

Studio dell'mRNA salivare umano per la diagnosi di natura e di specie

Ilaria Carboni¹, **Valentina Cetica¹**, **Ugo Ricci^{1,2}**

¹ Azienda Ospedaliero-Universitaria "A.Meyer", Viale Pieraccini n° 24 50139 Firenze

² Associazione Identificazioni Forensi, Via F/lli Cervi n° 81 Pontassieve, Firenze

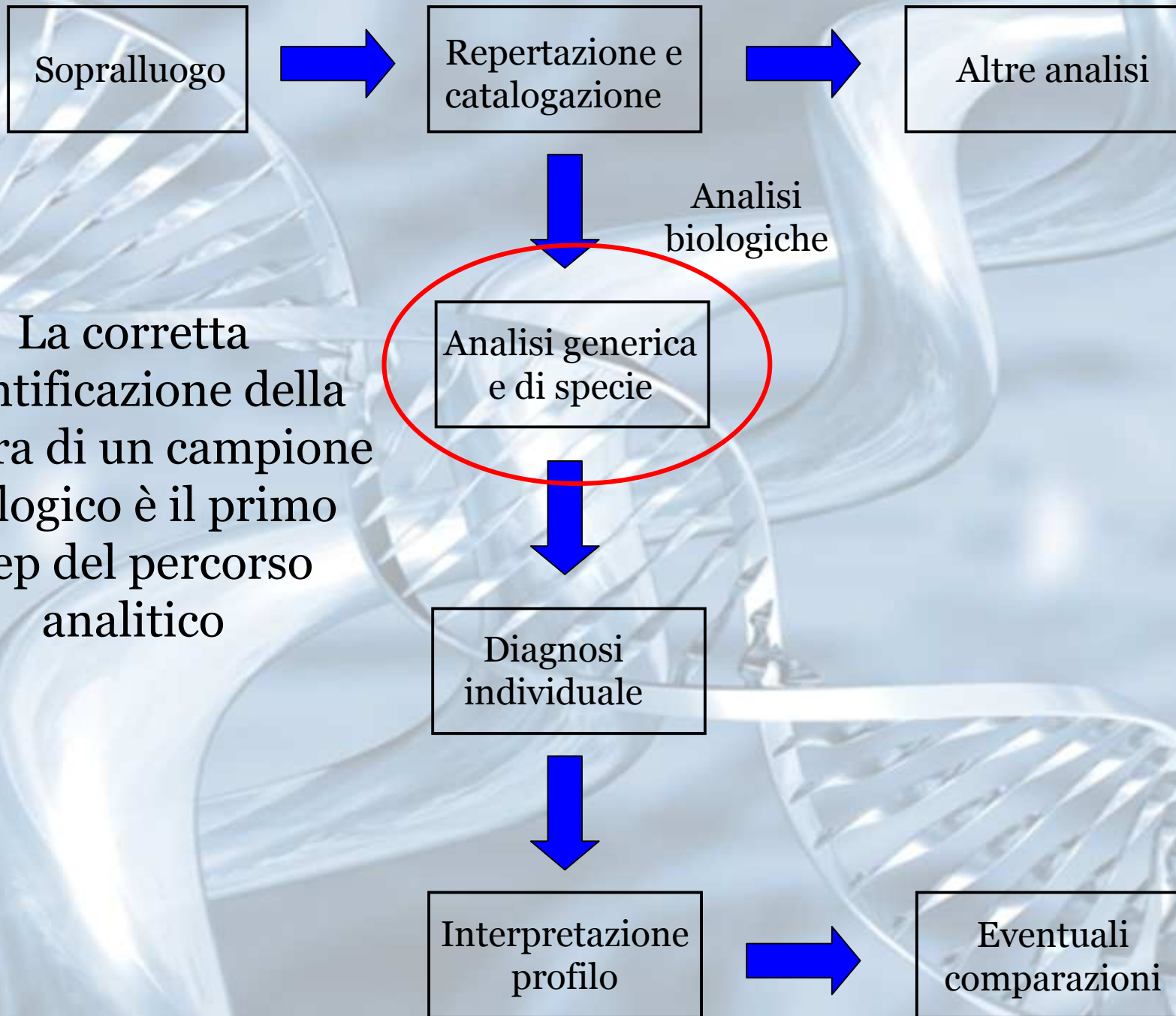
22° CONVEGNO NAZIONALE



Genetisti Forensi Italiani

Padova, 18-20 settembre 2008

La corretta
identificazione della
natura di un campione
biologico è il primo
step del percorso
analitico



Identificazione saliva

Ricerca di	Metodo	Vantaggi/svantaggi
Prodotti proteici: amilasi	- Colorimetrici (Whitehead e Kipps 1975; Bonavita e Crinò 1984; De Leo et al. 1985)	Non specifici, laboriosi, richiedono molto campione.
Prodotti proteici: α -amilasi	- Test enzimatici (Phadebas®)	Rapidi e sensibili, richiedono poco materiale Non sempre specifici.
Prodotti proteici: α -amilasi	- Immunocromatografici (SALiGAE®, RSID™)	Rapidi e sensibili, richiedono poco materiale.
Geni specificamente espressi tramite studio dell'mRNA	- Retrotrascrizione (RT-PCR) - Real-Time PCR	Specifiche e sensibili, richiedono poco materiale, analisi su tracce miste.

Geni candidati per l'identificazione di tracce di saliva

**KRT4, KRT6A,
KRT13, SPRR1A,
SPRR2A**

sono in grado di differenziare la saliva dal liquido seminale, ma non dalle secrezioni vaginali, a causa della complessa natura delle secrezioni vaginali e della similarità biologica delle mucose buccale e vaginale (Zubakov D et al. 2008).

MUCINA 4 (MUC)

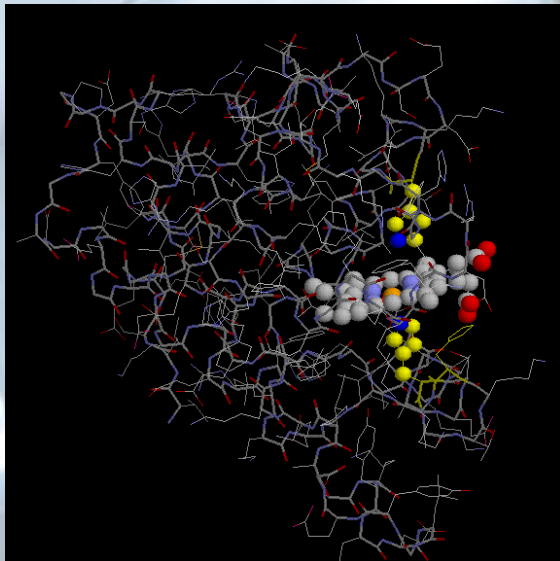
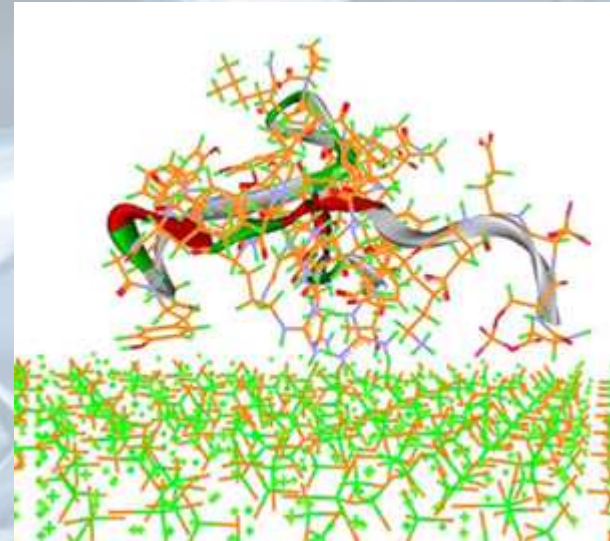
analisi condotta con Real-Time PCR dove si evidenzia espressione in secrezioni vaginali, saliva e anche in liquido seminale. (Nussbaumer C et al. 2006).

STATH, HTN3

Sono espressi nelle ghiandole salivari e sperimentalmente i loro mRNA sono risultati assenti nel sangue, liquido seminale, secrezioni vaginali e sangue mestruale (Juusola J, Ballantyne J 2005).

Caratteristiche delle proteine STATH e HTN₃

La staterina (STATH) è un inibitore della precipitazione del fosfato di calcio nella cavità orale (Sabatini LM et al. Gene 1990)



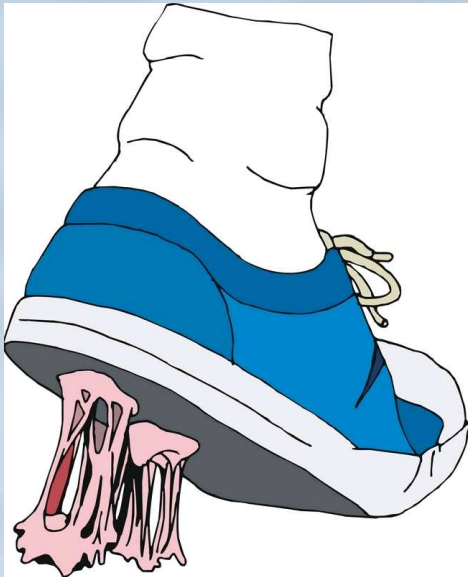
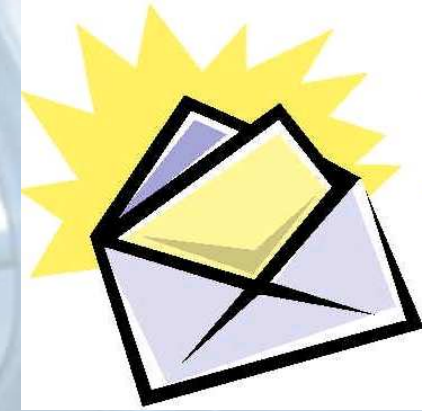
L'istatina 3 (HTN₃) è una proteina ricca di istidina coinvolta nella difesa non immunitaria nella cavità orale (Sabatini LM et al. Mol Biol 1993)

SCOPO DEL LAVORO

- Specificità dell'mRNA di STATH e HTN3 su saliva
- Verifica della stabilità dell'mRNA fino a 60 giorni su campioni salivari
- Valutazione del possibile utilizzo in genetica forense per l'identificazione di saliva umana su traccia incognita

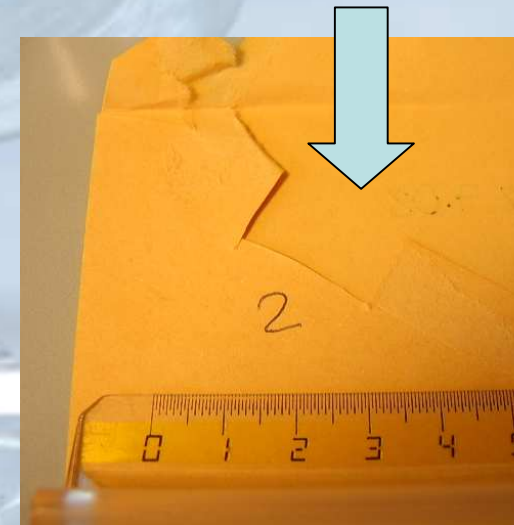
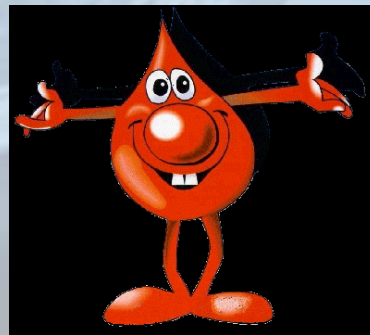
MATERIALI E METODI I

Campioni: ➤ 8 campioni di saliva su busta da lettere



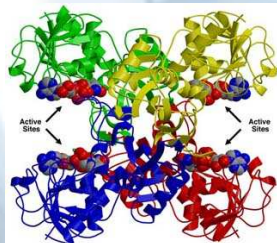
➤ 8 campioni di saliva su chewing-gum

➤ altri campioni biologici



MATERIALI E METODI II

- Estrazione dell'RNA con Qiagen RNase® Micro Kit
- Dosaggio con NanoDrop
- Retrotrascrizione del cDNA con SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen)
- PCR multiplex con primer specifici
 - HTN3
 - STATH
 - GAPDH (controllo interno)

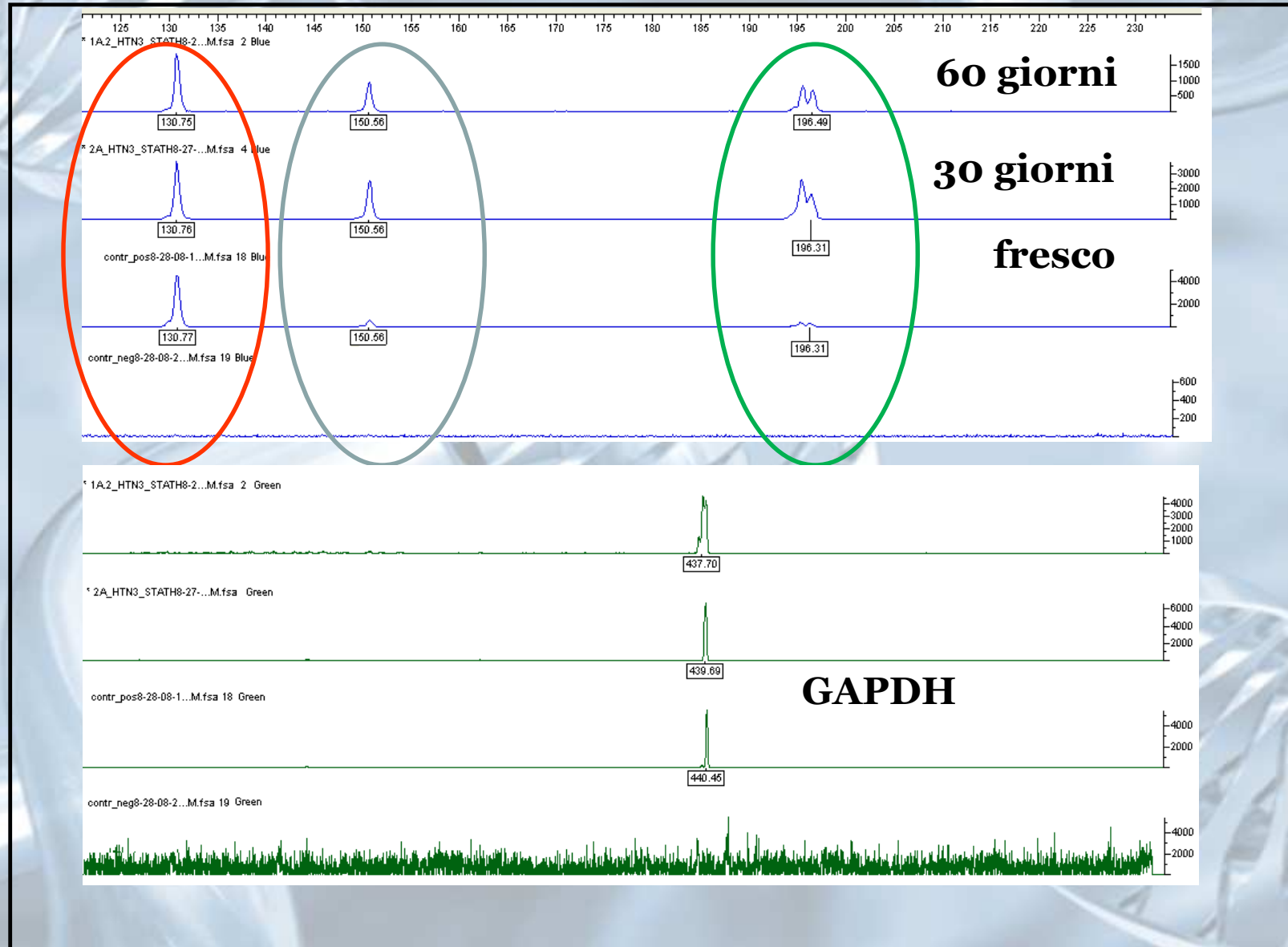


RISULTATI

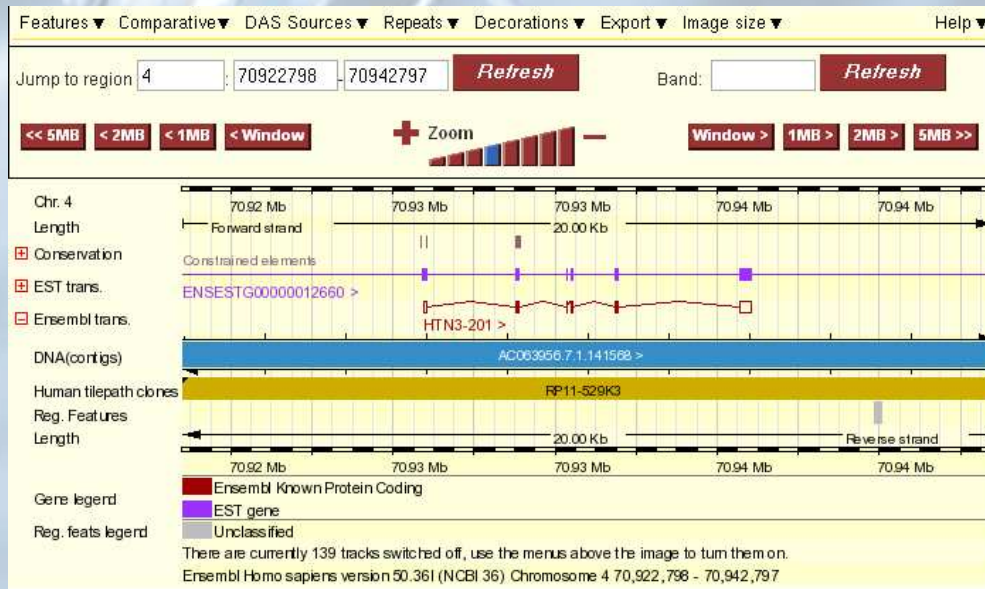
HTN₃

HTN₁

STATH



Omologia HTN1 - HTN3



e!Ensembl Human ContigView

Ensembl release 50 - Jul 2008

Your Ensembl

- Login or Register
- About User Accounts

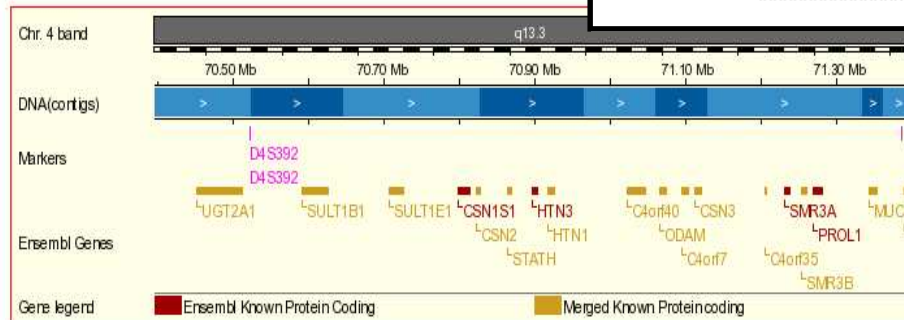
Chromosome 4
70,922,798 - 70,942,797

- View of Chromosome 4
- Graphical view
- Graphical overview
- Resequencing alignment
- View alignment with ...
 - ... 12 amniota vertebrates
 - Pecan
 - ... 4 catarrhini primates
 - EPO

Chromosome 4

Overview

Detailed view



CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

```

HTN1      -----CTTGAGACTTCACITTCAGCTTCAGCTTCCTTCCTTGGAGTAAA 52
HTN3      GGACATCCTCTTGAGACTTCACITTCAGCTTCAGCTTCCTTCCTTGGAGTAAA 60
          ***** **

HTN1      AGGACTCAGCCAACTATGAAAGTTTTTGTCTTTGCTTTAGTCTTGGCTCTCATGATTC 112
HTN3      AGGACTCAGCCAACTATGAAAGTTTTTGTCTTTGCTTTAATCTTGGCTCTCATGCTTTC 120
          *****

HTN1      ATGATTAGCGCTGATTCACATGAAAAGAGACATCATGGGTATAGAAAGAAATTC CATGAA 172
HTN3      ATGACTGGAGCTGATTCACATGCAAAAGAGACATCATGGGTATAGAAAGAAATTC CATGAA 180
          **** * *

HTN1      AAGCATCATTACATC GAGAATTC CATTTTATGGGGCATATGGATCAAAATATCTATAT 232
HTN3      AAGCATCATTACATC GAGG-----CTATAGATCAAAATATCTGTAT 222
          *****

HTN1      GACAAITGATATCTTAGTAATCATGGGGCATGATTATAGAGTTTGACTGGCAAATTC A 292
HTN3      GACAAITGATATCTTAGTAATCATGGGGCATGATTATGGAGTTTGACTGGCAAATTC G 282
          *****

HTN1      CTTTTACTCTTTATTCATTCATCATACC GCATCAGCACTACCCTGCTTTTTTGAAGA 352
HTN3      CTTTGGACTCTGTATATTCATTTGTCATACC GCATCAGCACTACCCTGCTTTTTTGAAGA 342
          **** * *

HTN1      ATTATCATAAGGCATGCGAATTAAGAAAGACCATGATTTAGTGAAATTCGTGTTTCA 412
HTN3      ATTATCATAAGGCATGCGAATTAAGAAAGACCATGATTTAGTGAAATTCGTGTTTCA 402
          *****

HTN1      TGGATCTTCCTTCCTAATTATCATTGATTAGATACITTCGAAATTTAACTGTTAAGCTG 472
HTN3      GGATACCTTCCTTCCTAATTATCATTGATTAGATACITTCGAAATTTAACTGTTAAGCTG 461
          *****

HTN1      TTTTCAGCTGCTTTCTGAGTAAAGAAATTCATTCCTCTCCAAAAGCAATAAATTTCTA 532
HTN3      TTTTCAGCTGCTTTCTGAGTAAAGAAATTCATTCCTCTCCAAAAGCAATAAATTTCTA 521
          *****
    
```

CONCLUSIONI

- L'mRNA salivare è risultato stabile per campioni fino a 60 giorni
- Campioni di sudore, sangue e secrezioni vaginali sono risultati negativi
- STATH e HTN3 sono ad oggi specifici per la diagnosi di saliva umana
- Necessario individuare mRNA proteici espressi in maniera tessuto-specifica
- E' una metodica molto laboriosa



PROSPETTIVE FUTURE

- Testare STATH e HTN₃ su altri fluidi biologici
- Testare la stabilità dell'mRNA su altri substrati
- Ampliare la casistica a campioni più datati
- Applicare l'analisi dell'mRNA ad altri trascritti tessuto-specifici per l'identificazione inequivocabile di reperti biologici (secrezioni vaginali, sangue, etc...)





**GRAZIE
PER L'ATTENZIONE!**