



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche- Ciclo XXXIII

Coordinatore Chiar.mo Prof. Carlo Catassi

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
MEDICINA LEGALE, MED/43

Sviluppo e validazione di un saggio in Real-Time PCR per la determinazione della quantità e qualità del DNA nucleare e mitocondriale umano e le sue applicazioni nelle analisi forensi

Development and validation of a Real-Time PCR assay for the determination of the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA and its applications in forensic analysis

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Filomena Melchionda

Relatore: Chiar.mo
Prof. Adriano Tagliabracci

Correlatore: Chiar.mo
Prof.ssa Chiara Turchi

A Gaia e Alice

Indice

Riassunto	1
Abstract.....	2
1. Capitolo 1- Metodi di quantificazione in genetica forense e caratteristiche generali del DNA nucleare e del DNA mitocondriale..	3
1.1. Quantificazione del DNA in genetica forense	3
1.2. Il DNA mitocondriale e il DNA nucleare	7
1.3. La degradazione del DNA nucleare	10
1.4. La degradazione del DNA mitocondriale	14
2. Capitolo 2- Real-Time PCR (qPCR).....	15
2.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	15
2.2. Real-Time PCR (qPCR)	19
2.2.1. Sonde intercalanti DNA SYBR® Green	22
2.2.2. Sonde molecolari a DNA.....	23
2.2.3. Multiplex Real-Time PCR	30
2.2.4. Aspetti pratici dell'ottimizzazione di un saggio Real-Time PCR	32
2.2.5. Quantificazione assoluta vs quantificazione relativa.....	37
2.2.6. Validazione di un saggio Real-Time PCR	41
2.2.7. Linee guida MIQE	42
2.2.8. Strumentazioni per Real-Time PCR	42
3. Capitolo 3- Scopo della tesi	44
4. Capitolo 4- Materiali e Metodi	46

4.1.	Progettazione saggio Real-Time PCR	46
4.2.	Allestimento reazione qPCR.....	49
4.3.	Campioni selezionati per lo studio.....	53
4.4.	Estrazione dei campioni	54
4.4.1.	Estrazione automatizzata con Maxwell FSC DNA IQ™	54
4.4.2.	Estrazione DNA con QIAamp® DNA Micro kit	55
4.4.3.	Estrazione DNA con QIAamp® DNA Investigator kit	56
4.4.4.	Estrazione DNA con QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit.....	56
4.4.5.	Estrazione capelli automatizzata con Maxwell FSC DNA IQ™	58
4.5.	Quantizzazione del DNA	58
4.5.1.	Quantificazione con Plexor® HY System	59
4.5.2.	Quantificazione con Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit.....	62
4.6.	Tipizzazione STR autosomici	64
4.7.	Sequenziamento DNA mitocondriale	66
5.	Capitolo 5- Risultati	67
5.1	Considerazione sulla progettazione del saggio.....	67
5.1.1.	Selezione e disegno delle sonde del DNA nucleare	67
5.1.2.	Sviluppo del saggio in Real-Time PCR.....	68
5.1.3.	Ottimizzazione del saggio.....	68
5.2.	Risultati equivalenza mtGE/μl e copie genoma nucleare.....	78
5.3.	Valutazione dei parametri del saggio tetraplex.....	79
5.4.	Quantificazione DNA nucleare e mitocondriale dei campioni forensi.....	81
6.	Capitolo 6- Discussioni e conclusioni	91
7.	Capitolo 7- Bibliografia	96

Riassunto

La quantificazione del DNA umano ha un ruolo molto importante nella genetica forense. Una stima quanto più accurata della quantità di DNA umano è indispensabile per una pianificazione e un'ottimizzazione delle reazioni di genotipizzazione, così come è altrettanto utile una valutazione della presenza di sostanze inibitrici della reazione di PCR presenti nei campioni forensi. Inoltre, per campioni altamente compromessi, la quantificazione può fornire informazioni sullo stato di degradazione del DNA, indirizzando l'analista forense verso strategie di genotipizzazione più opportune.

In questo studio, presentiamo un test in Real-Time PCR (qPCR TaqMan®) per la quantificazione del DNA specifico per applicazioni forensi, in grado di valutare simultaneamente sia la quantità di DNA nucleare che di DNA mitocondriale (mtDNA). Il saggio combina due target mtDNA e due target di DNA nucleare, con prodotti di amplificazione di dimensioni diverse (mtDNA=69bp e 143bp; DNA nucleare=71bp e 181bp), così da fornire informazioni sullo stato di degradazione del materiale genetico estratto. Inoltre, il test qPCR contiene un controllo positivo interno (IPC) per rilevare la presenza di potenziali inibitori. Tuttavia, a causa di un'interazione tra i primers del target mitocondriale da 69bp e la sonda del target nucleare da 71bp, riscontrata durante la validazione e l'ottimizzazione del saggio qPCR, è stato eliminato dal saggio il target da 71bp del DNA nucleare passando da una reazione pentaplex ad una reazione tetraplex. Il saggio è stato testato su diverse matrici biologiche, costituite da campioni forensi contenenti esigue quantità di DNA nucleare e/o DNA degradato, come ossa, denti, unghie, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) e fusti dei capelli. I risultati di quantificazione ottenuti mediante il saggio tetraplex sono stati confrontati con i dati ottenuti sugli stessi campioni con altri sistemi di quantificazione esistenti in commercio e di uso comune nei laboratori di genetica forense.

Abstract

Quantification of human DNA plays a key role in forensic genetics. A more accurate estimate of the amount of human DNA is essential for planning and optimizing genotyping assays, as is an evaluation of the presence of PCR inhibitory substances present in forensic samples. Furthermore, for highly compromised samples, quantification can provide information about the DNA degradation status, directing the forensic analyst towards more appropriate genotyping strategies.

In this study, we present a Real-Time PCR assay (qPCR TaqMan®) for the quantification of DNA specific for forensic applications, able to assess simultaneously both the quantity of nuclear and mitochondrial DNA. The assay combines two mtDNA targets and two nuclear DNA targets, with amplification products of different sizes (mtDNA=69bp and 143bp; nuclear DNA=71bp and 181bp), in order to provide information on the degradation status of the extracted genetic material. In addition, the qPCR test contains an internal positive control (IPC) to detect the presence of potential inhibitors. However, due to an interaction between the 69bp mitochondrial target primers and the 71bp nuclear target probe, found during validation and optimization of the qPCR assay, the 71bp DNA target was removed from the assay passing from pentaplex to tetraplex reaction. The assay was tested on various biological matrices, consisting of forensic samples that contain small amounts of nuclear DNA and/or degraded DNA, such as bone, teeth, fingernails, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and hair shafts. The quantification results obtained by the tetraplex assay have been compared with the data achieved on the same samples with other quantification systems commercially available and commonly used in forensic genetics laboratories.

Capitolo 1

METODI DI QUANTIFICAZIONE IN GENETICA FORENSE E CARATTERISTICHE GENERALI DEL DNA NUCLEARE E DNA MITOCONDRIALE

1.1. Quantificazione del DNA in genetica forense

In campo genetico-forense lo scenario ideale è rappresentato dall'ottenimento di un profilo completo e di buona qualità a partire da un'ampia varietà di substrati biologici presenti sulla scena del crimine; tuttavia, la realtà della pratica di laboratorio si scontra nella maggior parte dei casi con campioni difficili contenenti DNA di scarsa quantità e/o qualità. La determinazione della quantità di DNA in un campione è essenziale per la buona riuscita di un'analisi mediante saggi PCR (Polymerase Chain Reaction), per la quale una precisa quantità di DNA input è richiesta. Tipicamente 0.5 ng-1.0 ng di DNA umano è richiesto dai kit STRs disponibili in commercio e utilizzati comunemente nei laboratori forensi. L'impiego di una quantità di DNA input errata può compromettere i processi a valle: da un lato, un eccesso di DNA stampo può portare all'ottenimento di una quantità di prodotti amplificabili troppo elevata che potrebbero compromettere la corretta interpretazione dei risultati dopo elettroforesi capillare; dall'altro, una ridotta quantità di prodotti di amplificazione può portare all'ottenimento di profili parziali con la perdita di alleli (drop-out allelico) poiché la polimerasi in tali campioni fallisce nella corretta amplificazione per effetti stocastici. Inoltre una reazione di PCR può fallire anche a causa di una inadeguata quantità di DNA, oltre che per la presenza di inibitori co-estratti e di DNA altamente degradato o una combinazione di tutti questi fattori. Questo è particolarmente importante per i campioni forensi dei quali è difficile conoscere a priori lo stato di conservazione e la quantità del materiale genetico presente. La quantificazione del DNA eseguita correttamente permette non solo di

risparmiare tempo ma anche di preservare il DNA estratto dalle prove biologiche che molto spesso sono in quantità limitata [1]. Nel corso degli anni, diversi metodi di quantizzazione sono stati utilizzati nei laboratori forensi per quantificare gli acidi nucleici; inizialmente questi erano basati sulla quantizzazione del DNA genomico totale tramite spettrofotometria UV, un'analisi che permetteva di calcolare la quantità di DNA presente in un campione tramite l'assorbanza della luce degli acidi nucleici a 260nm. Nonostante questa tecnica fosse rapida e di facile utilizzo, oggi non viene più utilizzata nei laboratori forensi poiché il saggio richiedeva un consumo eccessivo di campione, spesso insostituibile, e la presenza di contaminanti impediva un'accurata analisi nell'assorbimento a 260nm. Inoltre, il metodo non era specifico per il DNA umano, non era abbastanza sensibile per la quantizzazione di basse concentrazioni di DNA e non permetteva di definire lo stato di degradazione dei campioni poiché non riusciva a differenziare il DNA a singolo filamento (ssDNA) dal DNA a doppio filamento (dsDNA). Un altro popolare approccio di quantizzazione utilizzava coloranti intercalanti la cui fluorescenza aumentava notevolmente al momento del legame con il dsDNA consentendo una sensibilità maggiore nel quantificare piccole quantità di DNA e con una relativa insensibilità ai contaminanti. Sebbene questo saggio fosse più sensibile della spettrofotometria UV, poiché in grado di rilevare fino a 250pg di DNA, anche questa tecnica non era specifica per il DNA umano e poteva sovrastimare la quantità di DNA totale presente a causa di potenziali contaminazioni di DNA batterico. Per rispondere alla crescente richiesta di procedure più sensibili e specifiche per il DNA umano e per una valutazione rapida della quantità di DNA estratto prima dell'amplificazione del DNA, nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi saggi che prevedevano l'utilizzo di sonde con sequenze complementari a regioni target del DNA umano. L'ibridazione sequenza-specifica di tale sonda sulla regione target di interesse innescava una serie di reazioni enzimatiche che permettevano il rilevamento del DNA presente nel campione. Tuttavia, queste tecniche presentavano principalmente due vantaggi: incapacità nel definire la qualità del campione, ovvero lo stato di degradazione e le eventuali contaminazioni da parte del DNA batterico [2]. I metodi basati sulla Real-Time PCR sono quelli maggiormente utilizzati poiché sono altamente sensibili, specifici e riproducibili.

Esistono diversi kit in commercio pronti all'uso per la quantificazione degli acidi nucleici, anche se la maggior parte di essi permette di quantizzare solo il genoma nucleare. Inoltre, sono disponibili anche diversi saggi commerciali in Real-Time PCR che permettono di quantificare e valutare la qualità del DNA nucleare (nDNA), come il Quantifiler™ HP DNA Quantification kit e Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit (Applied Biosystems™). Tuttavia, in ambito forense capita di incontrare dei campioni in cui il materiale cellulare è ridotto oppure è stato sottoposto a fenomeni di degradazione come nel caso di reperti antichi o di materiale biologico mal conservato o esposto ad agenti fisici e chimici; di conseguenza, questi campioni sono spesso caratterizzati da una limitata quantità e qualità di DNA nucleare poiché il DNA può presentarsi degradato. Per questi campioni l'utilizzo del DNA mitocondriale (mtDNA) aumenta notevolmente le probabilità di ottenere un risultato interpretabile, poiché il numero di copie di mtDNA presente nelle cellule è molto maggiore rispetto a quello del DNA nucleare; così come per il DNA nucleare, una quantificazione accurata del DNA mitocondriale può indirizzare l'analista forense verso strategie di genotipizzazione più opportune. Negli ultimi dieci anni, a causa di una maggiore consapevolezza all'interno della comunità forense per il sequenziamento del DNA mitocondriale sono stati pubblicati diversi saggi di quantificazione del mtDNA [3-12], alcuni dei quali descrivono la simultanea quantificazione del mtDNA con il nDNA [3-7,12]. Nonostante il crescente interesse, in commercio non sono disponibili kit per la quantificazione diretta del DNA mitocondriale, le uniche due soluzioni disponibili ne consentono la quantificazione deducendone la quantità dal confronto con un target di DNA nucleare quantificato simultaneamente. Allo stesso modo è stato sviluppato un solo saggio multiplex che prevedesse la valutazione della degradazione del DNA mitocondriale [12].

Per questo motivo diversi gruppi di ricerca hanno descritto, nel corso degli anni, vari metodi qPCR per quantificare in modo specifico il DNA mitocondriale e valutarne la degradazione. Il primo studio per la quantizzazione del DNA mitocondriale è stato condotto nel 2002 da von Wurmb-Schwark [13] utilizzando come target il gene della subunità 1 (ND1) della deidrogenasi NADH. Un saggio per la degradazione e la quantificazione del mtDNA su campioni forensi e DNA antico è stato sviluppato da

Alonso e colleghi [4] utilizzando due frammenti di diverse dimensioni (113 e 287bp) all'interno della regione ipervariabile I (HVI) della regione di controllo del mtDNA, mediante due sonde fluorogeniche per determinare specificamente il numero di copie di mtDNA per ciascun frammento. La valutazione dello stato di degradazione è stata fatta confrontando i prodotti amplificati dai due frammenti di diversa lunghezza, assumendo che i frammenti da 287bp fossero più rari o addirittura inesistenti in campioni di degradati o frammentati. Tuttavia, questo metodo richiedeva due amplificazioni separate a causa dell'inefficiente reazione di amplificazione delle inefficienze di amplificazione durante il duplex, consumando così più campione e non includeva un controllo interno positivo (IPC) per rilevare la presenza di inibitori.

Per massimizzare le informazioni ottenibili da una singola reazione Real-Time PCR, molti ricercatori hanno messo a punto e descritto metodi che utilizzavano più ampliconi di varie lunghezze per valutare simultaneamente non solo il DNA nucleare ma anche il DNA mitocondriale [14-18]. Altri saggi di Real-time PCR messi a punto, invece, permettevano anche la valutazione dello stato di degradazione del campione. Ad esempio, Niederstätter et al. [7] ha sviluppato un saggio qPCR modulare per quantificare e valutare la degradazione di nDNA (ampliconi di 79, 156 o 246bp) e mtDNA (ampliconi di 102, 143, 283 o 404bp), oltre a consentire il rilevamento dell'inibizione (una per nDNA e mtDNA). Tuttavia, i target sono stati amplificati in duplex, il che ha precluso la valutazione simultanea di quantità, degradazione e inibizione. Oltretutto, ciascun target condivideva almeno un primer con uno o più dei target esaminati o utilizzava primer simili che differivano in determinate posizioni di base, risultando in target sovrapposti e quindi concorrenti, vincolando ulteriormente la scelta di sviluppare una reazione duplex. Schwarz et al. [19] hanno progettato sei diversi set di primer per mtDNA per amplificare sequenze di mtDNA di lunghezza compresa tra 84 e 921bp e cinque diversi set di nDNA per amplificare sequenze da 67 a 632bp. Lo svantaggio è che questo sistema utilizzava un approccio seriale anziché un approccio multiplex richiedendo quindi un maggiore consumo di campione di DNA e ulteriori manipolazioni che aumentavano anche il rischio di contaminazione.

Kavlick e colleghi hanno generato uno standard di DNA sintetizzato per mtDNA, aumentando la sensibilità fino a 10 copie di mtDNA [8], inoltre hanno sviluppato e convalidato un test di PCR quantitativa assoluta duplex (qPCR) in tempo reale per quantificare il mtDNA tramite l'amplificazione di un piccolo segmento di 105bp della mtDNA NADH deidrogenasi, subunità 5 gene (ND5). Successivamente, è stato sviluppato un saggio triplex [12] mantenendo il target del mtDNA corto situato nel gene ND5 e lo standard corrispondente del test duplex descritto prima aggiungendo un secondo target per il DNA mitocondriale, di lunghezza pari a 316bp per rilevare la degradazione e includere un nuovo sistema IPC progettato su misura come test qualitativo per gli inibitori dell'amplificazione.

Recentemente è stato sviluppato un saggio tetraplex in Real-Time PCR [20] che permette la quantizzazione simultanea del DNA nucleare e del DNA mitocondriale. Inoltre consente di valutare lo stato di degradazione del DNA mitocondriale e la presenza degli inibitori tramite un controllo interno positivo (IPC) inserito all'interno della reazione.

1.2. Il DNA mitocondriale e il DNA nucleare

Ad eccezione delle alghe azzurre, dei batteri e di alcune cellule altamente specializzate, come per esempio i globuli rossi, negli esseri viventi sono presenti due tipi di DNA: il DNA mitocondriale ed il DNA nucleare, che differiscono per molti aspetti tra i quali la struttura e il luogo dove sono conservati (Fig.1).

Il DNA mitocondriale è costituito da una molecola circolare a doppio filamento di 16569 paia di basi (bp) ed è presente in più copie nei mitocondri [21]. La sequenza del DNA mitocondriale fu ottenuta per la prima volta da Stephen Anderson e collaboratori nel 1981, a partire da un soggetto di nazionalità inglese ed è stata indicata come "Sequenza di Riferimento di Cambridge"; in seguito, vari studi di sequenziamento hanno permesso di correggere gli errori originari e di ottenere una sequenza più aggiornata [22]. È presente all'interno dei mitocondri, organelli cellulari di origine endosimbiontica, che presiedono all'attività energetica della cellula tramite la fosforilazione ossidativa. Il DNA mitocondriale rappresenta solo lo 0.006% del genoma totale di un individuo, è

localizzato in specifiche regioni del mitocondrio chiamate “regioni nucleoidi”, ciascuna delle quali contiene numerose copie di genoma mitocondriale, e poiché ciascuna cellula contiene più mitocondri, è stato calcolato che esistono circa 10^3 - 10^4 copie di mtDNA per ogni cellula [1].

I due filamenti che compongono la molecola sono distinguibili l'uno dall'altro per il differente peso molecolare ovvero per la composizione in base, infatti sono indicati convenzionalmente con H (Heavy), filamento pesante con residui guaninici, e L (Light), filamento leggero ricco di residui citosinici. L'analisi della struttura del genoma ha rivelato che l'mtDNA umano è organizzato in modo molto compatto e rappresenta un modello di economia genetica: tutti i geni sono infatti privi di introni, e inoltre le sequenze codificanti dei geni vicini sono contigue e separate da nessuna o poche basi non codificanti. La molecola del mtDNA è per il 93-95% codificante e contiene 37 geni: 2 geni per gli rRNA (12S e 16S), 22 geni per i tRNA necessari per la sintesi proteica mitocondriale e 13 geni che codificano per polipeptidi di quattro subunità enzimatiche della fosforilazione ossidativa (subunità I, II, III, della citocromo ossidasi C, le subunità 6 e 8 dell'adenosintrifosfatasi o ATPasi), il citocromo B e le 7 subunità dell'NADH deidrogenasi della catena respiratoria (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6). Le altre proteine necessarie alle funzioni mitocondriali vengono sintetizzate nel nucleo e poi trasportate nel mitocondrio. Oltre a queste, è presente una regione di controllo o regione del D-loop (displacement loop), all'interno del quale si possono identificare due regioni ipervariabili (HVI e HVII) di circa 400bp ciascuna, che contengono ben il 92% dei siti polimorfici di tutta la regione, e una terza regione ancora poco conosciuta denominata HVIII. In queste regioni si accumulano mutazioni con un tasso costante nel tempo e tale da poter costruire un orologio molecolare la cui variabilità è caratteristica per una popolazione.

È ereditato esclusivamente per via materna, ciò deriva dal fatto che gli oociti contengono i mitocondri mentre nello spermatozoo sono presenti solo pochi mitocondri e sono localizzati nella coda che viene persa durante la fecondazione. Altra caratteristica decisiva di questa molecola è il rapido e costante tasso di evoluzione stimato, pari all'1-2% di basi mutate per milioni di anni, circa 10-20 volte più veloce dei geni del DNA

nucleare di funzione paragonabile e inoltre soggetto a fenomeni quali effetto fondatore, deriva genica e ricombinazione. Ciascuna molecola si trasmette quindi invariata dalla madre alla progenie, salvo mutazioni casuali [23]. Considerando la replicazione clonale del genoma mitocondriale, generalmente tutte le molecole di mtDNA in un individuo sono identiche (omoplasmia); tuttavia, a causa dell'alta frequenza di mutazione e dell'elevato numero di copie di mtDNA per cellula, il verificarsi di una mutazione in alcune di esse non è raro e conduce alla coesistenza di più popolazioni diverse (in genere due) di mtDNA in uno stesso mitocondrio, cellula, tessuto, organo o individuo, condizione nota con il nome di eteroplasmia [24]. Viene replicato indipendentemente dal ciclo cellulare e dalla replicazione dell'nDNA, sebbene tutte le proteine coinvolte nella replicazione del mtDNA siano codificate da nDNA.

Il DNA nucleare, invece, è una molecola di grandi dimensioni più evoluta e complessa del mtDNA. È definito il "codice della vita" poiché racchiude tutte le informazioni per il funzionamento e il mantenimento del nostro organismo. Secondo il modello di Crick e Watson, la molecola del DNA è formata da due filamenti ciascuno dei quali costituito da una catena di basi o nucleotidi, indicate con le lettere A (Adenina), G (Guanina), T (Timina) e C (Citosina), appaiati ed avvolti a spirale a formare una doppia elica.

Ogni nucleotide è costituito da uno zucchero a cinque atomi di carbonio, il desossiribosio, a cui sono legati una base azotata e un gruppo fosfato. Le basi puriniche (Adenina e Guanina) sono composte da un anello a sei atomi di carbonio; le altre due sono basi pirimidiniche (Timina e Citosina) formate da un anello a sei e da uno a cinque atomi di carbonio fusi tra loro [1]. La successione di nucleotidi costituisce il patrimonio genetico dell'individuo e varia da soggetto a soggetto ma è identica per tutte le cellule della stessa persona. Diverso è anche il modo di trasmissione tra genitori e figli dei due tipi di DNA, il nDNA viene infatti trasmesso come combinazione del DNA nucleare di entrambi i genitori.

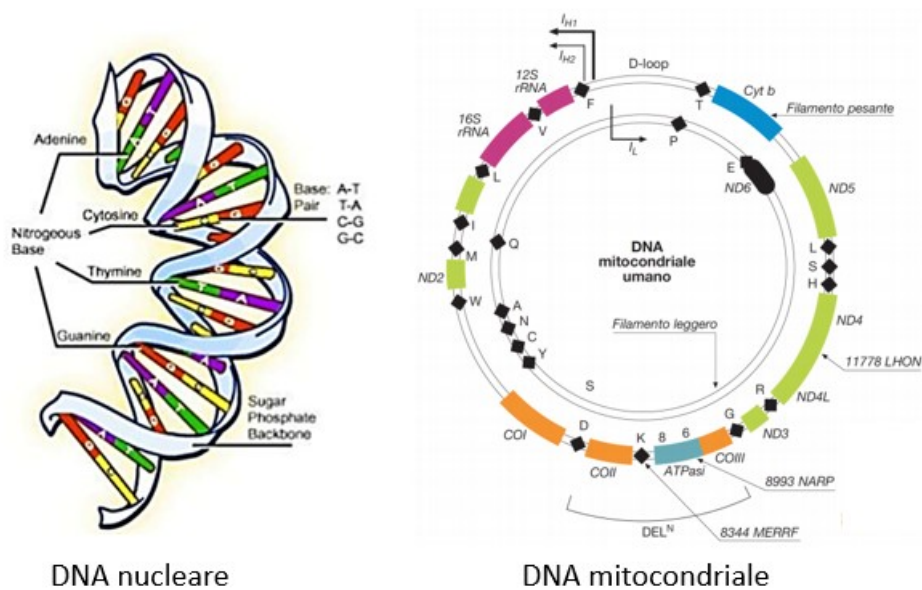


Fig.1. DNA nucleare e DNA mitocondriale. Immagine DNA nucleare tratta da: <http://www.scq.ubc.ca/a-monks-flourishing-garden-the-basics-of-molecular-biology-explained/>; immagine DNA mitocondriale tratta da: https://cla.unisalento.it/c/document_library/get_file?folderId=10999060&name=DLFE-189428.pdf.

1.3. La degradazione del DNA nucleare

Essendo il DNA un residuo chimico altamente reattivo la sua struttura primaria può essere alterata sia da numerose reazioni chimico-fisiche che inducono la degradazione delle nucleobasi che da processi di lisi enzimatica che portano alla frammentazione della doppia elica. Un esempio è il DNA ottenuto da campioni forensi complessi, che spesso può essere danneggiato nella sua struttura molecolare causa del decadimento spontaneo nei tessuti post mortem e/o di una cattiva conservazione o esposizione del DNA a condizioni ambientali sfavorevoli che comporta la degradazione in piccoli frammenti.

Due sono i percorsi attraverso i quali avviene la morte cellulare: la necrosi e l'apoptosi. Questi processi sono determinati sia da fattori interni che da fattori esterni alla cellula come la natura del segnale di morte, il tipo di tessuto e dal suo stadio di sviluppo. La frammentazione del nucleo, la marcata degradazione dei cromosomi in oligomeri di circa 180 basi e l'addensamento del citoplasma caratterizzano il processo di apoptosi

[25]. L'apoptosi è un processo attivo, durante il quale la cellula "accende" uno specifico programma che ne determina la morte; questo è un fenomeno univoco che può essere spontaneo o indotto da agenti di diverso genere. Viceversa la necrosi è un processo degenerativo passivo accidentale che coinvolge contemporaneamente gruppi più o meno estesi di cellule. A seconda della natura dell'agente lesivo la necrosi interviene nell'alterazione dello stato omeostatico e nel collasso metabolico della cellula con il conseguente crollo della concentrazione intracellulare di ATP. Questo processo è favorito da condizioni ambientali estreme determinate da acqua (umidità), luce, ossigeno, temperatura e radiazioni o da fattori enzimatici. Infatti tutto ciò comporta una degradazione del tutto casuale effettuata da enzimi intracellulari rilasciati in seguito alla rottura delle membrane cellulari [25]. Infatti, tra i primi agenti degradativi del DNA ci sono le nucleasi endogene, un gruppo di enzimi che idrolizza il legame fosfodiesterico tra i nucleotidi degli acidi nucleici. Si dividono in esonucleasi, che agiscono alle estremità della molecola e in endonucleasi, le quali agiscono all'interno della molecola di DNA. Oltre a queste, una serie di altri enzimi come lipasi, diversi tipi di proteasi e altri enzimi vengono rilasciati a seguito della morte cellulare. Da notare che, le proteasi agiscono sulle proteine istoniche, le quali sono alla base della struttura cromatinica. La rimozione degli istoni favorisce l'azione casuale delle nucleasi endogene [25]. Il processo di degradazione può anche essere mediato da nucleasi esogene, quest'ultime vengono rilasciate da microrganismi presenti nell'ambiente e possono contribuire alla frammentazione del DNA [26].

I campioni biologici forensi sono naturalmente sottoposti a vari livelli di degradazione enzimatica, a volte promosse da contaminazione batterica o fungina. Inoltre questi substrati biologici sono maggiormente propensi al danneggiamento derivante sia dall'età dei campioni raccolti e sia da fattori ambientali; in aggiunta, nei casi di analisi di resti umani, dalle caratteristiche acide o basiche del terreno [27]. Per questi campioni è fondamentale la fase di amplificazione tramite reazione di PCR che consente la moltiplicazione di frammenti di acidi nucleici permettendo di ottenere in vitro molto rapidamente una maggiore quantità di materiale genetico. Tuttavia, è da sottolineare che l'affidabilità dei risultati ottenuti viene influenzata da diversi fattori, primo tra tutti

l'integrità del template, cioè il filamento di DNA che viene copiato durante la reazione di replicazione in vitro eseguita della Taq polimerasi durante la reazione di PCR. Inoltre, l'inibizione prodotta dalla presenza di sostanze co-estratte con il campione come l'emoglobina, melanina, collagene ed altri polisaccaridi complessi, causa un'amplificazione parziale che potrebbe comportare la perdita di loci fino a nessuna amplificazione.

Diverse sono le modificazioni chimiche della struttura primaria del DNA che si ripercuotono sulla fedeltà di replicazione mediante PCR. Di seguito vengono descritte le principali modificazioni chimiche del DNA:

- L'idrolisi è una delle modificazioni più frequenti della molecola del DNA e può essere causato da processi enzimatici che cominciano dopo la morte cellulare o da processi non enzimatici e portano alla frammentazione della molecola del DNA interferendo con il normale processo di amplificazione.

Nella velocità dell'idrolisi del DNA incidono il pH e la concentrazione di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} . L'idrolisi può avvenire sia a livello N-glicosidico (Fig.2), che coinvolge la rottura del legame tra il C1 del deossiribosio e la base azotata; in questo caso nella molecola di DNA si forma un sito apurinico/apirimidinico. Sia la degradazione del template, che la presenza di siti AP producono il fenomeno di "jumping PCR", cioè, quando la Taq polimerasi salta da un filamento di DNA danneggiato all'altro, generando degli alleli "chimera" [28]. Inoltre, i siti AP possono facilitare riarrangiamenti chimici che portano alla rottura del filamento di DNA [29].

L'idrolisi può avvenire anche a livello del legame fosfodiesterico (Fig.2) tra il C2 del desossiribosio ed il C3 del nucleotide successivo determinando la rottura della doppia elica di DNA.

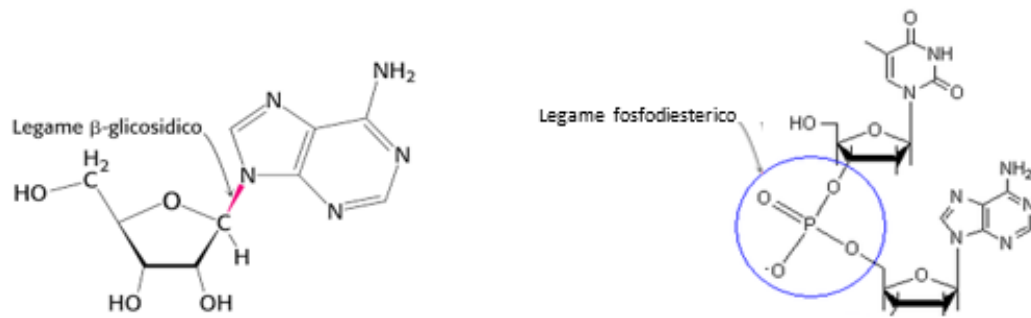


Fig.2. Rappresentazione del legame glicosidico e del legame fosfodiesterico. Immagine Legame β-glicosidico tratta da: http://192.146.242.139/biologia/sites/default/files/lezioni_2014-nucleotidi_ac.nucleici.pdf; immagine legame fosfodiesterico tratta da: https://it.wikipedia.org/wiki/Legame_fosfodiesterico.

- Il danno ossidativo provoca la modificazione delle basi azotate mediante la loro deamminazione, ossia la perdita del gruppo ammino. Le specie derivate dall'ossigeno, come il radicale superossido (O_2^-) e l'acqua ossigenata (H_2O_2), vengono generate a seguito di radiazioni ionizzanti o dal metabolismo di alcuni microrganismi aerobici che colonizzano i tessuti. L'area più suscettibile ai radicali derivati dall'ossigeno è la base azotata. In particolare le pirimidine (soprattutto la timina) sono più sensibili al danno ossidativo rispetto alle purine [25].
- I raggi UV promuovono la fusione di due gruppi etilene per formare un anello ciclo-butano. La componente ultravioletta della luce solare è in grado di modificare la molecola di DNA provocando modifiche di base, crosslinkage, formazione di dimeri etc.
- Modificazioni strutturali del DNA a carico della formaldeide, sostanza utilizzata comunemente per il fissaggio dei tessuti ottenuti da autopsie e/o biopsie. Questo, provoca la formazione di derivati metilene delle purine che bloccano la polimerizzazione [30].

Esistono molti inibitori che possono essere presenti nei campioni forensi come ad esempio l'emoglobina e alcuni coloranti tessili. Questi inibitori possono interferire con la fase di lisi cellulare durante l'estrazione, legarsi all'acido nucleico evitando il legame dell'enzima polimerasi o degradandolo fisicamente e infine inibire l'attività della polimerasi [31-33]. I campioni che contengono degli inibitori della PCR spesso

producono dei profili parziali, che assomigliano molto ai profili ottenuti con campioni di DNA degradato.

1.4. La degradazione del DNA mitocondriale

Come il DNA nucleare anche il DNA mitocondriale è soggetto al fenomeno della degradazione, fenomeno influenzato dalle condizioni ambientali, come la temperatura, l'umidità e il pH, in combinazione con il tempo trascorso dalla morte. Tuttavia si conosce ancora poco sulla cinetica post mortem della degradazione del DNA e se il tasso di degradazione varia tra il DNA nucleare e il DNA mitocondriale o in base alle varie matrici biologiche. Questo perché il danno al DNA è stato caratterizzato sulla base di studi teorici e/o in vitro su DNA recuperato da campioni antichi e degradati [34]. Si ritiene che il DNA mitocondriale si degrada ad una velocità inferiore rispetto al DNA nucleare per campioni molto antichi [35-36]. Non è ben noto, tuttavia, se il tasso di degradazione a lungo termine e la degradazione differenziale del mtDNA rispetto al DNA nucleare si applichi a periodi di tempo rilevanti dal punto di vista forense (giorni-anni).

In campo forense può accadere di dover analizzare reperti biologici in cui il DNA nucleare è scarso e/o degradato, come per esempio un capello, un dente o un frammento d'osso. In situazioni di questo tipo si deve ricorrere ad analisi basate sul DNA mitocondriale. Generalmente si ritiene che il successo nell'analisi del mtDNA derivi non solo dal numero di copie più elevate nelle cellule ma anche per altri fattori quali la posizione cellulare, le caratteristiche molecolari, che possono essere ugualmente o più importanti per la maggior preservazione del mtDNA. A differenza del DNA nucleare, il genoma mitocondriale è ridondante, costituito da centinaia a migliaia di copie per cellula. Pertanto un vincolo "repair or die" non è imposto al mtDNA. In teoria, una frazione sostanziale del mtDNA danneggiato può essere persa senza effetti dannosi a condizione che questa perdita sia compensata dalla replicazione di nuovi genomi [37].

Capitolo 2

REAL-TIME PCR (qPCR)

2.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione a Catena della Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR), ideata da Kary Mullis alla metà degli anni ottanta, ha segnato un punto di svolta nell'analisi del DNA rivoluzionando l'intero settore della genetica molecolare rendendo possibile un tipo di approccio del tutto nuovo per lo studio e l'analisi dei geni. La tecnica, estremamente specifica e sensibile, permette la sintesi enzimatica in vitro di segmenti di DNA in maniera esponenziale amplificando il numero di molecole target di partenza. Si tratta di una reazione di tipo ciclica, ripetuta un numero variabile di volte direttamente proporzionale alla quantità di target ottenuto. La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della duplicazione cellulare: la sintesi di un segmento di dsDNA a partire da un filamento a singola elica. Il filamento "mancante" viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che, disposti nella corretta sequenza, sintetizzeranno un filamento complementare a quello del DNA interessato.

La reazione di amplificazione parte dalla capacità enzimatica della DNA polimerasi I di sintetizzare un secondo filamento partendo da un DNA stampo denaturato. La miscela di amplificazione deve perciò contenere i quattro deossiribonucleotidi, opportune concentrazioni saline e pH, oligonucleotidi che funzionano da inneschi o primer per l'attività enzimatica. Tipicamente, si utilizzano forme di DNA polimerasi termostabili, quali la Taq polimerasi, in grado di resistere alle elevate temperature necessarie per la denaturazione del DNA. Inoltre, l'utilizzo della Taq polimerasi ha consentito di ottenere anche un miglioramento nella specificità della PCR in quanto ha permesso l'uso di temperature di annealing e di estensione più elevate rendendo la reazione più stringente. La reazione a catena della polimerasi si compone tipicamente di 30-40 cicli,

ognuno dei quali presenta tre fasi: la denaturazione, l'appaiamento o annealing e l'estensione.

Inizialmente il DNA è sottoposto ad una fase di denaturazione alla temperatura di 95°C che provoca il "melting" del DNA, ovvero l'elevata temperatura rende i legami idrogeno, presenti tra le basi complementari, instabili permettendo l'apertura della doppia elica del DNA in due filamenti singoli. Siccome l'emivita della Taq pol è di circa 30 minuti in ambiente a 95°C, l'attività dell'enzima si mantiene stabile per la realizzazione dei 30-40 cicli necessari ad ottenere milioni di copie della stessa sequenza bersaglio.

Nella fase dell'annealing la temperatura viene abbassata solitamente tra 50 e 65°C. A queste temperature si verifica l'appaiamento dei primer, ovvero la completa ibridazione di una coppia di oligonucleotidi sintetici (circa 19-25 basi) sulle regioni fiancheggianti la regione target di DNA a singolo filamento alle estremità 5' e 3'. In questa fase la temperatura gioca un ruolo chiave e può essere ottimizzata in modo da ottenere una maggiore efficienza per un corretto appaiamento con la sequenza target di interesse riducendo le possibilità di formazione di aspecifici. Questa fase è dunque temperatura dipendente, poiché la formazione di amplificati aspecifici è riconducibile a temperature di annealing (T_a) basse tali da consentire l'ibridazione anche con regioni del DNA non perfettamente complementari (mismatch). Viceversa, T_a elevate non porteranno all'ibridazione dei primer con nessuna sequenza in quanto la temperatura è tale da mantenere la coppia primer-target in uno stato di melting, determinando di fatto una non amplificazione. La temperatura di annealing più idonea è condizionata dalla sequenza scelta, dalla lunghezza dei primers e dal contenuto di basi guanina e citosina presenti in essi, questo perché più residui GC saranno presenti nella sequenza del primer maggiore sarà la forza del suo appaiamento e, di conseguenza, più elevata sarà la T_a da applicare. Per il calcolo della temperatura di melting T_m (temperatura alla quale si verifica il distacco del primer) spesso si utilizza la formula seguente:

$$T_m = 4 G + C + 2 A + T \text{ } ^\circ\text{C}$$

dove G, C, A e T indicano il numero di nucleotidi contenenti le basi azotate corrispondenti. Le T_m delle coppie di primer devono essere più simili possibili tra loro

($\pm 2^\circ\text{C}$). Nel caso che i due primer abbiano delle T_m differenti, si utilizza in generale la T_m più bassa. La temperatura di annealing spesso viene stimata, sulla base di quella di melting, secondo la seguente relazione:

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Solo in questi casi il complesso primer-DNA target si legherà stabilmente e formerà i legami idrogeno fornendo quindi un 3'-OH libero alla DNA polimerasi per catalizzare la successiva reazione di allungamento.

In questa ultima fase la temperatura viene leggermente alzata, solitamente ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72°C , per massimizzare l'azione dell'enzima. In questa fase i primer oligonucleotidici vengono estesi dalla DNA polimerasi che sintetizza un nuovo filamento complementare di DNA aggiungendo nucleotidi trifosfati all'estremità 3' del complesso primer-DNA target. Il tempo di estensione dipenderà dalla grandezza del frammento da amplificare, il quale dipende dalla velocità di incorporazione nucleotidica della polimerasi, mediamente a temperatura ottimale, di circa 1000 nucleotidi per minuto. A questo punto la temperatura verrà ancora una volta innalzata per iniziare un nuovo ciclo di PCR (Fig. 3).

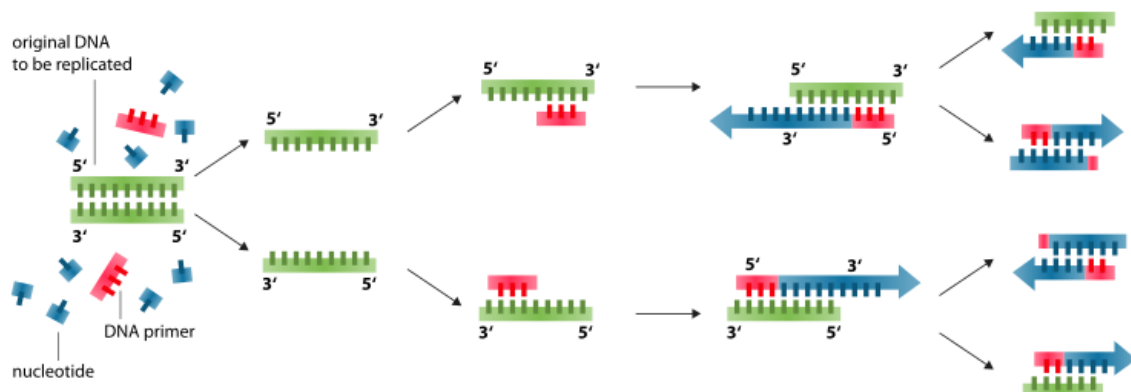


Fig.3. Rappresentazione delle fasi della reazione a catena della polimerasi (PCR). Immagine tratta da <https://upbiotech.wordpress.com/2017/08/24/pcr-reazione-a-catena-della-polimerasi/>.

La reazione di PCR, almeno su base teorica, è caratterizzata da una efficienza perfetta legata al raddoppio delle molecole di DNA dopo ciascun ciclo di PCR rispetto alla quantità di DNA di partenza, in altre parole al primo ciclo si otterranno due molecole di DNA a

doppio filamento per ciascuna molecola originaria e, in assenza di condizioni limitanti come substrati e reagenti, in ciascun ciclo la quantità di DNA verrà raddoppiata, amplificando di fatto in maniera esponenziale il target scelto. Tuttavia, in una reazione reale di PCR classica, o end-point, l'amplificazione delle molecole di DNA target procederà solo per un certo numero di cicli prima che vadano in esaurimento i reagenti della reazione determinando la cosiddetta fase di plateau a livello della quale non si avrà più un incremento di prodotti [38].

Infatti, riportando in ordinata il logaritmo della quantità di amplificato e in ascisse il numero di cicli termici si ottiene una curva sigmoideale (Fig.4), in questo modo possiamo considerare la reazione di PCR composta da tre distinte fasi che caratterizzano la sua cinetica di amplificazione.

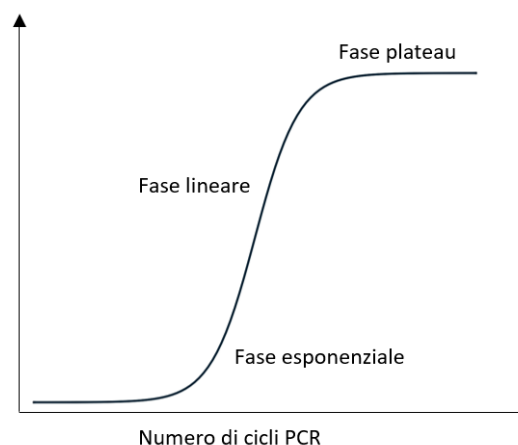


Fig.4. Schematizzazione della cinetica della reazione della PCR.

Nella fase esponenziale della reazione di PCR si osserva un accumulo apprezzabile del prodotto e mediante misurazione in questa fase di crescita è possibile stabilire una correlazione con la quantità di DNA target, dopodiché la diminuzione dei reagenti e l'aumento dei prodotti residui inibisce la sintesi di ulteriore DNA. Ciò comporta prima una stabilizzazione della crescita nella fase lineare e poi una diminuzione della stessa fino ad arrivare ad una fase di plateau. La crescita esponenziale dei frammenti in una PCR avviene solo nei primi cicli dato l'eccesso di oligonucleotidi aggiunti alla reazione e date le condizioni ottimali a cui operano unitamente alla concentrazione di Mg^{2+} e alla temperatura, dopodiché la diminuzione dei reagenti e l'aumento dei prodotti residui

inibisce la sintesi di ulteriore DNA. Ciò comporta prima una stabilizzazione della crescita nella fase lineare e poi una diminuzione della stessa fino ad arrivare ad una fase di plateau.

2.2. Real-Time PCR (qPCR)

La quantizzazione del DNA tramite Real-Time PCR è stata descritta per la prima volta nel 1993 da Higuchi et al.

[39] in una pubblicazione che delineava i principi base di ciò che gli autori indicavano con il termine di "Kinetic PCR", ad oggi più comunemente conosciuta come Quantitative PCR o qPCR. Comparata alle PCR tradizionali, il test non solo è altamente sensibile, ma garantisce una maggiore specificità e precisione per la quantificazione di un campione incognito; inoltre, consente di ridurre il numero di repliche necessarie alla tipizzazione di un campione, nella fase post-amplificazione, permettendo un minor consumo del materiale da testare. In una reazione Real-Time PCR la quantità di prodotto formato è monitorata durante l'intero ciclo di reazione mediante la misurazione, istante per istante, dell'intensità di fluorescenza emessa da particolari fluorofori che fungono da reporter [40]. Questi reporter fluorescenti emetteranno luce visibile solo quando sono associati con l'amplicone della sequenza target, per cui le variazioni nella fluorescenza emesse rappresentano una espressione diretta della quantità di prodotto formato permettendo di quantificare il numero di molecole di DNA target presente all'inizio della reazione. Da notare che poiché l'intensità della fluorescenza del reporter è misurata costantemente durante l'intera reazione è possibile identificare il ciclo di PCR al quale il segnale emesso risulta significativo e correlarlo con la quantità di template iniziale ed otterremo come risultato una corsa di "amplificazione" fatta in questo modo (Fig.5).

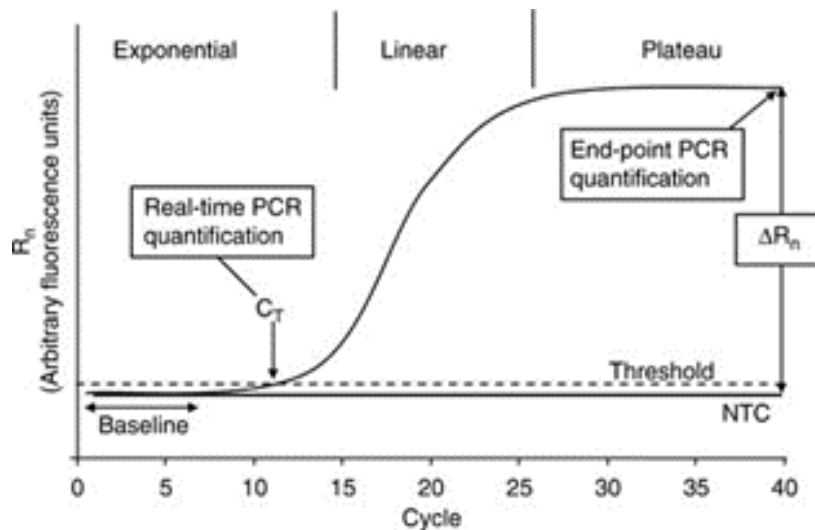


Fig.5. Rappresentazione schematica dell'andamento esponenziale di una tipica reazione di Real Time PCR. Ct: Ciclo di threshold. Immagine tratta da: https://media.springernature.com/lw785/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-540-77587-4_311/MediaObjects/978-3-540-77587-4_311_Fig1_HTML.jpg.

Come indicato nella figura 6a durante i primi cicli di reazione, il segnale di fluorescenza è debole e non mostra ancora delle oscillazioni considerevoli in quanto il prodotto amplificato è, in questo momento, a bassa concentrazione e non può essere ancora distinto dal segnale di fondo (background o baseline) dato dai fluorofori impiegati.

A mano a mano che la reazione procede, il prodotto di amplificazione inizia ad aumentare rapidamente sviluppando un segnale di fluorescenza che cresce in maniera esponenziale (fase esponenziale), per poi saturarsi in fase di plateau, seguendo la medesima cinetica descritta per la PCR tradizionale.

Il numero di cicli necessari per raggiungere un'intensità di fluorescenza che supera la linea di base (baseline) è detto ciclo soglia Ct (threshold cycle, Ct o Cq), e corrisponde ad un numero intero o frazionario, tanto maggiore quanto minore è la quantità di target presente nel campione in analisi (Fig.6b) [41].

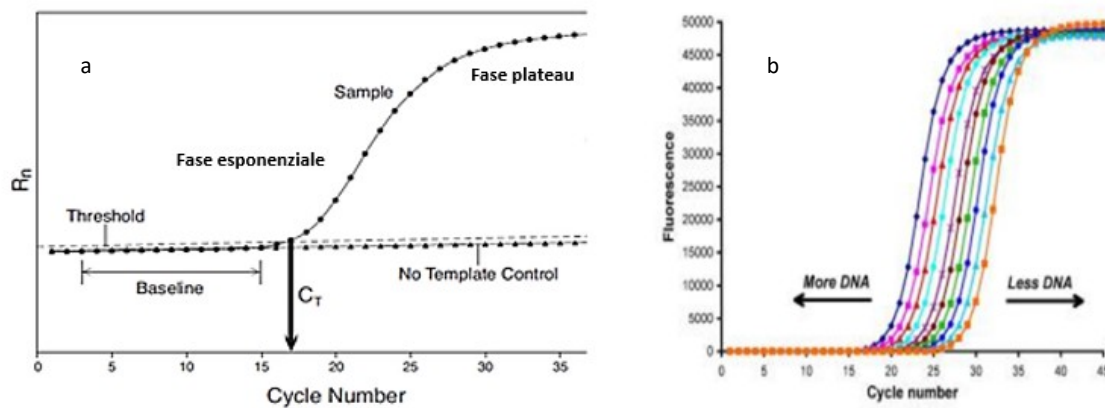


Fig.6a-b. Rappresentazione grafica del segnale di fluorescenza sul numero di cicli di amplificazione (amplification plot). Immagine 6a tratta da: http://www.irsa.cnr.it/images/docs/Notiz/notiz2016_1.pdf; immagine 6b tratta da: <http://www.unife.it/sveb/bioteconologie/insegnamenti/minisiti-anni-precedenti/c-i-tecnologie-biochimiche-e-ricombinanti/modulo-tecnologie-molecolari-e-ricombinanti/materiale-esercitazioni-lab4>.

Conoscendo il valore di C_t e generando una curva standard determinata da una serie di diluizioni seriali di DNA a concentrazioni note, plottata su un grafico in cui sono riportate in ascissa il numero di cicli ed in ordinata la fluorescenza, è possibile determinare la concentrazione della quantità di DNA iniziale dei campioni presi in esame. L'analisi è dunque effettuata in tempo reale ed è eseguita senza manipolazioni post PCR evitando contaminazioni del prodotto poiché l'amplificazione avviene direttamente in situ. Un elemento importante a favore dell'utilizzo della Real-Time PCR è la sua rapidità dal momento in cui i processi di amplificazione e rilevazioni sono simultanei, ciò si traduce in un risparmio di tempo e nella riduzione di errori operativi. Un altro vantaggio non trascurabile è rappresentato dalla elevata sensibilità, non inferiore a quella della PCR tradizionale e paragonabile a quella di una "nested-PCR". Ciò ha permesso di superare la divisione tra saggio qualitativo, in cui si ricerca una sensibilità elevata, e saggio quantitativo, di norma meno sensibile del precedente. Altri vantaggi sono legati al monitoraggio continuo dell'andamento dei cicli di PCR mediante l'uso di reporter fluorescenti e un basso rischio di contaminazione dovuto all'utilizzo di un sistema chiuso [42]. Uno dei principali svantaggi di questa tecnica è rappresentato dalla limitata capacità di condurre esperimenti in multiplex PCR a causa dalle chimiche supportate dalle strumentazioni, infatti ognuna di esse ha una soglia massima di target rilevabili simultaneamente poiché ogni target deve essere marcato con un fluorocromo diverso e

che emetta a una lunghezza d'onda chiaramente discriminabili, affinché i segnali corrispondenti ai diversi amplificati non si sovrappongano tra di loro.

Ad oggi sono i due principali approcci che vengono utilizzati per la rilevazione di un prodotto di sintesi in Real-Time PCR ed entrambi sono basati su molecole fluorescenti: il primo prevede l'utilizzo di fluorofori intercalanti del DNA quale il SYBR® Green, il secondo sistema si basa sull'impiego di sonde oligonucleotidiche, a cui sono legate covalentemente fluorocromi, specifiche per il gene target come ad esempio le sonde TaqMan®.

2.2.1. Sonde intercalanti DNA SYBR® Green

Il sistema di rilevazione del segnale si basa sull'utilizzo della molecola SYBR® Green, un intercalante della doppia elica del DNA in grado di emettere un segnale fluorescente 1000 volte superiore a quello emesso quando non è legata all'acido nucleico in soluzione [38]. In condizioni ideali un saggio SYBR® Green segue un pattern di amplificazione simile a quello prodotto da un saggio TaqMan®. Nei primi cicli di amplificazione, durante la fase di denaturazione, il SYBR® Green si trova libero nella miscela di reazione durante la quale emette un segnale fluorescente debole non essendo legato alla molecola di dsDNA, successivamente nella fase di annealing esso si posiziona in maniera aspecifica nel solco minore del DNA. Nella fase di estensione il colorante si intercala nella molecola di DNA e quando eccitato emette fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte. Quindi la quantità di prodotto amplificato è misurata rilevando l'emissione del segnale dai fluorofori al termine della fase di estensione di ciascun ciclo.

La molecola del SYBR® Green non è in grado di intercalarsi nel DNA a singolo filamento e non possiede le caratteristiche di specificità proprie delle sonde TaqMan®, questo significa che rileverà qualsiasi prodotto di amplificazione anche non specifico derivanti da dimeri di primer o prodotti derivati dalla cross-reactivity di sequenze non target, per cui tali proprietà la rendono impiegabile per monitorare la produzione di ampliconi generici in quanto affine per qualsiasi dsDNA delineandone una certa versatilità. Un elemento importante da tenere in considerazione è che non è necessario incorporare un reporter fluorescente nei primer disegnati o sonde specificatamente marcate solo

per una sequenza target, ciò semplifica la progettazione dei primer e riduce i costi sperimentali. Un'ulteriore caratteristica favorevole deriva dal fatto che la presenza della molecola legata al dsDNA non impedisce l'attività di numerosi enzimi, tra cui quelli di restrizione, le ligasi e le DNA polimerasi. Tuttavia, alcuni di questi vantaggi sono essi stessi dei limiti nell'utilizzo di questa molecola primo tra tutti il legame ad ampliconi aspecifici e ai dimeri di primer. Questi problemi possono essere superati mediante l'analisi di melting che permette non solo di determinare a quale temperatura si formano i dimeri di primer, permettendone di conseguenza l'identificazione di questi prodotti visto la diversa T_m rispetto gli amplificati target ma permette anche l'individuazione degli ampliconi aspecifici, i quali in base alla loro sequenza nucleotidica mostreranno T_m differenti. Grazie all'analisi di melting questi prodotti aspecifici possono essere discriminati rispetto all'amplicone target ma la loro presenza gioca un ruolo nell'efficienza della reazione relativamente al prodotto specifico. Il principale utilizzo di questo sistema di rilevazione è utilizzato in reazioni singleplex di Real-Time PCR.

2.2.2. Sonde molecolari a DNA

I saggi maggiormente utilizzati in Real-Time PCR utilizzano sonde oligonucleotidiche fluorescenti che si basano sull'ibridazione sequenza-specifica di tale sonda sulla regione target di interesse e risolvono il problema di specificità dato dalla molecola SYBR® Green. Il più delle volte questa sonda è interna, ovvero compresa tra i due primers, come nei saggi TaqMan® o costituisce essa stessa uno dei primer come ad esempio le Scorpion probe. In termini di struttura, queste sonde sono marcate con 2 molecole fluorogeniche legate covalentemente al 3' e al 5' che prendono il nome di molecola Reporter e Quencher con la particolarità di avere lo spettro di emissione di uno sovrapposto allo spettro di emissione dell'altro.

Queste sonde sfruttano il principio del trasferimento di energia per risonanza, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), in cui l'energia viene trasferita da un fluoroforo "donatore" (Reporter) ad uno "accettore" (Quencher). Essenzialmente il principio di base prevede che quando il Quencher e il Reporter sono spazialmente vicini il Quencher assorbe il segnale del Reporter risultando, quindi, in una non emissione di

luce. Viceversa, a seguito dell'allontanamento delle due molecole il Reporter emetterà fluorescenza ma che non sarà più tamponata dalla molecola Quencher determinando così un segnale fluorescente registrabile esattamente in corrispondenza della formazione dell'amplicone. Principalmente due sono i vantaggi offerti dall'impiego di tali fluorofori rispetto alle molecole fluorescenti leganti il dsDNA:

- Specificità di legame: le sonde sono progettate per legarsi in maniera specifica alla sequenza di DNA bersaglio, eliminando di fatto la formazione di ampliconi aspecifici e dimeri di primer,
- disponibilità di molecole fluorogeniche che emettono a lunghezza d'onda differente, permette l'allestimento di saggi multiplex mediante impiego di più sonde, specifiche per diversi target e legate a differenti fluorocromi.

Le sonde molecolari a DNA sono distinte in due categorie: probe di ibridazione e di idrolisi.

Le **sonde di ibridazione** permettono di rilevare il segnale nel momento in cui si legano alla sequenza bersaglio. Esistono diversi modelli di sonde di ibridazione, tra queste troviamo un tipo di sonde che sfrutta il processo FRET. Le sonde FRET sono formate da una coppia di oligonucleotidi ognuno marcato con un solo fluorocromo e progettate in modo tale da ibridizzarsi sulla sequenza target in una configurazione testa-coda al fine di massimizzare la specificità della reazione.

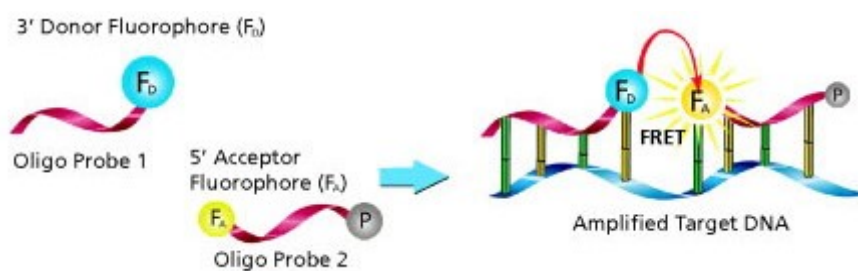


Fig.7. Rappresentazione e funzionamento delle sonde FRET. Immagine tratta da: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/lightcycler-probes.html>.

Come indicato in figura 7, una sonda porterà al 3' un fluoroforo donatore (Oligo Probe 1) in grado di emettere la fluorescenza quando eccitato da una fonte di luce, il suo spettro di emissione però si sovrappone con quello di un fluoroforo accettore legato

covalentemente al 5' del secondo probe (Oligo Probe 2) il quale risulta bloccato al 3' per prevenire l'estensione da parte della Taq polimerasi. Quando le sonde non sono legate alla sequenza target i due fluorofori, sono separati e, a causa della distanza spaziale tra le due molecole, solo una fluorescenza di base è emessa dal donatore, registrata come rumore di fondo. Durante lo step di annealing, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target e ciò permette l'avvicinamento dei due fluorofori in modo che il donatore potrà trasferire la sua energia ad alta efficienza all'accettore, il quale emetterà un segnale registrabile. Pertanto, solo se entrambi i probe ibridizzano correttamente alla sequenza target e si troveranno giustapposti si svilupperà un segnale. Tale tecnica risulta molto precisa ed inoltre permette di "riutilizzare" la fluorescenza emessa in quanto i probe non vengono idrolizzati nella reazione, per cui sfruttabili per generare curve di melting. Altri probe di ibridazione ampiamente utilizzati sono i Molecular Beacons e Scorpions Probe.

I Molecular Beacons, o sonde beacons (Fig. 8) sono delle sonde progettate in modo da avere le estremità complementari tra loro formando una caratteristica struttura a forcina (stem-loop) mentre la regione centrale del probe è disegnata per essere complementare alla sequenza del target di interesse. Alle estremità 3' e 5' sono legati rispettivamente un fluoroforo e una molecola quencher. Finché il fluoroforo e il quencher sono nelle immediate vicinanze, eventuali fotoni emessi dal fluoroforo sono assorbiti dal quencher e ciò si verifica alle basse temperature. Dopo la fase della denaturazione, la rottura dei legami delle regioni complementari nello stelo della forcina, consente alla sonda di ibridarsi con la sua sequenza target. In questo modo, il colorante reporter e il quencher vengono separati sufficientemente per indurre la fluorescenza del fluoroforo. La quantità di segnale che si ottiene è proporzionale alla quantità di sequenza bersaglio, e viene misurata in tempo reale per consentire la quantificazione della quantità di sequenza bersaglio [43].

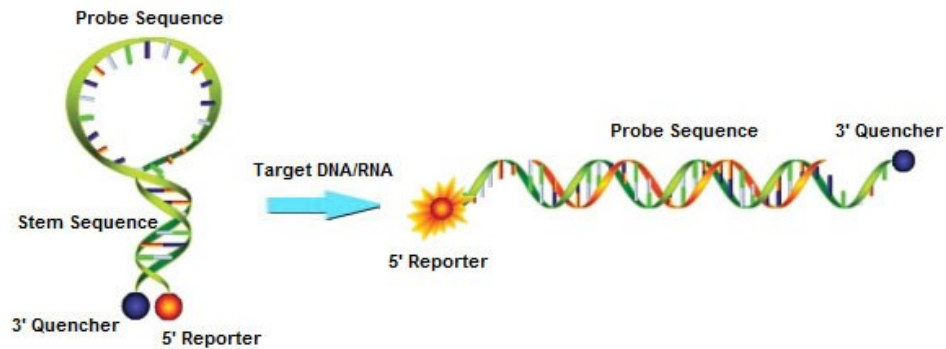


Fig.8. Rappresentazione di una sonda Molecular Beacons. Immagine tratta da: <https://www.biosyn.com/molecular-beacons.aspx>.

Nel caso in cui non è disponibile alcun prodotto di amplificazione PCR per il legame, la sonda ritorna nella sua conformazione a forcina, in modo tale non si ha nessun segnale fluorescente visto la vicinanza tra il fluoroforo e la molecola quencher [44].

Le sonde Scorpion (Fig.9) sono primers di PCR con una coda “stem-loop” che contiene un fluoroforo e una molecola quencher. La coda è separata dalla sequenza del primer di PCR da un “blocker”, una modificazione chimica che impedisce alla Taq DNA polimerasi di copiare la sequenza dello Scorpion, impedendo così l’apertura non specifica del loop. Gli Scorpions differiscono dalle metodiche tradizionali dal momento che il loro meccanismo di “probing” è intramolecolare. All’inizio della qPCR, la polimerasi estende il primer PCR e sintetizza il filamento complementare della sequenza target specifica. Durante il ciclo successivo, il loop a forcina si dispiega e la regione del loop della sonda si ibrida intramolecolarmente alla sequenza target appena sintetizzata, poiché il reporter non è più in prossimità del quencher, può verificarsi l’emissione di fluorescenza. Il segnale fluorescente viene rilevato dallo strumento qPCR ed è direttamente proporzionale alla quantità di DNA target [45].

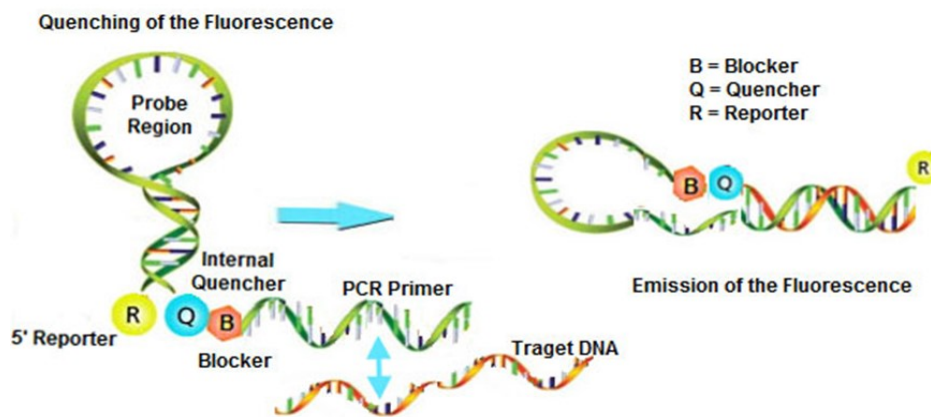


Fig.9. Rappresentazione di una sonda Scorpion. Immagine tratta da: <https://www.myebpl.com/details-of-scorpion-primers.html>.

I sistemi per Real-Time PCR sono stati migliorati con l'introduzione delle sonde di idrolisi poiché hanno reso possibile il rilevamento dei soli prodotti di amplificazione di interesse. Il sistema TaqMan®, descritto per la prima volta nel 1991 [46], si basa sull'utilizzo di un singolo oligonucleotide, che come i primer della PCR è disegnato per essere complementare alla sequenza target, marcato all'estremità 5' con il colorante reporter e all'estremità 3' con il colorante quencher. Esempi di comuni quencher utilizzati includono BHQ, TAMRA o DABCYL mentre i reporter sono più numerosi (ad esempio FAM, VIC, HEX, NED, etc.). Una combinazione popolare di coloranti è FAM o VIC per il colorante reporter e per il colorante quencher. Quando la sonda è intatta e il colorante reporter è molto vicino al colorante quencher, si avrà una fluorescenza minima o nulla a causa della soppressione della fluorescenza reporter secondo il meccanismo di trasferimento di energia FRET /dovuta a un trasferimento di energia tra i due coloranti [47]. Durante la reazione di PCR, primers e probe annilano sulle rispettive sequenze target e la DNA polimerasi estenderà il 3'-OH del primer subito a monte della sonda. In questa fase di estensione, se il probe è correttamente ibridato, la DNA polimerasi raggiungerà il terminale 5' della sonda TaqMan® iniziando a degradarla grazie alla sua attività esonucleasica 5'-3', separando il reporter dal quencher. La separazione delle due molecole, interrompe il trasferimento di energia di risonanza fluorescente eliminando, quindi, lo "spegnimento" del reporter ce è libero di emettere un segnale fluorescente. L'attività esonucleasica della Taq si ha solo se la sonda è attaccata al bersaglio (Fig.10).

L'aumento di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR che si è formato e quindi alla quantità di template iniziale, riducendo dunque, a differenza della classe di molecole intercalanti il DNA, la presenza di falsi positivi.

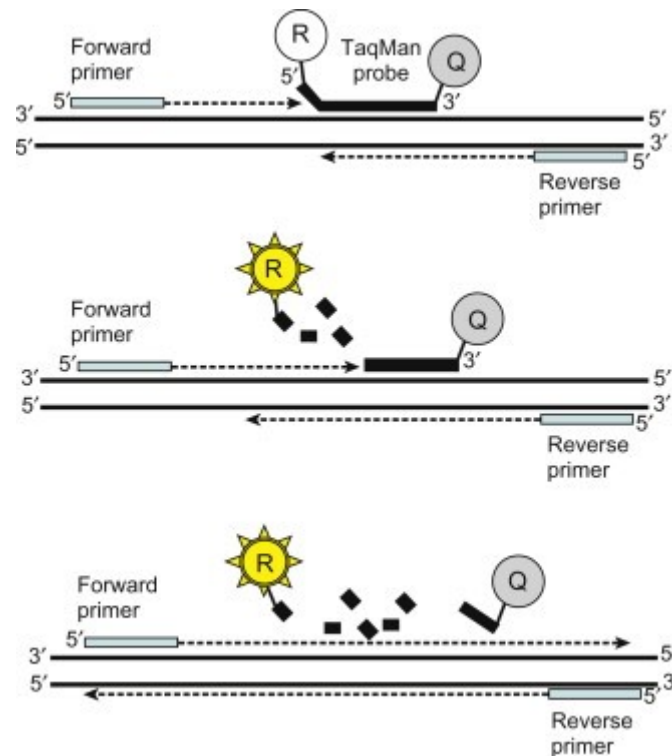


Fig.10. Rappresentazione del funzionamento di una sonda TaqMan®. Immagine tratta da [47].

Uno dei maggiori vantaggi delle sonde TaqMan® è la possibilità di allestire una reazione di PCR multiplex mediante una differente marcatura dei diversi target.

Le sonde TaqMan® possono essere di due tipi: non MGB, ovvero quelle descritte sopra e quelle invece di tipo MGB, la differenza tra le due è che la sonda TaqMan® non MGB richiede una temperatura di melting significativamente più alta di quella impiegata per la coppia di primer affinché possa avvenire l'ibridazione e la degradazione della stessa e, per tale ragione, risultano generalmente più lunghe degli stessi primer. Per l'allestimento di alcune tipologie di saggi, in cui è richiesta un'elevata specificità, l'utilizzo di una sonda lunga implica che anche un singolo mismatch di base determinerà un lieve effetto sulla stabilità di legame della sonda al target ma consentirà comunque l'annealing del probe al target e la rilevazione dei prodotti amplificati anche se si perde, in parte, la specificità della reazione. Inoltre, anche la composizione nucleotidica della

sonda risulta fondamentale in quanto l'utilizzo di sonde da stretch di guanine spesso determinano strutture secondarie le quali possono determinare una inefficiente ibridazione della sonda, così come probe costituiti da residui A/T definiranno basse temperature di melting che indurranno, di conseguenza, all'incremento del numero di basi costituenti la sonda al fine di compensare la riduzione in T_m . Oltretutto, la scelta di una regione target di DNA piccola potrebbe scontrarsi con la progettazione della sonda; infatti, quest'ultima potrebbe necessitare di una maggiore lunghezza per una efficienza ottimale. L'utilizzo delle sonde TaqMan® di tipo MGB risolve problemi di tale natura, in quanto costituite allo stesso modo della classica sonda TaqMan® ma incorpora due ulteriori tecnologie: una molecola di legame al solco minore del DNA, detta appunto MGB (Minor Groove Binding) che aumenta notevolmente la stabilità e la specificità della sonda e l'uso di un NFQ al posto del colorante quencher TAMRA che migliora le prestazioni spettrali (Fig.11). NFQ, chiamato anche "Dark Quencher", è essenzialmente un cromoforo che funge da accettore di trasferimento di energia dalla molecola reporter (che non emette un proprio segnale fluorescente rilevabile).

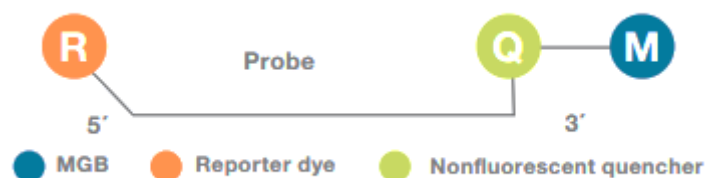


Fig.11. Rappresentazione di una sonda TaqMan®-MGB. Immagine tratta da: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FGSD%2FFlyers%2Ftaqman-mgb-probe-flyer.pdf&title=Rmx5ZXI6lFRhcU1hbiBNR0lgUHJvYmVz>.

Come con il test TaqMan® standard, quando la sonda è intatta, la vicinanza del colorante reporter al quencher sopprime la fluorescenza del reporter, principalmente tramite il trasferimento di energia di tipo Förster. Al momento del legame della sonda al DNA target, il motivo MGB si ripiega a mezzaluna all'interno del solco minore permettendo dunque di interagirvi saldamente. Tale legame aumenta la forza di interazione della sonda al DNA target determinando di fatto un innalzamento della T_m del probe stesso di circa 10°C e consentendo quindi l'impiego di sonde più corte. Tali probe infatti risultano

composti in numero variabile da 12 a 20 nucleotidi e permettono quindi di legare il target in maniera più specifica e salda, mantenendo al contempo una elevata temperatura di melting. In questo modo, singoli mismatch di base avranno un notevole impatto sulla T_m del complesso sonda-target, permettendo così una maggiore specificità di reazione. La fluorescenza del colorante reporter aumenta in ogni ciclo di PCR, riflettendo la separazione fisica del colorante reporter dal NFQ. La maggiore specificità, l'utilizzo in reazioni multiplex e la possibilità di customizzare queste sonde sono alcuni dei vantaggi delle sonde TaqMan® di tipo MGB.

2.2.3. Multiplex Real-Time PCR

La multiplex Real-Time PCR rappresenta una variante della qPCR tradizionale in cui due o più loci sono simultaneamente amplificati all'interno di una singola provetta di reazione. Tale approccio, applicato sia ai saggi qualitativi che quantitativi, è realizzabile utilizzando un numero variabile di sonde fluorescenti specifiche e dipendenti dal numero di target da identificare e, ancora più importante, è necessario che esse siano marcate con un unico fluorocromo in modo che il segnale emesso sia rilevato in maniera univoca. Per questo motivo sono necessarie strumentazioni in grado di discriminare le fluorescenze emesse dai differenti reporter i quali, legati con una sonda specifica, si ritroveranno contemporaneamente in un unico pozzetto di reazione. Il segnale di fluorescenza emesso da ciascuna sonda sarà usata per quantificare separatamente ciascun target di DNA, purché esso sia significativamente prodotto per ciascun amplicone. Questo approccio è sensibile e preciso come l'amplificazione di un singolo target (singleplex) ma è tecnicamente più complesso [48]. Principalmente i saggi multiplex offrono quattro vantaggi: i) minor utilizzo, in termini di quantità, del campione da esaminare, ii) ridotto uso dei reagenti (in relazione al numero di target analizzati), iii) incremento throughput nell'esame più campioni parallelamente e iv) maggior precisione dei risultati. Ad esempio, un esperimento condotto con un saggio duplex aumenterà il numero di informazioni ottenibili rispetto una singola reazione, ridurrà la quantità di campione richiesto e dimezzerà l'utilizzo del reagente con una conseguente riduzione dei costi. Inoltre l'amplificazione di più target simultaneamente migliora la precisione dell'analisi riducendo al minimo gli errori di pipettaggio; se i target vengono

amplificati nella stessa provetta, piccole differenze nelle quantità di campioni o reagenti in ciascuna provetta non causeranno problemi.

I numerosi vantaggi degli esperimenti qPCR multiplex sostanzialmente derivano dal fatto che tutti i target sono amplificati simultaneamente in un'unica provetta, tuttavia, queste reazioni sono in competizione per lo stesso pool di reagenti e ciò potrebbe causare la saturazione della reazione di amplificazione per uno dei bersagli che si verifica quando uno dei target risulta overespresso rispetto all'altro o agli altri presenti. Questo fenomeno è determinato dalla quantità di template di partenza, il quale, nel caso di una miscela di DNA in cui uno dei target è presente ad una differente percentuale, determinerà un'amplificazione preferenziale del target più abbondante nella miscela, che consumerà precocemente i reagenti (dNTPs e DNA polimerasi) influenzando dunque l'amplificazione del target meno abbondante. Questo problema può essere facilmente superato mediante la tecnica della "primer limitation" che comporta la riduzione della quantità di primer per il target più abbondante. La concentrazione dei primer limitati dovrebbe essere sufficiente per consentire l'amplificazione ma sufficientemente bassa da permettere alla coppia di primer di essere rapidamente utilizzata per la reazione andando a plateau precocemente e lasciando, così, una quantità sufficiente di reagenti per un'amplificazione efficiente del target meno abbondante. È molto importante, quando si pianifica un saggio multiplex, identificare quali target potrebbero causare un potenziale problema di saturazione della reazione qPCR [49].

Il tipo di multiplex più semplice e più comunemente usata è il duplex, in cui due target vengono amplificati in una singola reazione. È possibile, in condizioni accuratamente ottimizzate, eseguire qPCR multiplex per misurare simultaneamente l'espressione di tre o quattro target in una reazione. Ciò può fornire enormi risparmi in termini di costi, reagenti e tempo, ma gli esperimenti risultanti sono più complessi e la convalida diventa più dispendiosa in termini di tempo. Nell'allestimento di un saggio multiplex contenenti tre o quattro target diversi c'è ancora più competizione per il pool di reagenti inoltre, aumenta la possibilità di interazioni indesiderate tra primer e sonde; pertanto è necessario convalidare accuratamente la reazione multiplex. Da quanto detto, è facilmente intuibile che maggiori saranno i target da identificare in una reazione

multiplex maggiori saranno i problemi con cui ci si dovrà misurare per la sua implementazione [49]. Una prima limitazione deriva dall'impiego di diversi probe di ibridazione, questi richiedono l'uso di differenti fluorofori che siano tra di loro compatibili ma vi è una limitata disponibilità di reporter fluorescenti dotati di una spettrale di emissione non sovrapponibile in fase di analisi del dato. Un secondo ostacolo è legato alla strumentazione utilizzata che dovrà essere dotata di specifiche caratteristiche di eccitazione e rilevazione del segnale con conseguente impatto sulla scelta dei fluorofori da utilizzare per lo sviluppo della reazione. Le sonde TaqMan® di tipo MGB permettono di superare alcune di queste limitazioni poiché si prestano molto bene nell'impiego in reazioni multiplex, sia per l'efficienza sia per la sensibilità, ma soprattutto perché il quencher di tali sonde non emette alcuna fluorescenza o comunque non significativamente valida, minimizzando dunque il cross-talk tra i segnali e rendendo quindi possibile l'aggiunta di più fluorofori nella medesima reazione.

2.2.4. Aspetti pratici dell'ottimizzazione di un saggio Real-Time PCR

La messa a punto di un saggio qPCR è molto complessa poiché un certo numero di fattori possono influenzare l'esito finale del metodo. Parametri quali specificità di reazione, sensibilità ed efficienza sono fondamentali per il buon esito della reazione e per la validazione del metodo applicato; tuttavia, oltre a questi parametri bisogna tener presente anche una serie di accorgimenti relativamente alla concentrazione di primer e sonda da utilizzare, dei reagenti costituenti la mix di reazione e dalle condizioni di PCR da impiegare. Pertanto, è necessario che tali parametri siano settati in modo da ridurre al minimo le variazioni intrasaggio garantendo la riproducibilità del metodo e dei risultati, nonché la sua robustezza, ovvero la capacità di non risentire in maniera significativa delle normali variazioni analitiche del saggio, particolarmente non interferendo con il Ct del test e determinando solo minime differenze nella fluorescenza registrata. Diverse sono le considerazioni da adottare per lo sviluppo di un test di quantificazione in Real-Time PCR che includono: la scelta iniziale del target, la sequenza dei diversi primer e probe (possibilità di dimerizzazione primer e probe e/o produzione di prodotti aspecifici), il tipo e la concentrazione dei reagenti (si potrebbero riscontrare fenomeni di competizione per i reagenti o di inibizione) ed il profilo termico. Per

garantire l'affidabilità dei risultati analitici, sia la progettazione del saggio che i reagenti devono essere considerati attentamente ai fini della sua validazione.

Considerazione sul template. Idealmente, la regione di DNA target da amplificare in una reazione di qPCR varia da 60-150bp in lunghezza, concretamente i frammenti di DNA da amplificare possono avere anche dimensioni maggiori ma mai oltre le 200bp. La dimensione dell'amplicone può influenzare l'efficienza e la sensibilità del saggio Real-Time PCR; ampliconi più corti consentono reazioni più rapide, una maggiore efficienza e una incrementata attività esonucleasica nel caso di utilizzo di sonde TaqMan®, questo perché ampliconi più corti tendono ad essere più tolleranti a condizioni di reazioni non ideali e permettono una maggiore probabilità di successo di ibridazione della sonda sul target. Se troppo lunghi i prodotti della PCR potrebbero non denaturarsi in modo efficiente ad ogni ciclo e potrebbero preferenzialmente reibridarsi tra loro prima che si possano legare sonde e primer al target. (ampliconi maggiori riducono notevolmente la probabilità di successo della reazione). Particolare attenzione deve essere prestata alla formazione di strutture secondarie del template. Questa è un'area in cui il design del primer e della sonda qPCR differisce leggermente dal design della PCR tradizionale, in cui le strutture secondarie non sono necessariamente un fattore critico. Template contenenti allungamenti omopolimerici superiori a quattro basi consecutive dovrebbero essere evitati. Una significativa struttura secondaria può inficiare la formazione del duplex DNA-probe e DNA-primer ed impedire la completa estensione del prodotto da parte della polimerasi [50]. Soprattutto la percentuale di residui GC sul target, la quale dovrebbe oscillare dal 40% al 60% è da tenere in considerazione per evitare la formazione di strutture secondarie. Inoltre, la sequenza target deve essere analizzata, tramite un database di sequenze come ad esempio BLAST, per l'identificazione di sequenze simili che possono interferire con la regione target scelta in modo tale da ridurre al minimo qualsiasi reattività crociata.

Disegno Primer e Probe. Primer e probe andrebbero disegnati mediante l'impiego di appositi software, facendo una particolare attenzione alla regione da amplificare la quale determinerà le dimensioni dell'amplicone. Le considerazioni di base sono le stesse per il disegno dei primer di una PCR tradizionale. Idealmente i primer dovrebbero

possedere una lunghezza tra 18 e 25bp per consentire l'utilizzo di una temperatura di annealing ragionevolmente alta durante l'amplificazione. L'utilizzo di primer più corti è sconsigliato poichè perdono di specificità di legame, per cui è sempre bene, dopo il loro disegno, controllarne la specificità complessiva mediante ricerca sul database BLAST. Le coppie di primer dovrebbero avere approssimativamente la stessa lunghezza, avere un contenuto di GC del 40-60%, idealmente in percentuale simile tra di loro evitando al contempo serie successive di tali residui (<4) particolarmente al 3'al fine di prevenire fenomeni di slippage della polimerasi e la formazione di tetraplex di Guanine. Entrambi i primer non devono possedere sequenze complementari che porterebbero alla formazione di dimeri o prive di strutture secondarie significative (hairpin), i quali inficerebbero l'efficienza di amplificazione [45]. La temperatura di melting dovrà essere inferiore a quella di una eventuale struttura secondaria del template, in modo che a quella specifica temperatura, la formazione di possibili strutture secondarie sono sfavorite durante la fase di annealing dei primer stessi. Inoltre, per i sistemi multiplex è bene abbassare di 2-4°C la temperatura di annealing in quanto, sebbene nella reazione singleplex la medesima coppia di primer dia un'efficiente amplificazione ad una determinata temperatura, evidenze mostrano che in un sistema multiplex una temperatura di annealing lievemente minore della corrispettiva in singleplex sia più performante [48]. La concentrazione ottimale dovrà sperimentalmente essere determinata e generalmente oscilla da 0.1 a 0.5 µM per ciascun primer, anche se a volte la concentrazione del primer forward e reverse può essere differente [51]. Una eccessiva concentrazione di primers avrà una influenza significativa sulla reazione poiché porterà alla formazione di aspecifici a causa di errate ibridazioni sul template (mispriming); ciò non è vero per una quantità più bassa in quanto potrebbe essere già stato registrato un segnale di amplificazione significativo ancora prima che i primer si esauriscano.

La lunghezza di un probe fluorescente dovrebbe oscillare da 20 a 30 nucleotidi in lunghezza. Sonde più lunghe potrebbero essere anche utilizzate se necessario, ma in tali casi, specialmente se si tratta di sonde di tipo TaqMan®, sarebbe consigliabile porre la molecola Quencher in mezzo alla sequenza della sonda e non all'estremo 3', al fine di rendere efficiente il trasferimento di energia. La composizione in basi dovrebbe avere

una percentuale di GC tra 30% e 70% e favorire i residui di citosina a quelli di guanina. Generalmente la temperatura di melting dovrebbe essere di circa 8-10°C maggiore rispetto a quella dei primer di amplificazione in modo da ibridare sul target prima dei primer stessi e dell'inizio della fase di estensione; oltretutto, andrebbero evitati qualsiasi self-complementary della sonda e tra essa e i primers il quale porterebbe ad una riduzione di tali reagenti nella reazione. Relativamente alla localizzazione della sonda sul target, è bene che il suo estremo 5' sia localizzato il più vicino possibile al 3'-OH del primer forward, ma senza sovrapporsi con esso, favorendo in questo modo l'attività esonucleasica della DNA polimerasi [50]. La concentrazione del probe da utilizzare dovrebbe essere messa a punto dopo l'ottimizzazione della concentrazione dei primer e comunque in un range variabile da 0.1 a 0.4 μM , utilizzando poi il valore di concentrazione che fornisce il più basso valore di Ct congiuntamente al più alto valore di fluorescenza per quel dato target [51].

Considerazioni sulla Master Mix PCR. La mix di reazione include buffer, dNTPs, DNA polimerasi e MgCl_2 , inoltre possono essere inclusi anche componenti aggiuntivi come ROX, un referente passivo utilizzato per normalizzare il segnale del reporter fluorescente, e UNG con dUTP per prevenire la contaminazione del prodotto PCR. Molte ditte produttrici di strumenti qPCR forniscono reagenti e/o sonde abbinati a particolari strumenti sebbene molti reagenti funzionino bene con una diverse strumentazioni e software di analisi. L'uso di reagenti commerciali offre numerosi vantaggi tra cui l'ottimizzazione dei vari componenti risparmiando così molto tempo e fatica oltre a garanzie di qualità e coerenza da lotto a lotto. Un'alternativa a quelle preformate e disponibili in commercio è la scelta della preparazione di una master mix di tipo in-house, poiché la messa a punto di un saggio potrebbe essere più performante per il target scelto. Un vantaggio è rappresentato da un costo minore rispetto ai reagenti preparati in-house, di contro queste master mix richiedono l'ottimizzazione dei vari componenti. Relativamente all'ottimizzazione di una multiplex Real-Time PCR bisogna tenere in considerazione alcuni elementi come ad esempio l'aumento della quantità di polimerasi e di dNTPs, tale da assicurare l'amplificazione di tutti i bersagli ricercati.

Considerazioni sui fluorofori. Nella progettazione delle sonde fluorescenti è importante considerare la scelta del fluoroforo da impiegare, è necessario i) assicurarsi che lo strumento utilizzato possa rilevare i fluorofori, ii) è importante valutare la compatibilità tra fluoroforo e quencher e iii) per le reazioni multiplex, è importante valutare lo spettro di eccitazione e di emissione delle molecole utilizzate in modo da ridurre al minimo la sovrapposizione spettrale. Affinché si verifichi il FRET le molecole, donatore e accettore, devono essere separate di circa 100 Å. Poiché un'elica occupa circa 3,4 Å, la distanza massima tra un reporter e il suo quencher su una sonda lineare non deve superare circa 30bp. Tuttavia, la fluorescenza del fluorocromo utilizzato come quencher può contribuire al segnale di fondo riducendo la sensibilità del test e rendendo più difficile il multiplexing. Queste limitazioni hanno portato all'introduzione di una classe di molecole definite Dark Quencher, la loro caratteristica è quella di assorbire l'energia emessa dal fluoroforo reporter ed emettere calore anziché fluorescenza. I primi dark quencher, come DABCYL, avevano una sovrapposizione spettrale limitata tra il colorante fluorescente e la molecola del quencher. Un'altra classe di molecole, oggi molto utilizzate, sono i Black Hole Quencher (BHQ) le quali presentano un basso o non significativo livello di fluorescenza di base e al contempo un ampio spettro di assorbimento di lunghezza d'onda. Tali molecole sono particolarmente versatili in quanto utilizzabili con diverse classi di reporter fluorescenti incrementando di fatto la possibilità di sviluppo di reazioni multiplex Real Time PCR e forniscono una maggiore sensibilità. È importante assicurarsi che il Black Hole Quencher sia abbinato alla sonda in base agli spettri di eccitazione ed emissione della sonda.

Considerazioni sul profilo termico. L'impostazione del profilo termico è molto importante per stabilire i tempi e le temperature ottimali in ogni fase del ciclo di qPCR. Esiste una correlazione tra la qualità dei risultati e i parametri impostati per le fasi di annealing e di estensione [52]. La temperatura di annealing T_a può essere tenuta costante durante i cicli oppure programmata in modo che decresca al seguirsi dei cicli (touch-down). La strategia più comune è quella di mantenere la T_a costante, senza effettuare variazioni in base al numero dei cicli; tuttavia quando si vuole promuovere l'amplificazione di determinanti frammenti, rendendo instabili eventuali appaiamenti

aspecifici, si sceglie la strategia touch-down per rendere i primi cicli di PCR molto specifici. Se da un lato, valori troppo bassi di T_a possono causare appaiamenti dei primer a sequenze di DNA non esattamente complementari, compromettendo così la specificità della reazione; dall'altro, valori troppo elevati possono ridurre il rendimento, in quanto solo una parte delle molecole del primer è in grado di innescare la polimerizzazione, data l'elevata instabilità del loro accoppiamento con il DNA stampo. Per aumentare la specificità occorre tenere in considerazione anche la durata della fase di annealing che non deve essere troppo lunga al fine di evitare appaiamenti aspecifici, solitamente si utilizzano tempi inferiori o pari a circa 30 secondi. Di norma il tempo di estensione viene calibrato in base alla lunghezza del target da amplificare, in alcuni casi può essere utile aumentare il tempo di estensione al susseguirsi dei cicli per prevenire, almeno in parte, la riduzione di concentrazione della DNA polimerasi attiva. Nei saggi multiplex, aumentare la T_a non è una strategia appropriata perché è improbabile che si abbia una temperatura di annealing uguale per tutti i target. Per i saggi TaqMan® è raccomandato un protocollo in due fasi in cui la fase di annealing ed estensione sono combinati in un unico step, ad una unica temperatura di circa 60°C, il che assicura il legame del probe alla sequenza durante la fase di estensione del primer. Questa fase garantisce anche la massima attività 5'-3' esonucleasica da parte dell'enzima [53].

2.2.5. Quantificazione assoluta vs quantificazione relativa

Il metodo della **quantificazione assoluta** prevede l'utilizzo di un campione standard ovvero un frammento di DNA a doppio filamento (dsDNA), DNA a filamento singolo (ssDNA) o cRNA recante la sequenza bersaglio [54] che consente la produzione di una curva standard definita anche curva di calibrazione, ottenuta amplificando diluizioni seriali di quantità note dello standard. I valori dei Ct generati per ciascuna curva del DNA standard vengono infatti plottati, con un intervallo di confidenza del 95%, su un grafico in rapporto alla loro concentrazione logaritmica, numero di copie o al fattore di diluizione per generare una retta di regressione lineare, detta curva di taratura o curva standard. Spesso la curva di calibrazione è rappresentata in un diagramma Ct/log (concentrazione) come mostrato in figura 12.

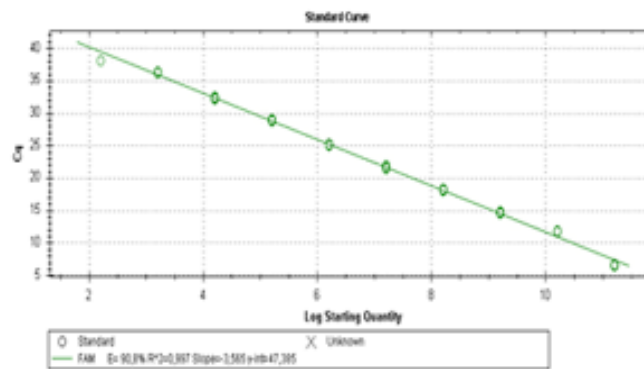


Fig.12. Rappresentazione di una retta di calibrazione. Immagine tratta da: http://www.irsa.cnr.it/images/docs/Notiz/notiz2016_1.pdf.

Le concentrazioni finali scelte per la curva standard dovrebbero comprendere valori nell'intervallo ipotizzato per il campione incognito. Essenzialmente, essendo noto il Ct di ciascuno standard e la sua concentrazione iniziale, si può facilmente ricavare la quantizzazione dei campioni ignoti interpolando il loro valore di Ct in tale curva. Il Ct rappresenta dunque un indicatore del numero di copie iniziali ed è funzione dell'efficienza della reazione; infatti in linea teorica, con un'efficienza di reazione del 100% ad ogni ciclo di PCR il numero di copie di quel target raddoppia ne deriva che un numero di copie iniziali doppio anticiperà il Ct di un ciclo, mentre un numero di copie pari a metà lo posticiperà di uno. Questo implica che Ct e concentrazione di template sono strettamente correlati: specificatamente il Ct di una curva è inversamente proporzionale al logaritmo del numero iniziale di copie. Inoltre il valore del Ct dipenderà dal threshold settato e in particolare dal momento in cui la fluorescenza diventa significativa. Fluttuazioni del segnale di fluorescenza non dovute a fenomeni di amplificazione sono sempre presenti all'interno di un saggio quantitativo e, di conseguenza, influenzeranno il valore di Ct e indirettamente anche l'efficienza. Per questi motivi, il valore di efficienza complessivo della reazione è ricavato dalla bontà della curva standard e dalla valutazione di alcuni parametri ad essa connessi quali il coefficiente di correlazione (R^2), l'intercetta nell'asse (Y) e la slope (s).

- Coefficiente di correlazione (R^2): Questo valore fornisce un parametro di misura della precisione con cui la retta approssima i dati sperimentali; rappresenta quindi una valutazione della correttezza delle diluizioni effettuate misurando la

linearità della curva standard. Quanto più R^2 è prossimo al valore 1 (valore ideale) tanto più la retta riproduce l'andamento dei dati sperimentali. Un valore $R^2 > 0.980$, indica come i valori in ordinata possano essere utilizzati per predire accuratamente i valori in ascissa. Pertanto rappresenta un indice di bontà dell'adattamento [49].

- Limite di determinazione (Y-intercetta): corrisponde al limite teorico di rilevazione della reazione di PCR, ovvero al valore di Ct al quale il più basso numero di copie di DNA target dà origine ad un segnale di amplificazione statisticamente significativo. Sebbene la metodica, in via teorica, è in grado di rilevare una singola copia di un target, un numero di copie da 2 a 10 è utilizzato come valore di riferimento che può essere affidabilmente identificato in una qPCR Real Time. Questo limite può essere anche una misura della sensibilità del metodo [49].
- Slope: corrisponde alla pendenza della retta di taratura, ovvero al numero di cicli che intercorrono tra due diluizioni dello standard, ed è una misura diretta dell'efficienza della reazione. Per ottenere dei risultati accurati e riproducibili, la reazione deve avere un'efficienza il più possibile vicino al 100%, equivalente ad uno slope di -3.32, il che significa che il DNA target raddoppia ad ogni ciclo termico, nella fase esponenziale di reazione. La formula per calcolare l'efficienza è la seguente: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Fattori sperimentali come la lunghezza, la struttura secondaria e il contenuto in GC dell'amplicone possono influenzare l'efficienza della reazione. Altre condizioni che possono influenzare la reazione, tanto da far diminuire l'efficienza sotto il 90%, sono la dinamica della reazione stessa, l'uso di concentrazioni non ottimali di reagenti e la qualità dell'enzima. La presenza di inibitori di PCR, nei reattivi o nel campione, può produrre, invece, un'efficienza superiore al 110%. Una buona reazione deve avere un'efficienza compresa tra il 90% e il 110%, che corrisponde ad avere uno slope compreso tra -3.58 e -3.10 [49].

Affinché la quantificazione corrisponda quanto più fedelmente alla vera concentrazione di template, risulta utile allestire una curva standard caratterizzata da un minimo di 5

logaritmi di concentrazione e almeno 2 replicati per ciascun logaritmo. Questo si rende necessario in quanto, se la reazione venisse allestita con un numero minore di replicati insieme ad un ristretto intervallo di logaritmi di concentrazione, la variazione di slope e quindi di efficienza di reazione risentirebbe di notevoli fluttuazioni statistiche agenti sul fattore di diluizione del singolo campione. Massimizzare dunque il numero di standard diluiti, incrementa il cosiddetto range dinamico del saggio e la sua precisione, riducendo la variazione matematica per campione intesa come deviazione standard (DS). Generalmente un valore di efficienza compresa tra il 90% e il 110% è indicatore di una buona reazione il che equivale ad un valore di slope tra -3.58 e -3.10; valori maggiori di efficienza sono spesso riferibili a errori procedurali o a coamplificazione di prodotti non specifici. Dopo la validazione le curve di calibrazione sono altamente riproducibili e permettono la creazione di dati altamente specifici e sensibili [55].

La **quantificazione relativa** analizza i cambiamenti di livello di espressione di un gene target in più campioni rispetto a un controllo interno, ovvero un gene di riferimento (reference gene) che può essere co-amplificato insieme al target di interesse. Per gene di riferimento si intende un gene il cui livello di espressione rimane costante in tutti i campioni del test, e la cui espressione non è influenzata dal trattamento sperimentale di cui si vuole studiare gli effetti. L'utilizzo di un gene di riferimento è vantaggioso nei casi dove non è possibile una precisa quantificazione del materiale di partenza e quando è disponibile solo una piccola quantità di template iniziale. Il calibratore si impiega nel confronto tra campioni multipli; l'espressione del gene target in tutti i campioni è rappresentata da un incremento o decremento relativo rispetto al calibratore. Abitualmente viene scelto come calibratore il campione in condizione di assenza di trattamento, chiamata anche condizione di controllo. Quando si utilizza un calibratore, i risultati sono espressi come rapporto target /riferimento. Per calcolare l'espressione di un gene target in relazione a un gene di riferimento sono stati proposti vari modelli matematici. I calcoli si basano sul confronto di distinti cicli, ad esempio i valori soglia corrispondenti ad un livello costante della fluorescenza o l'acquisizione di Ct rispettando un determinato algoritmo matematico. In questo tipo di analisi il risultato che si ottiene è un rapporto (ratio). Ad oggi sono stati sviluppati diversi modelli matematici che determinano l'espressione relativa Sono

disponibili numerosi modelli matematici per calcolare l'espressione genica normalizzata media dai saggi di quantificazione relativa [55].

2.2.6. Validazione di un saggio Real-Time PCR

La validazione rappresenta la parte finale della messa a punto di un saggio e prende in considerazione diversi parametri, la cui applicazione risulterà dipendente dagli obiettivi e dai risultati che si intende raggiungere. Essa non segue infatti dei principi guida ufficiali relativi al workflow da impiegare, ma solo delle indicazioni alla verifica mediante specificazione di alcune grandezze che definiscono la bontà del metodo analitico utilizzato, la cui scelta spetterà all'operatore. Nello specifico questi parametri sono rappresentati:

- **Robustezza:** indica la capacità del metodo di non risentire di piccole variazioni dei parametri sperimentali, come ad esempio: pH, temperatura, lotto dei reagenti;
- **Precisione:** rappresenta il grado di concordanza tra i risultati ottenuti da una serie di prove indipendenti, realizzate tutte con lo stesso metodo e nelle stesse condizioni sul medesimo campione. La precisione può essere espressa come misura della deviazione standard e include i concetti di ripetibilità e riproducibilità;
- **Specificità:** capacità di un metodo di individuare in modo selettivo un determinato target in presenza di altre sostanze interferenti nel campione da analizzare;
- **Limite di rilevabilità (LOD):** Il limite di rivelabilità di una procedura analitica è la più piccola quantità di molecola target, contenuta nel campione in esame, che può essere individuata in modo significativo impiegando il metodo scelto. In pratica il LOD fornisce una stima di errore e imprecisione alle più basse concentrazioni del target di interesse, delineando dunque di fatto, in alcuni casi, una sua possibile equivalenza al LOQ.

- Limite di Determinazione o di Quantificazione (LOQ): la quantità minima di molecola bersaglio contenuta nel campione che può essere determinata mediante l'impiego del metodo scelto.

2.2.7. Linee guida MIQE

Il MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments) consiste nelle linee guida da seguire per la pubblicazione di esperimenti di Real-Time PCR. L'utilizzo di queste linee guida garantisce l'inclusione di dati e informazioni chiave nella relazione dei risultati sperimentali, così da poter valutare criticamente la qualità dei risultati presentati o ripetere gli esperimenti di altri ricercatori. Questo è risultato da un'iniziativa dell' "International Real-time PCR Data Markup Language" (RDML), un'associazione internazionale finalizzata a creare uno standard universale per permettere lo scambio di dati ottenuti tramite Real-time PCR. Le informazioni minime necessarie per valutare un esperimento di Real-time PCR comprendono una lista di tutte le condizioni sperimentali rilevanti e un'informazione completa su reagenti, sequenze e metodi di analisi utilizzati. L'utilizzo di queste linee guida è fondamentale per uniformare i dati presentati nella letteratura scientifica e permettere un'univoca interpretazione dei risultati [56]. L'RDML inoltre si adopera per creare un formato standard per i dati di Real-time PCR e uniformare la terminologia tecnica.

2.2.8. Strumentazioni per Real-Time PCR

La strumentazione per eseguire una reazione di Real-Time PCR deve essere dotata di sistema ottico, termociclatore e di un software per la raccolta e l'analisi dei dati. Il termociclatore è uno strumento di laboratorio utilizzato per automatizzare le variazioni cicliche di temperatura necessarie per eseguire una reazione di PCR. Essenzialmente è costituito da un blocco termico, dotato di alloggi per le provette contenenti i campioni, e da un sistema di riscaldamento e raffreddamento in grado di portare velocemente il blocco termico alla temperatura richiesta dalla reazione.

Il sistema ottico può essere suddiviso in due categorie: la sorgente di eccitazione e il rilevatore di emissione. La fonte di eccitazione può essere una lampada alogena o un LED ed è necessaria per eccitare i coloranti fluorescenti, mentre il rivelatore può essere costituito da un fotodiodo, che cattura le emissioni fluorescenti in tempo reale e una telecamera CCD (dispositivo di accoppiamento di camera). Il principio di funzionamento è molto semplice: il campione viene irradiato da una radiazione luminosa che dovrà possedere una lunghezza d'onda adatta ad eccitare i fluorofori presenti nella reazione selezionata tramite un primo sistema di filtri. Un sistema ottico di lenti devia e proietta la luce sulla provetta, che dopo l'irradiazione emetterà fluorescenza quest'ultima catturata da un secondo sistema di filtri. La radiazione della lunghezza d'onda di emissione arriva al rivelatore che registra i segnali di fluorescenza generati da ogni provetta o pozzetto per costruire le curve di fluorescenza. Di ogni campione. Esistono delle variazioni occasionali da imputare alle alte temperature si possono creare delle bolle d'aria nei reagenti liquidi. Questi fenomeni si trovano sul percorso della luce di eccitazione e di emissione e possono causare fluttuazioni del segnale fluorescente, influenzando la precisione dei risultati e causando variazione del valore di Ct.

Capitolo 3

SCOPO DELLA TESI

Il metodo attualmente più applicato per la quantizzazione del DNA in campo forense è la Real-Time PCR in quanto caratterizzato da una maggiore specificità e sensibilità. Questa tecnica permette di ridurre i tempi di preparazione ed analisi, ma cosa più importante permette di ottenere dei dati interpretabili utilizzando una minima quantità di DNA estratto. Inoltre, uno dei principali vantaggi della qPCR deriva dal fatto che diversi target possono essere amplificati simultaneamente in un'unica reazione. Questo è molto importante in ambito forense perché spesso i campioni sono limitati in termini di quantità, gli estratti di tali campioni sono estremamente preziosi e dovrebbero essere usati con la massima moderazione. Quantizzare il DNA umano in un campione probatorio forense prima dell'amplificazione garantisce che venga utilizzata solo la quantità necessaria di estratto per l'ottenimento di risultati interpretabili. In generale per la tipizzazione del DNA umano, in ambito forense, si predilige utilizzare il DNA nucleare ma, per alcuni campioni quali resti scheletrici, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) e capelli, questo non è possibile. Sebbene questi campioni potrebbero contenere DNA nucleare quest'ultimo potrebbe essere danneggiato, modificato e/o degradato, per questo risulterebbe utile un'analisi del DNA mitocondriale. Allo stesso modo del nDNA la quantificazione del mtDNA prima dell'amplificazione garantisce che venga utilizzato la quantità di materiale utile per l'ottenimento di un risultato e/o di un profilo comprensibile. La scarsa qualità del DNA, tuttavia, non è l'unico problema riscontrato con questi tipi di campioni, a causa della loro natura intrinseca molti campioni possono contenere inibitori della PCR. La co-estrazione di noti inibitori della PCR come acido umico, ematina e melanina può interferire con le reazioni successive. Di conseguenza, l'efficienza di amplificazione è ridotta o completamente inibita, compromettendo così la tipizzazione del DNA e l'analisi

delle sequenze. La valutazione della quantità e della qualità dell'mtDNA di un estratto del campione prima del sequenziamento potrebbe indirizzando l'analista forense verso strategie di genotipizzazione più opportune.

Per questo motivo, lo scopo di questa tesi è stato la progettazione e lo sviluppo di un saggio multiplex in Real-Time PCR, utilizzando sonde molecolari di tipo TaqMan®, che valutasse simultaneamente la quantità e la qualità sia del DNA nucleare e sia del DNA mitocondriale umano, per ottenere da pochi microlitri di estratto il maggior numero di informazioni possibili. Il saggio nello specifico è stato sviluppato per campioni forensi e consiste in 5 diversi target, tutti processati in una singola reazione. I cinque target comprendono: due regioni del DNA mitocondriale, Mt-ATP8 (143bp in lunghezza) e MtND1 (69bp in lunghezza), due regioni del DNA nucleare nel gene RNU2, la corta di 71bp in lunghezza e il frammento lungo di 181bp, unitamente a un controllo interno positivo che permette la rilevazione di eventuali inibitori presenti.

Capitolo 4

MATERIALI E METODI

4.1. Progettazione saggio Real-Time PCR

I primer e le sonde per qPCR per i target mitocondriali e il controllo positivo interno (IPC) sono stati tratti dalla letteratura [7-20-57]. I primer e le sonde per i target nucleari sono stati progettati ex novo per questo studio. Nel saggio sono presenti due diverse sonde che amplificano due frammenti di lunghezza differente del mtDNA.

Il target mitocondriale corto è lungo 69bp e si localizza all'interno del gene MT-ND1 che codifica per la proteina NADH-ubichinone ossidoreduttasi catena 1. Questo gene, che all'interno del DNA mitocondriale si trova in posizione 3307-4263, produce una proteina composta da 318 aminoacidi. La subunità ND-1 fa parte del dominio idrofobico del Complesso I, immerso nella membrana mitocondriale interna ed è costituito da sette subunità (ND1-6 e 4L). Le subunità ND1 e ND2 sono comprese nel subcomplesso alfa che si trova nell'interfaccia tra il dominio idrofilico e il dominio idrofobico.

Il target mitocondriale lungo è costituito da 143bp e si localizza sul gene Mt-ATP8 che codifica per una subunità di ATP sintasi mitocondriale. Questo gene si trova nel mtDNA in posizione 8366-8572 e fa parte del complesso V responsabile della fase finale della fosforilazione ossidativa nella catena di trasporto degli elettroni.

Il controllo positivo interno (IPC, 70bp) è introdotto nel saggio per monitorare i potenziali inibitori presenti nell'estratto di DNA. A tale scopo un oligonucleotide artificiale è stato progettato come descritto nel lavoro [20].

La determinazione del DNA mitocondriale è ottenuta tramite l'amplificazione di un genoma mitocondriale sintetico progettato per il sistema mtND1 (sonda mitocondriale corta) secondo quanto riportato nel precedente studio [57].

Per la quantificazione del DNA nucleare è stato selezionato come target il gene RNU2 (RNA, U2 small nuclear 1), poichè caratterizzato da regioni conservate tra i primati e organizzato con una ripetizione in tandem (-6 Kb ciascuna) sul braccio lungo del cromosoma 17. L'utilizzo di un gene multicopia, rispetto ad uno a singola copia permette non solo di ottenere una quantizzazione più efficiente ma anche di risolvere il problema di una possibile variazione presente nella sequenza nella regione di attacco dei primer.

Per la progettazione dei primer e delle sonde per i due target nucleari è stato utilizzato il software Primer3Plus v.2.4.2 (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) [58], uno specifico software online che permette di ottenere una serie di primer e sonde disegnati per la sequenza desiderata. La sequenza di riferimento del gene RNU2 è stata scaricata da Gene Bank (accession number: L37793.1) dal sito National Center for Biotechnology information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Per il disegno dei primer sono stati curati in particolar modo parametri quali la T_m con valori compresi tra 57-63°C, con differenza di temperatura tra le coppie dei primers di 2-3°C e di massimo 5°C tra i primers all'interno della multiplex. La lunghezza è stata contenuta tra 18 e 27 nucleotidi, con un intervallo di percentuale GC tra 20-80%. Le potenziali sequenze di primer e sonde sono state confrontate con le sequenze disponibili sul sito web del NCBI utilizzando il Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Lo scopo di questo confronto era identificare ed evitare omologie involontarie di primer e/o sonde a genomi non bersaglio che potrebbero portare a reattività incrociate indesiderate, permettendo di individuare in questo modo sequenze altamente conservate e specifiche per il target di interesse.

Inoltre è importante che le sequenze dei primers e probe non siano complementari tra loro e che abbiano una lunghezza e un rapporto GC simile, questo per evitare la formazione di dimeri che porterebbero alla formazione di prodotti di estensione aspecifici e per garantire la stessa temperatura di annealing. La valutazione dei dimeri e degli hairpin è stata fatta tramite sia il software Autodimer (<https://www.s.nist.gov/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) [59] e sia tramite il software Multiple Primer Analyzer ([47](https://www.thermofisher.com/it/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-</p></div><div data-bbox=)

resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html, Thermo Fisher Scientific).

Tutte le sequenze dei primer e probe scelti per il saggio qPCR sono riportate nella tabella 1 insieme alle sequenze dell'oligonucleotide sintetico dell'IPC e del genoma sintetico mitocondriale riportate nella tabella 2. Nella tabella 1 sono riportati i dye e quencher utilizzati per le diverse sonde, scelti in base ai canali di letture dello strumento Rotor-Gene Corbett 6000 (Qiagen) tali da non creare una sovrapposizione della fluorescenza di due diversi target nello stesso canale, alterando così il risultato di quantizzazione.

Localizzazione Gene	Sequenze primer e probe	Taglia amplicone (bp)	Ref.
MtND1	F_5' -CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-3'	69bp	[20-57]
	R_5' -GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3'		
	Probe_5' - VIC -CCA TCA CCC TCT ACA TC- MGBNFQ		
Mt-ATP8 (mt143bp)	F_5' -CCA CTG TAA AGC TAA CTT AGC ATT AAC C-3'	143bp	[7-57]
	R_5' -GTG ATG AGG AAT AGT GTA AGG AGT ATG G-3'		
	Probe_5' - FAM -CCA ACA CCT CTT TAC AGT GAA- MGBNFQ		
RNU2 (nuRNU2_181bp)	F_5' -GTG TGG ACT CTG GTG ACC TG-3'	181bp	NA
	R_5' -CTC AGC TAT CAC CTC TGC CG-3'		
	Probe_5' - Quasar 705 -TCC CAG GGC CAC CCG TAA CT- BHQ-2		
RNU2 (nuRNU2_71bp)	F_5' -TCT CGC TGT TCA ACT CCC AC-3'	71bp	NA
	R_5' -GCA AAC TGA CAC AGG AAG CG-3'		
	Probe_5' - ROX -AGG AGC GAG AAC ATG CGG TGT- BHQ-2		
IPC	F_5' -ATC AGC TTA GCG TGC AGT CA-3'	70bp	[20]
	R_5' -TCT TCG TCG TAA CGG TGA GC-3'		
	Probe_5' - Cy5 -GTT GCA CTA CTT CAG CGT CCC A- BHQ-2		

Tab.1. Sequenze primer e sonde utilizzate per lo studio. In grassetto sono indicati i dye e i quencher utilizzati per le diverse sonde.

	Concentrazione finale	Sequenze primer e probe	Ref.
OLIGO IPC	0.001 nM	5'-ATC AGC TTA GCG TGC AGT CAG ATA ATG TTG CAC TAC TTC AGC GTC CCA AGC TCA CCG TTA CGA CGA AGA G-3'	[20]
OLIGO MITO	Da 600000a 960 cps/μl	F_5' -GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG TCG GGG CGG TGA TGT AGA GGG TGA TGG TAG ATG TGG CGG GTT TTA GGG-3'	[20]
		R_5' -CCC TAA AAC CCG CCA CAT CTA CCA TCA CCC TCT ACA TCA CCG CCC CGA CCT TAG CTC TCA CCA TCG CTC-3'	

Tab.2. Sequenze dell'oligonucleotide sintetico dell'IPC e del genoma sintetico mitocondriale.

4.2. Allestimento reazione qPCR

Preparazione dello standard G1521 Human Genomic DNA Female. Per l'allestimento della multiplex Real-Time PCR un DNA genomico umano pre-quantificato disponibile in commercio, il G1521 Human Genomic DNA Female (Promega), è stato utilizzato come standard di quantificazione. La curva standard è stata realizzata diluendo in modo seriale il DNA genomico standard partendo da una concentrazione iniziale di 62.5 ng/μl fino a 0.0008 ng/μl, in totale otto diluizioni standard sono preparate e analizzate in triplicato (Tab.3). Per la preparazione del primo standard occorre verificare la concentrazione dello standard G1521 acquistato e preparare la prima diluizioni a 62.5 ng/μl, lo standard da noi acquistato aveva una concentrazione pari a 174 ng/μl.

Conc. [ng/μl]	Volume G1521	Volume TE
62.5 ng/μl	Diluizione basata sullo standard G1521 acquistato	
12.5 ng/μl	5 μl della diluizione 62.5 ng/μl	20 μl
2.5 ng/μl	5 μl della diluizione 12.5 ng/μl	20 μl
0.5 ng/μl	5 μl della diluizione 2.5 ng/μl	20 μl
0.1 ng/μl	5 μl della diluizione 0.5 ng/μl	20 μl
0.02 ng/μl	5 μl della diluizione 0.1 ng/μl	20 μl
0.004 ng/μl	5 μl della diluizione 0.02 ng/μl	20 μl
0.0008 ng/μl	5 μl della diluizione 0.004 ng/μl	20 μl

Tab.3. Diluizioni seriali del G1521 Human Genomic DNA Female standard.

Preparazione oligonucleotide sintetico IPC. Diluire l'oligonucleotide sintetico a una concentrazione di 100μM, corrispondenti a 6×10^{13} copie/μl, come da indicazioni della ditta produttrice. Preparare delle diluizioni seriali fino a raggiungere una concentrazione di 600.000 copie/μl.

Preparazione oligonucleotide mitocondriale e protocollo reazione qPCR. Al fine di calcolare la quantità di equivalenti del genoma mitocondriale (mtGE) presenti nelle diluizioni dello G1521 Human Genomic DNA Female standard, 1μl del forward e 1 μl del complementare dell'oligonucleotide progettato per il sistema mtND1 sono stati combinati per simulare il DNA a doppia elica e utilizzati come mtDNA standard.

L'oligonucleotide mtND1 e il complementare sono stati ordinati a una concentrazione di 100 μ M corrispondente a 6.0 \times 10¹³ copie/ μ l. Cinque diluizioni seriali, a partire 600.000 copie "a doppio filamento"/ μ l fino a 960 copie/ μ l, sono state utilizzate come curva standard per calcolare la quantità di mtGE presenti nelle diluizioni dello standard G1521. Il protocollo di reazione qPCR per l'oligonucleotide mitocondriale è riportato nella tabella 4, tutte le reazioni sono state condotte in un volume finale di 20 μ l.

	Conc. Iniziale (μ M)	Conc. finale (nM)	Volume (μ l)
4x Quantinova Multiplex PCR MM			5
mtND1-primer Fw	6.25	312.5	1
mtND1-primer Rv	6.25	312.5	1
mtND1-probe	2	100	1
Standard mitoligo o standard G1521*			2
H ₂ O			10

Tab.4. Protocollo per allestimento della reazione mitoligo.

*Diluizioni seriali Mitoligo dalla prima alla quinta, diluizioni dalla prima all'ottava dello standard G1521.

Protocollo reazione qPCR per 5 target. Tutte le reazioni sono state condotte in un volume finale di 20 μ l, contenente 2 μ l di campione o standard e 5 μ l di 4x Quantinova Multiplex PCR Mastermix (Qiagen). I volumi e le concentrazioni di primer e sonde per tutti target sono riportate nella tabella 5.

	Conc. Iniziale (μ M)	Conc. finale (nM)	Volume (μ l)
4x Quantinova Multiplex PCR MM			5
IPC- primer Fw	4	100	1
IPC- primer Rv	4	100	1
IPC-probe	4	100	1
IPC-oligo	600.000	600.000	1
nuRNU2_71bp- primer Fw	20	900	0.9
nuRNU2_71bp- primer Rv	20	900	0.9
nuRNU2_71bp- probe	10	500	1

nuRNU2_181bp- primer Fw	20	900	0.9
nuRNU2_181bp- primer Rv	20	900	0.9
nuRNU2_181bp- probe	10	500	1
mtND1-primer Fw	6.25	312.5	1
mtND1-primer Rv	6.25	312.5	1
mtND1-probe	2	100	1
mt143bp- primer Fw	12.5	312.5	0.5
mt143bp- primer Rv	12.5	312.5	0.5
mt143bp- primer probe	4	100	0.5
Standard o campione			2
H ₂ O			0.4

Tab.5. Protocollo per allestimento della reazione di qPCR.

L'amplificazione e il rilevamento della fluorescenza sono stati eseguiti utilizzando il Rotor-Gene 6000 Corbett (Qiagen). Le condizioni della PCR sono state le seguenti: 95°C per 2 min per la denaturazione e l'attivazione della polimerasi, come indicato nel manuale del kit QuantiNova Multiplex PCR Kits [60] utilizzato per lo studio, e 40 cicli a 95°C per 3 secondi e 60°C per 30 secondi. La combinazione dello step di annealing ed estensione è raccomandato per i saggi Real-Time PCR in cui si utilizzano sonde TaqMan® per una maggiore specificità dei prodotti di amplificazione. Il kit QuantiNova Multiplex PCR [60] consente una quantificazione rapida e affidabile di un massimo di 5 target di cDNA o gDNA in una singola provetta. La Quantinova DNA polimerasi è un enzima hot start che a temperatura ambiente è nella forma inattiva e non ha attività enzimatica, questo grazie alla tecnologia Q-bond, un sistema di anticorpi che "avvolgono" l'enzima così da mantenerlo inattivo fino al raggiungimento dei 95°C, temperatura a cui gli anticorpi si denaturano lasciando libera la polimerasi di agire. Questo meccanismo previene la formazione e l'estensione degli aspecifici durante la fase di denaturazione.

Il Rotor-Gene 6000 Corbett è uno strumento per Real-Time PCR che tramite l'innovativo formato rotatorio rende possibile l'acquisizione di dati qualitativamente ottimi in quanto assicura l'uniformità della temperatura in tutti i campioni, elemento critico in ogni studio molecolare. Come mostrato in figura 13, i campioni vengono eccitati dal

fondo della camera attraverso un LED, l'energia viene trasmessa attraverso la base delle provette e la fluorescenza emessa passa attraverso i filtri di emissione ai lati della camera e viene catturata da un fotomoltiplicatore. Il percorso ottico fisso assicura l'uniforme eccitazione di ogni singolo campione durante la rotazione nella camera. Questo evita la necessità dell'utilizzo di un fluoroforo passivo di riferimento come il ROX.

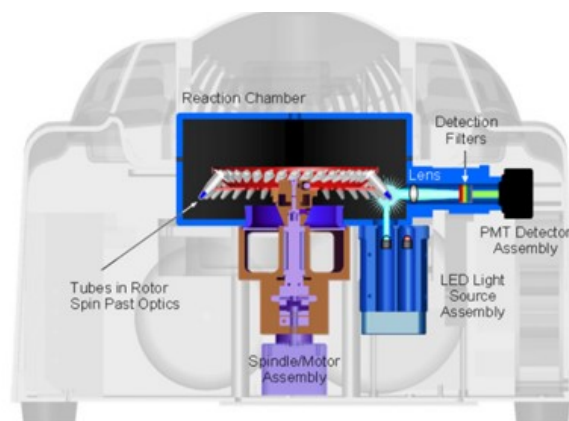


Fig.13. Illustrazione del sistema ottico del Rotor-Gene 6000 Corbett (Qiagen).

Un vantaggio di questo strumento, rispetto ad altri presenti in commercio, è la possibilità di acquisire fino a 6 canali diversi ovvero permette di scegliere fino a 6 fonti di eccitazione e 6 filtri di lettura differenti (Fig.14). Questa caratteristica è essenziale per i saggi multiplex ovvero saggi multitarget che analizzano contemporaneamente più target in provette singole, utilizzando primer e sonde diversi. Le sonde recano un'etichetta in cui sono riportati coloranti specifici, che vengono sottoposti ad annealing secondo le diverse sequenze dei target. Il rilevamento viene eseguito tramite i diversi canali cromatici.

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ⁱ , SYBR Green 1 ⁱ , Fluorescein, EvaGreen ⁱ , Alexa Fluor 488 ⁱ
Yellow	530nm	555nm	JOE ⁱ , VIC ⁱ , HEX, TET ⁱ , CAL Fluor Gold 540 ⁱ , Yakima Yellow ⁱ
Orange	585nm	610nm	ROX ⁱ , CAL Fluor Red 610 ⁱ , Cy3.5 ⁱ , Texas Red ⁱ , Alexa Fluor 568 ⁱ
Red	625nm	660nm	Cy5 ⁱ , Quasar 670 ⁱ , Alexa Fluor 633 ⁱ
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ⁱ , Alexa Fluor 680 ⁱ
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ⁱ , EvaGreen ⁱ

Fig.14. Canali e dyes utilizzabili sullo strumento Rotor-Gene 6000 Corbett (Qiagen).

4.3. Campioni selezionati per lo studio

Con l'obiettivo di valutare la performance del saggio multiplex sono stati testati 46 campioni forensi costituiti da denti (n=9), ossa (n=11), tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) (n=4), unghie (n=6) e fusti di capelli (n=16). Su questi campioni era già stata precedentemente valutata la quantizzazione del DNA nucleare utilizzando il sistema Plexor® HY (Promega) e il Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit (Thermo Fisher Scientific). Inoltre sono stati tipizzati i microsatelliti autosomici e, sui campioni più critici, è stato eseguito il sequenziamento del DNA mitocondriale. Le metodiche utilizzate per tali analisi vengono di seguito descritte. Nella tabella 6 sono riportati i campioni utilizzati nello studio e per ognuno di essi indicato il metodo di estrazione e la matrice biologica di appartenenza.

Matrice	Campione	Metodo estrazione
Denti	5877	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6587-2	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6587-1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5672-2	QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)
	7220-A	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	7253-1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5876	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	7064-A	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6244	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
FFPE	6950 A	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6950 F	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6267-B	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)
	6295	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen)
Unghie	6413-B	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6170-1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6863-1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6290-A	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5869	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1989-A	Qiagen Investigator
Ossa	6344	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	2576	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5894-B	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit

	5883	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	7065-A2	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6259 D	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6259 A	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6916	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5903	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6001-C	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5775	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
Fusti capelli	1_H1.1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H1.5	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H1.9	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H2.1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H2.5	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H2.9	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H3.1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H3.5	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	1_H3.9	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	M5 GHEP 2016	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	6864-3	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5898	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5899-1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5899-2	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5900-1	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit
	5900-2	Promega Maxwell® LEV e DNA IQ™ Casework Pro Kit

Tab.6. Campioni utilizzati nello studio, matrice di provenienza e metodo di estrazione.

4.4. Estrazione dei campioni

4.4.1. Estrazione automatizzata con Maxwell FSC DNA IQ™

Per l'estrazione di DNA da resti scheletrici calcificati (ossa e denti) è necessaria una fase preliminare di demineralizzazione del campione. Le fasi della demineralizzazione e dell'estrazione realizzata tramite lo strumento Maxwell16 (Promega), con configurazione LEV, sono riportate di seguito:

1. La superficie della porzione di osso o dente viene ripulita da residui di tessuti molli o altre incrostazioni tramite un bisturi sterile, eventualmente tamponabile

con ipoclorito di sodio decontaminato e lasciarlo completamente ad asciugare a temperatura ambiente. Dopo questa prima fase, si passa alla polverizzazione del campione tramite lo strumento Tissue LyserII (Qiagen) settando lo strumento ad una frequenza di 30Hz e per 30 secondi.

2. Aggiungere al campione 400 μ l di Demineralization Buffer, 40 μ l di Proteinasi K e 10 μ l di 1-thioglycerolo;
3. Incubare il campione a 56°C, tenendolo in agitazione a 1000rpm per circa 2.5 ore;
4. Dopo aver centrifugato il campione per 5 minuti a 11000rpm, trasferire il sovrantante in una nuova eppendorf e aggiungere 792 μ l di Lysis Buffer e 8 μ l di 1-thioglycerolo;
5. Trasferire il campione così preparato in una Maxwell16 LEV cartridges, posizionare un plunger per ogni campione ed un elution tube codificato col codice del campione davanti ogni Maxwell16 LEV cartridge, nell'apposito alloggiamento ed aliquotare 50 μ l di Elution Buffer.

4.4.2. Estrazione DNA con QIAamp® DNA Micro kit

L'estrazione del DNA genomico tramite QIAamp® DNA Micro kit [61] (Qiagen) prevede una fase iniziale di lisi cellulare, necessaria per il rilascio dell'acido nucleico, che avviene in condizioni denaturanti ad alta temperatura; il passaggio del lisato attraverso una colonnina e il legame del DNA alla matrice silicea della colonnina. Successivamente si effettuano diversi lavaggi e infine si eluisce il DNA con un buffer o semplice acqua distillata. I passaggi della procedura sono riportati di seguito (Fig.15):

1. Mettere al massimo 10 mg di tessuto all'interno di una provetta tipo eppendorf e aggiungere 180 μ l Buffer ATL e 20 μ l di proteinasi K;
2. Incubare a 56°C finchè il tessuto non è completamente digerito;
3. Aggiungere 200 μ l Buffer AL e vortexare;
4. Aggiungere 200 μ l di etanolo assoluto, vortexare e incubare 5 min a T ambiente;
5. Trasferire il campione in una colonnina e centrifugare per 1 min a 8000 rpm;
6. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW1 e centrifugare per 1 min a 8000 rpm;
7. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW2 e centrifugare per 1 min a 8000 rpm;

8. Centrifugare per 3 min a 14000 RPM per asciugare completamente la membrana;
9. Aggiungere 20-100 μl di buffer AE e incubare 1 min a T ambiente;
10. Centrifugare per 1 min a 14000 rpm.



Fig.15. Protocollo d'estrazione del DNA con QIAamp DNA Micro kit [61]. Immagine tratta da [61].

4.4.3. Estrazione DNA con QIAamp® DNA Investigator kit

Il protocollo di estrazione QIAamp® DNA Investigator kit (Qiagen) [62], segue i passaggi principali dell'estrazione QIAamp® DNA Micro kit [61]. Le uniche differenze le riscontriamo negli ultimi passaggi. Dopo il secondo lavaggio con il buffer AW2, viene effettuato un ulteriore lavaggio della colonnina con 700 μl di etanolo, eliminando lo scarto dopo la centrifugazione. La fase finale di eluizione del DNA viene effettuata come nel protocollo QIAamp® DNA Micro kit [61] utilizzando 20-100 μl di buffer ATE o acqua distillata.

4.4.4. Estrazione DNA con QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit

La procedura QIAamp® DNA FFPE Tissue kit [63] consiste in 6 fasi (Fig.16):

1. Rimuovere la paraffina: la paraffina viene sciolta in xilene e rimossa;
2. Lisi: il campione viene lisato in condizioni di denaturazione con proteinasi K;
3. Calore: l'incubazione a 90 ° C inverte la reticolazione della formalina;
4. Legame: il DNA si lega alla membrana e gli agenti contaminanti fluiscono attraverso;
5. Lavaggio: i contaminanti residui vengono lavati via;
6. Eluito: il DNA puro e concentrato viene eluito dalla membrana.

I passaggi della procedura sono riportati di seguito (Fig.16):

1. Utilizzando un bisturi, tagliare la paraffina in eccesso dal blocco campione e tagliare fino a 8 sezioni con uno spessore di 5-10 μm , se la superficie del campione è stata esposta all'aria, scartare le prime 2-3 sezioni;

QIAamp DNA FFPE Tissue Procedure

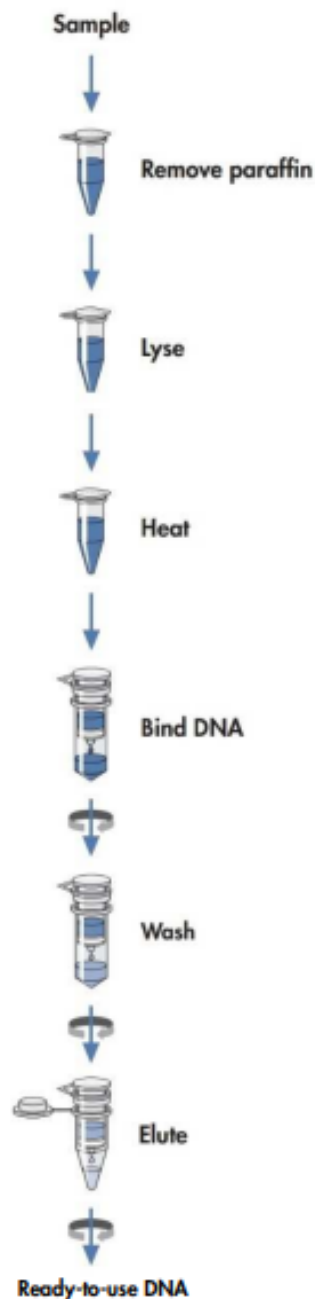


Fig.16. Protocollo d'estrazione del QIAamp® DNA FFPE Tissue kit [63]

2. Posizionare immediatamente le sezioni in una provetta da 1,5 o 2 mL e aggiungere 1 ml di xilene al campione. Agitare vigorosamente per 10 secondi e centrifugare alla massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.
3. Dopo aver rimosso il surnatante, aggiungere 1 ml di etanolo (96-100%) al pellet e mescolare agitando su vortex. Centrifugare alla massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente. Rimuovere ogni residuo di etanolo e incubare a temperatura ambiente la provetta aperta fino a che tutto l'etanolo residuo è evaporato.
4. Risospendere il pellet con 180 μl di buffer ATL e 20 μl di proteinasi K. Incubare a 56°C fino a quando il campione non è completamente lisato.
5. Incubare a 90°C per 1 h. Al termine aggiungere 200 μl di buffer AL al campione e 200 μl etanolo (96-100%) e mescolare.
6. Dopo una breve centrifuga, trasferire l'intero lisato in una colonnina QIAamp MinElute e centrifugare per 1 min a 8000 rpm;
7. Aggiungere 500 μl di Buffer AW1 e centrifugare per 1 min a 8000 rpm;
8. Aggiungere 500 μl di Buffer AW2 e centrifugare per 1 min a 8000 rpm;
9. Centrifugare per 3 min a 14000 rpm per asciugare completamente la membrana;

10. Aggiungere 20-100 μ l di buffer AE e incubare 1 min a T ambiente;
11. Centrifugare per 1 min a 14000 rpm.

4.4.5. Estrazione capelli automatizzata con Maxwell FSC DNA IQ™

Prima dell'estrazione del DNA, i fusti dei capelli sono stati decontaminati utilizzando una soluzione di etanolo al 70% per 5 min, e sottoposti poi a tre risciacqui con acqua ultrapura. Infine, i campioni sono tagliati in porzioni da 0.5 cm ciascuno, in modo che, durante l'estrazione, tutti i frammenti siano coperti dai reagenti. Il processo di estrazione è semiautomatico ovvero ad una prima fase di lisi manuale segue il processamento dei campioni tramite lo strumento Maxwell FSC DNA IQ™ secondo il protocollo DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 [64].

Per ogni campione aggiungere 386 μ l di Casework extraction buffer, 10 μ l di Proteinasi K e 4 μ l di 1-Tioglicerolo, vortexare alla massima velocità per mescolare bene;

1. Incubare il campione sul thermomixer a 56°C in agitazione per 1 ora;
2. Aggiungere 200 μ l di Lysis buffer +100 μ l di DTT;
3. Posizionare le Maxwell16 LEV cartridges sul supporto, e aggiungere il campione nel pozzetto 1 e posizionare un plunger nel pozzetto 8;
4. Posizionare un elution tube in cui sono stati aliquotati 50 μ l di Elution Buffer;
5. Porre sullo strumento e seguire le istruzioni.

4.5. Quantizzazione del DNA

Nella tabella 7 sono riportati i campioni selezionati per lo studio e i corrispondenti metodi di quantizzazione. In tabella non sono presenti i n=9 fusti di capelli, poiché per questi campioni non è stata eseguita una precedente quantizzazione.

Matrice	Campione	Metodo quantizzazione
Denti	5877	Plexor® HY System
	6587-2	Plexor® HY System
	6587-1	Plexor® HY System
	5672-2	Plexor® HY System
	7220-A	Plexor® HY System
	7253-1	Plexor® HY System

	5876	Plexor® HY System
	7064-A	Plexor® HY System
	6244	Plexor® HY System
FFPE	6950 A	Plexor® HY System
	6950 F	Plexor® HY System
	6267-B	Plexor® HY System
	6295	Plexor® HY System
Unghie	6413-B	Plexor® HY System
	6170-1	Plexor® HY System
	6863-1	Plexor® HY System
	6290-A	Plexor® HY System
	5869	Plexor® HY System
	1989-A	Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit
Ossa	6344	Plexor® HY System
	2576	Plexor® HY System
	5894-B	Plexor® HY System
	5883	Plexor® HY System
	7065-A2	Plexor® HY System
	6259 D	Plexor® HY System
	6259 A	Plexor® HY System
	6916	Plexor® HY System
	5903	Plexor® HY System
	6001-C	Plexor® HY System
	5775	Plexor® HY System
Fusti capelli	M5 GHEP 2016	Plexor® HY System
	6864-3	Plexor® HY System
	5898	Plexor® HY System
	5899-1	Plexor® HY System
	5899-2	Plexor® HY System
	5900-1	Plexor® HY System
	5900-2	Plexor® HY System

Tab.7. Campioni forensi esaminati e corrispondente metodo di quantizzazione utilizzato precedentemente.

4.5.1. Quantificazione con Plexor® HY System

Tutti i campioni forensi, eccetto uno, sono stati sottoposti a quantificazione mediante il Plexor® HY System kit (Promega) [65] utilizzando lo strumento Rotor-Gene Corbett 6000 Series Detection System (Qiagen), seguendo il protocollo Plexor® HY System for the Corbett Rotor-Gene 6000 Series Detection System.

Il sistema Plexor® HY è un sistema di Real-Time PCR per la quantificazione simultanea del DNA umano totale (autosomico) e maschile (Y) all'interno di un campione. Questa tecnologia si basa sull'impiego di due nucleotidi modificati che interagiscono tra loro in maniera specifica. Uno dei primer di PCR contiene, all'estremità 5', un nucleotide modificato (iso-dC) legato ad un marcatore fluorescente che emette fluorescenza in assenza di una molecola quencher. Un secondo nucleotide modificato, iso-dGTP, legato al quencher dabcyll, è presente nel mix di reazione (Fig.17). Nel corso della reazione di PCR il nucleotide dabcyll-iso-dGTP viene incorporato nel frammento neo-sintetizzato in quanto complementare al residuo iso-dC presente nel primer marcato. L'incorporazione di dabcyll-iso-dGTP risulta in un trasferimento di energia (Förster resonance energy transfer: FRET) dal fluorocromo legato al nucleotide iso-dC al quencher del nucleotide iso-dGTP incorporato e, di conseguenza, in una riduzione della fluorescenza rilevata.

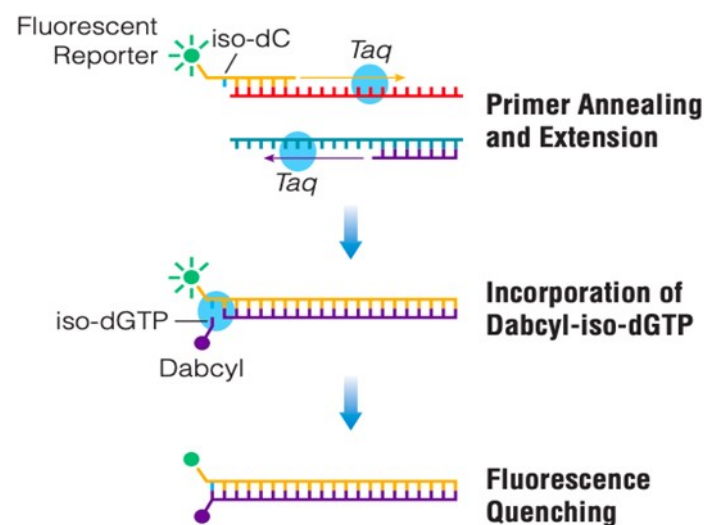


Fig.17. Meccanismo di azione del sistema Plexor® HY. Immagine tratta da [65].

Utilizzando la tecnologia Plexor, l'accumulo di prodotti di PCR è rilevato sottoforma di diminuzione della fluorescenza rilevata dallo strumento. Il punto sulla curva in cui la diminuzione di fluorescenza comincia ad essere rilevabile dallo strumento, solitamente alcuni scarti quadratici medi sotto la linea di base, è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct). Il valore di Ct dipende dalla quantità di DNA template presente nel campione e dall'efficienza della PCR. Un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di

calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. Per effettuare una quantificazione assoluta della concentrazione del DNA si deve produrre una curva standard di calibrazione utilizzando dei campioni la cui concentrazione assoluta sia nota. Il DNA utilizzato come standard è il Plexor® HY Male Genomic DNA Standard, concentrato 50 ng/μl, fornito insieme al kit, utilizzato per generare la curva di calibrazione. Questo standard è una miscela di DNA di diversi DNA maschili umani e non è derivato da linee cellulari. Per la reazione di Real-Time PCR è essenziale preparare delle diluizioni seriali dello standard a partire da 50 ng/μl fino a 3.2 pg/μl come riportato in tabella 8.

Conc. [ng/μl]	Volume Plexor® HY Male Genomic DNA Standard	Volume TE
50 ng/μl	Plexor® HY Male Genomic DNA Standard non diluito	0 μl
10 ng/μl	10 μl del Plexor® HY Male Genomic DNA Standard non diluito	40 μl
2 ng/μl	10 μl della diluizione 10 ng/μl	40 μl
0.4 ng/μl	10 μl della diluizione 2 ng/μl	40 μl
0.08 ng/μl	10 μl della diluizione 0.4 ng/μl	40 μl
0.016 ng/μl	10 μl della diluizione 0.08 ng/μl	40 μl
0.0032 ng/μl	10 μl della diluizione 0.016 ng/μl	40 μl

Tab.8. Diluizioni seriali del Plexor® HY Male Genomic DNA standard come indicato nel manuale [65].

Preparare la mix di reazione ottenuta dalla combinazione di Plexor® HY 2X Master Mix, Plexor® HY 20X Primer/IPC Mix e acqua, nelle quantità indicate nella tabella riportata qui di seguito (Tab.9):

Plexor® HY 2X Master Mix	Plexor® HY 20X Primer/IPC Mix	Acqua	Standard/ Template DNA	Volume di reazione finale
10	1	7	2	20

Tab.9. Volumi delle componenti necessari per la reazione di qPCR Plexor® HY [65].

È possibile preparare la mix di reazione complessivamente semplicemente moltiplicando le quantità di reagenti per il numero di campioni da esaminare, e dopo un'averne aliquotata 18μl in ogni provetta aggiungere 2 μl di DNA standard o di campione. Di fondamentale importanza è anche la presenza di un controllo negativo, in cui non è

presente DNA, ma questo viene sostituito da tampone TE, al fine di verificare la presenza di contaminazioni. Trasferire le provette in cui è stata allestita la reazione sul rotore del Rotor Gene e avviare il software Rotor-Gene 6000 Series Software v. 2.1.0 (Qiagen) in cui si inseriranno il nome e la tipologia dei campioni (standard, unknown, NTC e none per le posizioni vuote del rotore) e la concentrazione (ng/ μ l) dei DNA standard nella tabella "Sample".

Il Plexor[®] HY System utilizza tre sonde [65]:

- Verde (fluorescein dye) usata per rilevare un target del DNA autosomico, che amplifica una regione di 99bp sul cromosoma 17 ed è utilizzata come indicatore della totale quantità di DNA umano nel campione.
- Gialla (CAL Fluor[®] Orange 560 dye) usata per rilevare il cromosoma Y, che amplifica una regione di 133bp specifica su questo cromosoma, ed è utilizzata come indicatore della presenza di DNA maschile.
- Arancione (CAL Fluor[®] Red 610 dye) serve per rilevare la presenza di IPC, il controllo interno di PCR. Il primer specifico amplifica una sequenza di DNA di 150bp che viene aggiunta nella soluzione di reazione a ciascun campione. Se l'IPC non viene amplificato significa che nel campione sono presenti inibitori di PCR che impediscono la reazione.

4.5.2. Quantificazione con Quantifiler[™] Trio DNA Quantification kit

La precedente quantificazione del campione 1989-A è stata eseguita attraverso il Quantifiler[™] Trio DNA Quantification kit [66] (Thermo Fisher Scientific), progettato per ottenere simultaneamente una valutazione quantitativa e qualitativa del DNA umano totale e maschile in una unica reazione di qPCR. Come altri kit presenti in commercio utilizza la tecnologia delle sonde TaqMan[®] per amplificare e rilevare loci target a copia multipla, ovvero regioni target umane costituite da più copie disperse sugli autosomi e sul cromosoma Y, con l'obiettivo di ottenere una migliore sensibilità di rilevamento. Il kit rileva tre loci target specifici per l'uomo [66]:

- Small Autosomal target (SA): questo target autosomico amplifica una regione di 80bp ed è allineata con le dimensioni dei tipici loci STR “mini” e lo rende più in grado di quantizzare campioni con DNA degradato;
- Large Autosomal target (LA): questo secondo target autosomico amplifica una regione di 214bp ed è utilizzato principalmente come indicatore della degradazione del DNA, confrontando il rapporto del suo risultato di quantificazione con quello del target SA;
- Y chromosome Target: consente la quantificazione della componente genomica maschile all'interno di un campione ed è particolarmente utile nella valutazione di campioni misti maschio-femmina.

Inoltre all'interno del kit è presente un controllo interno positivo della PCR (IPC), necessario sia per confermare che la reazione di amplificazione avvenga correttamente sia per identificare eventuali inibitori di PCR e validare i risultati negativi, è costituito da: una sequenza sintetica non presente in natura, primer per amplificare un DNA template di 130bp e una sonda TaqMan sonda. Il LOQ indicato dai produttori è tra i 24pg ed i 50ng.

Prima dell'allestimento della reazione di Real-Time PCR occorre preparare 5 diluizioni seriali di uno standard a concentrazione nota (100 ng/μl) a partire da 50 ng/μl fino a 0.005 ng/μl utilizzando il Quantifiler™ THP DNA Dilution Buffer. In seguito, è possibile preparare una mix di PCR utilizzando i volumi riportati in Tab.10.

Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix	Quantifiler™ HP Primer Mix	Standard/ Template DNA	Volume di reazione finale
10	8	2	20

Tab.10. Volumi delle componenti necessari per la reazione di qPCR Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit come indicato dal manuale [66].

Trasferire la plate utilizzata per la preparazione della reazione sullo strumento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Dai risultati ottenuti è possibile risalire allo stato di conservazione del campione grazie al calcolo di un indice detto indice di degradazione (DI) del campione, espresso come rapporto tra il valore dello Small Autosomal Target e

del Large Autosomal Target. Inoltre, l'indice di degradazione può essere influenzato sia dal grado di degradazione del Large Autosomal DNA target sia dalla presenza di inibitori della PCR, che agendo con modalità diverse, possono interrompere l'amplificazione. L'indice di degradazione e l'interpretazione dell'Indice di qualità sono elencati nella tabella 11, come riportato nel protocollo del kit [66]:

Indice di degradazione (DI)	Interpretazione dell'indice di qualità
DI<1	Indica che il DNA non è degradato o inibito
1<DI<10	Indica che il DNA è da leggermente a moderatamente degradato. È possibile che ci sia una inibizione ma non è in una misura tale da compromettere l'amplificazione dell'IPC
DI>10	Indica che il DNA è notevolmente degradato. È possibile che ci sia una inibizione ma non è in una misura tale da compromettere l'amplificazione dell'IPC

Tab.11. Valori ed interpretazione dell'indice di degradazione come indicato dal manuale [66].

4.6. Tipizzazione STR autosomici

L'amplificazione del DNA estratto è effettuata in un volume di 12.5 µl (o di 25 µl quando c'è la necessità di aggiungere una quantità di DNA maggiore, fino a 17.5 µl), utilizzando i kit commerciali contenenti tutti i reagenti necessari per la reazione. È richiesta una quantità di DNA estratto pari a 0.5 ng per i kit PowerPlex® Esx17 Fast (Promega)[67] e PowerPlex® Esi17 Fast (Promega)[68] ed 1 ng per il PowerPlex® Fusion 6C (Promega)[69], ma l'amplificazione può essere effettuata anche con quantità inferiori, come indicato dal manuale del kit utilizzato [67-69]. I kit PowerPlex® ESX Fast e PowerPlex® Esi Fast sono progettati per applicazioni di identificazione umana, comprese analisi forensi, test di parentela e uso di ricerca, come anche il PowerPlex® Fusion 6C (Promega). Questi sistemi soddisfano le raccomandazioni ENFSI per la condivisione del profilo del DNA in Europa e consentono la co-amplificazione e il rilevamento di 16 loci (D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D2S441, D10S1248, D22S1045, D1S1656, D12S391, D2S1338, D16S439, D19, SE33) più l'amelogenina. Questi due kit vengono convenzionalmente utilizzati per genotipizzare campioni di DNA degradato

poiché possono completarsi a vicenda, cioè i sistemi che in un kit sono ad alto peso molecolare nell'altro sono a basso peso molecolare, questo permette di massimizzare il recupero delle informazioni alleliche dal maggior numero possibile di loci e consentire la conferma dei risultati ottenuti con l'altro sistema. Il sistema PowerPlex® Fusion 6C permette la co-amplificazione e il rilevamento fluorescente di 27 loci, inclusi i loci core CODIS e i loci European Standard Set (ESS), amelogenina e DYS391 per la determinazione del sesso. Sono inclusi anche i loci Penta D, Penta E, TPOX, D22S1045 e SE33. Infine, due loci Y-STR in rapida mutazione, DYS570 e DYS576, sono inclusi nella multiplex. Per i kit PowerPlex® Esx17 Fast (Promega) e PowerPlex® Esi17 Fast (Promega) 0.5 nanogrammi di DNA estratto è stato amplificato in un volume di 12.5 µl unitamente a 2.5 µl di PowerPlex® Esx/Esi Fast 5X Master Mix, PowerPlex® Esx/Esi 17 Fast 10X Primer Pair Mix e acqua. Al termine della preparazione chiudere le provette e trasferirle nell'amplificatore. Le condizioni di amplificazione sono riportate nella tabella 12:

Attivazione	Denaturazione	Annealing	Allungamento	Allungamento	Step finale
96° C	96° C	60°C	72°C	60°C	4°C
1 min	5 sec	35 sec	5 sec	2 min	∞
30 cicli					

Tab.12. Condizioni di amplificazione PowerPlex® Esx/Esi17 Fast (Promega)[67-68].

Per il kit PowerPlex® Fusion 6C 1 nanogrammo di estratto è mescolato con 2.5 µl PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix, 2.5 µl PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix e acqua per raggiungere un volume finale di 12.5 µl. Al termine della preparazione chiudere le provette e trasferirle nell'amplificatore. Le condizioni di amplificazione sono riportate nella tabella 13:

Attivazione	Denaturazione	Annealing	Allungamento	Step finale
96° C	96° C	60°C	60°C	4°C
1 min	5 sec	1 min	10 min	∞
29 cicli				

Tab.13. Condizioni di amplificazione PowerPlex® Fusion 6C (Promega)[69].

Per quantizzare e misurare la taglia dei frammenti di DNA i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare sullo strumento ABIPrism 3500 (Applied Biosystems). L'analisi dei frammenti sottoposti ad elettroforesi capillare viene effettuata tramite il software GeneMapper ID-X version 1.4.

4.7. Sequenziamento DNA mitocondriale

La regione di controllo del DNA mitocondriale (16024-576) è stata amplificata e sequenziata utilizzando i primers e le condizioni di PCR e sequenziamento riportate in letteratura [70-72]. Dieci coppie di primer sono amplificati in due multiplex indipendenti per generare ampliconi sovrapponibili in grado di coprire l'intera regione di controllo del mtDNA. Entrambi le reazioni sono state amplificate in un volume finale di 50 μ l che includono 25 μ l di mastermix, 8 μ l di primer pool per la prima multiplex e 3 μ l di primer pool 2 e quantità di campione fino a raggiungimento del volume di reazione. Le condizioni di amplificazioni sono riportate nella tabella 14:

Attivazione	Denaturazione	Annealing	Allungamento	Step finale
95° C	95° C	57°C	72°C	4°C
15 min	30 sec	30 sec	30 sec	∞
39 cicli				

Tab.14. Condizioni di amplificazione DNA mitocondriale.

I raw data del sequenziamento Sanger sono stati generate dallo strumento a quattro capillari Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer. Tutte le sequenze ottenute sono state successivamente allineate e comparate con la sequenza di riferimento del DNA mitocondriale umano Cambridge Reference Sequence for human mitochondrial DNA (rCRS) attraverso il software Seqscape v2.5, seguendo le regole di allineamento filogenetico. L'annotazione dei polimorfismi è stata effettuata seguendo gli standard internazionali e l'assegnazione degli aplogruppi sulla base della filogenia del DNA mitocondriale (EMPOP mtDNA database, v3/R11-empop.online/; Phylotree, build 17-<http://www.phylotree.org/>).

Capitolo 5

RISULTATI

In questa sezione saranno trattati i risultati osservati nello studio

5.1. Considerazioni nella progettazione del saggio

Nella precedente sezione di materiali e metodi è stata inclusa una breve descrizione delle procedure utilizzate per progettare il saggio qPCR, in questo paragrafo è fornita una discussione più dettagliata della progettazione e dello sviluppo del saggio, tra cui: la scelta delle sequenze target bersaglio e i risultati sperimentali per stabilire le condizioni di amplificazione della multiplex.

5.1.1. Selezione e disegno delle sonde del DNA nucleare

Il motivo principale per quantificare il DNA nucleare nei campioni forensi è determinare la quantità di DNA input da utilizzare per la genotipizzazione STR ma la quantificazione del target ci permette anche di fare una predizione sul profilo STR ottenibile. La scelta del target nucleare sul gene RNU2 (RNA, U2 small nuclear 1) è stata fatta sulla base dei dati presenti in letteratura [20-57]. Inizialmente la scelta del bersaglio nucleare, in saggi di qPCR per l'identificazione simultanea di DNA nucleare e mitocondriale, ricadeva su una regione di 79bp nel gene del retinoblastoma (RB1), tuttavia nel lavoro condotto da Nicklas e colleghi [73] è stato notato che la scelta del RB1 come sequenza bersaglio qPCR potrebbe non essere l'ideale poiché indagini sull'omologia di specie ha indicato che questa sequenza bersaglio è solo relativamente conservata.

Abbiamo deciso, quindi, di disegnare due diverse sonde sul gene RNU2 con lunghezza differente (71bp e 181bp), allo scopo di riuscire ad ottenere una quantificazione anche in campioni con DNA molto degradato e per ottenere informazioni relativamente

all'indice di degradazione del campione. Criterio inderogabile nella scelta delle sequenze dei primer e delle sonde è stata la distanza tra i due target, questo per minimizzare la possibilità di una cross-reattività; in base alla sequenza scaricata dal NCBI (Accession number: L37793.1) i due target presentavano una distanza di 4398 basi nucleotidiche.

5.1.2. Sviluppo del saggio in Real-Time PCR

Per sviluppare un saggio qPCR multiplex di successo, è necessario identificare le condizioni di reazione che consentano effettivamente il verificarsi delle amplificazione dei vari target in modo indipendente l'uno dall'altro all'interno della stessa provetta. L'obiettivo è evitare la situazione in cui l'amplificazione di un target riduce l'efficienza della PCR di un secondo target. Questo fenomeno si verifica quando uno dei target testati è presente in una quantità maggiore rispetto agli altri; questo determinerà un'amplificazione preferenziale del target più abbondante che consumerà anticipatamente i reagenti causando la saturazione del sistema. È il caso di questo saggio poiché il rapporto tra le copie del genoma mitocondriale sono presenti in quantità superiori rispetto al genoma nucleare [74-75].

Per il seguente saggio qPCR, le concentrazioni dei primer e probe dei diversi target, sono state tratte dal lavoro condotto da Xavier [20], in cui la strategia del "primer limitation" è stata attuata per i primer e le sonde del DNA mitocondriale, essendo questo presente in quantità maggiori nelle cellule.

5.1.3. Ottimizzazione del saggio

Per tutti i target sono state condotte delle corse in singleplex per valutare il funzionamento dei primer e delle sonde acquistate con un campione di DNA di controllo (2800M) per essere sicuri che la qualità e quantità dei reagenti fossero opportuni.

Successivamente è stata condotta una multiplex qPCR con i volumi e le concentrazioni dei primer e sonde descritte nella tabella 5. La curva standard è stata costruita con le otto diluzioni seriale dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega). Mantenendo il threshold calcolato automaticamente dal software dello strumento Rotor-Gene 6000 Corbett (Qiagen), per ogni target sono stati valutati i parametri

intercetta, efficienza di PCR (Efficiency), slope e R^2 (Fig. 18a-d) per valutare la robustezza del saggio. In termini di linearità (R^2) ed efficienza di PCR (Efficiency) tutti i target rientrano negli intervalli stabiliti come ottimali secondo le linee guida MIQE [56] ($90 < \text{PCR Eff}\% < 110$, $R^2 > 0.980$ e $-3.6 \geq \text{slope} \geq -3.1$), ad eccezione del target mitocondriale corto (Fig.19). Allo stesso modo l'analisi del target IPC (Fig.18d) non ha evidenziato la presenza di inibitori e mostra che la reazione è avvenuta correttamente in tutti i campioni poiché in tutti c'è stata l'amplificazione dell'oligonucleotide sintetico.

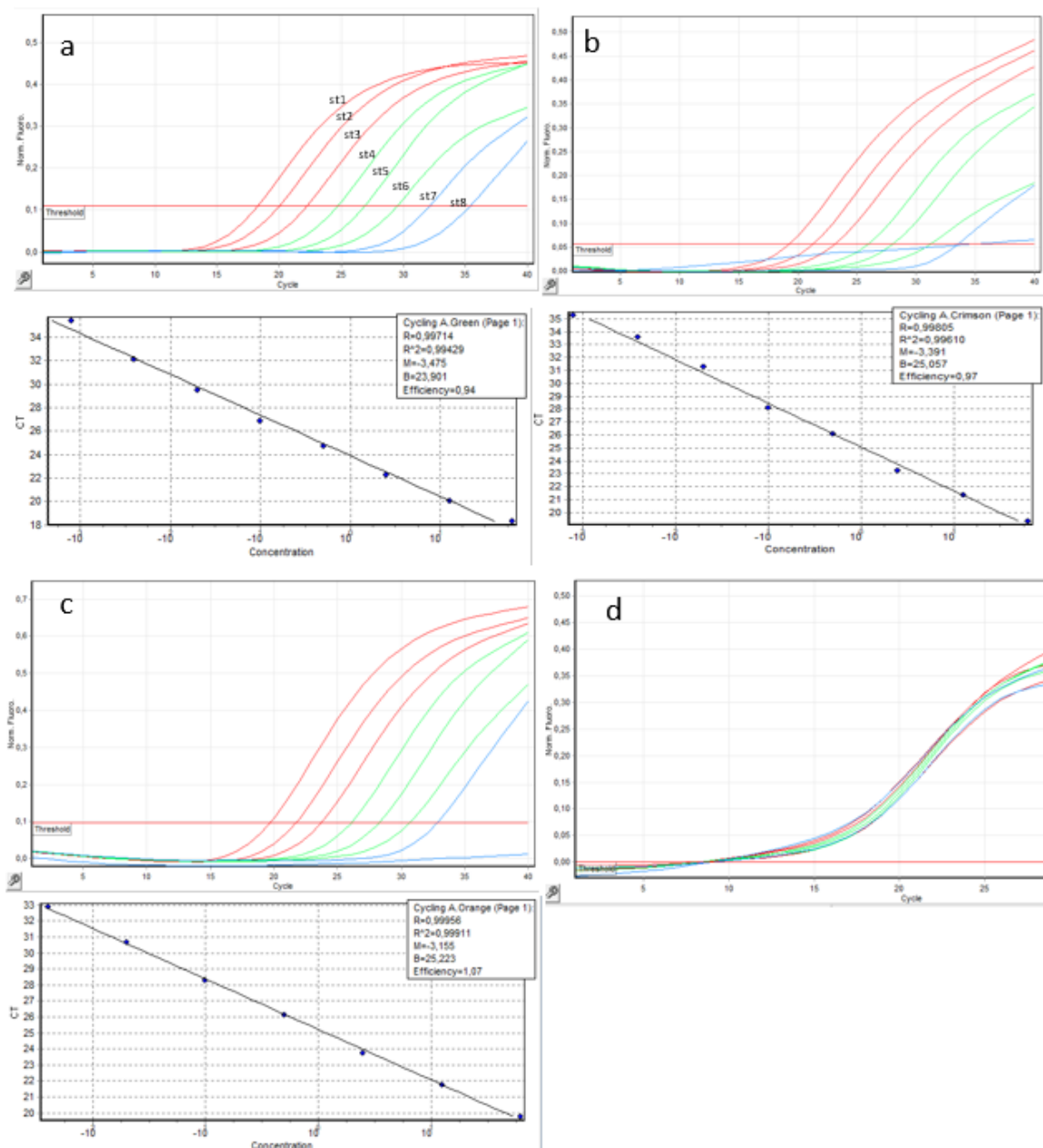


Fig.18. Cinetica di amplificazione delle otto diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) e le rispettive curve di calibrazione dei target presenti nel saggio di qPCR. Per il grafico

della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza; per le rette di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct. Fig 18a: mitocondriale lungo (mt143bp-Green), fig.18b: nucleare lungo (nuRNU181bp- Crimson), fig.18c: nucleare corto (nuRNU71bp-Orange), fig.18d: Controllo interno positivo (IPC-Red).

Il target mitocondriale corto presentava dei valori pari a $R^2 > 0.793$ e PCR Eff%=12.85 e valori di Ct molto ravvicinati a partire dalla diluizione dello standard 4 allo standard 8 (Fig.19).

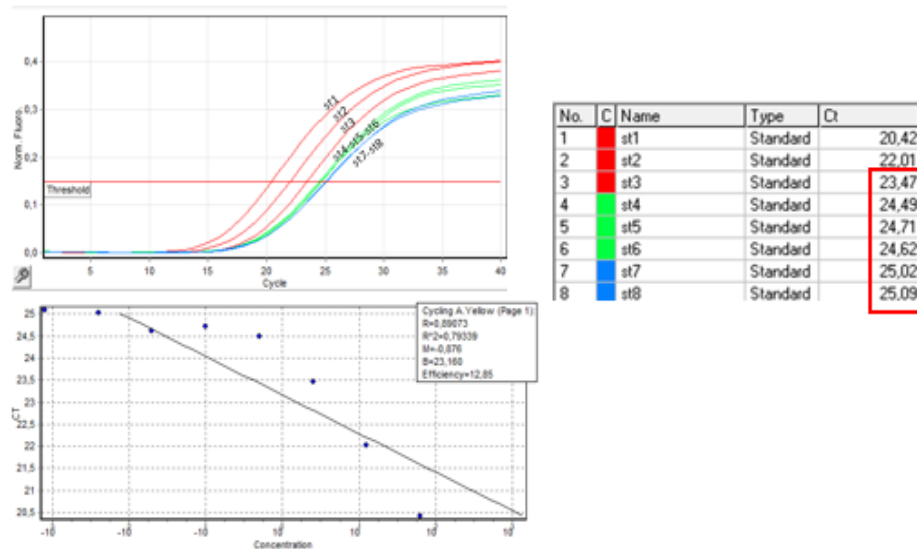


Fig.19. A sinistra: Cinetica di amplificazione delle otto diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) e la rispettive curve di calibrazione per il target mitocondriale corto (mtND1-Yellow). Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza; per la retta di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct. A destra: Ct riportato per ciascun standard relativamente alla sonda mitocondriale corta.

Diversi parametri possono influenzare l'efficienza della PCR tra cui:

- Presenza di inibitori di PCR;
- Disegno dei primer e/o dei probe potrebbe non essere ottimale;
- Inaccurato pipettaggio del campione e dei reagenti;
- Degradazione della sonda;
- L'analisi della curva standard non è stata fatta in modo appropriato.

Solitamente un valore di efficienza $> 110\%$ si verifica quando all'interno della reazione multiplex si creano dei dimeri o prodotti aspecifici o quando la sonda degradata perde di specificità. In considerazione di ciò, per risolvere questo problema legato al target

mitocondriale corto, sono state eseguite diverse prove per testare la funzionalità della sonda mtND1.

Innanzitutto è stata ripetuta la valutazione dei dimeri e degli hairpin sia tramite il software Autodimer (<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) impostando i parametri come indicato nel lavoro di Vallone [59] ponendo l'attenzione sul valore del threshold score=7 e ΔG Temp(°C)= 37°C, e sia tramite il software Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) lasciando i parametri di default. I due tools non hanno evidenziato self-dimer e cross-dimer che potrebbero interferire con la reazione di qPCR multiplex. Il risultato del tool Autodimer è rappresentato in fig.20.

Na+ (Molar)	Ct μ M	ΔG Temp (°C)	Threshold Score
0.085	1.0	37.0	7

[Return To Primer Tools](#)

Primer Dimer Results

Sequences	Match Sequence	Matches	Score	Est. Tm (°C)	ΔG (@ 37.0 °C) (kcal/mol)	Lineup
mt143bp-F CCACTGTAARAGCTAACTTAGCATTAACC	GGTNANNNGCTAAGNT	11	7	< 0	-1.7	3' - CCAATTACGATTCAATCGAAATGTCACC - 5' x xx x 5' - GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT - 3'
mtND1-R GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT						

Fig.20. Risultato dell'analisi condotta su Autodimer inserendo le sequenze dei primer e probe di tutti i 5 target testati.

Successivamente si è proceduto per step per tentare di ottimizzare le concentrazioni e le condizioni del saggio qPCR multiplex, eseguendo le prove multiplex solo su quattro standard anziché otto (dallo standard 2 allo standard 5, ovvero gli standard in cui si verificava la sovrapposizione dei Ct).

È stata realizzata una prova utilizzando per tutti i target la stessa concentrazione di primer e probe, rispettivamente 0.4 μ M e 0.25 μ M, come indicato nel user guide del kit Quantinova Multiplex PCR kit (Qiagen) [60] utilizzato per la reazione di Real-Time PCR.

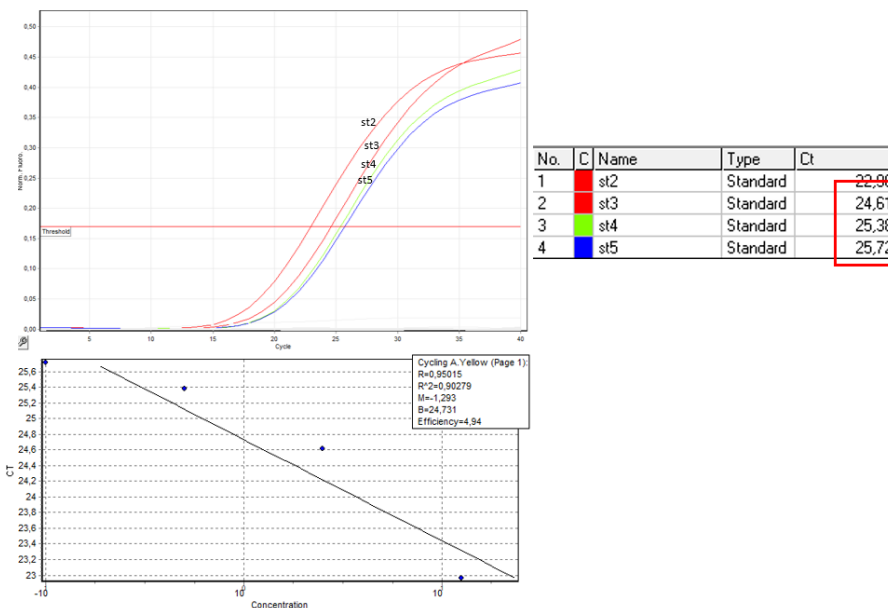


Fig.21. A sinistra: Cinetica di amplificazione delle quattro diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) e la rispettiva curva di calibrazione per il target mitocondriale corto (mtND1-Yellow). Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza; per la retta di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct. A destra: Ct riportato per ciascun standard relativamente alla sonda mitocondriale corta.

Come si può notare dalla figura 21 anche utilizzando concentrazioni di primer e probe da manuale il problema non è stato risolto. Per i restanti target i valori (Fig.22) rientravano negli intervalli ottimali riconosciuti dalle linee guida del MIQE [56].

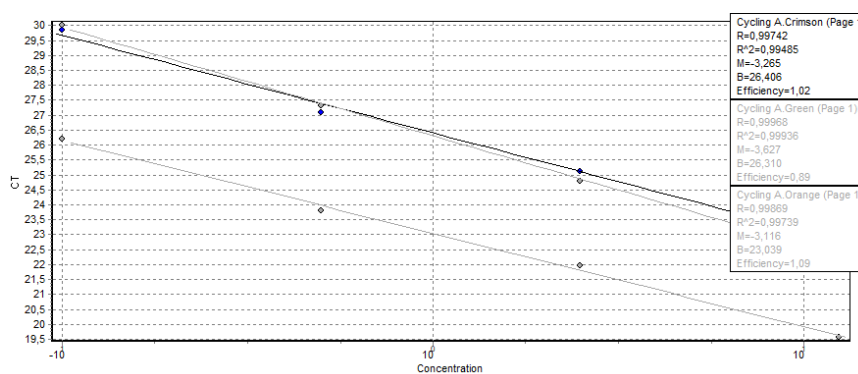


Fig.22. Comparazione tra le curve di calibrazione e valori R², Efficienza PCR e slope per il target nucleare lungo (Crimson), mitocondriale lungo (Green) e nucleare corto (Orange). In ascissa la concentrazione del target e in ordinata il Ct.

In seguito sono state condotte altre prove in cui è stata diminuita la sola concentrazione dei primer (200nM e 100nM) e del probe (100nM e 50nM) del target mitocondriale corto riportando le altre alle concentrazioni indicate nella tabella 5, per limitare una eventuale

presenza di dimeri realizzati dal target. Nonostante le concentrazioni modificate, come si può vedere nella figura 23, il risultato non è cambiato. Per la reazione a concentrazioni 200nM-100nM i valori di R^2 e PCR Eff% corrispondono rispettivamente a 0.980 e -0.93, mentre per il secondo test a concentrazione 100nM-50nM i valori di R^2 e PCR Eff% corrispondono rispettivamente a 0.854 e 13.54. Per i restanti target i valori rientravano negli intervalli ottimali riconosciuti dalle linee guida del MIQE [56].

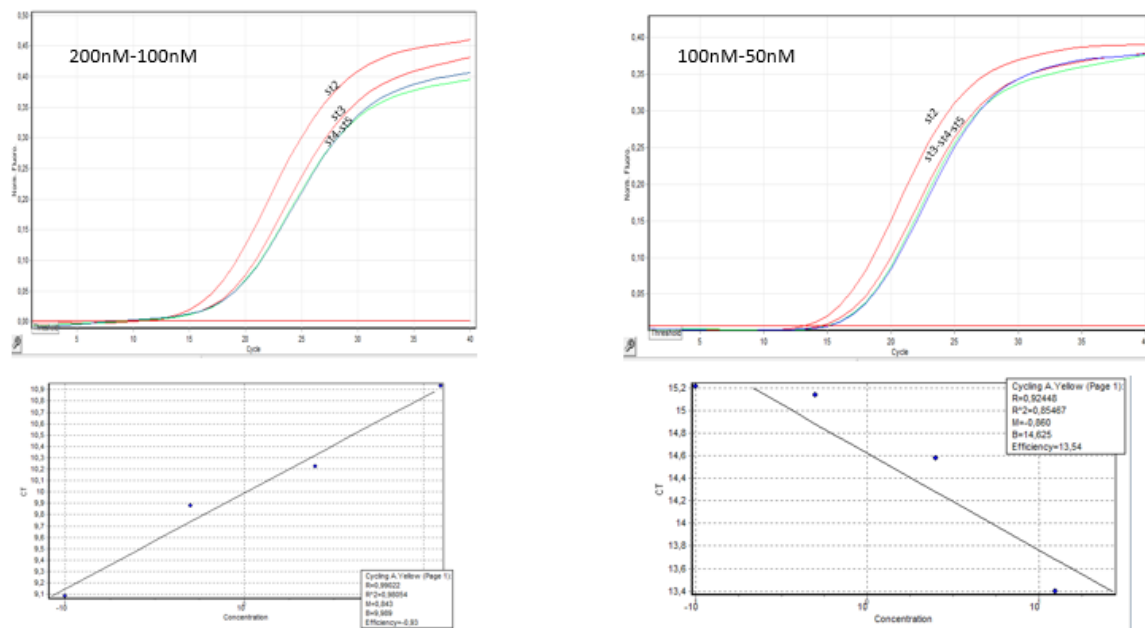


Fig.23. A sinistra: Cinetica di amplificazione delle quattro diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) e la rispettiva curva di calibrazione per il target mitocondriale corto (mtND1-Yellow) con concentrazione 200nM per i primer e 100nM per i probe. A destra: Cinetica di amplificazione delle quattro diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) e la rispettiva curva di calibrazione per il target mitocondriale corto (mtND1-Yellow) con concentrazione 100nM per i primer e 50nM per i probe. Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza; per le rette di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct.

Al fine di determinare se la scarsa efficienza identificata per il target mitocondriale corto derivi dalla formazione di dimeri tra i primer e la sonda del target stesso o se si creino appaiamenti e prodotto aspecifici con le sequenze degli altri target sono state eseguiti test a partire dalla reazione in singleplex per la sonda mtND1 e aggiunto, poi, un target alla volta al fine di individuare l'interazione indesiderata all'interno della reazione di PCR. Da notare che per questi test sono state mantenute le concentrazioni riportate in tabella 5 ovvero per i target mitocondriali i primer avevano una concentrazione di 300nM e la

sonda 100nM mentre per i due target nucleari i primer avevano una concentrazione di 900nM e la sonda di 500nM (“primer limitation” mtDNA vs nDNA: considerando il DNA mitocondriale il target overespresso).

Il test eseguito per la reazione in singleplex per il target mitocondriale (Fig.24) ha dato un risultato positivo in termini di linearità, efficienza di PCR e slope.

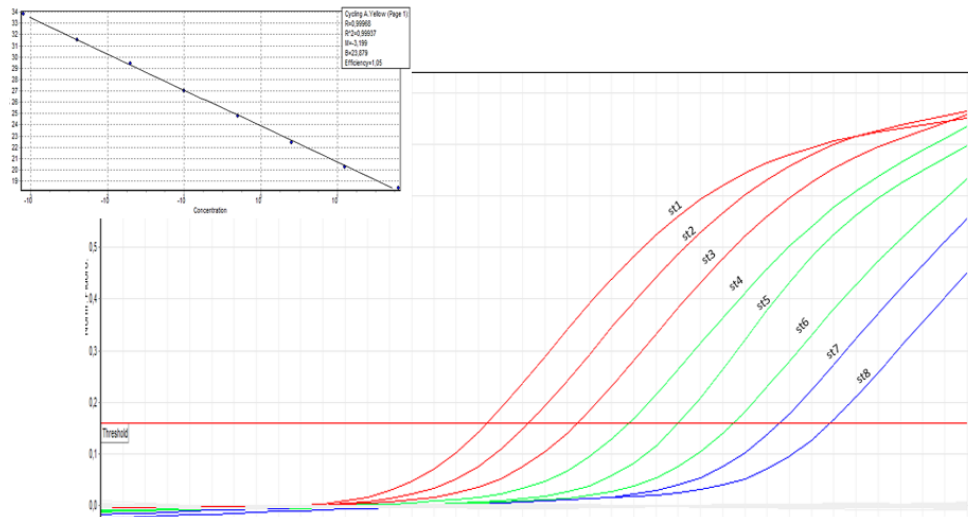


Fig.24. Cinetica di amplificazione delle otto diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female della reazione in singleplex mtND1. Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza; per la retta di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct.

Il target presentava dei valori pari a $R^2 > 0.999$ e PCR Eff%=1.05 rientranti negli intervalli stabiliti come ottimali secondo le linee guide MIQE [56]. Il test ci ha permesso anche di verificare che la sonda non era degradata come inizialmente avevamo ipotizzato.

Per i test successivi sono state eseguite sia una reazione duplex per i target mitocondriali e sia due reazioni triplex, la prima contenente i due target mitocondriali e la sonda lunga da 181bp del target nucleare e la seconda con il duplex mitocondriale unitamente alla sonda corta del nucleare. Nella figura 25 sono messe a confronto il pattern della sonda mitocondriale nella reazione duplex (Fig.25a), nella reazione triplex con sonda nucleare lunga (Fig.25b) e con la sonda corta (Fig.25c). Come si può notare dalla figura il pattern di rilevazione errato si verifica nella reazione triplex con la sonda del nucleare corto.

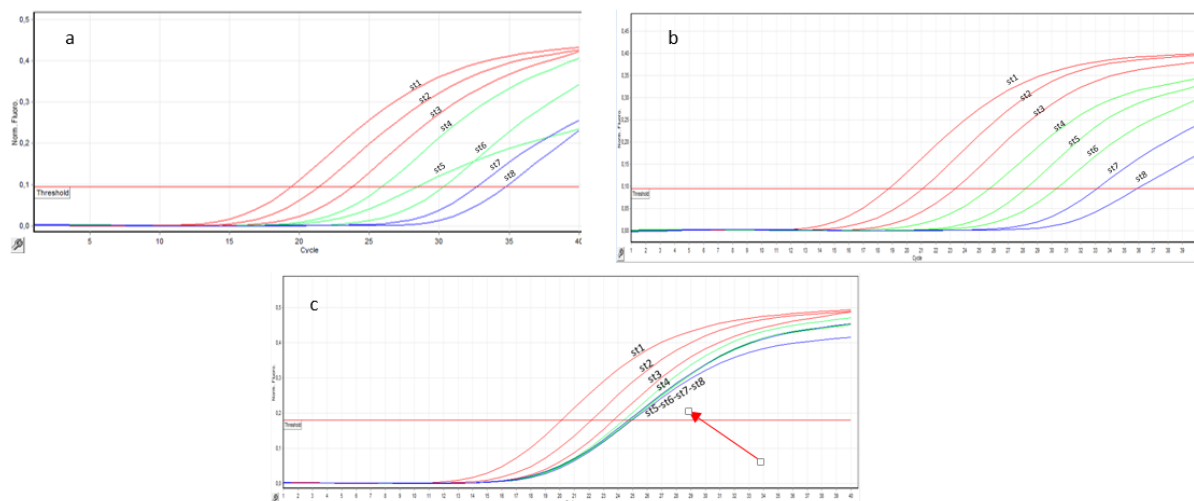


Fig.25. Comparazione della cinetica di amplificazione del target mitocondriale corto nella reazione duplex (a), triplex con target nucleare lungo (b) e triplex con target nucleare corto (c). Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza.

Nella tabella 15 sono riportati i valori di linearità (R^2), efficienza della PCR e slope per le tre reazioni esaminate.

	Target	R^2	Efficienza PCR	Slope
Duplex	Mitocondriale corto	0.999	1.07	-3.166
	Mitocondriale lungo	0.997	1.02	-3.281
Triplex	Mitocondriale corto	0.999	0.94	-3.465
	Mitocondriale lungo	0.999	0.96	-3.423
	Nucleare lungo	0.985	0.92	-3.529
Triplex	Mitocondriale corto	0.719	13.70	-0.857
	Mitocondriale lungo	0.999	1.01	-3.297
	Nucleare corto	0.996	1.19	-2.994

Tab.15.Valori di linearità, efficienza di PCR e slope con i corrispettivi target.

Per superare questo ostacolo ed ottenere un saggio di Real-Time PCR che ci permettesse di valutare simultaneamente sia la quantità che la qualità del DNA nucleare e del DNA mitocondriale umano sono stati progettati una nuova coppia di primer per il target nucleare corto che amplificavano una regione di 75bp. Questi primer sono stati disegnati in modo da poter utilizzare la stessa sonda precedentemente testata per il target del DNA nucleare corto.

È stata allestita la reazione di qPCR, con solo quattro diluizioni standard, seguendo le concentrazioni e i volumi riportati nella tabella 5. Come si può vedere nella figura 26, il target mitocondriale corto ha evidenziato nuovamente il pattern di amplificazione errato; questo ci permette di affermare che l'interazione con il target mitocondriale corto non è legata alla coppia di primer del nucleare corto ma bensì è attribuito alla sonda del target nucleare corto.

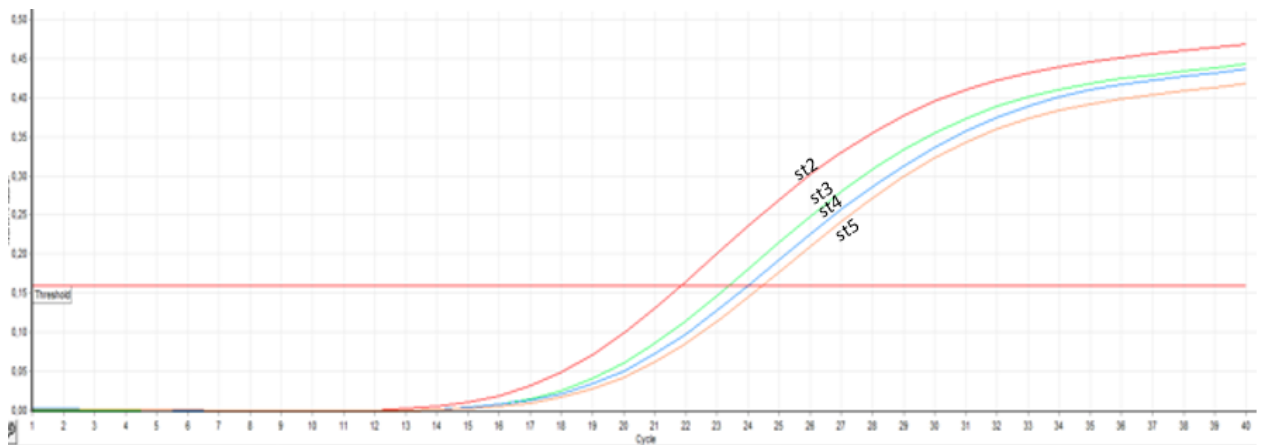


Fig.26. Cinetica di amplificazione della reazione multiplex qPCR con primer per il target nucleare corto da 75bp. Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza.

Per confermare questo risultato è stato eseguito un ulteriore test in cui alla mix di reazione sono stati aggiunti tutti i componenti indicati nella tabella 5 tranne la sonda del target nucleare corto. Il risultato, mostrato in figura 27, evidenzia che, anche utilizzando la coppia di primer da 71bp progettata all'inizio, la cinetica della curva di amplificazione del DNA mitocondriale corto è corretta così come anche i parametri di linearità, PCR efficienza e slope rientrano negli intervalli ottimali riconosciuti dalla linea guida MIQE [56].

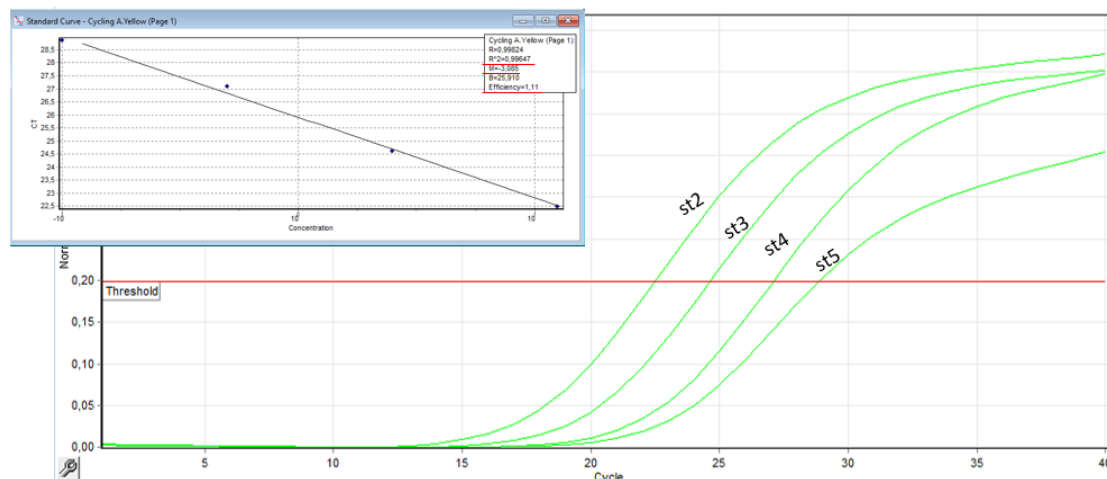


Fig.27. Cinetica della curva di amplificazione del target mitocondriale corto eseguita con quattro diluizioni seriale dello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) utilizzando i primer da 71bp per il target nucleare corto, e la rispettiva curva di calibrazione. In rosso sono sottolineati i parametri di linearità, efficienza della PCR e slope. Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza; per la retta di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct.

Poiché non siamo riusciti a ottimizzare la reazione di Real-Time PCR per i cinque target, abbiamo deciso di eliminare dal saggio il target da 71bp del DNA nucleare, passando da una reazione pentaplex ad una reazione tetraplex qPCR che ci permettesse di quantificare la quantità di DNA nucleare (target amplificato 181bp) presente nei nostri campioni forensi, valutare la qualità e quantità del DNA mitocondriale (target amplificati da 69bp e 143bp) e identificare l'eventuale presenza degli inibitori (target IPC da 70bp). Questa reazione di qPCR è stata testata secondo le concentrazioni ed i volumi indicati nella tabella 5, per sopperire al volume mancante dei primer e della sonda del target nucleare corto il volume di 20 μ l finali è stato raggiunto aumentando il volume di acqua (da 0.4 μ l a 3.2 μ l). Nella tabella 16 sono riportati i valori di linearità (R^2), efficienza della PCR e slope per il saggio tetraplex Real-Time PCR e nella figura 28 la curva di amplificazione dell'IPC.

	Target	R^2	Efficienza PCR	Slope
Tetraplex	Mitocondriale corto	0.983	1.12	-3.066
	Mitocondriale lungo	0.995	0.99	-3.348
	Nucleare lungo	0.980	1.00	-3.556

Tab.16. Valori di linearità, efficienza PCR e slope per la reazione tetraplex.

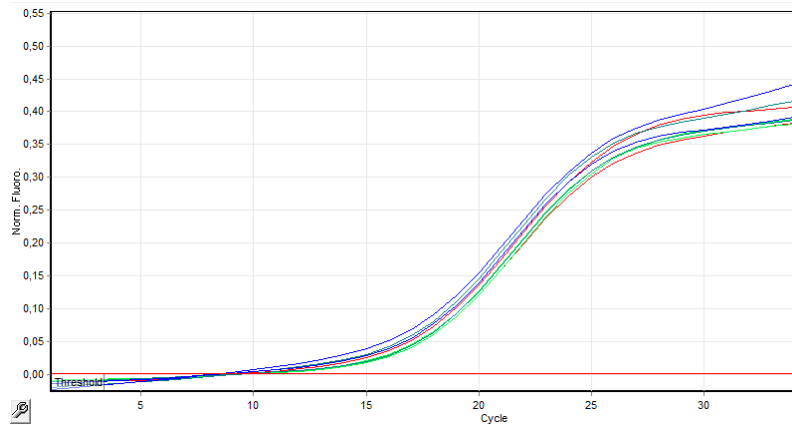


Fig.28. Cinetica della curva del target IPC nella reazione tetraplex. Per il grafico della cinetica di amplificazione: in ascissa Ct, in ordinata il segnale di fluorescenza.

5.2. Risultati equivalenza mtGE/ μ l e copie genoma nucleare

Il calcolo del mtGE presente nelle diluizioni standard è stato eseguito mediante una serie di diluizioni di un oligonucleotide a doppia elica con concentrazione nota sulla base di uno studio precedente [57]. Gli standard costituiti dall'oligonucleotide mitocondriale sono eseguiti in triplicati, mentre lo standard G1521 è stato eseguito in duplicato essendo in questo caso visto come un campione ignoto. La curva standard delle diluizioni degli oligonucleotidi mtND1 ha prodotto un'efficienza PCR del 89% e un $R^2 > 0.998$ (fig.29), confermando così che i valori di mtGE calcolati delle diluizioni dello standard G1521 erano accurate.

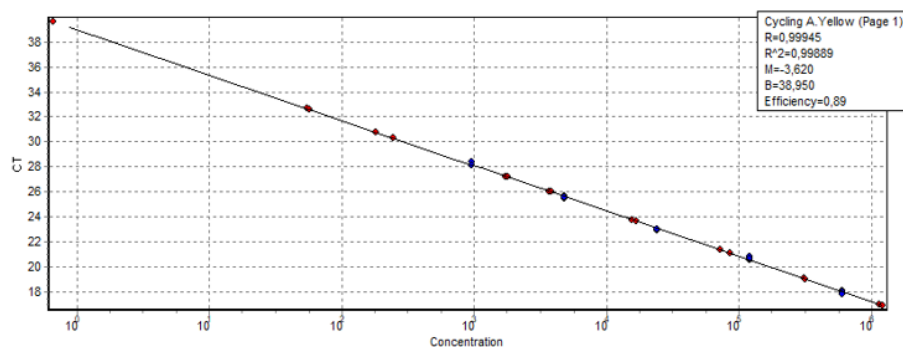


Fig.29. Curva di calibrazione dello standard oligonucleotidico per determinare il quantitativo di copie di genoma mitocondriale presente nello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega). Per la retta di calibrazione: in ascissa la concentrazione, in ordinata Ct.

Nella tabella 17 sono riportati i valori di Ct e di mtGE presenti nello standard G1521 Human Genomic DNA Female (Promega) acquistato per questo studio, i valori rappresentano la media delle due repliche eseguite per ogni standard. Dopo aver calcolato i valori di mtGE/ μl negli standard, questi saranno impostati come standard durante l'analisi dei due target mitocondriali. Poiché presumiamo che il DNA di controllo non sia degradato, questi valori dovrebbero essere teoricamente gli stessi per entrambe le sonde del DNA mitocondriali quindi utilizzabili in modo univoco sia per il target mtND1 e sia per mt143bp.

Standard	Ct*	mtGE/ μl
Standard 1	17.65	1173649.21
Standard 2	19.63	334969.92
Standard 3	21.97	76640.49
Standard 4	24.29	17860.11
Standard 5	26.65	4014.29
Standard 6	27.68	2097.78
Standard 7	31.14	240.52
Standard 8	33.28	61.68

Tab.17. Valori di mtGE presenti nelle diluizione del campione di controllo utilizzato per lo studio. Ct* ciclo soglia o threshold.

In questo modo è possibile verificare le curve standard per mtND1, mt143bp e nuRNU181 su una serie di diluizioni seriali del controllo G1521. Da notare che bisogna eseguire una nuova calibrazione all'acquisto di un nuovo controllo o se si nota una diminuzione dell'efficienza della curva standard.

5.3. Valutazione dei parametri del saggio tetraplex

La linearità, l'efficienza della PCR, la slope e l'intercetta Y sono elencati nella tabella 18 per le due corse multiplex indipendenti (differente mastermix e diluizioni standard) effettuate per lo studio. Per tutte le analisi è stato mantenuto il threshold calcolato automaticamente dal software Rotor Gene Q v. 2.1.0 (Qiagen). Da notare che per alcuni

target si è proceduto all' "eliminazione" dell'ultima serie di standard per ottenere valori della curva più accurati. Questa procedura è attuabile poiché, come descritto dalle linee guida MIQE [56], la curva standard presenta almeno cinque punti logaritmici rendendo ammissibili i risultati del saggio sviluppato.

	Target	Efficienza PCR%	R ²	Slope	Intercetta Y
Multiplex 1	nuRNU181	1.06	0.988	-3.184	23.943
Multiplex 2		1.03	0.998	-3.255	25.445
Media Mpx		1.045	0.993	-3.2195	24.694
SD Mpx		0.021	0.007	0.050	1.062
Multiplex 1	mt143bp	0.98	0.997	-3.365	20.813
Multiplex 2		1.04	0.998	-3.237	18.382
Media Mpx		1.01	0.9975	-3.301	19.5975
SD Mpx		0.042	0.001	0.091	1.719
Multiplex 1	mtND1	1.08	0.996	3.15	23.737
Multiplex 2		1.09	0.997	-3.124	22.072
Media Mpx		1.085	0.9965	0.013	22.9045
SD Mpx		0.007	0.001	4.436	1.177

Tab.18. Valori di efficienza della PCR, R², la slope e l'intercetta Y per due multiplex indipendenti per tutti i target. Tutti gli standard sono stati eseguiti in triplicato. Inoltre è riportato il valore medio per i parametri elencati e la deviazione standard per tutti i target.

La curva standard è stata costruita con otto diluizioni seriale di un campione di controllo a partire da una concentrazione di 62.5 ng/μl fino ad una concentrazione di 0.0008 ng/μl. In termini di linearità e efficienza di PCR entrambi i saggi multiplex raggiungevano i valori ottimali indicati dalle linee guida MIQE [56] (R²>0.980, 90<PCR Eff%<110 e -3.6 ≥ slope ≥ -3.1) indicando la robustezza del saggio.

I valori del ciclo soglia (Ct) sono stati ricavati dall'output del software Rotor Gene Q v. 2.1.0. Questi sono definiti come il numero di cicli PCR necessari affinché il segnale di fluorescenza superi in modo affidabile una soglia che separa il rumore di fondo dal segnale effettivo [49]. I valori Ct sono stati controllati per ciascuna diluizione standard per valutare la riproducibilità del dosaggio. Tutti e tre i target hanno prodotto una

variazione stabile insieme ai diversi input di DNA che indicano la robustezza e la ripetibilità del test.

5.4. Quantizzazione DNA nucleare e mitocondriale dei campioni forensi

Questo saggio tetraplex in Real-Time PCR è stato utilizzato per quantificare campioni rilevanti in campo forense quali ossa, denti, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), unghie e capelli noti per avere DNA degradato. Tutti i campioni utilizzati nello studio sono stati quantizzati in duplicato. Dato che l'effettivo contenuto di DNA e il suo stato di degradazione non possono essere sempre previsti in questo tipo di campioni, è utile combinare la quantificazione del bersaglio nucleare e del mtDNA. Per la valutazione della performance del saggio Real-Time PCR abbiamo utilizzato il DNA estratto da 9 denti, 11 ossa, 4 tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), 6 unghie, e 16 fusti di capelli.

Per il target nucleare la quantificazione risultante dal saggio tetraplex è stata confrontata con le precedenti quantizzazioni fatte mediante Plexor® HY System (Promega) e, per il campione 1989-A, con il Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit (Thermo Fisher Scientific). Nella tabella 19 sono riportati i valori ottenuti per i diversi sistemi di quantizzazione per il target nucleare per tutti i campioni tranne i capelli che non hanno prodotto risultati per il DNA nucleare.

Matrice	Campione	Metodo quantificazione	Plexor HY [] ng/μl	Tetraplex [] ng/μl
Denti	5877	Plexor® HY System	0.193	0.139
	6587-2	Plexor® HY System	0.320	0.005
	6587-1	Plexor® HY System	0.034	0.002
	5672-2	Plexor® HY System	0.054	0.022
	7220-A	Plexor® HY System	0.060	0.007
	7253-1	Plexor® HY System	3.330	0.139
	5876	Plexor® HY System	0.026	NEG

	7064-A	Plexor® HY System	0.024	0.008
	6244	Plexor® HY System	0.023	0.007
Tessuti FFPE	6950 A	Plexor® HY System	8.490	0.700
	6950 F	Plexor® HY System	0.440	0.006
	6267-B	Plexor® HY System	0.887	0.682
	6295	Plexor® HY System	4.540	1.841
Unghie	6413-B	Plexor® HY System	0.418	0.067
	6170-1	Plexor® HY System	0.610	0.128
	6863-1	Plexor® HY System	0.840	0.219
	6290-A	Plexor® HY System	1.500	0.263
	5869	Plexor® HY System	4.660	1.146
	1989-A	Quantifiler™ Trio DNA	26.551	18.782
Ossa	6344	Plexor® HY System	0.603	0.508
	2576	Plexor® HY System	1.800	0.897
	5894-B	Plexor® HY System	8.061	5.543
	5883	Plexor® HY System	20.030	7.076
	7065-A2	Plexor® HY System	41.170	51.098
	6259 D	Plexor® HY System	80.200	70.285
	6259 A	Plexor® HY System	110.000	96.909
	6916	Plexor® HY System	0.024	0.111
	5903	Plexor® HY System	0.024	0.003
	6001-C	Plexor® HY System	0.022	0.003
	5775	Plexor® HY System	0.019	0.017









Tab.19. Tabella che riporta i dati di quantificazione dei diversi metodi di quantizzazioni a cui sono stati sottoposti i campioni forensi divisi in base alla matrice di estrazione.












Come atteso si è riscontrata una certa differenza nella quantificazione del DNA degradato utilizzando il saggio qPCR proposto nello studio rispetto alle precedenti quantificazioni. Bisogna considerare la differenza di dimensioni tra le sequenze bersaglio, infatti mentre per il Plexor® HY System il target nucleare amplifica una regione di 99bp il saggio tetraplex amplifica una regione di 181bp, quindi c'è una notevole differenza nella lunghezza dei due target. Invece, il confronto tra il saggio tetraplex e il kit Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit, relativamente alla lunghezza del target, è

più appropriato poiché i target nucleari hanno pressochè la stessa dimensione (tetraplex amplicone 181bp, Quantifiler™ Trio 214bp). Inoltre bisogna tenere presente che questi campioni sono stati recuperati in un intervallo di tempo che va dal 2014-2020 e probabilmente sottoposti a più processi di scongelamento-ricongelamento.

I risultati della quantificazione sono stati analizzati in relazione ai risultati della genotipizzazione dei microsatelliti autosomici, per valutare la correlazione tra valore di quantificazione e profilo di DNA ottenuto. Per 5 campioni (6587-2, 1989-A, 2576, 5894-B,6001-C) su 30 presenti nella tabella 19 non si disponevano dei risultati degli STR, per questi campioni saranno fatte delle considerazioni solo in base alla quantità di DNA nucleare quantificato dai due saggi. I restanti 25 sono divisi in tre categorie differenziate da tre diversi colori (Tab.20):

- Verde- “Concordanza quantizzazione”: campioni che mostrano una concordanza tra il valore di quantizzazione ottenuto dal Plexor® HY System e il risultato della reazione tetraplex;
- Arancione- “Concordanza quantizzazione-tipizzazione”: campioni che mostrano una concordanza tra il valore ottenuto dalla reazione tetraplex e un profilo di tipizzazione caratteristico per il DNA degradato;
- Rosso- “Non concordanza”: campioni che non mostrano concordanza né tra i valori ottenuti dai due saggi di quantificazione né associazione tra valore ottenuto dal saggio tetraplex e profilo di tipizzazione.

Matrice	Campione	Metodo quantizzazione	Plexor HY [] ng/ul	Tetraplex [] ng/ul	STR kit	
Denti	5877	Plexor® HY System	0.193	0.139	PowerPlex®ESX Fast	
	6587-2	Plexor® HY System	0.320	0.005	PowerPlex®ESI/ESX Fast	
	6587-1	Plexor® HY System	0.034	0.002	-----	
	5672-2	Plexor® HY System	0.054	0.022	PowerPlex®ESX Fast	
	7220-A	Plexor® HY System	0.060	0.007	PowerPlex® Fusion 6C	
	7253-1	Plexor® HY System	3.330	0.139	PowerPlex® Fusion 6C	
	5876	Plexor® HY System	0.026	neg	PowerPlex®ESX Fast	
	7064-A	Plexor® HY System	0.024	0.008	PowerPlex® Fusion 6C	

Tessuti FFPE	6244	Plexor® HY System	0.023	0.007	-----	
	6950 A	Plexor® HY System	8.490	0.700	PowerPlex® Fusion 6C	
	6950 F	Plexor® HY System	0.440	0.006	PowerPlex® Fusion 6C	
	6267-B	Plexor® HY System	0.887	0.682	PowerPlex® ESI	
	6295	Plexor® HY System	4.540	1.841	PowerPlex® ESI	
Unghie	6413-B	Plexor® HY System	0.418	0.067	PowerPlex® ESX Fast	
	6170-1	Plexor® HY System	0.610	0.128	PowerPlex® ESI	
	6863-1	Plexor® HY System	0.840	0.219	PowerPlex® ESX Fast/ PowerPlex® Fusion 6C	
	6290-A	Plexor® HY System	1.500	0.263	PowerPlex® ESI	
	5869	Plexor® HY System	4.660	1.146	PowerPlex® Fusion 6C	
	1989-A	Quantifiler™ Trio DNA	26.551	18.782	-----	
	Ossa	6344	Plexor® HY System	0.603	0.508	PowerPlex® Fusion 6C
2576		Plexor® HY System	1.800	0.897	-----	
5894-B		Plexor® HY System	8.061	5.543	-----	
5883		Plexor® HY System	20.030	7.076	PowerPlex® ESX Fast	
7065-A2		Plexor® HY System	41.170	51.098	PowerPlex® Fusion 6C	
6259 D		Plexor® HY System	80.200	70.285	PowerPlex® ESX Fast	
6259 A		Plexor® HY System	110.000	96.909	PowerPlex® ESX Fast	
6916		Plexor® HY System	0.024	0.111	PowerPlex® Fusion 6C	
5903		Plexor® HY System	0.024	0.003	PowerPlex® Fusion 6C	
6001-C		Plexor® HY System	0.022	0.003	-----	
5775		Plexor® HY System	0.019	0.017	PowerPlex® ESI	

Tab.20. Confronto dati di quantizzazione e relazione con la tipizzazione del profilo.

In figura 30 è mostrato un esempio pratico delle tre categorie identificate precedentemente.

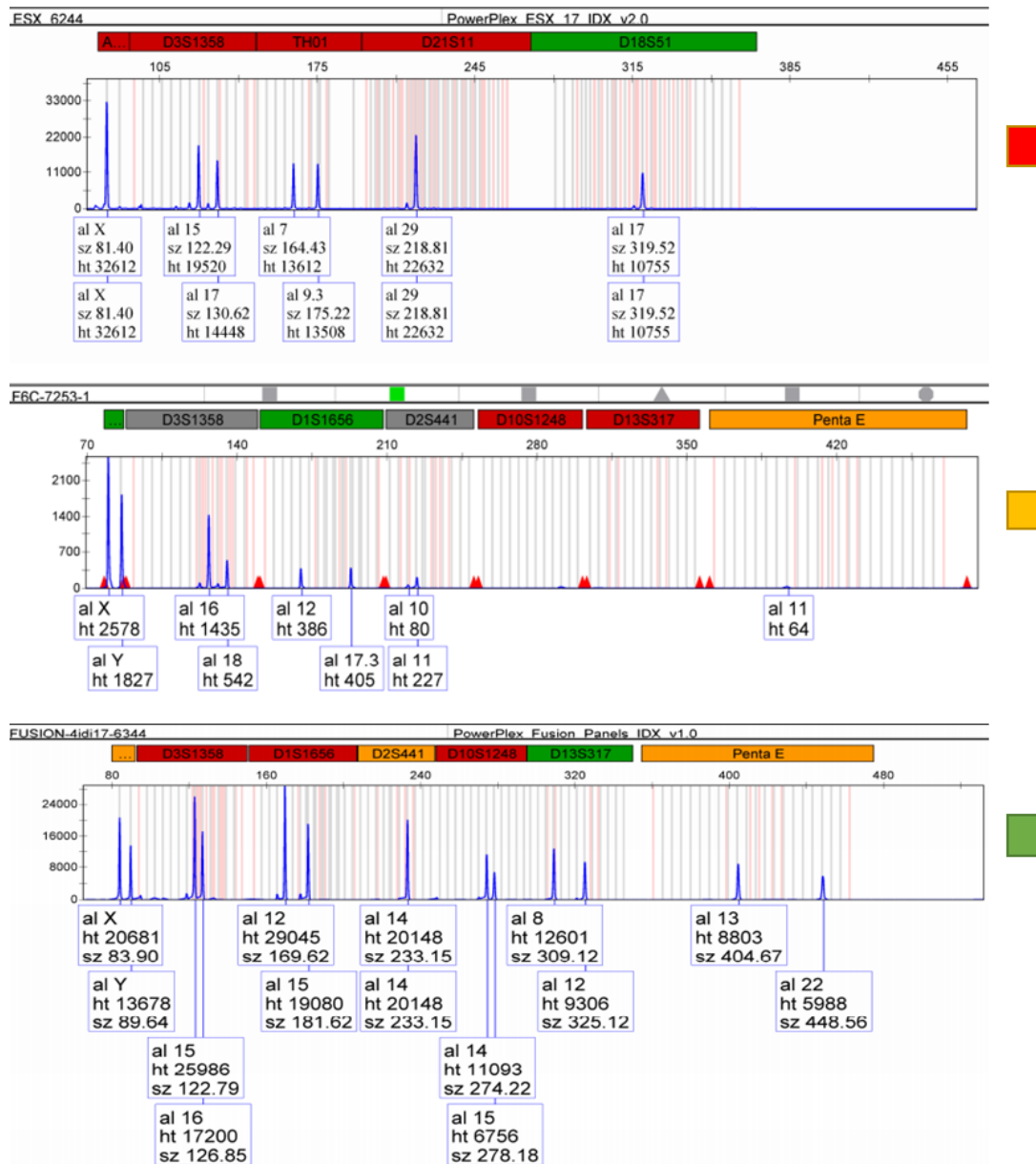


Fig.30. Tipizzazioni genetiche dei campioni 6244, 7253-1 e 6344.

Il campione 6244 è stato classificato come “non concordanza” poiché il valore di quantizzazione ottenuto con il saggio tetraplex è molto inferiore rispetto a quello identificato dal Plexor® HY System. Basandoci solo sul dato della reazione tetraplex ci aspettiamo un DNA molto degradato con una assegnazione allelica solo per i loci a più basso peso molecolare. In realtà, guardando l’elettroferogramma è evidente che il DNA non è sottoposto a degradazione e per questo campione si è ottenuto un profilo completo. Quindi in questo caso non vi è concordanza tra i valori di quantificazione

ottenuti con i due diversi saggi qPCR; inoltre dalla differenza dei valori osservati si ipotizzava una degradazione del campione che in realtà non è stata osservata nel profilo STR estrapolato che invece ha dato come esito un profilo genetico completo.

Il campione 7253-1 è stato classificato come “concordanza quantizzazione-tipizzazione”, anche in questo caso, come il precedente, il valore di quantizzazione ottenuto con il saggio tetraplex è molto più basso rispetto a quello ottenuto con il Plexor® HY System. Ci aspettiamo un DNA abbastanza degradato ed infatti l’elettroferogramma evidenzia un tipico profilo di DNA degradato, in cui si nota una diminuzione dell’altezza dei picchi allelici intorno alle 150bp. In questo caso la discordanza della quantizzazione dipende dalla diversa lunghezza dei bersagli delle due sonde del nucleare.

Infine, il campione 6344, classificato come “Concordanza quantizzazione” presenta quantità simili tra i due saggi di Real-Time PCR e sufficiente per ottenere un profilo completo di tipizzazione come si può notare dalla figura 30.

Per il target nucleare, non sorprende che, i valori di quantizzazioni più bassi si sono riscontrati nei campioni di resti scheletrici, viceversa nessuno dei fusti di capelli ha mostrato copie di DNA nucleare rilevabile. Nella tabella 21 sono riportati i valori di quantizzazione per il target mitocondriale corto e lungo per denti, ossa, tessuti inclusi in paraffina e unghie. I valori riportati nella tabella 21 sono i valori della media delle due repliche eseguite per ogni campione.

	Campione	mtND1 (mtGE/μl)	mt143bp (mtGE/μl)	Rapporto mtND1/mt143bp
Denti	5877	6.574,16	5.368,12	1.22
	6587-2	36.765,69	36.045,11	1.02
	6587-1	57.305,42	50.568,06	1.13
	5672-2	228.834,85	688.540,29	0.33
	7220-A	66.832,55	65.742,59	1.02
	7253-1	30.674,69	33.801,11	0.91
	5876	8.440,59	5.062,81	1.67
	7064-A	1.575,67	1.679,90	0.94
	6244	62.375,41	30.519,75	2.04

FFPE	6950 A	500.274,05	126.507,65	3.95
	6950 F	26.712,09	2.427,82	11.00
	6267-B	814.380,18	376.761,16	2.16
	6295	1.061.340,54	614.527,22	1.73
Unghie	6413-B	163.054,32	111.086,67	1.47
	6170-1	624.162,94	380.255,84	1.64
	6863-1	1.545.468,05	959.648,71	1.61
	6290-A	226.911,81	155.127,34	1.46
	5869	205.841,08	91.478,17	2.25
	1989-A	4.916.552,68	2.222.467,48	2.21
Ossa	6344	36.857,12	48.212,26	0.76
	2576	42.173,32	37.946,07	1.11
	5894-B	155.936,69	167.958,58	0.93
	5883	616.746,23	494.220,32	1.25
	7065-A2	1.727.403,68	1.008.264,49	1.71
	6259 D	5.641.370,35	2.389.994,64	2.36
	6259 A	42.901.496,12	19.109.967,63	2.24
	6916	1.118.551,42	1.040.409,26	1.08
	5903	47.667,60	48.813,77	0.98
	6001-C	842,92	406,68	2.07
	5775	13.555,02	14.097,39	0.96

Tab.21. Confronto valori di quantizzazione per il target mitocondriale corto (mtND1) e il target mitocondriale lungo (mt143bp). Nell'ultima colonna è calcolato l'indice di degradazione per il DNA mitocondriale (rapporto mtND1/mt143bp).

Come si può vedere dalla tabella 21 e dal grafico 1, i valori di quantificazione del DNA mitocondriale hanno mostrato dei valori positivi, anche se la maggior parte dei campioni presentavano quantità molto basse di DNA nucleare (Tab.20).

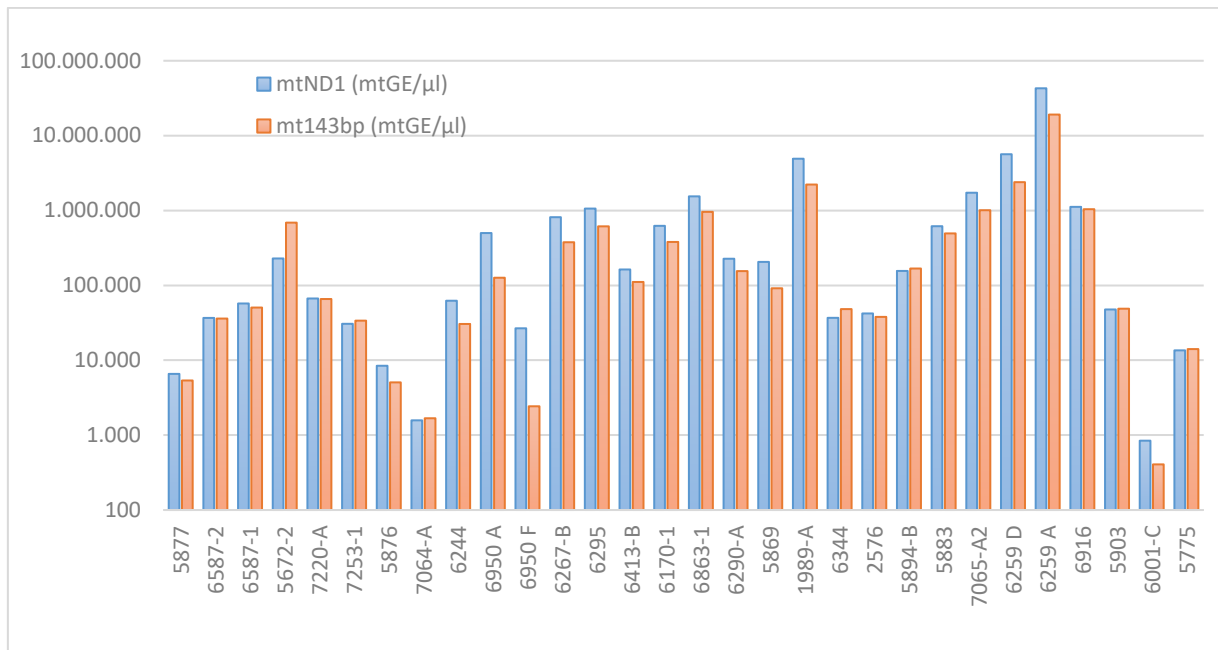


Grafico1. Risultati della quantizzazione della reazione tetraplex qPCR per i due target mitocondriali. Per ogni campione è mostrato in blu il target mitocondriale corto e in arancione il target mitocondriale lungo. L'asse Y è espressa in scala logaritmica, in ascissa sono presenti i campioni.

Per valutare la qualità del DNA mitocondriale è stato calcolato l'indice di degradazione (rapporto tra target mitocondriale corto/ target mitocondriale lungo) che variava in un intervallo da 0.33 a 11.00. Il grafico (grafico 1) mette a confronto i due target mitocondriali, come si può facilmente vedere dal grafico la maggior parte dei campioni non presenta una degradazione eccessiva. L'unico campione che ha mostrato un valore più alto di indice di degradazione è il 6950-F (DI=11), anche la quantizzazione per la sonda del DNA nucleare è basso e l'elettroferogramma presentava un profilo molto degradato.

I capelli sono uno delle matrici biologiche che si possono trovare sulle scene del crimine. I capelli, escludendo la parte del bulbo pilifero sono costituiti da cellule cheratinizzate e prive di nucleo, per cui l'unico materiale genetico a disposizione è quello mitocondriale, contenuto nel citoplasma cellulare. Il saggio tetraplex è stato utilizzato per quantificare il DNA mitocondriale presenti nei fusti di capelli appartenenti a sette diversi individui. In particolar modo i capelli codificati con 1_H1.1, 1_H1.5, 1_H1.9. codificano il primo, il quinto e il nono frammento del fusto di un capello al fine di valutare la quantità di DNA mitocondriale mano a mano che ci si allontana dalla radice. Lo stesso discorso vale per i

campioni 1_H2 e 1_H3. I valori di quantizzazione per i due target mitocondriali sono riportati nella tabella 22.

Campioni	mtND1 (mtGE/ μ l)	mt143bp (mtGE/ μ l)	Rapporto mtND1/mt143bp
1_H1.1	960,43	151,88	6.32
1_H1.5	665,34	37,50	17.74
1_H1.9	401,07	1,33	301.02
1_H2.1	411,19	23,65	17.39
1_H2.5	666,03	13,24	50.29
1_H2.9	696,58	1,19	583.62
1_H3.1	634,37	61,48	10.32
1_H3.5	742,78	22,19	33.48
1_H3.9	1.159,83	8,00	144.93
M5 GHEP 2016	871,99	110,54	7.89
6864-3	3.543,71	1.602,13	2.21
5898	2.945,82	2.642,92	1.11
5899-1	1.106,26	818,75	1.35
5899-2	991,52	63,44	15.63
5900- 1	1.670,00	599,25	2.79
5900-2	1.880,13	1.639,55	1.15

Tab.22. Confronto valori di quantizzazione per il target mitocondriale corto (mtND1) e il target mitocondriale lungo (mt143bp) per i fusti di capelli presi in esame. Nell'ultima colonna è calcolato l'indice di degradazione per il DNA mitocondriale (rapporto mtND1/mt143bp).

Come previsto i fusti dei capelli non hanno prodotto nessun risultato per il target del DNA nucleare mentre si apprezza una certa quantità di DNA mitocondriale. Le copie di mtDNA riscontrate variavano da 401,07 a 3.543,71 (mtGE/ μ l) e 1.19 a 2.642,92 (mtGE/ μ l) per il target corto e lungo rispettivamente.

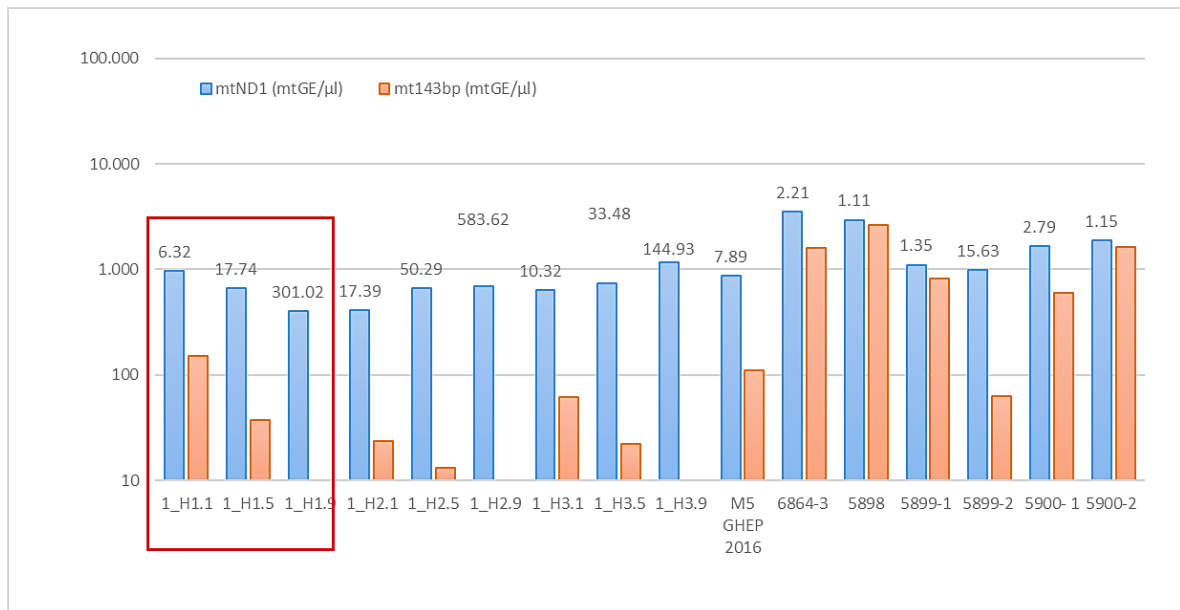


Grafico2. Risultati della quantizzazione della reazione tetraplex qPCR per i due target mitocondriali. Per ogni campione è mostrato in blu il target mitocondriale corto e in arancione il target mitocondriale lungo. L'asse Y è espressa in scala logaritmica, in ascissa sono presenti i campioni di capelli. Nella parte superiore della colonna sono indicati i valori di indice di degradazione.

Relativamente ai tre frammenti di capelli codificati con 1_H1.1, 1_H1.5, 1_H1.9, sia dalla tabella che dal grafico si può dedurre che mano a mano che ci si allontana dalla radice aumenta la quantità di DNA mitocondriale frammentato, diminuisce la quantità di DNA mitocondriale integro e di conseguenza aumenta l'indice di degradazione (riquadro rosso nel grafico2).

Il campione 5899-2 presenta un indice di degradazione abbastanza alto con una quantità di DNA mitocondriale per il target da 143bp pari a 63.44. Basandoci solo sul dato della reazione tetraplex è atteso un DNA moderatamente degradato. Infatti dalla reazione di sequenziamento del mtDNA si è ottenuto un profilo parziale per la regione di controllo. Viceversa il campione 5900-2 presenta dei buoni valori per sia in termini di qualità che quantità di DNA mitocondriale, difatti il sequenziamento ha prodotto un profilo completo.

Capitolo 6

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio descrive un nuovo saggio in Real-Time PCR per la simultanea quantificazione del DNA mitocondriale e del DNA nucleare in differenti matrici forensi quali resti scheletrici umani, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), unghie e capelli. Sebbene questi campioni potrebbero contenere DNA nucleare questo potrebbe essere danneggiato e/o degradato, per questo motivo le analisi di tipizzazione genetica sono condotte sul DNA mitocondriale.

È noto che, le applicazioni del DNA mitocondriale, rispetto al DNA nucleare, sono ridotte sia come tipologia che come potere discriminativo ma sono in relazione alle due più importanti caratteristiche biologiche del genoma mitocondriale: l'elevato numero di copie e l'assenza di ricombinazione. Proprio l'elevato numero di copie lo rendono indispensabile nell'analisi di reperti in cui il materiale cellulare è ridotto oppure è stato sottoposto a fenomeni di degradazione come nel caso di reperti antichi (resti scheletrici) o di materiale biologico mal conservato o esposto ad agenti chimici o fisici. Un reperto che viene tipizzato quasi esclusivamente attraverso l'analisi del DNA mitocondriale è rappresentato dalle formazioni pilifere, in particolare i capelli che spesso vengono rinvenuti sulla scena del crimine. I capelli, escludendo la parte del bulbo pilifero sono costituiti da cellule cheratinizzate e prive di nucleo, per cui l'unico materiale genetico a disposizione è quello mitocondriale, contenuto nel citoplasma cellulare.

La stima della quantità di DNA in un campione forense è essenziale per una buona pianificazione e ottimizzazione delle reazioni di genotipizzazione. Inoltre è opportuno valutare la presenza di sostanze inibitorie che potrebbero influenzare la reazione di PCR. Nel corso dell'ultimo decennio diversi metodi di quantificazioni sono stati sviluppati e posti in commercio ma la maggior parte di questi si concentrano sulla quantificazione

del solo DNA nucleare e nonostante l'utilità del DNA mitocondriale, sono pochissimi i kit in commercio che permettano una quantizzazione di quest'ultimo.

In questo studio, è stato progettato e sviluppato un saggio multiplex Real-Time PCR con cinque diversi target, tutti processati in una singola reazione. I cinque target comprendono: due regioni del DNA mitocondriale, Mt-ATP8 (143bp in lunghezza) e MtND1 (69bp in lunghezza), due regioni del DNA nucleare nel gene RNU2, la corta di 71bp in lunghezza e il frammento lungo di 181bp, unitamente a un controllo interno positivo (IPC) che permette la rilevazione di inibitori. L'utilizzo di target che agiscono sullo stesso bersaglio ma che amplificano frammenti di dimensioni diverse, permettono di ottenere informazioni relativamente alla qualità del mtDNA e del nDNA ovvero sullo stato di degradazione del DNA. Sono state scelte sonde TaqMan® perché più sensibili e affidabili, e rispetto alle sonde intercalanti DNA, come il SYBR Green, ed hanno meno possibilità di creare dimeri. Uno dei principali vantaggi delle sonde TaqMan® è che permettono di sviluppare reazioni in multiplex in modo da poter valutare diversi target in un unico saggio, criterio inderogabile è che ogni sonda deve essere marcata con un fluorocromo unico in modo che non ci sia sovrapposizione di segnale e, di conseguenza, ottenere dei risultati falsati. Principalmente i saggi multiplex offrono quattro vantaggi: i) minor utilizzo, in termini di quantità, del campione da esaminare, ii) ridotto uso dei reagenti (in relazione al numero di target analizzati), iii) incremento throughput nell'esame di più campioni parallelamente e iv) maggior precisione dei risultati. I numerosi vantaggi degli esperimenti qPCR multiplex sostanzialmente derivano dal fatto che tutti i target sono amplificati simultaneamente in un'unica provetta, tuttavia maggiore è il numero di target presenti maggiore sarà la possibilità di avere delle interazioni tra i diversi primer e tra i primer e le sonde.

Infatti, durante la fase di ottimizzazione del saggio multiplex qPCR il target mitocondriale corto (mtND1) mostrava valori di efficienza PCR molto più alti di quelli indicati nelle linee guida MIQE [56]. Al fine di risolvere questo problema, sono stati eseguiti diversi test di ottimizzazione modificando sia le concentrazioni dei primer che delle sonde e per verificare quale target interferisse con il target mtND1 sono state condotte diverse reazioni aggiungendo di volta in volta un target. I diversi test effettuati hanno

evidenziato che la sonda del nucleare corto (nuRNU71) interferiva con il target mtND1. Nonostante durante la progettazione e il disegno delle sonde ex novo del target nucleare sono stati utilizzati due diversi tool, Autodimer (<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) e Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific), per predire l'eventuale formazione di appaiamenti aspecifici, probabilmente durante la reazione qPCR si è verificato un appaiamento non specifico tra sonde e primer. Nel tentativo di risolvere questo problema sono stati ridisegnati primer di amplificazione per il target nucleare corto ma senza ottenere un miglioramento dei risultati. Perciò si è optato per una multiplex qPCR con 4 target, escludendo per il presente studio la sonda corta del nDNA in prospettiva di perfezionare il saggio ridisegnando un altro target per il nucleare corto eventualmente in un'altra regione genomica al fine di ottenere un saggio completo di determinazione simultanea della quantità e della qualità di DNA nucleare e mitocondriale.

Il saggio tetraplex ci ha permesso di quantificare il DNA nucleare (target amplificato 181bp) presente nei nostri campioni forensi, e valutare la qualità e quantità del DNA mitocondriale (target amplificati da 69bp e 143bp) e identificare l'eventuale presenza degli inibitori (target IPC da 70bp). Al fine di valutare la robustezza del saggio per ogni target sono stati valutati i parametri identificati nelle linee guida MIQE [56] quali linearità (R^2), intercetta Y, efficienza di PCR (Efficiency) e slope. Tutti i target rientrano negli intervalli stabiliti come ottimali secondo le linee guida MIQE ($90 < \text{PCR Eff\%} < 110$, $R^2 > 0.980$ e $-3.6 \geq \text{slope} \geq -3.1$) dimostrandone l'affidabilità.

Al fine di poter quantificare il DNA mitocondriale nei campioni utilizzando solo una curva standard valida sia per il nucleare che per il mitocondriale sono state stimate quante copie/ μl di DNA mitocondriali fossero presenti nello standard G1521 Human Genomic (Promega). Il calcolo del mtGE presente nelle diluizioni standard è stato eseguito mediante una serie di diluizioni di un oligonucleotide a doppia elica con concentrazione nota secondo quanto riportato nel precedente studio [57]. La curva standard delle diluizioni degli oligonucleotidi mtND1 ha prodotto un'efficienza di PCR del 89% e un $R^2 > 0.998$ confermando così che i valori di mtGE calcolati delle diluizioni dello standard G1521 erano accurate. Poiché si presume che il DNA di controllo non sia degradato, i

valori ottenuti sono utilizzabili in modo univoco sia per il target mtND1 e sia per mt143bp.

Un totale di 46 campioni forensi quali ossa, denti, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), unghie e capelli sono stati quantizzati mediante questo saggio qPCR. Tutti i campioni utilizzati nello studio sono stati quantizzati in duplicato per ottenere dei risultati riproducibili, e i risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti da altri sistemi di quantizzazione a cui questi campioni erano stati sottoposti in precedenza.

Come atteso si è riscontrato una certa differenza nella quantificazione del DNA degradato mediante le diverse tecniche di qPCR, a causa della differenza di dimensioni tra la sequenza bersaglio dei kit analizzati. Infatti mentre per il Plexor® HY System il target nucleare amplifica una regione di 99bp il saggio tetraplex amplifica una regione di 181bp. Inoltre occorre considerare che molti campioni sono stati sottoposti a più processi di scongelamento-ricongelamento e questo potrebbe aver causato un'alterazione della quantità e qualità di template presente nel campione.

Per valutare l'affidabilità dei risultati ottenuti, le stime di quantificazione per il DNA nucleare sono state analizzate in relazione ai risultati della genotipizzazione dei microsatelliti autosomici. La maggior parte dei risultati ottenuti ha mostrato una discordanza tra i valori di quantificazione ottenuti dalla reazione tetraplex e i valori ottenuti dal sistema Plexor HY, tale discordanza, considerando i profili degli STR autosomici prodotti da questi campioni, era del tutto attesa in quanto si trattava di profili con un andamento tipico del DNA degradato.

Per il target nucleare, non sorprende che, i valori di quantizzazione più bassi si sono riscontrati nei campioni di resti scheletrici, da notare che nessuno dei fusti di capelli ha mostrato copie di DNA nucleare rilevabile.

Per entrambi i target mitocondriali tutti i campioni hanno mostrato dei valori positivi anche se la maggior parte dei campioni presentavano quantità molto basse di DNA nucleare. Per il mitocondriale è stato possibile calcolare l'indice di degradazione (rapporto mtND1/mt143bp). Tutti i campioni ad eccezione di uno, il 6950-F (DI=11),

hanno riportato dei valori di indice di degradazione inferiore a 2.36, indicativo di una degradazione pressochè assente.

Questo saggio è stato utilizzato per quantificare il DNA mitocondriale presenti nei fusti di capelli appartenenti a sette diversi individui. Come previsto tutti i fusti dei capelli hanno mostrato esclusivamente la presenza di DNA mitocondriale. I capelli codificati con 1_H1.1, 1_H1.5, 1_H1.9 corrispondono a frammenti dello stesso capello, e codificano il primo, il quinto e il nono frammento del fusto di un capello al fine di valutare la quantità di DNA mitocondriale mano a mano che ci si allontana dalla radice. Per questi campioni, come atteso mano a mano che ci si allontana dalla radice aumentava la quantità di DNA mitocondriale frammentato e diminuiva la quantità del DNA mitocondriale integro e di conseguenza aumentava l'indice di degradazione.

Nonostante questa osservazione è stata ottenuta solo per tre diversi capelli merita di essere approfondita poiché potrebbe risultare molto utile per ottimizzare il sequenziamento del DNA mitocondriale.

In conclusione si può affermare che il saggio si è dimostrato robusto e sensibile sia per la quantificazione del mtDNA che del DNA nucleare su diversi tipi di campioni che si incontrano comunemente nella pratica forense.

Capitolo 7

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Tagliabracci, F. Alessandrini, L. Mazzarini, V. Onofri, N. Onori, C. Turchi, *Introduzione alla genetica forense: indagini di identificazione personale e di paternità* (2010), Springer; doi:10.1007/978-88-470-1512-8.
- [2] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Elsevier, 2010; <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01945-X>.
- [3] H. Andreasson, U. Gyllensten, M. Allenet, Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis, *Biotechniques*, 33 (2) (2002), pp. 402-44; doi: 10.2144/02332rr07.
- [4] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, O. García, L. Fernández de Simón, J. García-Hirschfeld, M. Sancho, C. de La Rúa, J. Fernández-Piqueras, Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, *Forensic Sci. Int.*, 139 (2–3) (2004), pp. 141-149; doi:10.1016/j.forsciint.2003.10.008.
- [5] J.A. Walker, D.J. Hedges, B.P. Perodeau, K.E. Landry, N. Stoilova, M.E. Laborde, J. Shewale, S.K. Sinha, M.A. Batzer., Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification, *Anal Biochem.*, 337 (1) (2005), pp. 89-97; doi: 10.1016/j.ab.2004.09.036.
- [6] H. Andreasson, M. Nilsson, B. Budowle, H. Lundberg, M. Allen, Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials, *Forensic Sci. Int.*, 164 (1) (2006), pp. 56-64; doi: 10.1016/j.forsciint.2005.11.024.
- [7] H. Niederstatter, S.Köchel, P. Grubwieser, M. Pavlic, M. Steinlechner, W. Parson, A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 1 (1) (2007), pp. 29-34; doi: 10.1016/j.fsigen.2006.10.007.

- [8] M.F. Kavlick, H. S. Lawrence, R. T. Merritt, C. Fisher, A. Isenberg, J. M. Robertson, B. Budowle, Quantification of human mitochondrial DNA using synthesized DNA standards, *J. Forensic Sci.*, 56 (6) (2011), pp. 1457-1463; doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01871.x.
- [9] M.L. Sprouse, N. R. Phillips, M. F. Kavlick, R. K. Roby, Internal validation of human mitochondrial DNA quantification using real-time PCR, *J. Forensic Sci.*, 59 (4) (2014), pp. 1049-1056; doi: 10.1111/1556-4029.12477.
- [10] C. Goodwin, D. Higgins, S.S. Tobe, J. Austin, A. Wotherspoon, M.E. Gahan, D. McNevin, Singleplex quantitative real-time PCR for the assessment of human mitochondrial DNA quantity and quality, *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 14 (1) (2018), pp. 70-75; doi: 10.1007/s12024-017-9944-8.
- [11] F. Fazzini, B. Schöpf, M. Blatzer, S. Coassin, A.A. Hicks, F. Kronenberg, L. Fendt, Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number, *Sci Rep.*, 8 (1) (2018), p. 15347; doi: 10.1038/s41598-018-33684-5.
- [12] M.F. Kavlick, Development of a triplex mtDNA qPCR assay to assess quantification, degradation, inhibition, and amplification target copy numbers, *Mitochondrion*, 46 (2018), pp. 41-50; doi: 10.1016/j.mito.2018.09.007.
- [13] N. von Wurmb-Schwark, R. Higuchi, A.P. Fenech, C. Elfstroem, C. Meissner, M. Oehmichen, G.A. Cortopassi, Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR, *Forensic Sci Int.* 2002 Mar 28;126(1):34-9; doi: 10.1016/s0379-0738(02)00026-9.
- [14] W.R. Hudlow, M.D. Chong, K.L. Swango, M.D. Timken, M.R. Buoncristiani, A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2 (2) (2008), pp. 108-125; doi: 10.1016/j.fsigen.2007.09.001.
- [15] S.R. Hughes-Stamm, K.J. Ashton, A. van Daal, Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples, *Int. J. Legal Med.*, 125 (3) (2011), pp. 341-348; doi: 10.1007/s00414-010-0455-3.
- [16] T. Kitayama, K. Fujii, H. Nakahara, N. Mizuno, K. Kasai, N. Yonezawa, K. Sekiguchi, Estimation of the detection rate in STR analysis by determining the DNA degradation ratio using quantitative PCR, *Leg. Med. (Tokyo)*, 15 (1) (2013), pp. 1-6; <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.07.003>.

- [17] K.L. Swango, M.D. Timken, M.D. Chong, M.R. Buoncristiani, A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples, *Forensic Sci. Int.*, 158 (1) (2006), pp. 14-26; doi: 10.1016/j.forsciint.2005.04.034.
- [18] K.L. Swango, W.R. Hudlow, M.D. Timken, M.R. Buoncristiani., Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples, *Forensic Sci. Int.*, 170 (1) (2007), pp. 35-45; <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.09.002>.
- [19] C. Schwarz, R. Debruyne, M. Kuch, E. McNally, H. Schwarcz , A. D. Aubrey , J. Bada, H. Poinar, New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains, *Nucleic Acids Res.* (2009)Jun; 37(10): 3215–3229; doi: 10.1093/nar/gkp159.
- [20] C. Xavier, M. Eduardoff, C. Strobl, W. Parson, SD quants—Sensitive detection tetraplex-system for nuclear and mitochondrial DNA quantification and degradation inference, *Forensic Sci. Int. Genet.* 42 (2019):39-44; <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.06.004>.
- [21] S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, I. G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* (1981), 290:457-64; <https://doi.org/10.1038/290457a0>.
- [22] R.M. Andrews, I. Kubacka, P.F. Chinnery, R. N. Lightowers, D. M. Turnbull, N. Howell, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for Human mitochondrial DNA, *Nature Genetics* (1999) 23:14; <https://doi.org/10.1038/13779>.
- [23] H. Innan, M. Nordborg, Recombination or mutational hot spots in human mtDNA?, *Mol Biol Evol.* (2002), 19(7):1122–27; doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004170. PMID: 12082131.
- [24] D.C. Wallace, D. Chalkia, Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol* 5 (2013) a021220; doi: 10.1101/cshperspect.a021220.
- [25] R. Alaeddini, S.J. Walsh, A. Abbas, Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - a review, *Forensic Science International: Genetics.* (2010) Apr; 4(3) 148-57; doi: 10.1016/j.fsigen.2009.09.007.

- [26] J. Antheunisse, Decomposition of nucleic acids and some of their degradation products by microorganisms, *Antonie Van Leeuwenhoek*. (1972), 38(3) 311-27; doi: 10.1007/BF02328101.
- [27] C. Capelli, F. Tschentscher, V.L. Pascali, "Ancient" protocols for scene crime? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sci Int* (2003) 131: 59-64; doi: 10.1016/s0379-0738(02)00396-1.
- [28] S. Pääbo, D. M. Irwin, A. C. Wilson, DNA damage promotes Jumping between templates during enzymatic amplification, *J Biol Chem*. (1990) 265 (8): 4718-4721.
- [29] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet*. (2004) 38: 645-679; doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143214.
- [30] M.T. Gilbert, J.J. Sanchez, T. Haselkorn, L.D. Jewell, S.B. Lucas, E. Van Marck, C. Børsting, N. Morling, M. Worobey, Multiplex PCR with minisequencing as an effective high-throughput SNP typing method for formalin-fixed tissue, *Electrophoresis* (2007) 28: 2361-2367; doi: 10.1002/elps.200600589.
- [31] I. G. Wilson, Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. (1997) 63, 3741–3751; doi: 10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997.
- [32] A. Akane, K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, K. Kimura, Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction, *Journal of Forensic Sciences* (1994), 39, 362–372;
- [33] P. Rådström, R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lövenklev, C. Löfström, Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* (2004) 26, 133–146; doi: 10.1385/MB:26:2:133.
- [34] M.T. Gilbert, E. Willerslev, A.J. Hansen, I. Barnes, L. Rudbeck, N. Lynnerup, A. Cooper, Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* (2003) 72: 32–47; doi: 10.1086/345378.
- [35] M.E. Allentoft, M. Collins, D. Harker, J. Haile, C.L. Osham, M.L. Hale, P.F. Campos, J.A. Samaniego, M. Gilbert, P. Thomas, E. Willerslev, G. Zhang, R.P. Scofield Holdaway, N. Richard, M. Bunce, The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proc R Soc B* (2012), 279: 4724–4733; <http://doi.org/10.1098/rspb.2012.1745>.
- [36] C. Schwarz, R. Debruyne, M. Kuch, E. McNally, H. Schwarcz, A.D. Aubrey, J. Bada, H. Poinar, New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost

preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res* (2009), 37: 3215–3229; doi: 10.1093/nar/gkp159.

[37] N.J. Gross, G.S. Getz, M. Rabinowitz, Apparent turnover of mitochondrial deoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat, *J Biol Chem* (1969), Mar 25;244(6):1552-62;

[38] C.T. Wittwer, M.G. Herrmann, A.A. Moss, R.P. Rasmussen, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Biotechniques* (1997) 22, 130-138; doi: 10.2144/97221bi01.

[39] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotechnol*, 1993;11:1026-30; <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>.

[40] C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams, Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* (1996):6 (10): 986-994; doi: 10.1101/gr.6.10.986.

[41] M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg, N.Zoric, The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* (2006) 27, 95-125; doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

[42] J.M.J. Logan, K. J. Edwards, An overview of real-time PCR platforms: Real-time PCR an essential guide, Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom (2004): 13-29, <http://www.horizonpress.com/pcrbooks>.

[43] S. Tyagi, F.R. Kramer, Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* (1996), 14, 303-308; doi: 10.1038/nbt0396-303.

[44] M.J. Espy, J.R. Uhl, L.M. Sloan, S.P. Buckwalter, M.F. Jones, E.A. Vetter, J.D. Yao, N.L. Wengenack, J.E. Rosenblatt, F.R. Cockerill 3rd, T.F. Smith, Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing, *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan; 19(1): 165–256; doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006.

[45] A. Scialpi, A. Mengoni, “La PCR e le sue varianti: quaderno di laboratorio.” Firenze 2008, Firenze University Press.

[46] P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, in *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, vol. 88, n. 16, 1991, pp. 7276–7280; doi: 10.1073/pnas.88.16.7276.

- [47] J. M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Elsevier, 2012; <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>.
- [48] O. Henegariu, N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt, Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* (1997). 23, (3): 504-511; doi: 10.2144/97233rr01.
- [49] Thermo Fisher Scientific, Real-Time PCR handbook; <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>.
- [50] M.J. McPherson, S.G. Moller, *PCR - Second Edition*, Taylor & Francis Group, Oxford, UK (2006).
- [51] K.J. Edwards, Performing Real Time PCR, Chapter 4. In: *Real-Time PCR: An Essential Guide*, Edited by: Logan J., Edwards K., Saunders N. Caister Academic Press, Norfolk, UK (2004).
- [52] S. Kennedy et al., *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*, Caister Academic Press Norfolk (2011).
- [53] T.B. Morrison, J. J. Weis, C. T. Wittwer, Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* (1998) 24, 954-962.
- [54] M.L. Wong, J.F. Medrano, Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques* (2005) 39; <https://doi.org/10.2144/05391RV01>.
- [55] S.A. Bustin, T. Nolan, Pitfalls of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, *J. Biomol. Tech* (2004):15, 155–16; PMID: 15331581.
- [56] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clin. Chem.* (2009) 55 (4): 611–622; <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- [57] M.D. Timken, K.L. Swango, C. Orrego, M.D. Chong, M. R. Buoncristiani, Quantitation of DNA for Forensic DNA Typing by qPCR (quantitative PCR): Singleplex and multiplex modes of nuclear and mitochondrial genomes and the Y chromosome, US Department of Justice (2005).

- [58] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm, S.G. Rozen, Primer3--new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res.* (2012), 40 (15) p. e115; doi: 10.1093/nar/gks596.
- [59] P.M. Vallone, J.M. Butler; AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques* (2004) 37(2): 226-231; doi: 10.2144/04372ST03.
- [60] QuantiNova Multiplex PCR Kit 06/2016, Qiagen, QuantiNova Multiplex PCR Kit Handbook: www.qiagen.com/HB-2105.
- [61] QIAamp® DNA Micro Handbook, Third Edition, December 2014, Qiagen.
- [62] QIAamp® DNA Investigator Handbook, January 2020, Qiagen.
- [63] QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook, February 2020, Qiagen.
- [64] DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16, TM332 · Revised 12/16, Promega.
- [65] Plexor® HY System for Applied Biosystems 7500 and 7500 fast Real-Time PCR systems technical manual, Revised 9/17 TM293, Promega.
- [66] Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits user guide (man.4485354, rev.H), Thermo Fisher Scientific.
- [67] PowerPlex® ESX 17 Fast System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Technical manual, Revised 1/21 TMD040, Promega.
- [68] PowerPlex® ESI 17 Fast System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Technical manual, Revised 2/21 TMD041, Promega.
- [69] PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Technical manual, Revised 12/18 TMD045, Promega.
- [70] C. Eichmann, W. Parson, 'Mitominis': multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. *Int J Legal Med.* (2008) Sep;122(5):385-8, doi: 10.1007/s00414-008-0227-5.
- [71] C. Berger, W. Parson, Mini-midi-mito: adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. *Forensic Sci Int Genet.* (2009) Jun;3(3):149-53, doi: 10.1016/j.fsigen.2009.01.011.
- [72] A. Brandstätter, H. Niederstätter, M. Pavlic, P. Grubwieser, W. Parson, Generating population data for the EMPOP database - an overview of the mtDNA sequencing and

data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example. *Forensic Sci Int.* (2007);166 (2-3):164-75, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.006.

[73] J.A. Nicklas, E. Buel, Quantification of DNA in forensic samples. *Anal Bioanal Chem*, 2003;376:1160-7; <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1924-z>.

[74] K. Szuhai, J. Ouweland, R. Dirks, M. Lemaître, J. Truffert, G. Janssen, H. Tanke, E. Holme, J. Maassen, A. Raap, Simultaneous A8344G heteroplasmy and mitochondrial DNA copy number quantification in Myoclonus Epilepsy and Ragged-Red Fibers (MERRF) syndrome by a multiplex Molecular Beacon based real-time fluorescence PCR, *Nucleic Acids Research*, 2001, Vol. 29, No. 3 e13; doi: 10.1093/nar/29.3.e13.

[75] M.E. Gahan, F. Miller, S.R. Lewin, C.L. Cherry, J.F. Hoy, A. Mijch, F. Rosenfeldt, S.L. Wesselingh, Quantification of mitochondrial DNA in peripheral blood mononuclear cells and subcutaneous fat using real-time polymerase chain reaction, *Journal of Clinical Virology*(2001), 22: 241-247; doi: 10.1016/s1386-6532(01)00195-0.