

H. Pulker et al.

Forensic Science International:
Genetics 1 (2007)

Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools

TRATTI FENOTIPICI

CARATTERI COMPLESSI (semiquantitativi)

L'espressione è data dall'azione congiunta di più geni e di fattori ambientali

L'**identificazione dei geni** che determinano i caratteri complessi è **COMPLICATA** da:

ETEROGENEITÀ ALLELICA e ETEROGENEITÀ DI LOCUS

PLEIOTROPIA

(un unico gene influenza aspetti multipli del fenotipo)

VARIABILITÀ FENOTIPICA e ESPRESSIVITÀ VARIABILE (fenocopie)

INTERAZIONE GENE-GENE e INTERAZIONE GENE-AMBIENTE

STUDI di ASSOCIAZIONE

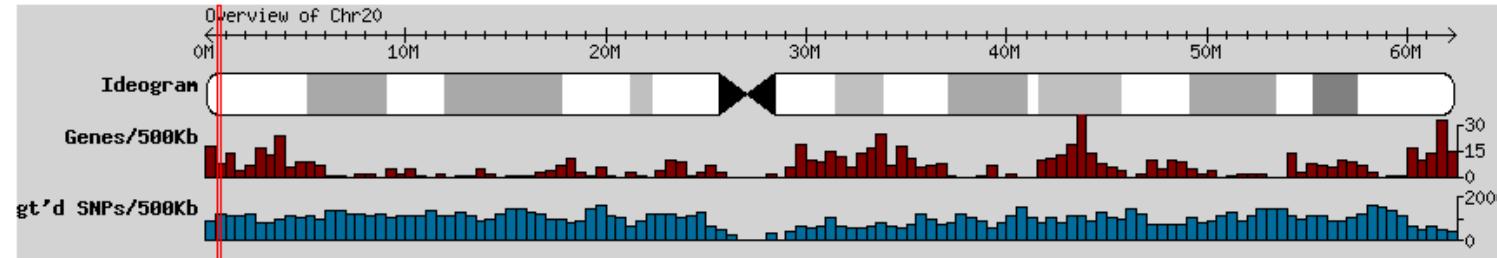
Valutano la frequenza di **VARIANTI POLIMORFICHE** in un campione di casi rispetto ad una popolazione di controllo (scala popolazionistica).

Più potere investigativo per geni con piccolo effetto rispetto agli studi familiari di linkage. I caratteri complessi sono spesso determinati da **varianti alleliche** con **FREQUENZE ELEVATE** nella popolazione.

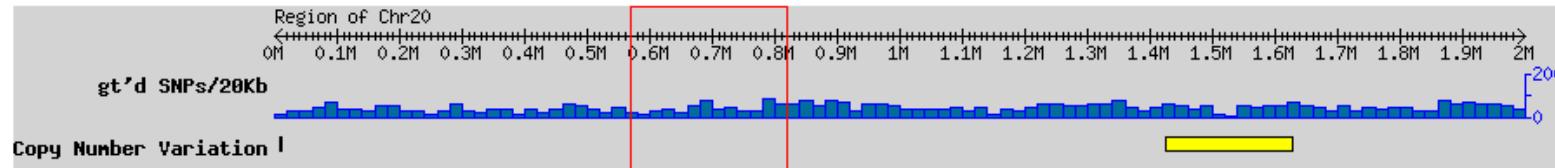
SNPs

(Single Nucleotide Polymorphism)

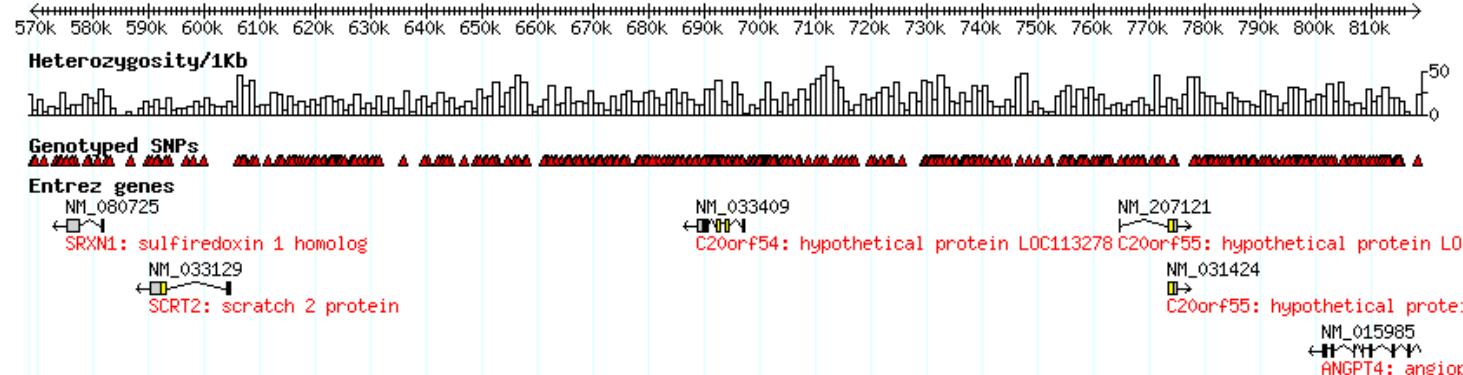
□ overview_panel Panoramica



□ region_panel Region



□ details_panel Dettagli



Population descriptors: YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria, JPT: Japanese in Tokyo, Japan,

CHB: Han Chinese in Beijing, China, CEU: CEPH (Utah residents with ancestry from northern and western Europe)

Disegno di uno Studio di Associazione

- **Numero elevato** di campioni, min 1000
(stabilire come pre-requisito una rete di collaborazione)
- Definizione del **tratto fenotipico** da studiare
- Definizione della **popolazione** in studio (etnia ecc.)
- Tipo di **approccio**

P
r
e
-
g
e
n
o
t
y
p
i
n
g

GENE CANDIDATO

Selezione dei geni
(studio dei pathway;
espressione genica;
markers informativi per l'origine
ancestrale della popolazione)

GENOME-WIDE

Dispendioso
Libero da BIAS
per geni specifici

selezionare **SNPs** ad un **gene candidato**
(sia interni al gene, potenzialmente patogeni, che aggiuntivi)

AFFIDABILITA' dello STUDIO: replicare i risultati in differenti popolazioni

Tratti Fenotipici e Genetica Forense

Numerosi studi hanno evidenziato possibili associazioni fra varianti geniche e tratti fenotipici, potenzialmente usabili nella pratica forense.

- **Pigmentazione**
- **Colore degli occhi (IRIDE)**
- **Statura**
- **Morfologia faciale**

PIGMENTAZIONE=Tratto SEMIQUANTITATIVO

La pigmentazione “costitutiva” dell’adulto è un **tratto stabile** e indipendente dai fattori ambientali se misurata nelle **aree non esposte**.

Shriver et al. (2003)

Mostra una **EREDITABILITÀ TRA IL 60-90%**
I geni per il colore della pelle mostrano un **EFFETTO ADDITIVO** e seguono una ereditarietà quasi-Mendeliana (pochi geni maggiori che interagiscono con geni modificatori).

Influenzata da numerosi **FATTORI AMBIENTALI**

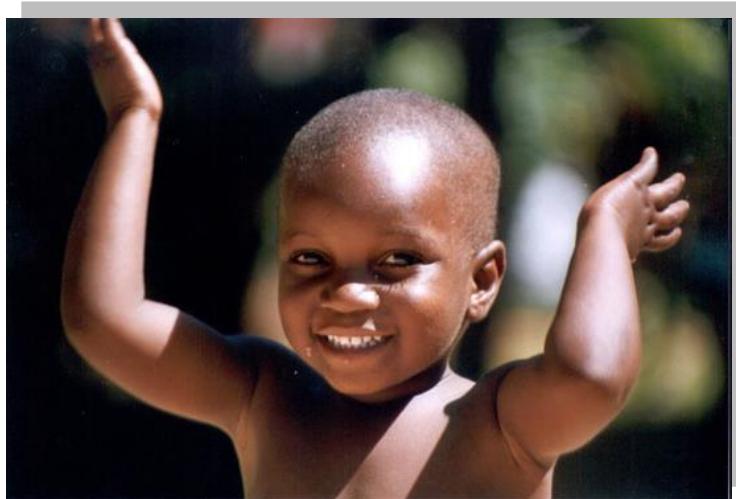
- Esposizione ai **raggi UV**
(\uparrow nella produzione della melanina facoltativa)
- **Area del corpo** considerata
(differente numero di melanociti e produzione di melanina)
- **Età e luogo**: la qualità di melanina prodotta varia
- **Sesso**: le donne sono più pallide degli uomini
(i bambini più chiari degli adulti)

PIGMENTAZIONE

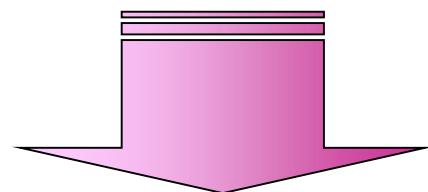
- Per analizzare la pigmentazione cutanea come **tratto quantitativo** è fondamentale avere delle **MISURE** accurate del fenotipo (per ridurre i bias di false associazioni).
- Si può misurare la **quantità e il tipo di melanina** utilizzando l'analisi dei prodotti specifici di degradazione attraverso l'**HPLC** (già usato per i capelli). Richiede una biopsia e non esiste ancora un metodo validato.

enzimi che intervengono
nella

SINTESI DELLA MELANINA



- L'INTENSITÀ del colore è direttamente proporzionale alla QUANTITÀ di MELANINA
- IL NUMERO, la GRANDEZZA e la DISTRIBUZIONE dei melanosomi pigmentati
- La proporzione di EUMELANINA (nera/marrone) rispetto alla FEOMELANINA (giallo/rossa)



ENORME VARIABILITÀ'

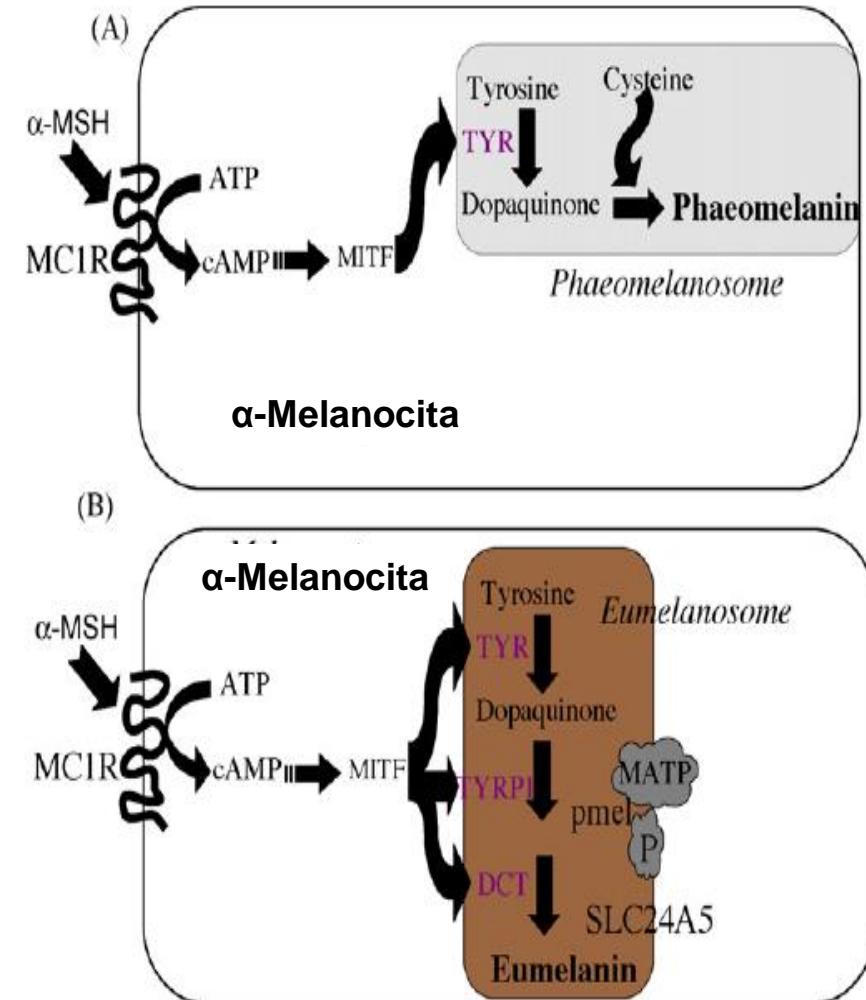
Melanogenesi

- α -MSH si lega al recettore MC1R sulla membrana del

Quando i livelli di **cAMP** sono **superiori**, MITF stimola anche TYRP1 (tyrosine related protein 1) e la DCT (dopachrome tautomerase), producendo **EUMELANINA**.

Proteine accessorie (Pmel 17, MATP, P and SLC24A5) servono a far sì che tale reazione avvenga.

ossidazione produrrà **FEOMELANINA** (incamerata nei feomelanosomi e trasportata nei cheratinociti).



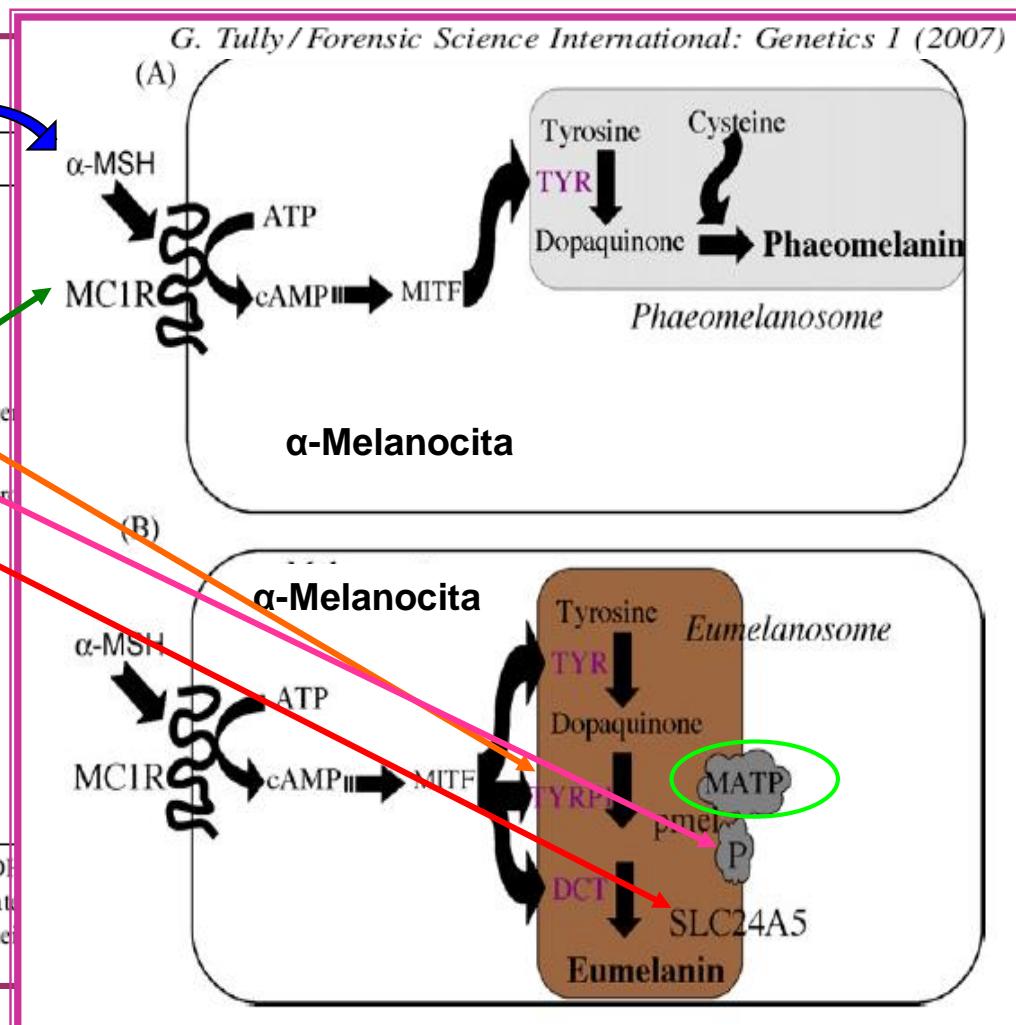
127 geni sono stati identificati nel **topo**, poco più di una **dozzina** degli ortologhi umani sono stati associati alla pigmentazione

H. Pulker et al. / Forensic Science International: Genetics 1 (2007)

Table 1
Principal skin pigmentation candidate genes

Locus	Chromosome	Protein
Melanosome proteins		
TYR	11q14-11q21	Tyrosinase
TYRP1	9p23	Gp75, TRYP1
DCT	13q12	DCT, TRYP2
OCA2	15q11.2-15q12	P-protein
SLC45A2	5p14.3-5q12.3	MTTP, AIM-1
SLC24A5	15q21.1	Ca ²⁺ exchange
Signal proteins		
ASIP	20q11.2-20q12	Agouti signal pr.
MC1R	16q24.3	MSH receptor
POMC	16q24.3	MSH receptor
OA1	Xp22.3	OA1 protein
MITF	3p12.3-3p14.1	MITF
Proteins involved in melanosome transport or uptake by keratinocytes		
MYO5A	15q21	MyosinVa
RAB27A	15q15-15q21.1	Rab27a
HPS1	10q23.1-10q23.3	HPS1
HPS6	10q24.32	HPS6

ACTH: adrenocorticotrophin hormone; DCT: dopachrome tautomerase; D¹ protein; MC1R: melanocortin-1 receptor; MITF: microphthalmia-associated transcription factor; POMC: pro-opiomelanocortin; TYRP1: tyrosinase-related protein 1.



MC1R

- Meglio caratterizzato
- Codifica per un recettore di 317 aminoacidi con 7 domande transmembranarie
- Sembra **non** svolgere un ruolo da **“gene-maestro”** (la sua funzione è fondamentale per una carnagione chiara e capelli rossi)
- Esistono **numerose varianti polimorfe** identificate in questo gene che comportano una **ridotta funzionalità del recettore** (e quindi sono associati al cosiddetto **FENOTIPO RHC** - capelli rossi e carnagione chiara e capelli rossi).



G. Tully / Forensic Science International: Genetics 1 (2007)

ASIP (Agouti signalling protein gene)

Table 1
Mutations in the ASIP gene (Agouti signalling protein gene) and their penetrance and functional significance (where known)

Mutation	Type	Designation	Penetrance (odds ratio)	Functional significance
----------	------	-------------	-------------------------	-------------------------

- La variante polimorfa **G8818A al 3'UTR** è collegata ad un aumento di capelli e carnagione **CHIARA** (Bonilla et al., 2005)
- La proteina codificata da tale variante agisce come un **potente antagonista di α -MSH**, si lega a MC1R e fa produrre feomelanina (colorazione più chiara).
- La variante 8818G potrebbe **modulare** l'influenza di **varianti in MC1R**, spiegando il fatto che esistono fenotipi RHC ma con capelli marroni in età adulta (Kanetsky et al., 2002).

MATP

Sue mutazioni sono state associate a forme di albinismo, ma la funzione non è ancora chiara. Due SNPs non associati ad albinismo, sembrano influenzare la normale **variabilità della pigmentazione fra le differenti popolazioni** (Graf et al., 2005):

- La sostituzione **374Leu** si presenta con una **aumentata frequenza** fra gli Asiatici (0.887), gli Afro-American (0.586) e gli Aborigeni Australiani (0.725) rispetto ai Caucasici (0.066). (I **Caucasici con 374Leu** tendono ad essere di **CARNAGIONE SCURA**).
- Un fenotipo simile è stato osservato con la sostituzione **Glu272Lys**, tuttavia questa sembra essere in linkage disequilibrium con 374Leu.
- La MATP alterata potrebbe alterare il traffico della tirosinasi o alterare il trasporto dei protoni, rendendo il pH dei melanosomi ottimo per la produzione di **eumelanina**.

SLC24A5 (golden gene)

- Scoperto nello **zebrafish**, dove rende più luminose (chiare) le strisce.
- L'ortologo umano con la sostituzione **Thr111Ala** sembra associato ad una carnagione più chiara.
- Influenza la differente pigmentazione fra gli Europei e Africani del 25–38%, anche se sembrano fondamentali le **interazioni con altri geni nella popolazione Europea**.
- **L'allele111 sembra “FISSATO”** nella popolazione **Europea (0.987–1.0)**, rispetto alla Africana, ai Nativi americani e agli Est-Asiatici (111Ala 0.93–1.0) (pressione selettiva).

TYRP1

- Codifica per un tipo di proteina (TYRP1) trovata con una frequenza più elevata negli Africani e Indiani rispetto ai Messicani, Cinesi ed Europei di **carnagione più chiara** (Alaluf et al., 2003).
- Ipotizzata una **selezione adattativa nei Caucasici**.
- Anche se **non** sono state evidenziate variazioni nei **livelli di tirosinasi** nelle diverse etnie, il gruppo di Shriver (2003) ha confermato la **diversa origine ancestrale** con dei markers.

OCA2

- codifica per la **proteina “P”**, localizzata sulla membrana dei melanosomi.
- Mutazioni in questo gene determinano alcune forme di albinismo.
- La variante polimorfa **AA** è la **più frequente fra i Caucasici** (0.83), mentre l'allele **CC** è più comune fra gli individui di carnagione **scura** (0.5).

SLC24A5**ASIP****Colore degli occhi (IRIDE)**

STATURA

- Carattere complesso con forte componente ereditaria (studi di linkage).
- Da studi familiari e sui gemelli: **ereditabilità** stimata fra il **76-90%**.

G

- Potrebbe essere puramente poligenica data la sua distribuzione normale nella popolazione. Sembra essere il risultato di un **EFFETTO ADDITIVO**.
- **NON** sono state evidenziate **forti associazioni** (né replicate).

e

- Gli **studi di linkage** hanno dato **risultati contrastanti**.
- Studi **gene-candidato** hanno portato all'identificazione di alcuni geni implicati in Patologie Endocrine ben definite con grave BASSA STATURA (**Several short stature-QTLs o STQTL1-8**).
- Varianti polimorfe del gene della **Fibrillina I** sono associate ad **alta statura non patologica**.

n

i

STATURA

A

- Cole et al. (2003) analizzano l'andamento della statura umana negli **ultimi 150 anni**: i **fattori ambientali** sono essenziali perché venga raggiunta l'altezza "target" di ogni individuo in base al proprio contributo genetico.

b

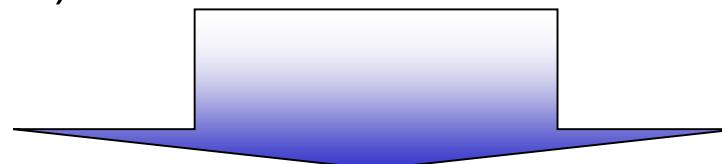
- Il coefficiente di correlazione, fra fratelli e genitori-figli, sembra essere identico: a livello di popolazione **l'ereditabilità della statura non può essere dovuta soltanto alla condivisione dello stesso ambiente**.

e

- L'altezza alla nascita non è cambiata. L'aumento avviene nei primi 2 anni ed è quasi interamente dovuto ad un aumento nella lunghezza delle gambe.

n

- La **differenza legata al sesso è aumentata** (nelle donne aumento inferiore ai maschi).



INTERAZIONE GENI-AMBIENTE

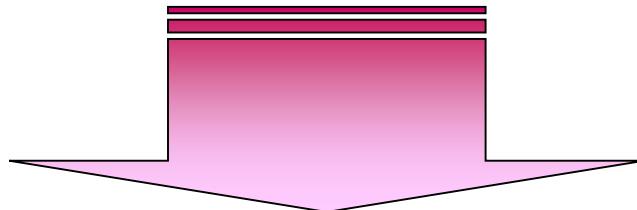
MORFOLOGIA FACIALE

La **somiglianza** del volto fra due **gemelli monozigoti** rispetto ai dizigoti suggerisce una elevata ereditabilità dei singoli tratti.

Possibili tratti **MONOGENICI**

(data la loro ereditarietà “quasi-Mendeliana”)

Per es.: Fossetta nel mento (detta a y); “widow’s peak”; lentiggini.



MISURAZIONE OGGETTIVA

dei singoli tratti della morfologia faciale

(possibilità di distinguere le variabili in continue o discrete).

Come predire il fenotipo dal DNA?

Campione **DNA** prelevato dalla **SCENA** del Crimine



Analisi mediante **STR** e **confronto** del profilo ottenuto con i **DNA “archiviati”**



SESSO del ricercato



PROBLEMI

- **Grande quantità di DNA** per tipizzare tutti gli alleli a geni diversi.
- **Velocità** d'esecuzione.
- **Penetranza non completa**
(tratti spesso non possono essere definiti con certezza)
- **Interazione geni e ambiente**

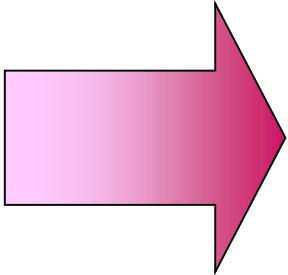
Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype

Eileen A. Grimes*, Penny J. Noake, Lindsey Dixon,
Andrew Urquhart

Forensic Science Service, 2960 Trident Court, Birmingham Business Park, Solihull, West Midlands B37 7YN, UK

Received 13 November 2000; received in revised form 5 March 2001; accepted 6 March 2001

- Primo esempio di “Predizione del Fenotipo” in una indagine criminale, studiando 12 varianti di *MC1R* (multiplex PCR).
- Dei **197** campioni, il **96%** degli individui corrispondenti avevano due mutazioni che portano al RHC e si erano descritti con **capelli rossi**, i restanti due avevano detto di aver avuto i capelli rossi da piccoli.



Un **4%** di possibilità che l'informazione ottenuta **non sia realmente associabile ad un fenotipo definito**, fa sì che l'informazione del test sia quasi del tutto **INUTILE** nei processi investigativi!



“Some genetic information is not considered private because people can see it, for example, your eye colour”
(Human Genetics Commission is the UK , 2002)

- Molti geni associati alla pigmentazione, sono **geni-suscettibilità per i tumori cutanei**.
- Gli individui con il fenotipo RHC hanno un rischio aumentato per questi tumori.
- Le varianti *MC1R* sono “predittive” del fenotipo RHC ma non del tumore.

VIRTUALMENTE è possibile predire il fenotipo dell'indagato...



...nella **REALTA'** l'unica associazione significativa è tra le varianti *MC1R* e il fenotipo RHC...