



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di laurea in Scienze Biologiche

**«TECNICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PROFILI DI
METILAZIONE NELLE INDAGINI FORENSI»**

**«TECHNIQUES FOR IDENTIFYING METHYLATION PROFILES IN
FORENSIC INVESTIGATIONS»**

Tesi di laurea di:
Silvia Fagioli

Docente
Referente
Marco Barucca

Sessione di Ottobre

Anno accademico 2018/2019

EPIGENETICA: studio delle modificazioni ereditabili che portano a variazioni dell'espressione genica, senza però alterare la sequenza del DNA.

METILAZIONE DEL DNA: modificazione epigenetica che prevede l'aggiunta di gruppi metilici alla citosina del DNA.

-fattori ambientali
-fumo
-alcol
-invecchiamento
-Dieta



**Metilazione
del DNA**




-Stato di salute
-Cancro
-Caratteristiche
fenotipiche

INDAGINI FORENSI ED EPIGENETICA



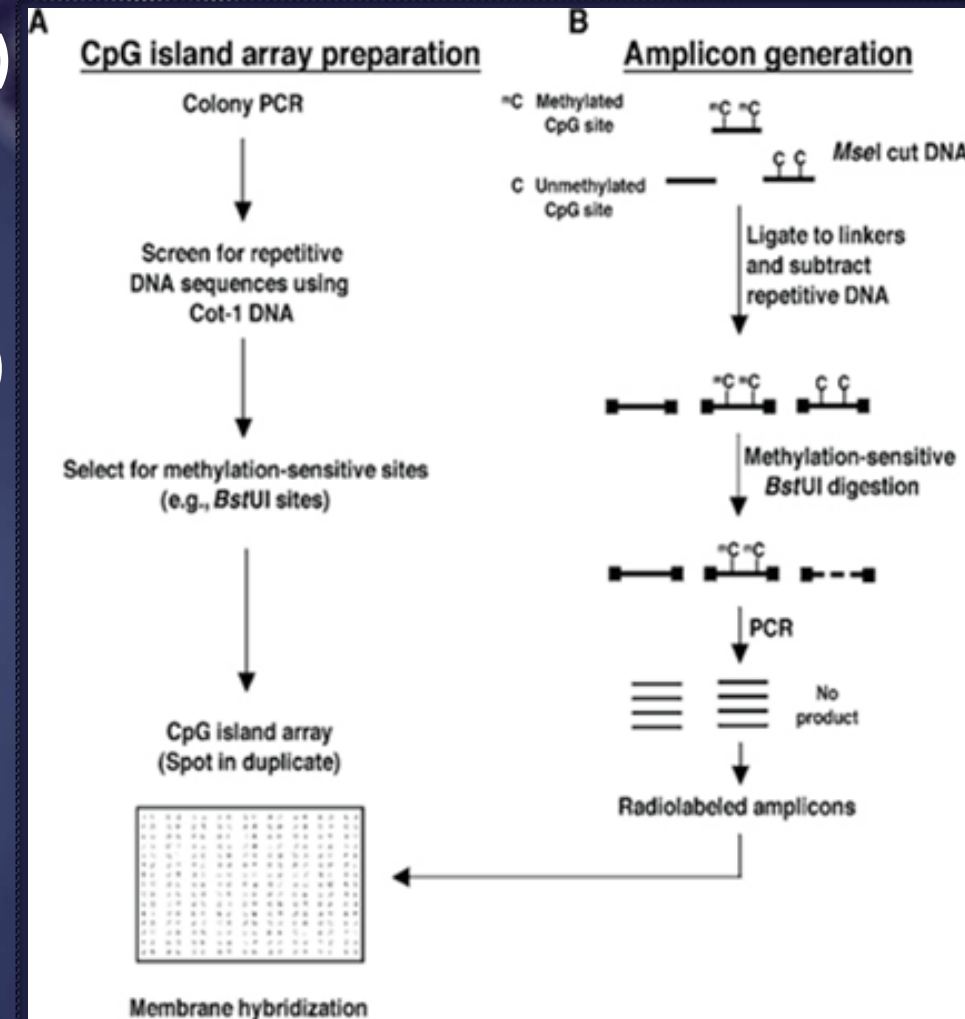
- Rilevamento dei campioni di DNA sulla scena del crimine
- Costruzione dei profili di metilazione (*marcatori di metilazione*)
- Determinazione di:
 - tipo di cellula e tessuto
 - sesso
 - stima dell'età
 - previsione di caratteristiche (colore capelli, occhi e pelle ecc.)
 - distinzione di gemelli omozigoti
- Restrizione del bacino di sospettati



TECNICHE per la l'analisi della metilazione del DNA

DIFFERENTIAL METHYLATION HYBRIDIZATION

- DNA tagliato con *MseI* (non sensibile alla metilazione)
- Legame dei linkers alle estremità
- Digestione con *BstUI*, *HpaII* (sensibili alla metilazione)
- PCR
- Marcatura degli ampliconi
- Ibridazione con microarray di isole CpG



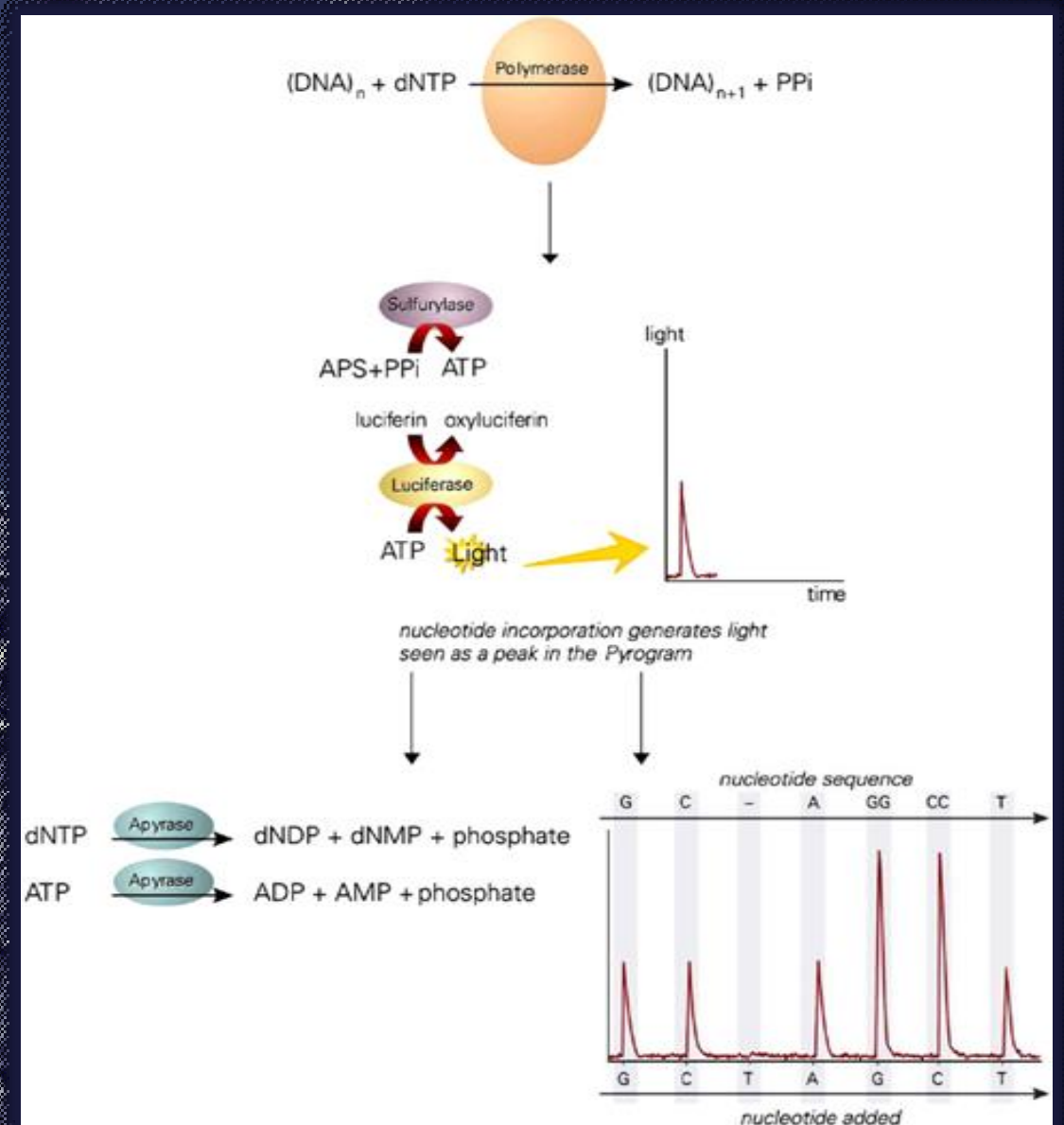
TRATTAMENTO CON BISOLFITO DI SODIO



- Clonazione degli amplificati
- Sequenziamento (sanger o di nuova generazione)

PIROSEQUENZIAMENTO

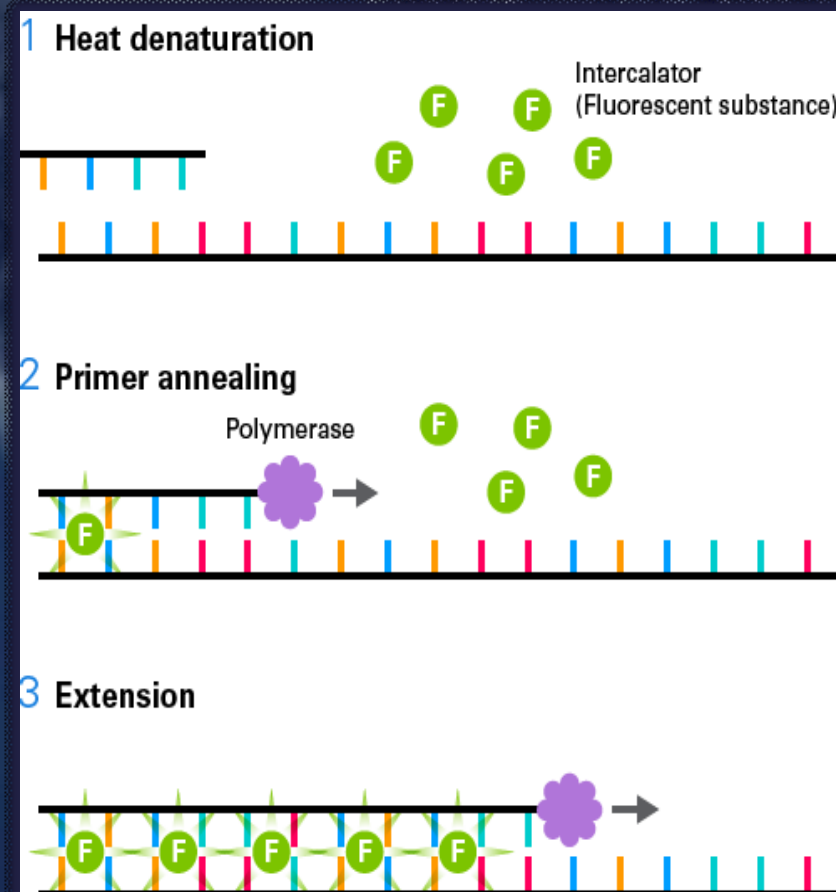
- Trattamento con bisolfito di sodio e PCR
- Pyrosequencing



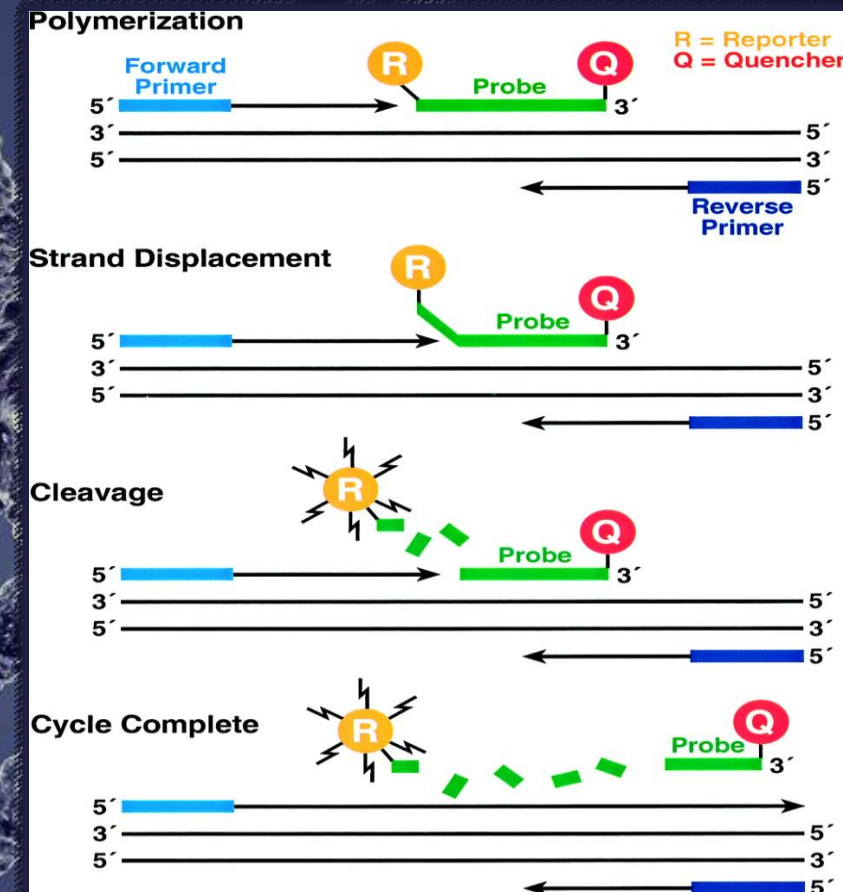
PCR QUANTITATIVA

- Trattamento con bisolfito di sodio

SYBER-GREEN qPCR



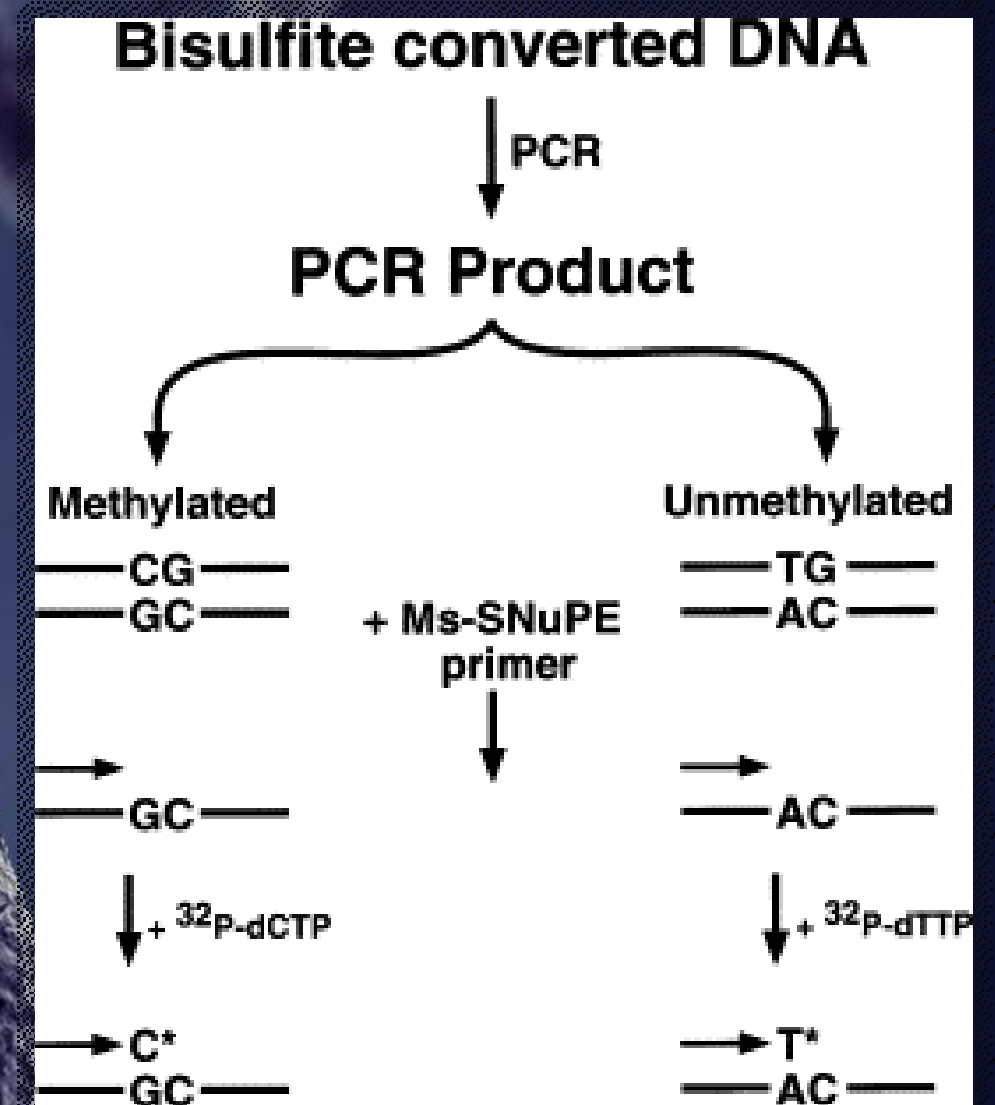
TACMAN qPCR



Ms-SNuPE

(ESTENSIONE DEL PRIMER MONONUCLEOTIDICO SENSIBILE ALLA METILAZIONE)

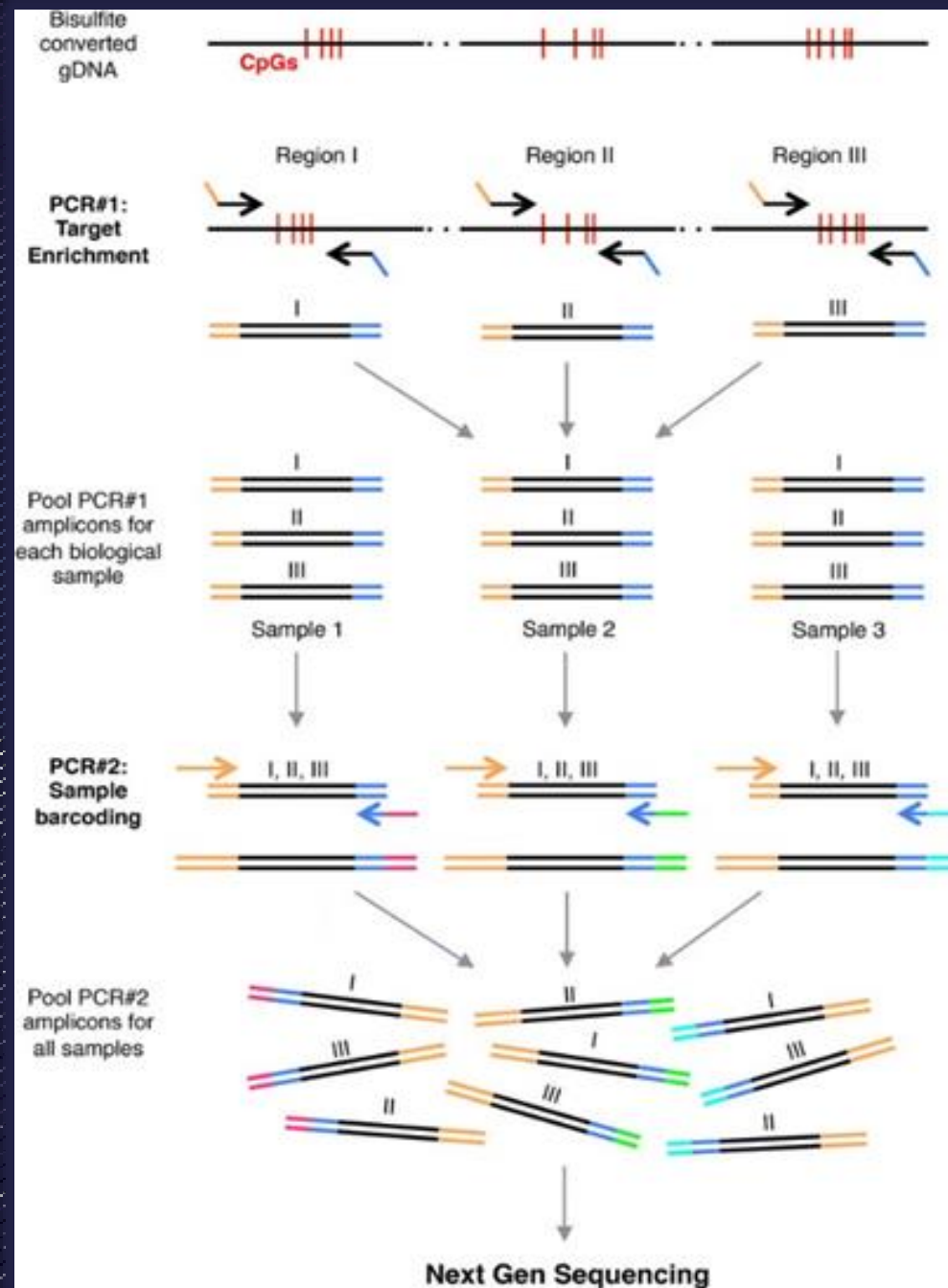
- Trattamento con bisolfito di sodio e PCR
- Primers *Ms-SNuPE* e ibridazione
- Aggiunta di un singolo nucleotide marcato (dCTP, dTTP)
- Corsa elettroforetica e quantificazione con fosforimetro



BBA-seq

(SEQUENZIAMENTO DI AMPLICONI CON CODICI A BARRE)

- Trattamento con bisolfito di sodio
- PCR di arricchimento dei target
- PCR per aggiunta di *CODICI A BARRE*
- Sequenziamento ILLUMINA



RIASSUNTO



In questa revisione si discute dell'importanza della metilazione del DNA negli studi forensi, i requisiti e i fattori limitanti delle tecniche epigenetiche per l'analisi del profilo di metilazione del DNA.

Tale modificazione, infatti, può rivelare informazioni cruciali per l'identificazione di un potenziale autore di un crimine, in quanto il profilo di metilazione di DNA di un individuo è unico, essendo esso il risultato di fattori ambientali presenti durante il suo sviluppo e la sua vita.

La tecnica di più rapida e facile utilizzazione nei laboratori della polizia scientifica è la differential methylation hybridization.

Mentre il pirosequenziamento, la PCR quantitativa, il Ms-SNuPE e il BBA-seq rappresentano delle estensioni di metodi basati sul trattamento con il bisolfito di sodio; quest'ultimo infatti permette di distinguere le citosine metilate da quelle non metilate.

BIBLIOGRAFIA

- Hasnain S.E. Sabeeha: Forensic Epigenetic Analysis: The Path Ahead. Med Princ Pract. 2019;28(4):301-308. Pub. 2019 Mar 12.
- <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-182-5:087>
- Diagnostica molecolare, George P. Patrinos e Wilhelm J. Ansorge, 2^a edizione 2010.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202302000646>
- Alegria-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V: Epigenetics and lifestyle. Epigenomics 2011;3:267–277.
- Borsting C, Morling N: Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. Forensic Sci Int Genet 2015;18:78–89.
- Genetica un approccio molecolare, Peter J. Russell, 4^o edizione italiana di Carla Cicchini e Alessandra Marchetti.