



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
Corso di laurea in Scienze Biologiche

L'importanza del trascrittoma nella genetica forense.

The importance of the transcriptome in forensic genetics

Relatore
Professore Marco Barucca

Laureanda
Francesca D'Ercole

Anno Accademico 2020/2021

Il **trascrittoma** indica la totalità degli RNA che vengono trascritti a partire dai geni di un individuo. Comprende:

- mRNA
- ncRNA

Gli ncRNA possono essere classificati in base alla loro lunghezza in:

- lncRNA: trascritti più lunghi
- sncRNA: trascritti più corti

A loro volta gli sncRNA possono essere distinti in:

Type of small non-coding RNA	Size (nts)	Function
MicroRNA (miRNA)	~22	Ago – RNAi
Small nuclear RNA (snRNA)	~150	Spliceosome components
Small nucleolar RNA (snoRNA)	60–140	RNA modification
Piwi-interacting RNA (piRNA)	26–31	PIWI – RNAi
tRNA derived small RNA (tsRNA)	15–50	Diverse

La trascrittomica è coinvolta in diversi campi della genetica forense:

1. Identificazione dei fluidi e tessuti corporei
2. Assegnazione dei fluidi corporei a donatori in macchie di fluido corporeo misto
3. Determinazione dell'età delle macchie

Identificazione dei fluidi corporei

La loro identificazione avviene tramite metodi MPS (Massively parallel sequencing):

- metodo di seconda generazione
- permette di sequenziare DNA e RNA

Nell'identificazione dei fluidi corporei sono coinvolti i miRNA

Wang et al. Impiegarono l'array qPCR (TaqMan® Array Human MicroRNA Cards) per lo screening dei miRNA specifici del fluido corporeo. Sette miRNA candidati sono stati identificati come potenzialmente specifici del fluido corporeo e potrebbero essere utilizzati come marcatori di fluidi corporei rilevanti dal punto di vista forense:

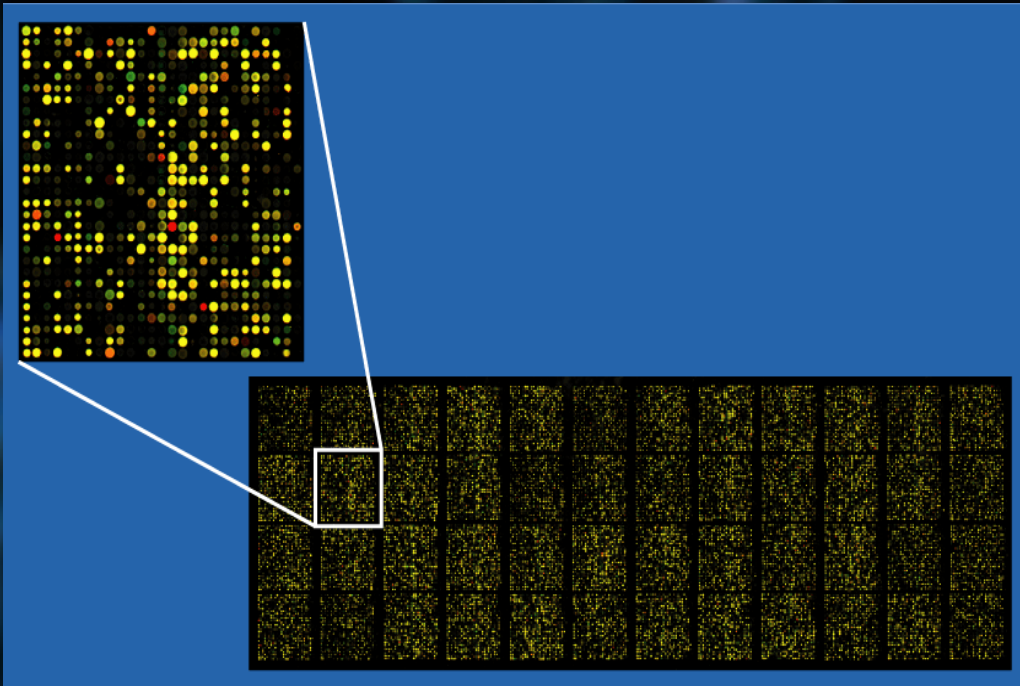
- miR16 e miR486 per il sangue venoso
- miR888 e miR891a per lo sperma
- miR214 per il sangue mestruale
- miR124a per le secrezioni vaginali
- miR138-2 per saliva.



Fasi dello studio:

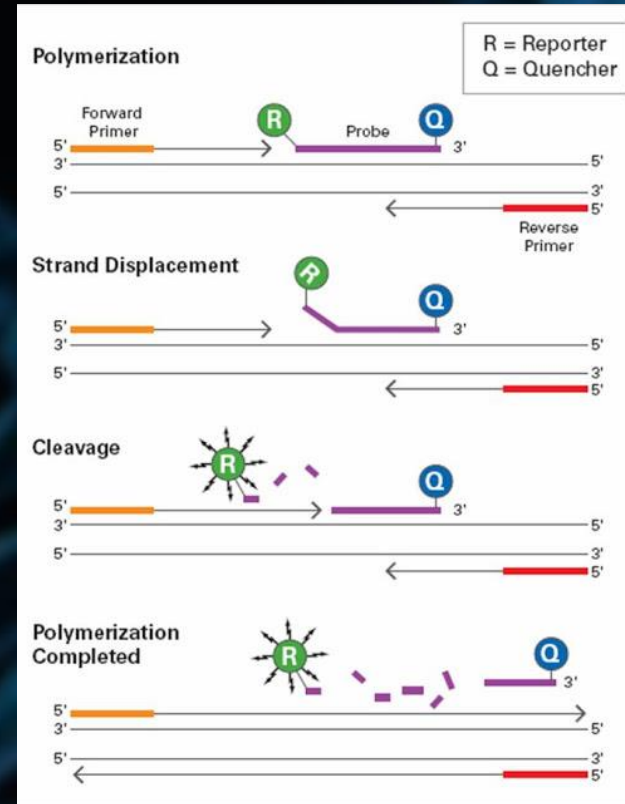
- raccolta di campioni di liquidi corporei
- isolamento e quantificazione dell'RNA
- Analisi dell'array q PCR e selezione dei candidati: utilizzando TaqMan Array Human MicroRNA Cards
- TaqMan RT-qPCR e selezione dei candidati: utilizzando TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit
- Validazione dei geni di riferimento RNU44,RNU48,U6 e U6b

Array qPCR



- le sequenze vengono attaccate al supporto secondo uno schema ordinato prefissato, in modo che sia possibile individuare quale sequenza genica è posizionata in ciascun punto. Le sequenze possono essere DNA, cDNA o oligonucleotidi sintetici
- Quando due sequenze complementari si “riconoscono”, si formano legami idrogeno fra basi complementari.
- L'ibridazione avviene tra una sequenza bersaglio immobilizzata sul supporto e una sequenza mobile, detta sonda, di mRNA, DNA o cDNA marcata con un fluorocromo.

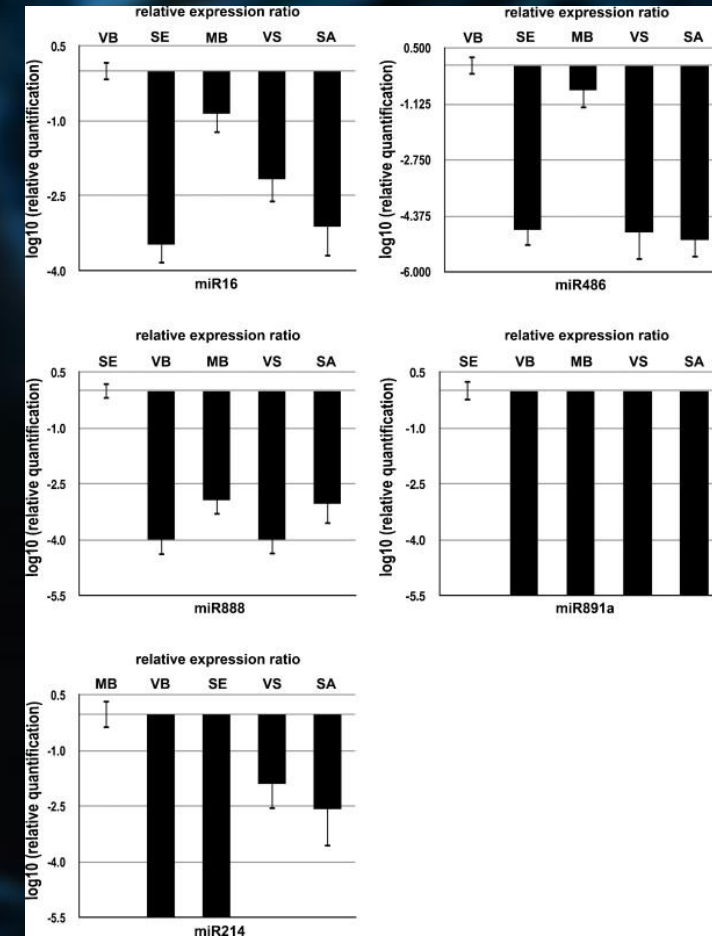
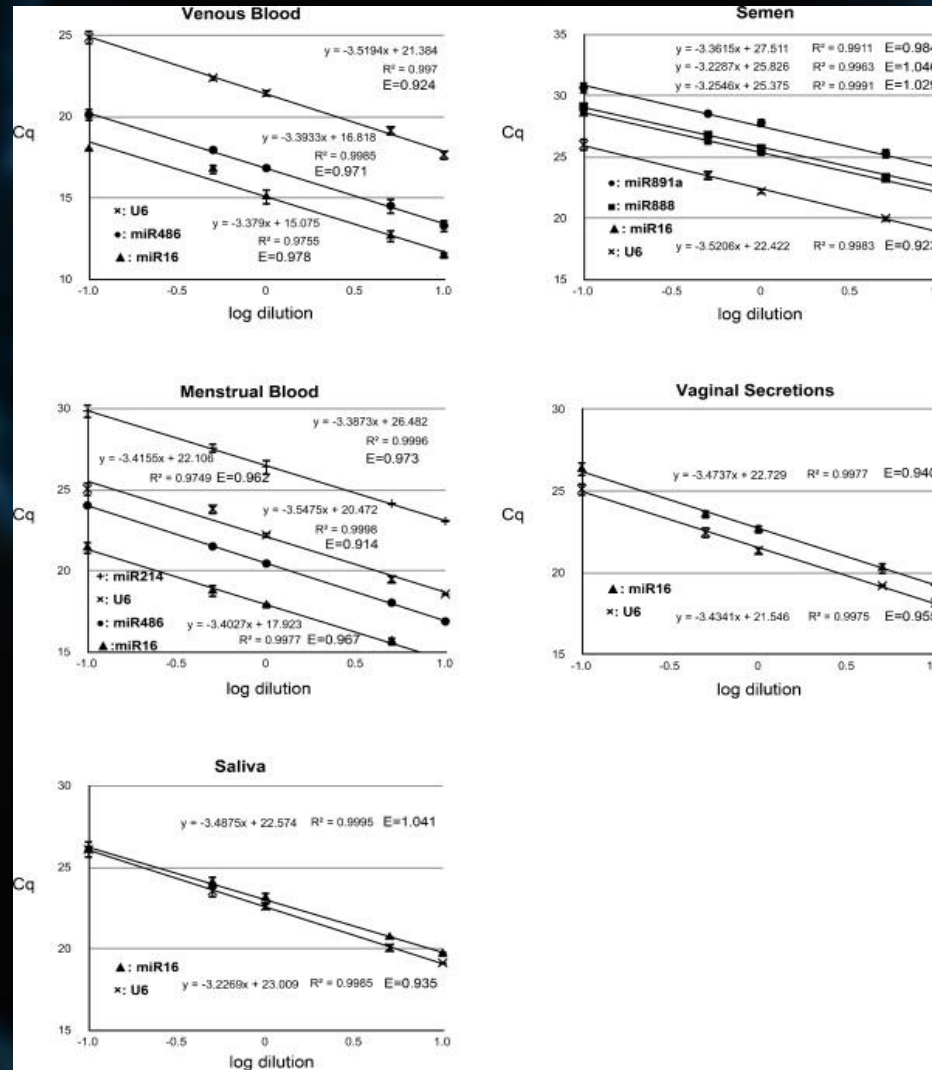
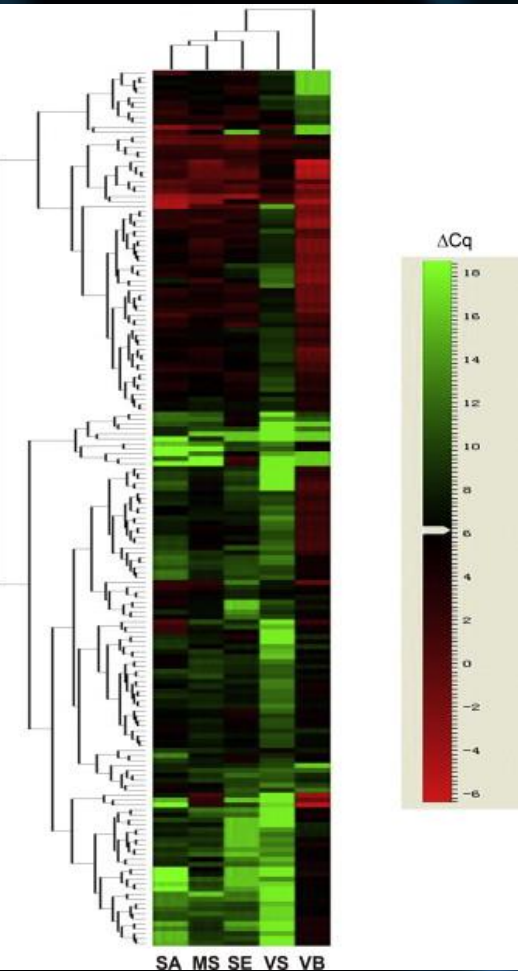
TaqMan RT-qPCR



- utilizzata per aumentare la specificità della real time PCR
- si basa sull'utilizzo di un oligonucleotide marcato con un fluoroforo a una estremità mentre nell'altra estremità è presente un quencher
- Sfruttando l'attività 5'→3' esonucleasica della Taq polimerasi, l'enzima esplica la propria attività esonucleasica scindendo il fluoroforo dal resto della molecola durante l'ibridazione.
- ad ogni ciclo dopo irradiazione del campione viene emessa fluorescenza

Risultati:

- TaqMan[®] Analisi dei dati dell'array:
- Validazione dei marcatori di miRNA candidati:



Mappa di cluster gerarchica non supervisionata di 177 miRNA dall'analisi qPCR-array di cinque fluidi corporei rilevanti dal punto di vista forense, ovvero sperma (SE), saliva (SA), secrezioni vaginali (VS), sangue mestruale (MB) e sangue venoso (VB).

Determinazione delle efficienze qPCR dalle pendenze della curva di calibrazione, secondo l'equazione: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$. Per calcolare la pendenza

Rapporto di espressione relativa di cinque marcatori di miRNA nei fluidi corporei, cioè sangue venoso (VB), secrezioni vaginali (VS), sangue mestruale (MB), sperma (SE), saliva (SA). I valori sono stati sottoposti a trasformazione log₁₀ (le barre di errore riflettono la variazione tra dieci individui non imparentati)

Identificazione dei tessuti

-Hanson et al. hanno progettato un sistema per identificare 10 tipi di organi/tessuti utilizzando un pannello mirato di 46 biomarcatori di mRNA. Gli organi e i tessuti identificabili includono cervello, polmone, fegato, cuore, rene, intestino, stomaco, muscolo scheletrico, adiposo e trachea.

Fasi del processo:

- Preparazione delle macchie di fluido corporeo
- Isolamento dell'RNA
- Digestione della DNasi I
- Quantificazione dell'RNA
- Preparazione della libreria di RNA mirata TruSeq
- Quantificazione della libreria di RNA mirata TruSeq
- Sequenziamento MiSeq

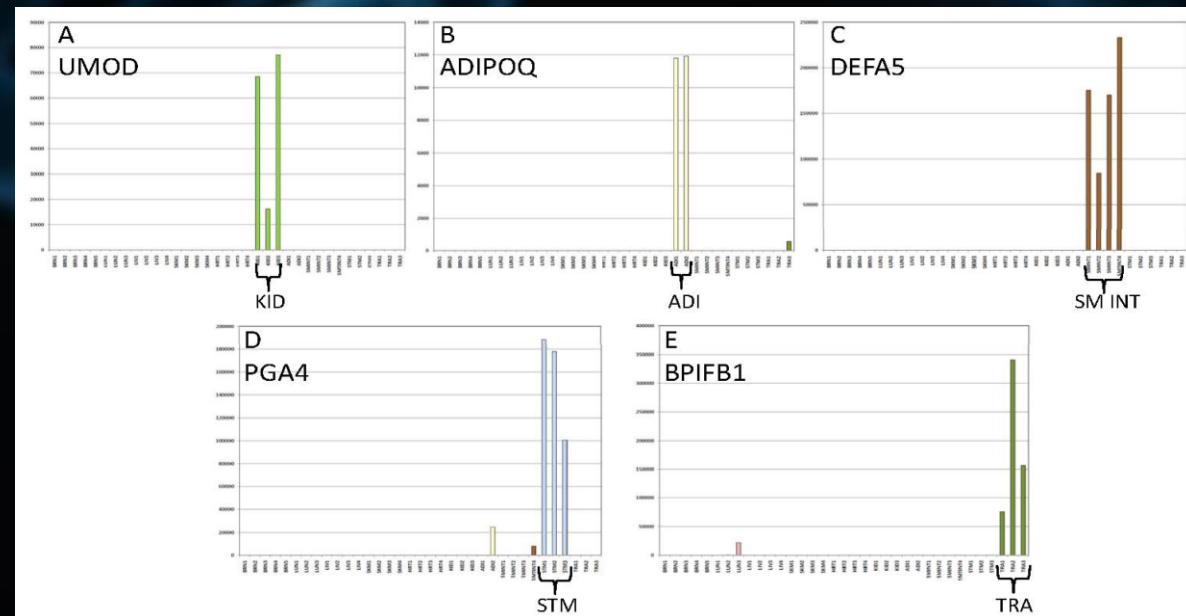
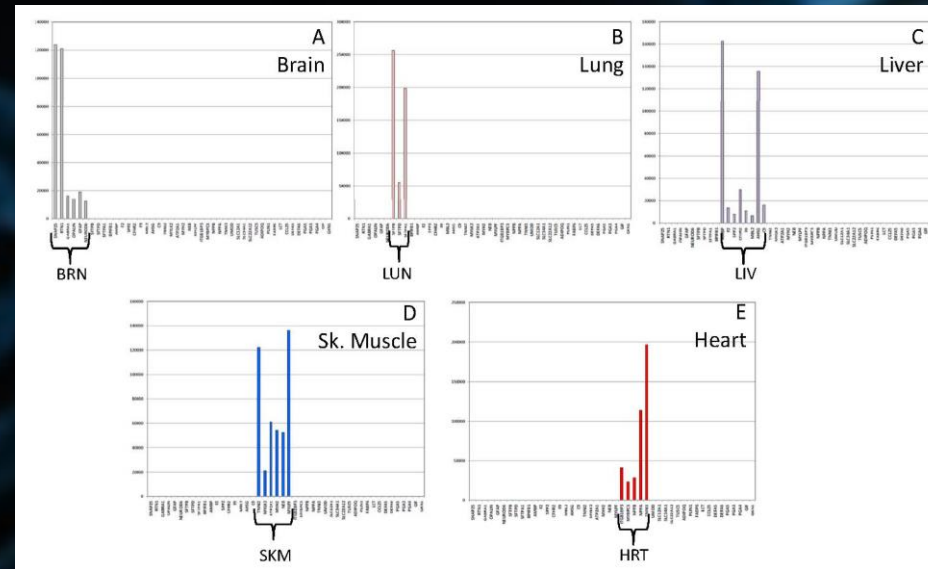
Risultati:

- Selezione dei candidati:



Mappa termica dell'espressione genica di 48 marcatori tessuto-specifici in 10 tessuti (muscolo scheletrico, trachea, polmone, rene, intestino, cuore, tessuto adiposo, cervello, fegato e stomaco). Asse Y: biomarcatori (geni); Asse X: campioni di tessuto. Il verde rappresenta l'espressione più alta, il rosso rappresenta l'espressione più bassa. I gruppi di espressione genica sovraregolata di un gruppo di biomarcatori specifici per il tessuto bersaglio sono evidenziati con cerchi blu

- Specificità del saggio di sequenziamento dell'RNA mirato 46—Plex:



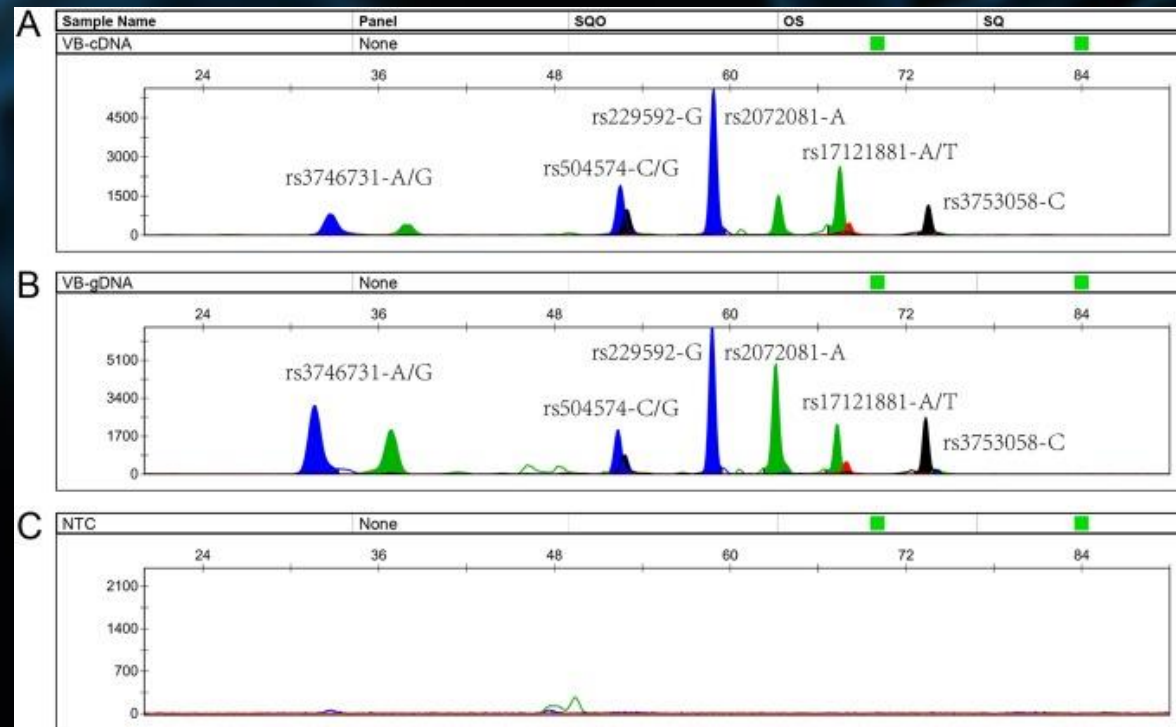
Assegnazione di fluidi corporei o tessuti ad un donatore, in macchie di fluido corporeo misto

- La presenza di SNP della regione codificante nei trascritti di mRNA, consente l'assegnazione diretta di un fluido corporeo a un individuo specifico
- Wang et al. Hanno analizzato 6 SNP specifici del sangue utilizzando un metodo di estensione a base singola (SBE)

Metodologia:

- Selezione del marcatore
- Preparazione del campione
- PCR e istantanea

Risultati:



Risultati della genotipizzazione dell'elettroforesi capillare. (A) cDNA del sangue venoso. (B) gDNA del sangue venoso. (C) Controllo negativo

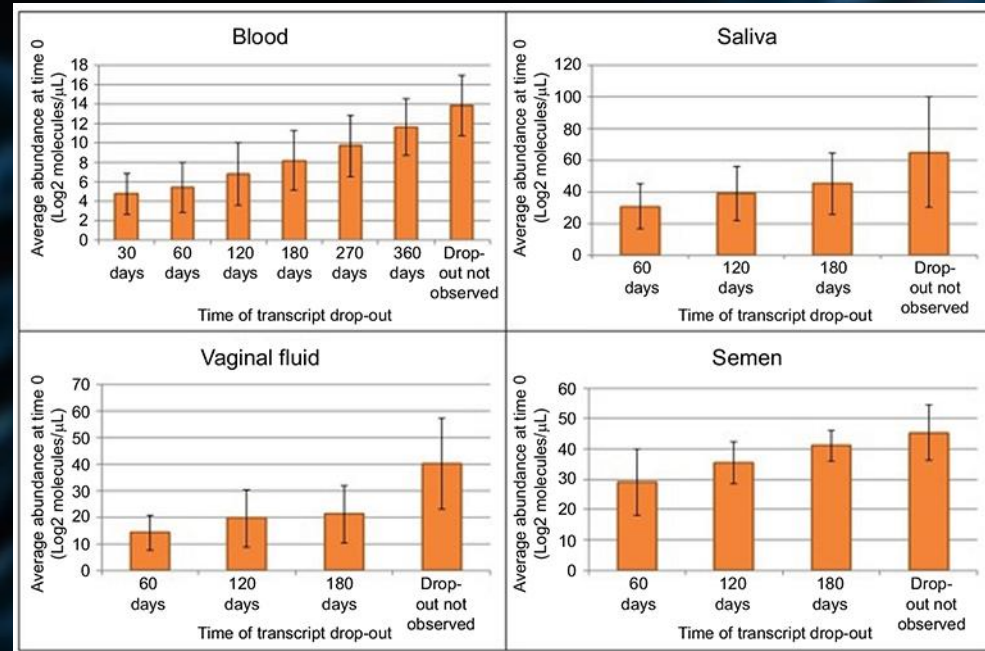
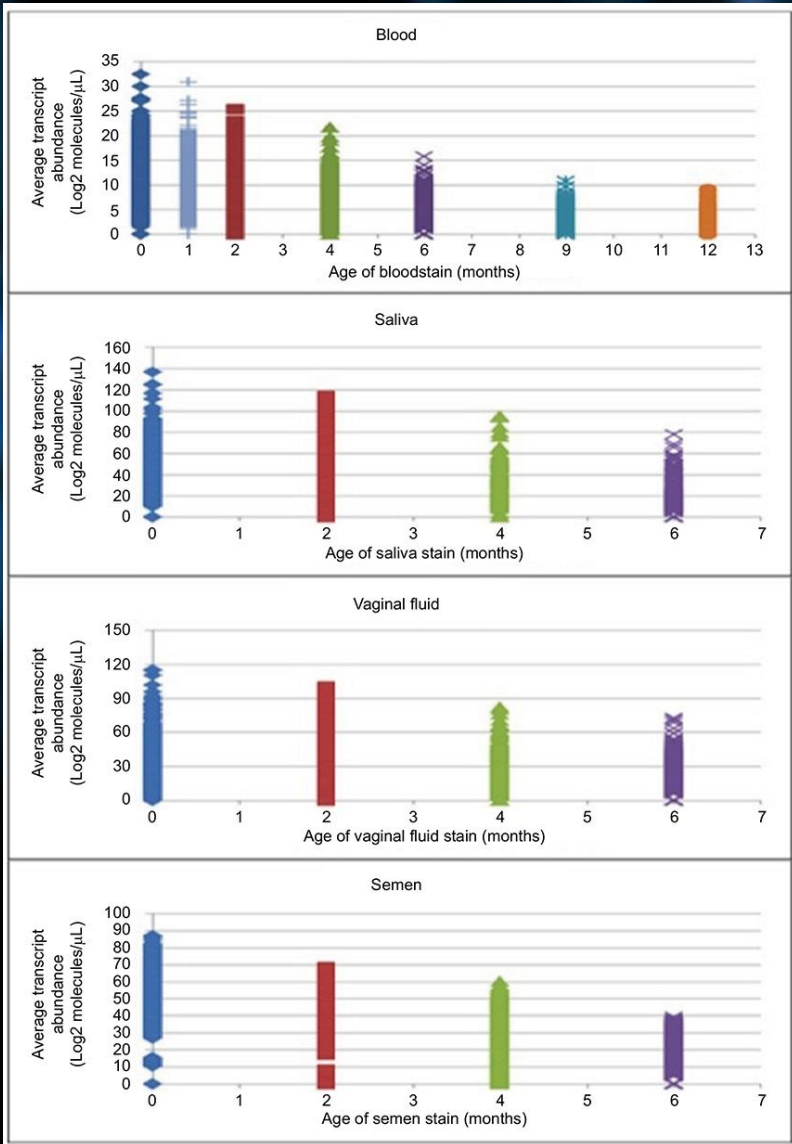
Determinazione dell'età delle macchie

- È fondamentale conoscere il tempo di deposizione (TsD) della macchia
- TsD viene determinato dall'analisi della degradazione tempo-dipendente di biomolecole come DNA e RNA
- Per valutare la qualità e il livello di degradazione vengono considerati i numeri di integrità dell'RNA (RIN), confermato da uno studio di Lin et al.
- Weinbrecht et al. hanno utilizzato RNA-Seq per analizzare la degradazione tempo-dipendente di alcune macchie

Materiali e metodi:

- Descrizione dei campioni
- Isolamento di RNA
- Preparazione della libreria di cDNA
- sequenziamento

Risultati:



La relazione tra l'abbondanza del trascritto al tempo 0 e il tempo di abbandono.

Cambiamenti nell'abbondanza globale della trascrizione con il tempo di conservazione

Il futuro della trascrittomica forense

Il campo e le tecnologie sviluppate in studi rapidi e continui nel prossimo futuro dovrebbero portare all'uso e / o alla scoperta di ulteriori biomarcatori e tipi di RNA. Ulteriori sviluppi nella trascrittomica forense potrebbero includere metodi di RNA non basati sulla PCR per l'identificazione rapida del fluido corporeo.

È probabile che il trascrittoma sarà una parte costitutiva di un processo di integrazione dati per l'analisi delle prove che includerà le entità biologiche non isolate del genoma, del trascrittoma, del metiloma, del proteoma e del microbioma

RIASSUNTO ESTESO

1. Importanza del trascrittoma nella genetica forense: Il trascrittoma comprende sia gli RNA codificanti che RNA non codificanti, utilizzati questi ultimi in diversi ambiti della genetica forense. L'RNA può essere estratto da elementi probatori ed essere analizzato
2. Impieghi del trascrittoma nella genetica forense: Nell'identificazione dei fluidi e tessuti corporei, in particolare sono coinvolti i miRNA mediante l'uso di una tecnica definita array qPCR. Questo studio ha analizzato 7 miRNA specifici per diversi fluidi corporei. Confrontando i dati ottenuti dalle tecniche qPCR array e la TaqMan qPCR si è giunti alla conclusione che miR16, miR486, miR888, miR891a e miR214 sono stati selezionati come potenziali miRNA specifici. Nell'assegnazione dei fluidi o tessuti ad un donatore. In questo caso vengono coinvolti SNP cioè polimorfismo a Singolo Nucleotide, si intende una piccola variazione rispetto alla sequenza "normale" del DNA presente nel corredo genetico individuale e che può concorrere a determinare una condizione anomala nell'organismo. Nello specifico, si tratta di alterazioni di una singola "lettera" nella lunga sequenza di basi azotate A-T-C-G che compongono il nostro patrimonio genetico. Haas et al. hanno proposto che gli SNP della regione codificante (cSNP) abbiano il potenziale per essere applicati nell'identificazione dell'origine dei fluidi corporei o dei tessuti, poiché possono stabilire un'associazione unica tra uno specifico profilo di DNA e uno specifico tipo di fluido corporeo. Nello studio di Wang et al. Sono stati analizzati 6 SNP specifici del sangue utilizzando un metodo di estensione a base singola. Lo scopo di questo studio era di indagare la coerenza dei risultati dell'analisi cSNP tra DNA e RNA su piattaforma di elettroforesi capillare. Sono stati selezionati diversi loci SNP situati in molecole di mRNA che sono stati confermati per essere altamente espressi nel sangue e quindi i genotipi di questi SNP sono stati determinati rispettivamente con DNA genomico (gDNA) e DNA complementare del primo filamento (cDNA) utilizzando il metodo SNaPshot. Il loro studio ha confermato la presenza di questi 6 SNP nel gDNA, mentre alcuni loci mancavano nel cDNA. Nella determinazione dell'età delle macchie assume un ruolo rilevante la definizione del tempo di deposizione. Questo può essere determinato dall'analisi della degradazione di biomolecole come il DNA o RNA. Gli studi iniziali sulla degradazione dell'RNA sono stati condotti principalmente nelle macchie di sangue, ma anche nella saliva, nello sperma e nei capelli strappati. Lin et al. hanno utilizzato un approccio di sequenziamento dell'intero trascrittoma (RNA-Seq) per caratterizzare la degradazione differenziale dell'RNA in diversi fluidi corporei. L'RNA è stato analizzato da sangue fresco e invecchiato (fino a sei settimane), sangue mestruale, mucosa orale/saliva e campioni di secrezione vaginale. Per valutare la qualità e il livello di degradazione dell'RNA, sono stati valutati i numeri di integrità dell'RNA (RIN) (10 indica un campione intatto e 1 un campione completamente degradato [90]). Hanno scoperto che i valori RIN del sangue diminuivano (8,2-2,4) con l'aumentare dell'età, mentre la mucosa orale, il sangue mestruale e la secrezione vaginale hanno mostrato valori di RIN costantemente bassi. Un altro studio molto interessante è quello condotto da Weinbrecht et al. I loro studi hanno dimostrato che l'RNA può essere molto più stabile ex vivo di quanto si credesse. La stima del tempo trascorso dalla deposizione di un fluido corporeo attraverso il monitoraggio della degradazione dell'RNA si è concentrata principalmente sull'RNA ribosomiale (rRNA), sulle trascrizioni dell'mRNA. Lo studio qui riportato ha utilizzato il sequenziamento dell'RNA di nuova generazione per identificare e quantificare un gran numero di trascrizioni estratte dalle macchie di fluidi corporei mediante un approccio shotgun. Lo studio ha dimostrato che le trascrizioni con abbondanza di trascrizioni iniziali più elevate tendono a ritirarsi in ritardo o a non scomparire affatto.
3. Conclusioni: È probabile che il trascrittoma sarà una parte costitutiva di un processo di integrazione dati per l'analisi delle prove che includerà le entità biologiche non isolate del genoma, del trascrittoma, del metiloma, del proteoma e del microbioma

Bibliografia

- Cordula HaasJacqueline NeubauerAndrea Patrizia SalzmannaErin HansonJack Ballantyne, Forensic transcriptome analysis using massively parallel sequencing
- Z. Wang, J. Zhang, H. Luo, Y. Ye, J. Yan, Y. Hou, Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 116–123
- E. Hanson, J. Ballantyne, Human organ tissue identification by targeted RNA deep sequencing to aid the investigation of traumatic injury, *Genes* 8 (2017)
- M.-H. Lin, D.F. Jones, R. Fleming, Transcriptomic analysis of degraded forensic body fluids, *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 35–42
- K.D. Weinbrecht, J. Fu, M. Payton, R. Allen, Time-dependent loss of mRNA transcripts from forensic stains, *RRFMS* 7 (2017) 1–12