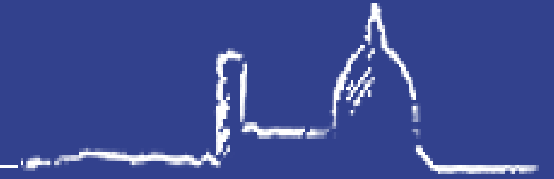




Università degli Studi di Firenze



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Scuola di Specializzazione in Genetica Medica
Anno accademico 2007-2008
Prof. Ugo Ricci

GENETICA FORENSE

SNPs Autosomici-multiplex per la tipizzazione di campioni forensi

15 Ottobre 2008

Annamaria Scognamiglio

Tipi di Polimorfismo

- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) >105 loci ; tipizzazione con Southern blot o con PCR
- **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats)
 - ❑ Minisatelliti: >104 loci ; tipizzazione con Southern blot
 - ❑ Microsatelliti: >105 loci ; tipizzazione con multiplex PCR
- **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism) >106 loci ; tipizzazione con microarray

Single Nucleotide Polymorphisms

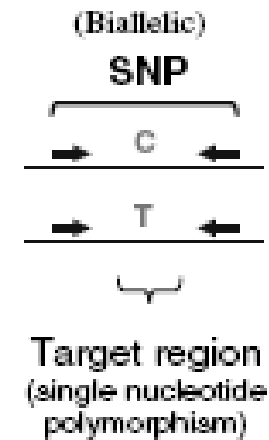
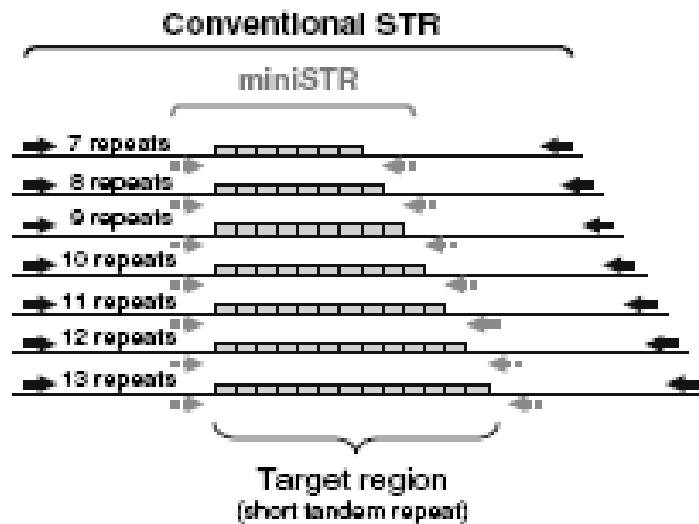
Offrono una ulteriore opportunità in campo forense per caratterizzare geneticamente un determinato campione o per identificare una persona sconosciuta

In generale i polimorfismi del DNA

- qualsiasi variazione di sequenza del DNA presente con una frequenza $>1\%$ in una popolazione
- qualsiasi variazione non patologica della sequenza di DNA, indipendentemente dalla frequenza con cui appare.

Single Nucleotide Polymorphisms caratteristiche

- Sono polimorfismi biallelici
 - Hanno una bassa informatività [eterozigosità massima 0.5]
 - Possono essere screenati su microarray, evitando la gel-elettroforesi.
-
- 10^7 SNPs nel genoma umano
 - 4-8 SNP per ogni gene
 - 300-600bp tra ogni SNPs
 - 500.000 tagSNIPs (Hap Map project)



<u>Alleles</u>	<u>Genotypes</u> (3 possible genotypes)
C	CC
T	TT
	CT

<u>Alleles</u>	<u>Genotypes</u> (28 possible genotypes)
7	7,7
8	7,8 8,8
9	7,9 8,9 9,9
10	7,10 8,10 9,10 10,10
11	7,11 8,11 9,11 10,11 11,11
12	7,12 8,12 9,12 10,12 11,12 12,12
13	7,13 8,13 9,13 10,13 11,13 12,13 13,13

INFORMATIVITA' DEGLI SNPs

Identity-testing SNPs sono meno informativi dei loci STR selezionati per le indagini forensi

- Più SNPs devono essere indagati per avere lo stesso livello di discriminazione dei 13 loci STR core degli Stati Uniti.
- Per ottenere lo stesso potere di discriminazione dei sistemi STR multiplex, è necessario un pannello di almeno 50-100 SNPs di loci autosomici.

Esempio: analisi di 50 SNPs per avere una informazione comparabile a quella ottenuta da un sistema di 10 STR.

→ Identity-testing SNPs **Criteri di selezione**

- ✓ Assenza in pubblicazioni riguardanti studi di associazione (studi caso-controllo)
- ✓ Alta eterozigosità *intra* e *inter* popolazioni
- ✓ Valore di F_{st} molto basso
- ✓ Attendibilità su DNA degradato

Adeguate uso in Genetica Forense

SNPs.....IN GENETICA FORENSE

- ❖ Posizione in regioni intergeniche a 100kb di distanza dal gene più vicino
- ❖ Assenza di associazione con i loci STRs
- ❖ Assenza di altri polimorfismi nella sequenza circostante lo SNP
- ❖ Posizione in regioni esterne a quelle coinvolte nelle CNVs (Copy Number Variants)

UTILITA' IN APPLICAZIONI FORENSI

- ❖ Molto frequenti nel genoma
- ❖ Necessità di amplificati più corti (minore sensibilità alla degradazione)
- ❖ Meno soggetti ad artefatti
- ❖ Basso tasso di mutazione ricorrenti

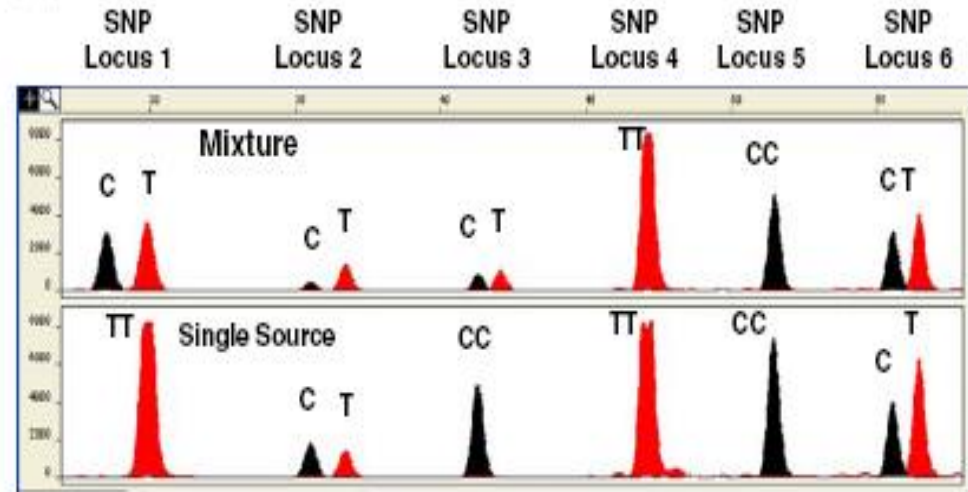
SNP vs STR 10^{-8} vs 10^{-3}

- ❖ Maggiore automazione

Comparazione STR e SNPs

Analisi di una traccia mista e di un campione singolo sia con STR che con SNP

(A) SNP typing results



(B) STR typing results

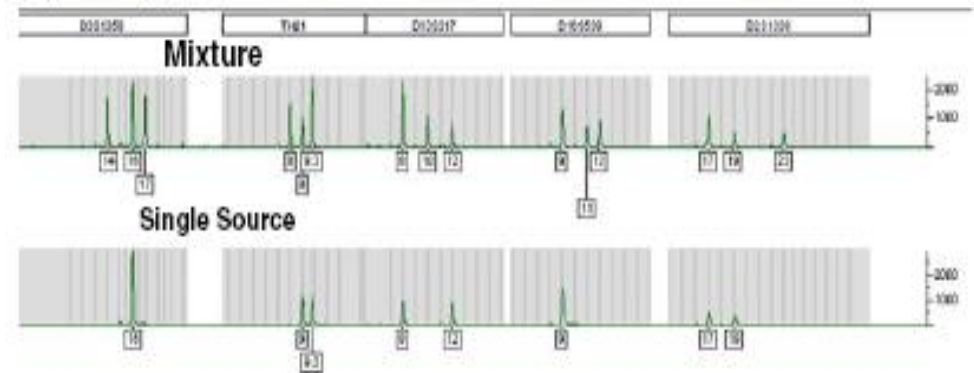


Table 1 A simple summary comparing the characteristics of STRs and SNPs

Characteristics	STRs/miniSTRs	SNPs
Success with degraded DNA	+	+
Power of discrimination (without significant multiplexing)	+	-
Mixture detection/interpretation	+	-
<i>Other applications:</i>		
Ethnicity estimation, physical traits, etc.	-	+
Commercial testing kits available	+	-
Consistent platform/assay for analysis	+	-

*FORENSIC TYPING OF AUTOSOMAL SNPs WITH A
29 SNP-MULTIPLEX – RESULT OF A
COLLABORATIVE EDNAP EXERCISE*

*J.J.Sanchez et al. Forensic Science International:
Genetics 2 (2008) 176-183*

Exercise EDNAP- *European DNA Profiling Group*

Gruppo di lavoro dell'ISFG-International Society for Forensic Genetics

Obiettivo

Valutare la robustezza e la riproducibilità di un kit con 52 SNPs-multiplex per la tipizzazione in 12 laboratori di genetica forense utilizzando la strumentazione di cui dispongono per le analisi di tipizzazione con STRs.

12 Laboratori di Genetica Forense di cui

- 11 Europei
- 1 US

Invio Reagenti

- 52 SNP-multiplex kit
- SNaPshot kit per analisi dei 52 SNPs in due separate multiplex reazioni SBE-single base extension, con 29 e 23 SNPs

Invio Campioni

Un totale di 11 campioni di sangue su FTA cards incluso un campione di scarsa qualità e un ct negativo (Cane)

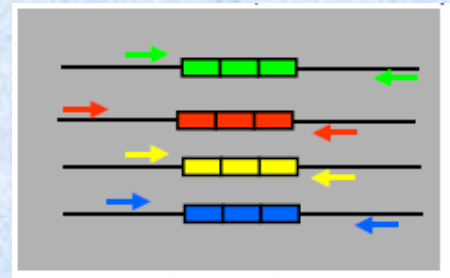
52 SNP multiplex Kit sviluppato dal Consorzio SNPforID

SNPs autosomici localizzati tutti sulla parte distale dei 22 cromosomi autosomici; distanza minima da ciascun gene noto 100kb.

Siti Primers sono localizzati in regioni senza polimorfismi per evitare potenziali alleli **null**

Lunghezza degli ampliconi 59 -115bp ✱

Multiplex PCR



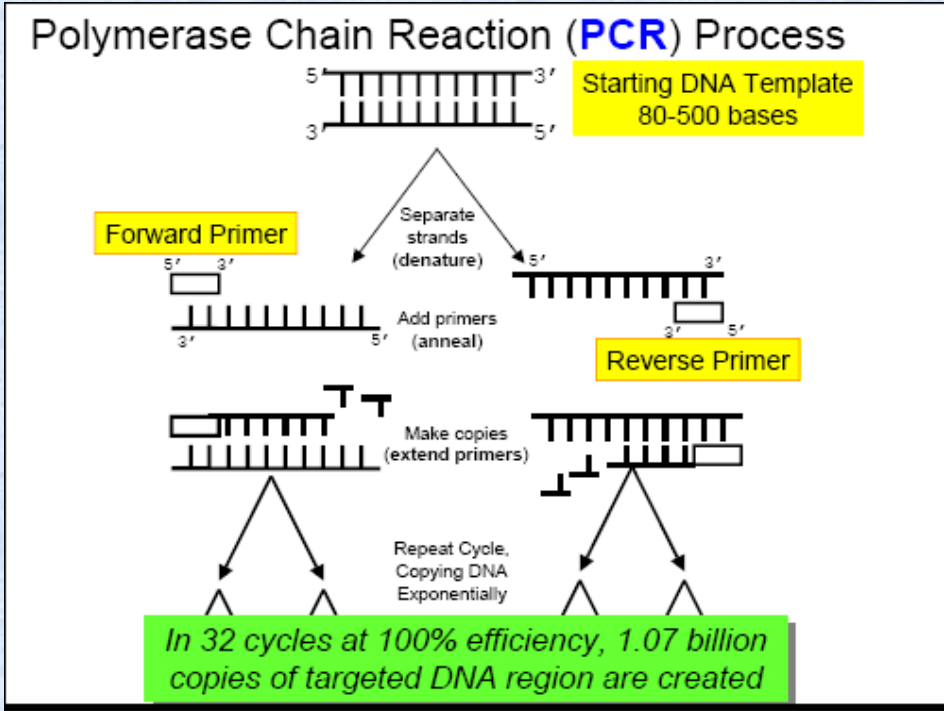
Vantaggi

- Aumento di informazione ottenuta per unità di tempo (↑ del potere di discriminazione)
- Riduzione delle ore di lavoro
- Piccole quantità di template

I campioni forensi sono tipicamente piccoli e contengono solo quantità molto limitate di DNA.
In questi casi, una soluzione potrebbe essere il metodo di amplificazione PCR multiplex

DNA di partenza 100-500pg

SNaPshot Kit (AB, Foster City,US) e analisi SBE- single base extension



Dopo PCR

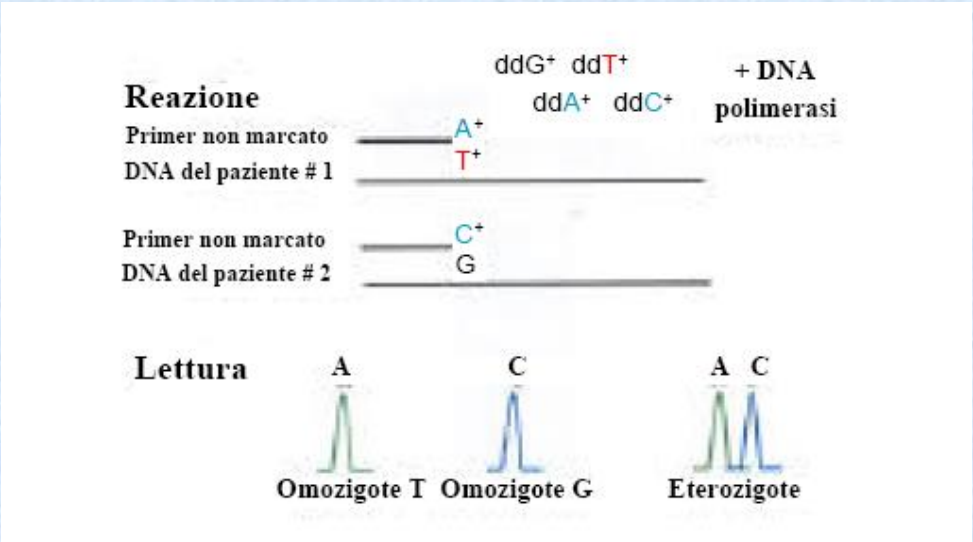
Analisi degli amplificati mediante

SBE

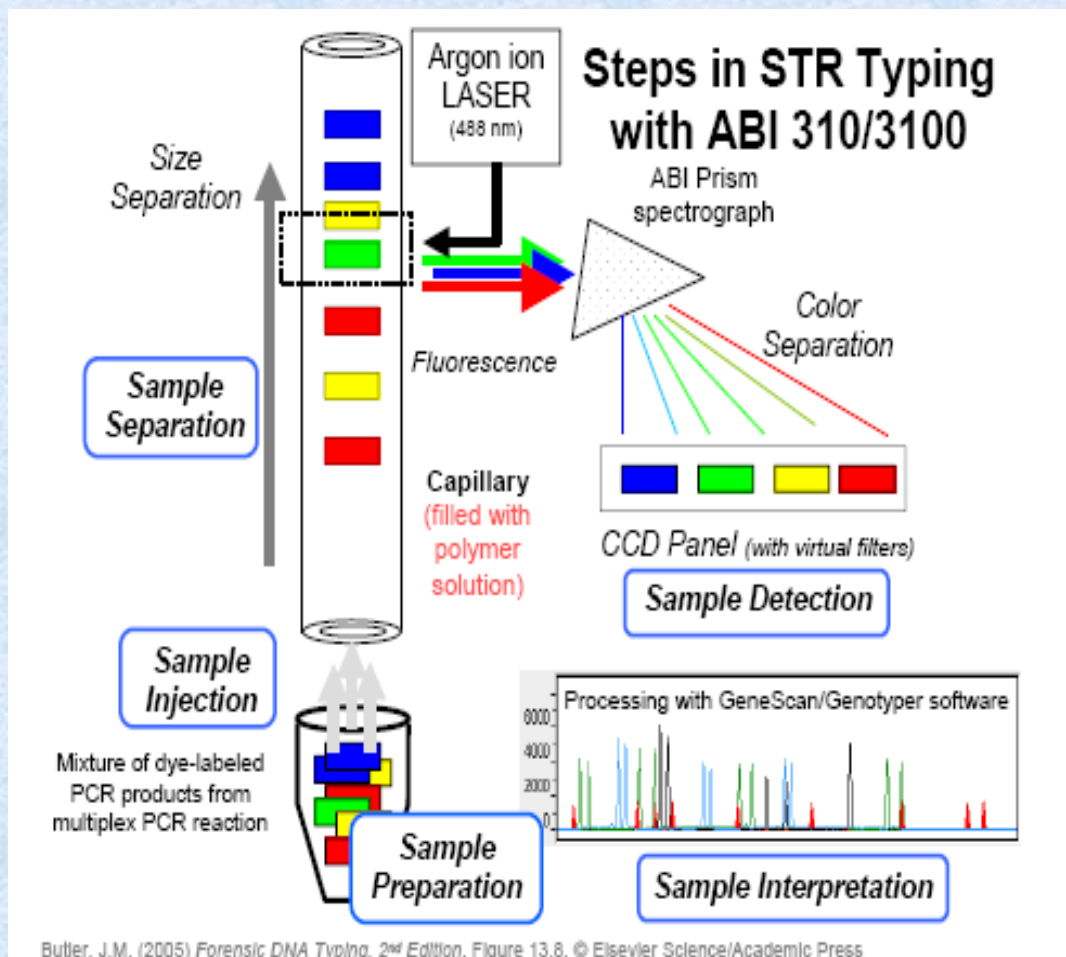
SNaPshot Kit

Due SBE multiplex con 29 e 23 SNPs

La reazione di SBE standard combina un primer non marcato con quattro terminatori dideossinucleotidici marcati ed una DNA polimerasi in una reazione di estensione ciclica. Il prodotto di un SNP bi-allelico è caratterizzato da due colori.



Elettroforesi capillare e analisi della fluorescenza multicolor



L'esercizio EDNAP viene eseguito da tutti i laboratori forensi che vi partecipano utilizzando la medesima strumentazione per tipizzazione STR.

Attualmente, tale tecnologia è quella preferita per tipizzazione SNPs di campioni forensi.

Typical Instruments Used for STR Typing

Thermal Cycler for
PCR Amplification

GeneAmp 9700



Capillary electrophoresis instruments for separating and sizing PCR products

single capillary

16-capillary array

ABI 310



ABI 3100

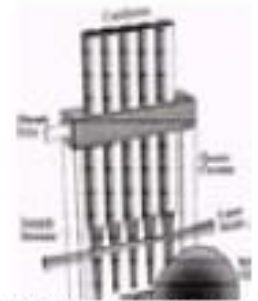


Capillary Electrophoresis



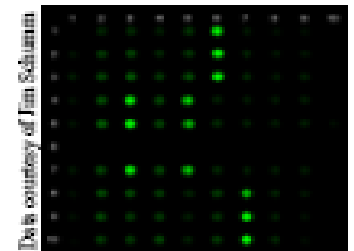
Electrophoresis, (1998) 19: 86-93

Capillary Arrays



Nucleic Acids Res. (1999) 27: 436

Hybridization Arrays



Nucleic Acids Res. (2000) 28: 417

Polimeri

❖ POP 4

❖ POP 6

I prodotti SBE sono stati analizzati, previa aggiunta di Standard interno, mediante Elettroforesi Capillare usando

- ABI Prism 3100
- ABI Prism 3100-Avant
- ABI Prism 3130/3130xl con 36 capillari array

Lab # 7

ABI Prism 377 con piastra gel per sequenza e modifica protocollo tpizz. STR

Increasing Sample Throughput with Parallel Processing

ABI 3100
16-capillary array



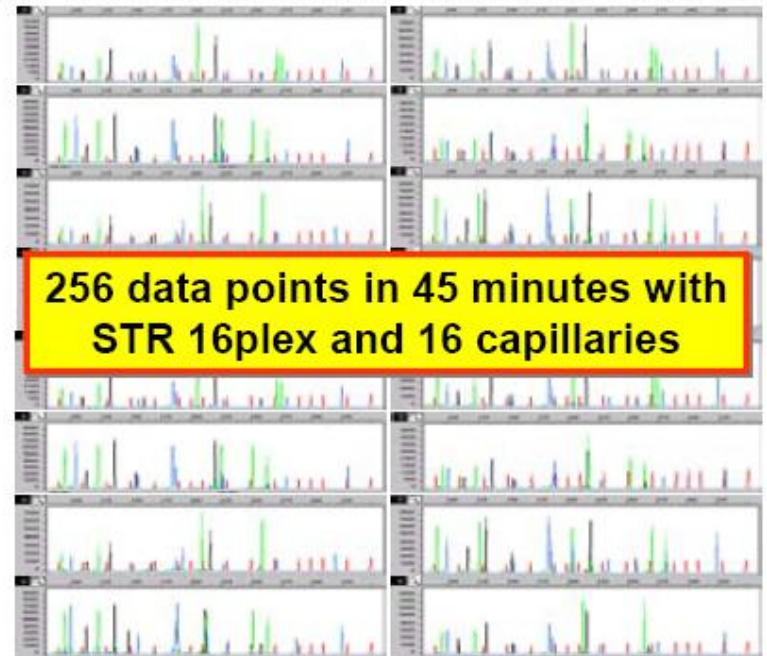
Subtle differences in matrix formation and sizing algorithms – NOT directly equivalent to 310



ABI 310
single capillary

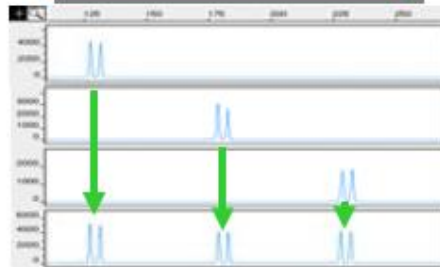


High-Throughput STR Typing on the ABI 3100 (16-capillary array)

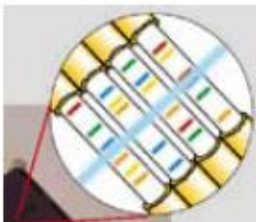
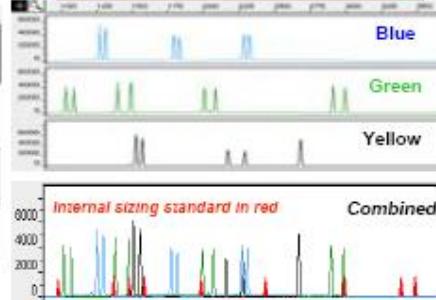


Methods for Parallel Sample Processing

Multiplex by Size



Multiplex by Dye Color



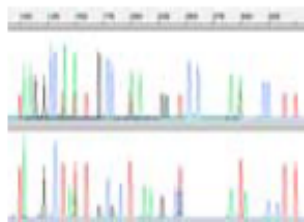
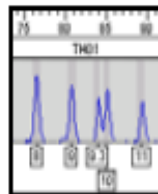
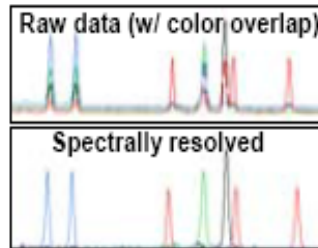
Multiplex by Number of Capillaries

ABI 3100: 16 capillaries
ABI 3730: 96 capillaries
ABI 3100 Avant: 4 capillaries

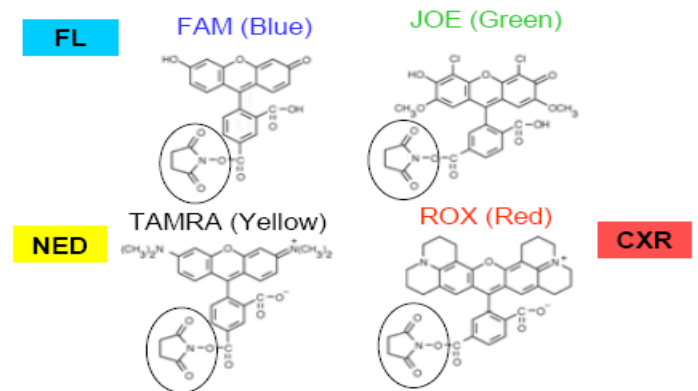
Analytical Requirements for STR Typing

Butler et al. (2004) Electrophoresis 25: 1397-1412

- Fluorescent dyes must be **spectrally resolved** in order to distinguish different dye labels on PCR products
- PCR products must be **spatially resolved** – desirable to have single base resolution out to >350 bp in order to distinguish variant alleles
- High **run-to-run precision** – an internal sizing standard is used to calibrate each run in order to compare data over time



Fluorescent Dyes Used in 4-Color Detection



Butler, J.M. (2001) Forensic DNA Typing, Figure 10.3, ©Academic Press

Altezza picco minimo in Genescan

Blue 120 RFU

Green 60 RFU

Red,yellow and orange 30RFU

Normalizzazione in base ai rapporti relativi della fluorescenza

dR110(blue):dR6G (green):TAMRA(yellow):dRox (red) 4:2:1:1

Eterozigoti Rapporto picco < 3:1

Omozigoti Rapporto picco >5:1

Inconclusivo 5:1> Rapporto picco >3:1

Risultati

10 Lab eseguono il test in duplicato

2 Lab eseguono il test una sola volta

Errori di trascrizione nella fase di inserimento degli SNP nel file Excel usato per la sottomissione dei risultati

➤ 8 discrepanze su 290 (2,8%) profili di SNP derivati da 4 laboratori

Intensità di segnale degli SNP

➤ L'intensità dei segnali varia tra i laboratori ma l'intensità di segnale relativa a ciascun campione era in generale simile in tutti i laboratori, dimostrando che la qualità del DNA su FTA cards inviata ai laboratori mostra solo piccole variazioni.

Assegnazione allele SNP

Omozigoti segnale $> 5:1$

Eterozigoti segnale $< 3:1$

Assegnazione inconclusiva tra $5:1$ e $3:1$

Totale di allele SNP incerti = 37 di cui 8 riferiti al Camp.5

Software Genotyper contribuisce a ridurre gli errori di calcolo dell'altezza dei picchi e il loro rapporto per ciascun locus SNP, quando eseguiti in manuale.

Locus dropouts

- Idealmente, da questo studio si dovrebbero ottenere 3480 SNPs.
- I 12 laboratori riportano per 10 campioni positivi un totale di 3383 SNPs
- 4 laboratori non assegnano alcun allele a uno o più loci SNP mentre gli altri 8 laboratori assegnano alleli a tutti i loci SNPs
- Due laboratori riportano 80 dei 97 (82,5%) dei locus dropout
- In totale, nessun allele è stato assegnato a 97 Loci SNP (campioni 1-10) che corrisponde al 2,8%
- La >parte dei locus dropouts ($54/97 = 55.7\%$) erano osservati nel campione degradato #5

Discrepanze

- Il totale delle discrepanze nell'assegnazione dell'allele SNP differisce dagli alleli SNP consenso era 68 (2.0%).
- Accuratezza per tutti i laboratori 98%
- Tasso di errore varia tra 0.0 e 7,6% (S#10)
- Tasso di errore del S#5 era del 4,6%, indicando che la scarsa qualità del DNA di questo campione offre un termine di confronto tra i laboratori partecipanti.

S#5 principale problema per questo campione era quello di ottenere un segnale sufficiente, dato che il DNA era degradato

In generale

L'interpretazione dei segnali dei picchi di tali campioni è difficile e richiede cautela nell'assegnazione dei genotipi

CONCLUSIONI

Il basso tasso di discrepanza ottenuto in questo lavoro è molto promettente, in special modo se si considera che la >parte delle discrepanze sono associate con campioni di scarsa qualità, esperienza insufficiente, attrezzature sub-ottimali e problemi tecnici dovuti alla mancanza di standardizzazione del kit SNaPshot.

Uno dei laboratori assegna correttamente il 99,7% di tutti gli SNP senza l'uso del computer per l'analisi dei risultati, dimostrando che approcci manuali all'assegnazione degli alleli sono validi quando l'operatore ha sufficiente esperienza nell'interpretazione dell'elettroferogramma SNaPshot

I RISULTATI DIMOSTRANO CHE LA TECNOLOGIA UTILIZZATA IN QUESTO LAVORO PUO' ESSERE SVILUPPATA COME POTENZIALE TOOL DI GENETICA FORENSE

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

ELEVATO NUMEROSITA'

ASSENZA DI DATABASE FORENSI

TASSO DI MUTAZIONE

LIMITATO CONTENUTO POLIMORFICO

ANALISI DI CAMPIONI BIOLOGICI DEGRADATI

NON UTILI NELL'INTERPRETAZIONE DI TRACCE MISTE

TECNOLOGIE DI ANALISI MOLTO AVANZATE

NON INDIVIDUATA LA METODICA ANALITICA IDEALE