



Università Politecnica delle Marche
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Anno Accademico
2019/2020

Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

Sessione
Luglio 2020

Presentazione di una nuova tipologia di marcatori genetici per l'identificazione di tessuti forensi: la variazione del numero di copie (CNV) permette di identificare l'origine di sangue e sperma

Introducing novel type of human DNA markers for forensic tissue identification: DNA copy number variation (CNV) allows the detection of blood and semen

Relazione Finale di
Francesca Polonara

Docente referente
Chiar.mo Prof. Marco Barucca

Sommario:

Il lavoro si focalizza sulla ricerca di una nuova tipologia di marcatori genetici per l'identificazione di tracce biologiche rinvenute nelle scene del crimine, in particolare tracce tissutali di sangue e sperma.

Questo studio pone le basi per lo sviluppo di una metodologia semplice, sensibile ed affidabile, che non necessita di un trattamento preventivo del DNA e abbatte quindi le difficoltà tecniche che si possono riscontrare nelle metodiche classiche.

L'utilizzo delle variazioni del numero di copie (CNV) come marker permette l'identificazione di tessuti forensi tramite metodi di analisi ben conosciuti e precisi come la PCR quantitativa in tempo reale (qPCR); tecnica che consente di ottenere risultati positivi per piccole quantità di DNA e comporta anche una buona gestione del DNA degradato.

Questo fornisce ottimi prerequisiti per l'applicazione della metodologia in campo forense; soprattutto in casi remoti in cui sono disponibili limitate quantità di DNA, di scarsa qualità e non sono presenti tracce di RNA.

Variazione del Numero di Copie (CNV)

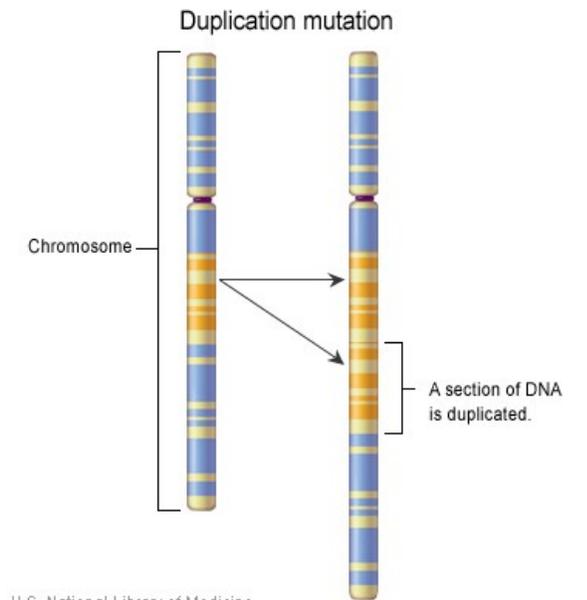
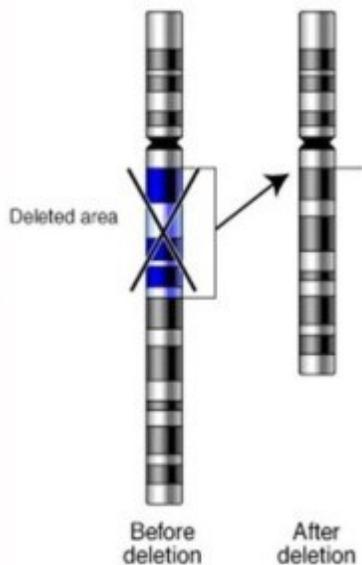
Di che cosa si tratta?

E' un fenomeno genetico che comporta un cambiamento delle ripetizioni delle copie di un frammento di DNA rispetto ad una sequenza di riferimento

Anomalie strutturali

- DELEZIONI → un tratto di cromosoma risulta mancante a seguito di un evento di frammentazione
- DUPLICAZIONI → un tratto di cromosoma risulta raddoppiato

Ogni individuo presenta un modello unico di guadagni e perdite di sezioni complete di DNA



U.S. National Library of Medicine

Le variazioni del numero di copie (CNV) possono trovare applicazione in ambito forense per l'identificazione di tracce di sangue e sperma rinvenute nelle scene del crimine.



<https://www.onb.it/2019/09/13/corso-fad-dal-titolo-introduzione-alla-genetica-forense/>

Metodiche classiche: test chimici, enzimatici e immunologici.



Inclini a risultati falso positivi o falso negativi.

Metodi molecolari basati su marker di RNA messaggero (mRNA) e micro RNA (miRNA) → difficoltà nel legare le tracce di DNA donatore con le tracce di tessuto identificate tramite l'analisi del RNA.

Utilizzo di marcatori genetici della metilazione del DNA → problematiche da un punto di vista tecnico; il sequenziamento bisolfito ha efficacia ridotta con ridotte quantità di DNA acquisito e comporta anche *degradazione* del DNA.

Sviluppo di un nuovo approccio nell'analisi dei tessuti forensi

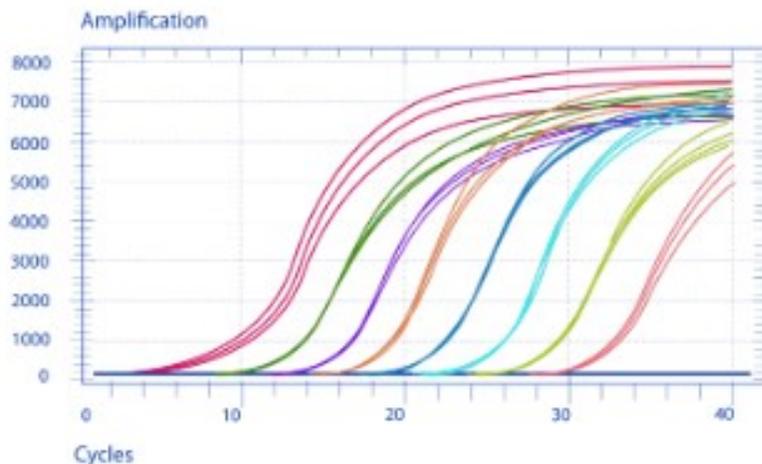
Innovazioni a livello Tecnico:

Dopo l'estrazione del DNA è stata utilizzata un'analisi **PCR quantitativa in tempo reale (qPCR)** per identificare le variazioni del numero di copie (CNV).

Successivamente i risultati dell'analisi qPCR sono stati normalizzati secondo il segnale di amplificazione del **gene albumina** a singola copia, utilizzato come gene di riferimento.

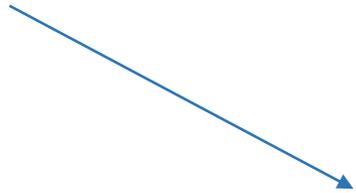
Campioni analizzati

- Sangue periferico
- Sangue mestruale
- Sperma

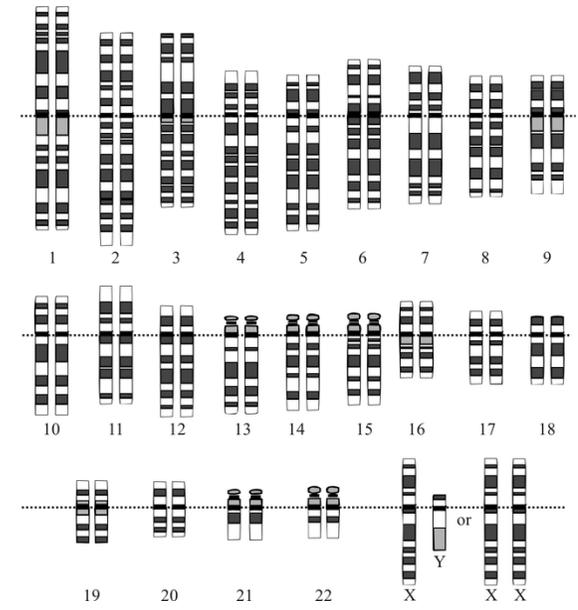


Risultati delle Analisi

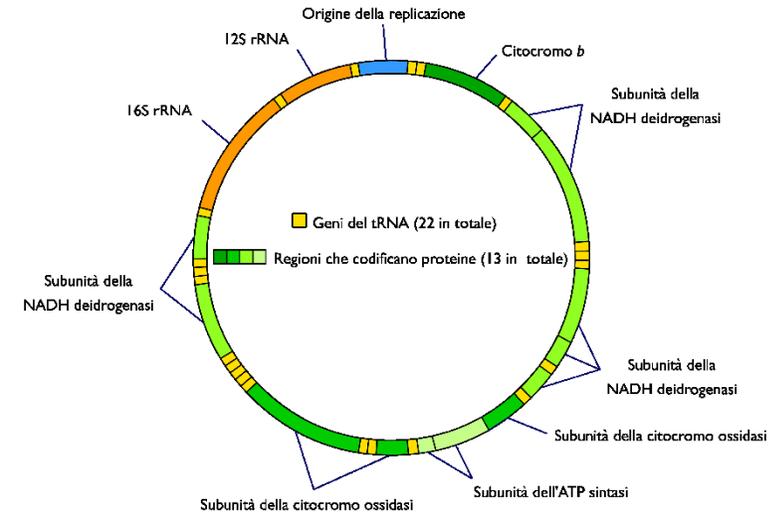
1. Identificazione di due regioni di alterazione del numero di copie per tutte le ibridazioni di sangue (periferico e mestruale) collocate nei cromosomi 2 e 14; corrispondono approssimativamente a 2p11.2 e 14q11.2.
2. Nei campioni di sperma è stata osservata un'impressionante alterazione del numero di copie in 14 regioni disseminate nei cromosomi, che contengono DNA mitocondriale (mtDNA).



Il processo di spermatogenesi comporta una graduale eliminazione del DNA mitocondriale.



https://www.wikiwand.com/it/Genoma_umano

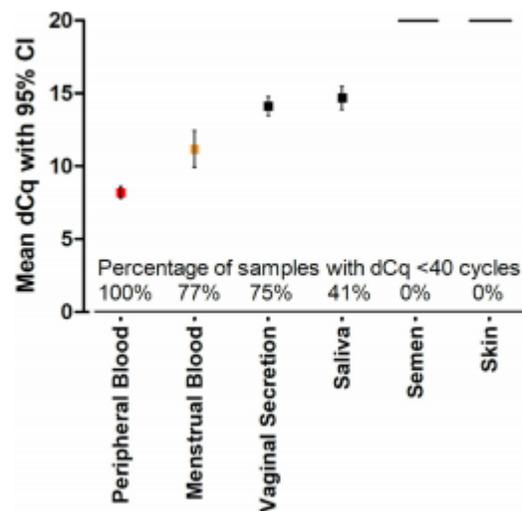
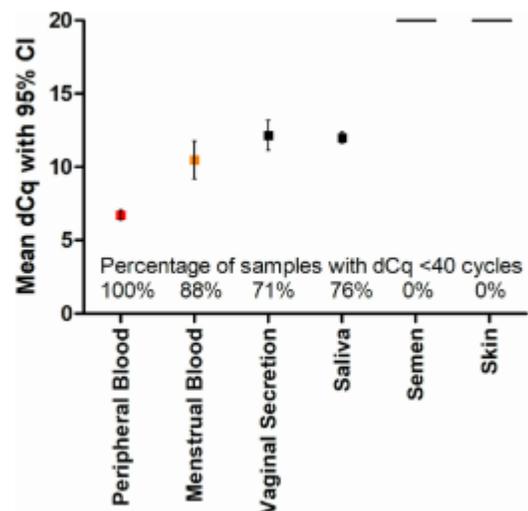


https://it.wikipedia.org/wiki/DNA_mitocondriale#/media/File:Mitochondrial_DNA_it.png

Individuazione dei Marker per i campioni di sangue

Alterazioni cromosomiche in corrispondenza dei cromosomi 2 e 14 e includono i geni per l'Immunoglobulina K e il gene recettore delle cellule T (TCR).

L'analisi qPCR con i primer specifici per questi geni hanno dimostrato che le due alterazioni sono causate **da una variazione del numero di copie di *cjKREC* e *cjTREC***



Considerando i due *marcatori genetici* *cjKREC* e *cjTREC*, sangue periferico e sangue mestruale sono *significativamente differenti a livello statistico* rispetto ad altri tessuti non di origine sanguigna; sono differenti anche tra loro.

Variabili che possono influenzare i risultati per i campioni di sangue

I marcatori cjTREC hanno dimostrato una forte correlazione con **età e sesso**.

Le femmine tendono ad avere un dCq, riferita a cjTREC, più bassa rispetto ai maschi; con l'aumento dell'età le dCq aumentano sia per maschi che per femmine.

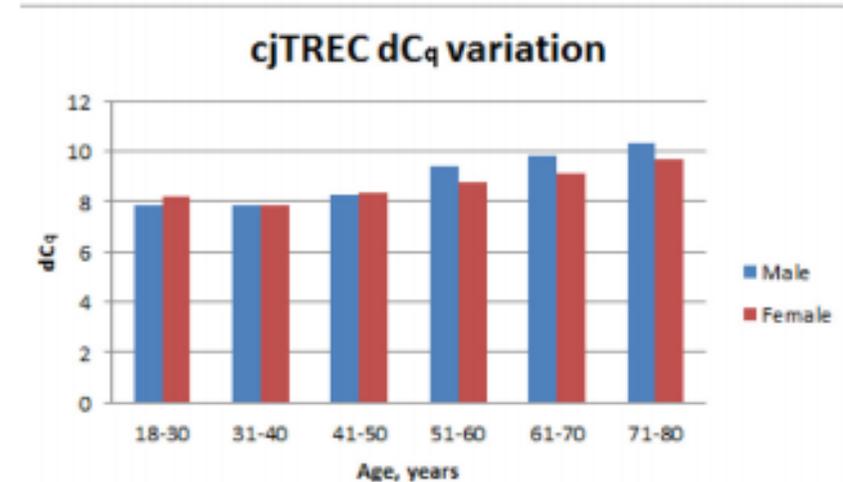
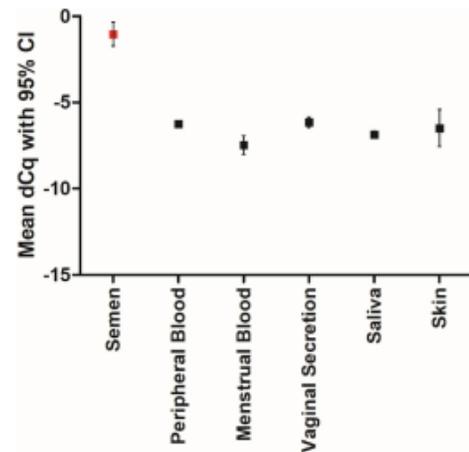


Fig. 6. Influence of age and sex on cjKREC and cjTREC CNV variation in blood samples based on qPCR testing using albumin as reference gene.

Anche i **disordini immunitari**, che causano un conteggio delle cellule B e T al di fuori del normale campo di variazione, possono influenzare l'identificazione del sangue attraverso i marker cjTREC e cjKREC.

Individuazione dei Marker per i campioni di Sperma



I campioni di sperma hanno rilevato una quantità significativamente più bassa nel numero di copie di mtDNA, rispetto ad altri tessuti.



Se contengono spermatozoi maturi, i tessuti spermatici possono essere identificati tramite **mtDNA utilizzato come marcatore genetico**

Fig. 4. mtDNA copy number variation detected with qPCR in forensically-relevant tissue samples using albumin as reference gene. Bars represent 95% confidence intervals.

Anche **la variazione del numero di copie della sequenza TTAGGG** nelle estremità telomeriche può essere utilizzata come marker. I campioni di sperma hanno rilevato telomeri significativamente più lunghi rispetto ad altri tessuti.

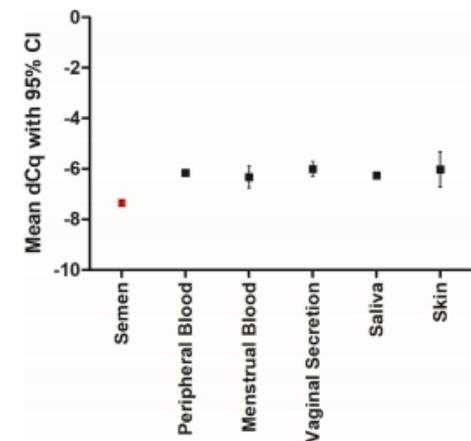


Fig. 5. Telomere repeat length variation detected by qPCR in forensically-relevant tissue samples using albumin as reference gene. Bars represent 95% confidence intervals.

Conclusioni

Questo studio ha evidenziato la possibilità di identificare l'origine dei tessuti forensi evitando problematiche tecniche, come quelle che si riscontrano tramite l'analisi della metilazione del DNA attraverso sequenziamento bisolfito.

E' stata fornita la prima prova che l'origine delle tracce di sangue e sperma, rinvenute nella scena del crimine, può essere stabilita tramite l'analisi delle molecole di DNA, individuando le regioni che contengono variazioni del numero di copie per mezzo della tecnologia qPCR che risulta semplice, sensibile ed affidabile.

La qPCR associata alla normalizzazione dei risultati secondo il segnale di amplificazione del gene albumina è altamente specifica e fornisce risultati positivi fino al livello di picogramma di input di DNA e riesce a far fronte al DNA degradato.

Referenze Bibliografiche

1. D. Zubakov, J. Chamier-Cieminska, I. Kokmeijer, A. Maciejewska, P. Martinez, R. Pawlowski, C. Haas, M. Kayser. Introducing novel type of human DNA markers for forensic tissue identification: DNA copy number variation allows the detection of blood and semen. *Forensic Science International: Genetics* 36 (2018), 112-118
2. D. Mackenzie, Human DNA is far more varied than thought. *NewScientist*, 22 Novembre 2006.
3. J. Juusola, J. Ballantyne. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci. Int.* 152 (2005) 1-12.
4. D. Frumkin, A. Wasserstrom, B. Budowle, A. Davidson. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 517-524.
5. A. Wasserstrom, D. Frumkin, A. Davidson, M. Shpitzen, Y. Herman, R. Gafny. Demonstration of DSI-semen-a novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 136-142.
6. S. Forat, B. Huettel, R. Reinhardt, R. Fimmers, G. Haidi, D. Denschlag, et al. Methylation markers for the identification of body fluids and tissues from forensic trace evidence. *PLoS One* 11 (2016) e0147973.
7. A.M. Raizis, F. schmitt, J.P. Jost, A bisulfite method of 5-methylcytosine mapping that minimizes template degradation. *Anal. Biochem.* 226 (1995) 161-166.
8. K. Munson, J. Clark, K. Lamparska-Kupsik, S.S. Smith. Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive qPCR. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2893-2903.
9. R. Pique-Regi, J. Monso-Varona, A. Ortega, R.C. Seeger, T.J. Triche, S. Asgharzadeh. Sparse representation and Bayesian detection of genome copy number alteration from microarray data. *Bioinformatics* 24 (2008) 309-318.
10. Y. Nushimura, T. Yoshinari, K. Naruse, T. Yamada, K. Sumi, H. Mitani, et. al.. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1382-1387.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Francesca Polonara