Projecte de Recerca

El repte de la discriminació dels bessons monozigòtics en genètica forense

Janina Tubau Martínez, Grau Biologia 2013

UAB Universitat Autònoma de Barcelona

1. Antecedents

Durant els últims 20 anys, l'anàlisi de l'ADN ha revolucionat les investigacions forenses i actualment s'ha convertit en una tècnica rutinària i indispensable en els casos d'identificació. Els mètodes actuals per la identificació humana són els múltiplex de STR autosòmics, els SNPs autosòmics, els marcadors del cromosoma Y i els marcadors de l'ADN mitocondrial [1].

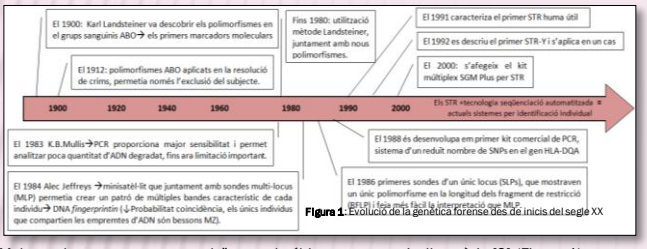

Figura 1. Evolució de la genètica forense des de inicis del segle XX

Malgrat els grans avenços produïts en els últims temps a nivell genètic [2] (Figura 1), encara no es possible la discriminació dels bessons monozigòtics, ja que fins fa poc, els científics creien que aquests eren genèticament idèntics i que qualsevol variació era producte de l'ambient [3]. Aleshores, les identificacions s'han basat en tècniques independents de la seqüència de l'ADN, com diferències de les característiques biomètriques [4].

Ara sabem que el genoma d'una cèl·lula pot variar amb el temps, degut a les petites modificacions que es van introduint en les seqüències d'ADN mentre ens diferenciem i desenvolupem. Alguns d'aquests canvis són modificacions en l'ADN mitocondrial o canvis epigenètics.

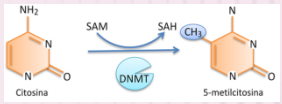

Figura 2: La metilació de l'ADN es produeix sobre el carboni 5 de la citosina. SAM: S-adenosil-metionina (donador del grup metil CH_3). SAH: S-adenosil-homocisteina. DNMT: ADN metiltransferasa

Destaquem la metilació de l'ADN (Figura 2) dins de les modificacions epigenètics [5], perquè diferents estudis suggereixen que els patrons de metilació poden ser en gran mesura heretables i determinats genèticament, però no romanen estables durant la vida d'una persona, de manera que graus variables de discordança epigenètica poden estar presents en parelles de bessons monozigòtics.

2. Hipòtesi i Objectius

- Es parteix de la hipòtesi que existeix la possibilitat de distingir els bessons a partir de les modificacions epigenètiques, concretament amb la metilació de l'ADN.
- L'objectiu principal del projecte proposat és investigar si amb tècniques epigenètiques es poden determinar les diferències de metilació entre parelles de bessons a partir de diferents tipus de mostres. També es vol que el mètode d'identificació sigui eficient per aplicar-lo en genètica forense.

3.Material i Mètodes

El projecte es dividirà en tres fases. En la primera fase s'analitzarà la metilació de seqüències d'ADN d'una mostra representativa d'individus. S'usarà un microarray basat en la prèvia conversió per bisulfit de l'ADN, que permetrà determinar els lloc amb major variabilitat de metilació.

En la segona fase, els marcadors seleccionats, que gràcies al tractament amb bisulfit es poden detectar com SNPs (citosina no metilada passen a uracils), es determinaran en bessons monozigòtics amb la tècnica SNaPshot, que permet la detecció de múltiples marcadors específics.

En la tercera fase es farà la validació de la tècnica en mostres forenses triades a l'atzar de la població.

Fase 1: Determinació dels marcadors amb alta variabilitat de metilació

1. Obtenció de les mostres: 50 individus sense cap patologia aparent + 10 parelles de bessons.
2. Processament de les mostres:
   - Extracció de l'ADN (Kit QIAamp DNA Investigator de Qiagen).
   - Tractament amb bisulfit (kit CpGenome™ Turbo) (Figura 3).
   - Determinació de la metilació (kit HumanMethylation27 BeadChip (Illumina®)).
3. Obtenció de resultats i anàlisis: buscarà 20 marcadors amb major variabilitat de metilació.

Fase 2: Determinació dels marcadors en bessons per especificar les diferències

1. Obtenció mostres: 25 parelles de bessons monozigòtics en diferents teixits (sang, mucosa i pèl)
2. Processament mostres:
   - Extracció de l'ADN (= Fase 1)
   - Tractament amb bisulfit (= Fase 1).
   - Preparació PCR múltiplex: disseny primers PCR específics per marcador + amplificació múltiplex.
   - Anàlisi tècnica miniseqüenciació (kit Applied Biosystems® SNaPshot® Múltiplex System)(Figura 4)
3. Anàlisi dels resultats

Fase 3: Validació del protocol fase 2 en mostres forenses

- S'utilitzaran mostres forenses, tan recents com antigues.
- S'obtindran aprox. 5 mostres de cada tipus: os, múscul, saliva, sang, pèl i altres.
- L'objectiu és obtenir fins a 50 mostres diferents.

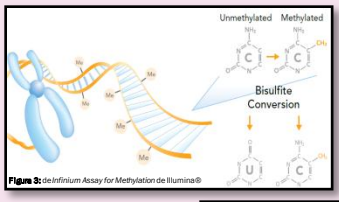

Figura 3: de Infinium Assay for Methylation de Illumina®

Figura 3: Conversió amb bisulfit de l'ADN: les citosines no metilades passen a uracil i després de la PCR passaran a timines.

Figura 4: Tècnica SNaPshot per determinar SNPs específics. Cal un disseny previ dels primers adjacents a la base d'interès. Un cop s'ha fet l'alineament amb la cadena motlle s'afegeixen 4 didesoxinucleòtids (ddNTPs) marcats amb fluorocrom.

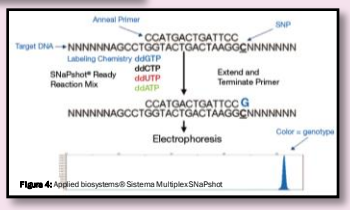

Figura 4: Applied biosystems® Sistema Multiplex SNaPshot

Pla de difusió

- Difusió en la web i creació d'una pàgina informativa dels resultats rellevants
- Publicació d'articles en revistes internacionals amb alt impacte i relacionades amb la l'antropologia forense
- Elaboració de normes, reglaments i nova metodologia al laboratori.
- Divulgació publica
- Presentació dels resultats en congressos de prestigi

Pla de treball i Pressupost del projecte

El projecte es realitzarà en 3 anys (Taula 1). L'ajut sol·licita serà d'un total de 165.000€ (Taula 2).

CALENDARI GENERAL	Set.	Oct.	Nov.	Des.	Gen.	Feb.	Març	Abr.	Maig	Juny	Jul.	Ag.
FASE 1	2013-2014											
1. Obtenció mostres												
2. Processament mostres - Extracció ADN												
- Tractament Bisulfit												
-Determinació metilació												
3. Anàlisis resultats												
FASE 2	2014-2015											
1. Obtenció mostres												
2. Processament mostres - Extracció ADN												
- Tractament amb Bisulfit												
-Preparació múltiplex												
-Anàlisis tècnica SNapShot												
3. Anàlisis resultats												
FASE 3	2015-2016											
Validació												
PLA DE DIFUSIÓ (2013-1016)	Es portarà a terme all llarg de tot el projecte, sobretot al final de cada fase											

Taula 1: Cronograma del projecte

Concepte	Ajut sol·licitat
Equipament científic-tècnic	10.000
Personal investigador	50.000
Viatges i dietes	10.000
Material fungible destinat al projecte	65.000
Altres despeses per execució del projecte	30.000
Total	165.000 €

Taula 2: Pressupost del projecte

4. Resultats esperats

- ✓S'espera que els resultats permetin el desenvolupament d'un mètode per discriminar els bessons monozigòtics amb l'ajut de les tècniques epigenètiques.
- ✓S'espera que el mètode s'adeqüi a la pràctica rutinària del laboratori forense.
- ✓S'espera que en la primera fase s'identifiquin els marcadors necessaris amb alta variabilitat, i així la segona fase gaudeixi de la robustesa necessària.
- ✓En la segona fase s'espera que els marcadors siguin adequats per poder distingir els bessons monozigòtics i permetin mostrar uns perfils de metilació prou consistent entre els bessons.
- ✓En la darrera fase de validació, s'espera que la tècnica d'identificació tingui èxit i realment pugui ser aplicada en mostres forenses.

Referències

1. Jobling, M.A. and P. Gill. Nat Rev Genet, 2004. 5(10): p. 739-51.
2. Kayser, M. and P. de Knijff. Nat Rev Genet, 2011. 12(3): p. 179-92.
3. Czyz, W., et al. BMC Med, 2012. 10(1): p. 93.
4. Sun ZN, P.A., Feng JJ, Chai ZH, Tan TN, et al. Biometric Technology for Human Identification, 2010. 7667
5. Shen, L. and R.A. Waterland. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. 10(5): p. 576-81.