknown what is the minimum number of differentially methylated cytosines (markers) necessary to achieve reliable differentiation between individuals and how this number may vary depending on the tissue (Vidaki et al., 2018). Due to the high requirements for the quantity and quality of DNA, microarray technology is not suitable for trace analysis. In addition, the assessment of the cellular composition of biological material (based on the results of DNA analysis) would be required (Vidaki et al., 2018). Another problem was the normalization and analysis of the results obtained using Illumina 450K microarrays in a way that would eliminate artefacts (Vidaki et al., 2018). The last issue could be the source of some problems with the analysis of epigenetic markers in twins.

Methylation microarrays have been successfully used to assess human age for years, but there were limitations of this technology (Carmona et al., 2017; Logue et al., 2017; Maksimovic et al., 2015; Planterose Jiménez et al., 2021a; Price & Robinson, 2018). Recently, it turned out that the method of analysing the results from methylation microarrays caused errors in estimating the methylation level – it generated artefacts that distorted age prediction (Higgins-chen et al., 2022; Pang et al., 2022). These conclusions are consistent with the findings suggesting that targeted sequencing methods may be more adequate than microarrays in differentiating twins for forensic purposes based on DNA methylation patterns (Vidaki et al., 2018). Prediction of age and phenotypic traits has been successfully performed using next-generation targeted sequencing technology (Freire-Aradas et al., 2020; Kukla-Bartoszek et al., 2019; Pośpiech et al., 2020; Spólnicka et al., 2018; Zbieć-Piekarska et al., 2015).

Undoubtedly, variability in methylation patterns and levels has greater potential to discriminate between monozygotic twins than genetic diversity, because identical DNA sequences may differ in the level and status of cytosine methylation. Recently, hundreds of markers have been found to differentiate twins and unrelated individuals, which could potentially be used for forensic purposes in the future (Planterose Jiménez et al., 2021b). A new method for detecting methylated cytosines has been developed based on the enzymatic conversion of these bases. TAPS (TET-assisted pyridine borane sequencing) (Liu et al., 2020; Siejka-Zielińska et al., 2021) requires a smaller amount of DNA, which is extremely important in forensic applications, and will probably be used for these purposes in the future.

As in the case of genome research, the methods used to study epigenome variability will need to be adapted to the stringent requirements for forensic methods. It is expected that in the near future they will be included in the catalogue of techniques routinely used in forensics, but this will require their standardization and the appropriate legal regulations. In Poland, research into the forensic applications of epigenome testing is advanced (Freire-Aradas et al., 2020; Kukla-Bartoszek et al., 2019; Pośpiech et al., 2020; Spólnicka et al., 2018; Zbieć-Piekarska et al., 2015). Currently, the Central Forensic Laboratory of the Police is implementing the EPIGENOM project, number DOB-BIO10/06/01/2019, which also focuses on the differentiation of monozygotic twins based on the differences in patterns and levels of genomic DNA methylation.

References

1. Angers, A., Drabek, J., Fabbri, M., Petrillo, M., Querci, M., & European Commission. Joint Research Centre. (2021). *Wholegenomesequencingandforensicsgenomics*. <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., Rakyan, 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., Izzi, 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 genome 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.0000000000200745>.
 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 germlines 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., Iltott, 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. WinnyśmierciAngeliki. Karol F., jeden z bliźniaków, usłyszałwyroksześciulatwięzienia. *GorliceNaszeMiasto*, 4maja. <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 twin 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>.