

II DNA alla ricerca... del colpevole

L'analisi del DNA viene attualmente utilizzata nelle investigazioni per: il riconoscimento di paternità, l'identificazione di resti organici lasciati sulla scena di un crimine o di un delitto sessuale (per individuare cioè il colpevole di un crimine), o per l'identificazione di un cadavere.

In tutti questi casi si deve eseguire un confronto tra due DNA:

- quello del figlio e del "candidato" (o dei candidati) padre da identificare, nel riconoscimento di paternità;
- del campione organico trovato sulla scena del crimine e quello dei soggetti sospettati di averlo compiuto;
- del cadavere e di reperti organici appartenenti alla persona scomparsa o a diretti congiunti.

La risposta "positiva" all'esame si ha quando il DNA dei due reperti combaciano.

Le indagini genetiche che vengono svolte a fini di giustizia penale sono spesso legate a casi giudiziari di grande importanza e sono connessi all'identificazione degli autori di gravi reati, quindi il **DNA profiling** (profilo genetico individuale) gioca un ruolo cruciale perché se il DNA ottenuto dal materiale biologico rinvenuto sulla scena del crimine coincide con il profilo di un sospettato, allora questo fornisce una prova inconfutabile. Poiché in questi casi sono in gioco delicati interessi (ad esempio la libertà di eventuali imputati) è necessario cercare di ridurre al minimo il rischio di errore.

L'uso delle tecnologie più evolute, associate ad accurate precauzioni, può ridurre drasticamente

questi rischi, ma non annullarli. I rischi di errore o insuccesso sono legati soprattutto all'esiguità e alla degradazione del materiale genetico, ma anche alla contaminazione ambientale dei reperti.

1. Campioni da analizzare

Per poter stabilire il profilo genetico di un individuo, è sufficiente una goccia di sangue o la saliva lasciata su un mozzicone e il DNA può essere isolato, analizzato e infine confrontato con quello di altri individui che possono essere coinvolti in una vicenda ed essere così sospettati di qualche crimine.

Le analisi per l'identificazione del DNA in ambito forense si applicano a tracce di sangue, di sperma, di saliva e di urina, bulbi di formazioni pilifere, frammenti di organi e tessuti (denti e ossa in particolare) e preparati istologici.

Questi campioni di materiale biologico, da cui è possibile estrarre il DNA genomico o mitocondriale contenuto nelle cellule, hanno caratteristiche peculiari che li rendono più o meno adatti a certe tipologie di esami.

campione	probabilità di successo
sangue fresco	alta
sangue (su tessuti)	media
sangue (di cadavere)	media/bassa
tampone buccale	alta
capelli (con bulbo)	alta
liquido seminale	alta
liquido seminale (su indumenti o tampone vaginale)	media
chewing-gum	media
unghie	media
urine	bassa
ossa	bassa



Come si isola il DNA

Il DNA può essere estratto da ogni tipo di cellula e tessuto attraverso una procedura relativamente semplice, che consiste di pochi passaggi in cui il campione subirà trattamenti chimico-fisici durante i quali si farà in modo di eliminare dalla soluzione tutte le componenti non necessarie. Si comincia con la rottura dei tessuti (mediante l'utilizzo di mortaio e pestello, omogeneizzatori...) e si procede a porre il campione in un bagno termostato, cioè a temperatura costante (vasche contenenti acqua a 60 °C nella quale vengono immersi recipienti da riscaldare) insieme a un enzima (proteinchinasi K) che provvederà alla digestione della parete cellulare e a lisare la membrana plasmatica. Tutte le componenti proteiche, incluso lo stesso enzima, saranno così digerite e l'acido nucleico ottenuto apparirà più "pulito" da residui proteici.

Ciò che non è stato digerito durante la fase precedente, viene fatto precipitare sul fondo della provetta grazie a un breve giro in centrifuga, dopo il quale si procederà a separare tutte le componenti rimaste nella soluzione

acquosa aggiungendovi fenolo e cloroformio.

Il fenolo è un alcol denaturante le proteine ed è lipofilo, caratteristica che gli permette di sciogliere (insieme al cloroformio), in un solvente organico, lipidi e residui di proteine. Dopo aver centrifugato si otterrà una separazione di fasi. La fase organica sarà visibile sul fondo della provetta e sopra si avrà la fase acquosa contenente non solo DNA, ma anche residui tissutali e sali.

Per ottenere solo il DNA si procede a renderlo insolubile in acqua. Questa fase richiede l'utilizzo di etanolo o isopropanolo, nei quali il DNA non è solubile. Man mano che si aggiunge fenolo le altre componenti della soluzione acquosa si solubilizzano (fenolo e isopropanolo sono solubili in acqua), mentre il DNA progressivamente si separa (non essendo solubile nel fenolo) dalla soluzione. Centrifugando il tutto, nella provetta si potranno vedere gocce di alcol e acqua e sul fondo il DNA in un piccolo ammasso biancastro che verrà raccolto e conservato in una soluzione tampone con EDTA (acido etilendiamminotetracetico, un anticoagulante) a una temperatura compresa tra -20 e -80 °C.

2. Il DNA nell'uomo

Ogni cellula è dotata di un nucleo al cui interno si trova il DNA. Questo acido nucleico è identico in tutte le cellule di un individuo ed è differente da individuo a individuo, di conseguenza il materiale biologico che lasciamo in un luogo, anche solo per essere entrati in contatto con degli oggetti, consente agli esperti di risalire alla nostra identità. Per tale ragione l'analisi del DNA è tanto importante nelle indagini di un crimine.

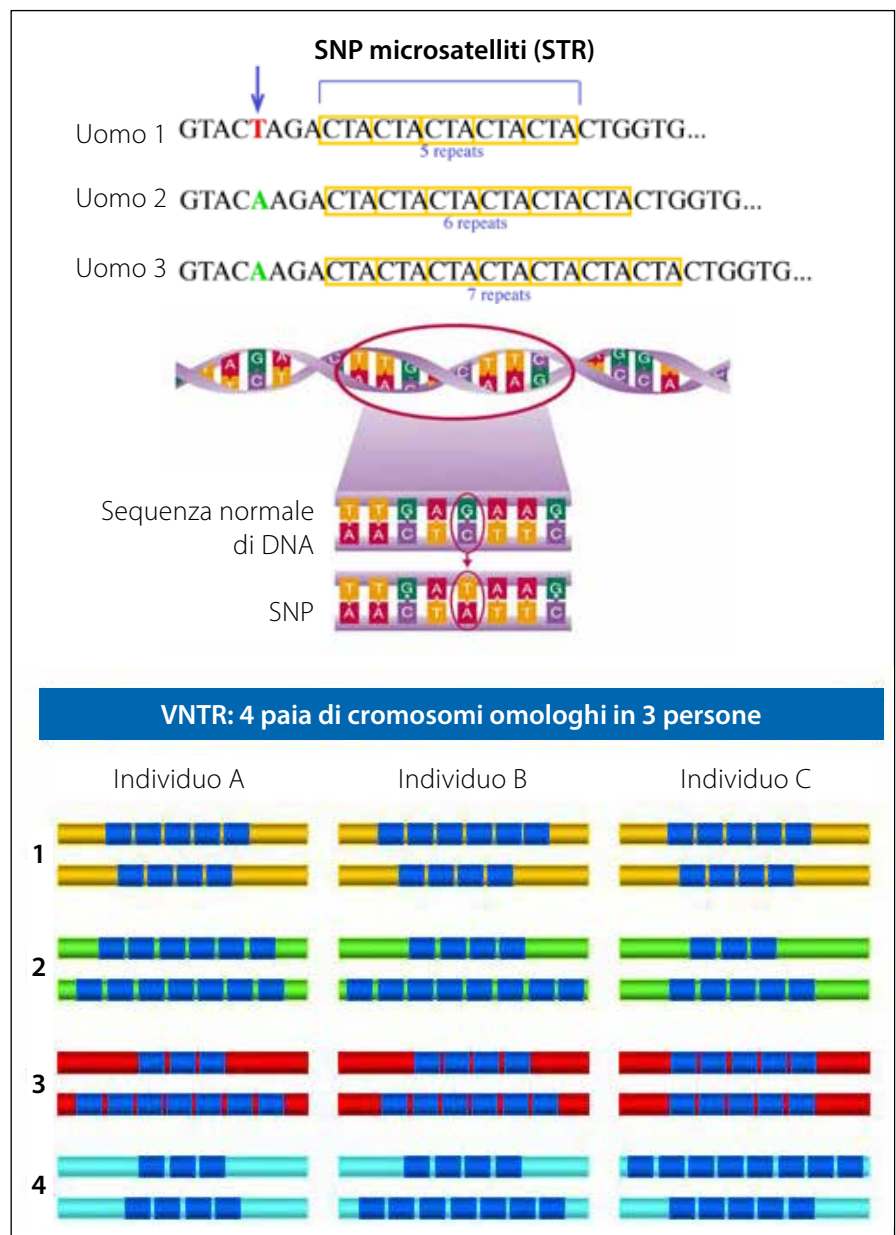
Le cellule umane (eucariotiche) contengono due tipi di DNA: nucleare e mitocondriale. Ciascuno di questi due tipi di DNA è caratterizzato da una sequenza specifica di nucleotidi, unica per ogni individuo: l'analisi dell'uno o dell'altro tipo di DNA consente di distinguere individui che hanno patrimoni genetici differenti (solo i gemelli monozigoti hanno un identico patrimonio genetico).

La scelta del tipo di DNA da analizzare dipende da diversi fattori, come le condizioni del campione, l'obiettivo dell'analisi (cosa stiamo cercando di scoprire) ecc.



Polimorfismi del DNA

A partire dagli anni '80, sono state sviluppate, in ambito forense, metodiche per l'identificazione personale basate sul DNA. I test sul DNA (per l'identificazione di un sospetto) cominciarono a essere utilizzati con successo per la prima volta nel 1987. L'identificazione di un sospetto mediante analisi del DNA si basa sul principio biologico secondo il quale il DNA di ogni singolo individuo è unico e, di conseguenza, questo studio è improntato sull'analisi di alcuni frammenti della doppia elica che possiedono variabilità dovuta al polimorfismo genetico che caratterizza ciascun individuo.



I polimorfismi del DNA

I polimorfismi sono delle varianti alleliche (ossia alleli diversi) di uno stesso gene dovute a mutazioni del DNA, le quali possono essere singole (i cosiddetti Single Nucleotide Polymorphisms, o SNPs, molto informativi) o ripetizioni di una porzione di DNA (minisatellite VNTR [Variable Number Tandem Repeat] o microsatellite STR [Short Tandem Repeat]).

I **microsatelliti** sono corte sequenze costituite da gruppi di 1-10 paia di basi (simbolo: bp, dall'inglese base pairs, paia o coppie di basi) ripetute in tandem (ossia ripetute più volte di seguito, una dopo l'altra); essi sono frequenti nella regione telomerica del cromosoma (ossia all'estremità del cromosoma). I **minisatelliti** sono formati da unità più lunghe (11-100 bp) ripetute anch'esse in tandem tra 20 e 50 volte e distribuite in modo più uniforme lungo tutto il genoma. Questi due tipi di sequenze sono

utili marcatori genetici e per questa ragione vengono utilizzati in ambito forense e nella mappatura di geni associati a patologie. La lunghezza di questi segmenti (ovvero il numero di ripetizioni delle sequenze di nucleotidi) è diversa anche nei due cromosomi omologhi di uno stesso individuo e varia da un individuo all'altro e ciò rende possibile la discriminazione del DNA di un soggetto rispetto a un altro mediante il confronto delle lunghezze delle regioni considerate.

Il DNA alla ricerca... del colpevole

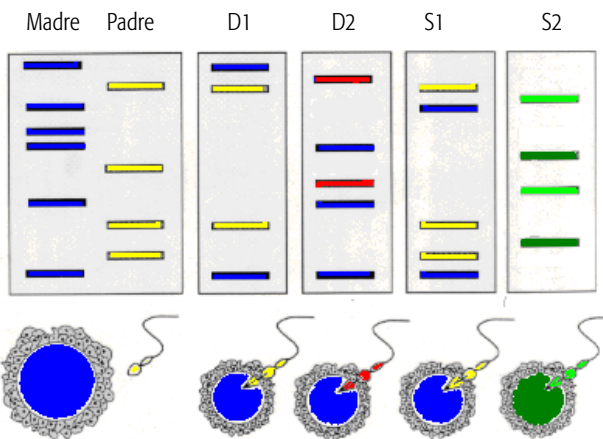
3. Tecniche di analisi DNA fingerprinting

La tipizzazione del DNA, ovvero il DNA fingerprinting, è una tecnica utilizzata per l'identificazione di un individuo, perché marcatori altamente polimorfici (tratti di DNA che possiedono moltissime varianti alleliche) sono distribuiti su tutto il genoma e grazie a essi è possibile ottenere un'impronta genetica caratteristica per ogni persona. Ogni marcatore consiste di un **frammento di restrizione** all'interno del quale si trovano brevi sequenze nucleotidiche identiche, ripetute in tandem, in orientamento testa-coda (es:

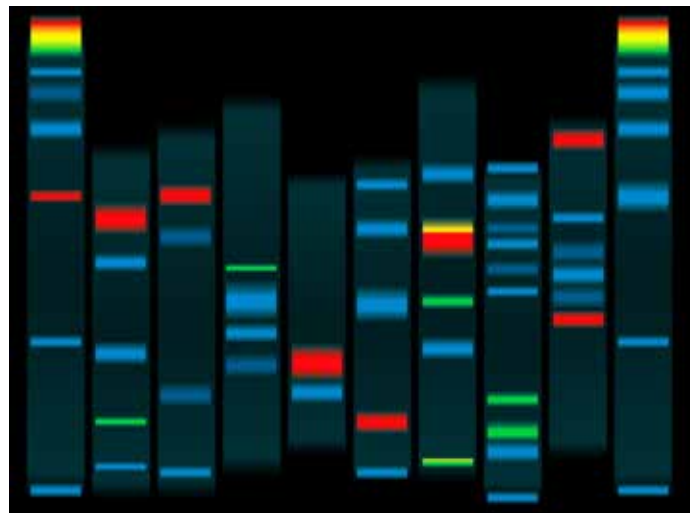
5'-CACACACACA-3' nella quale l'unità di ripetizione: 5'-CA-3' è ripetuta cinque volte). Le differenze fra individui derivano dalla variabilità del numero di queste ripetizioni, conosciute anche come VNTR (Variable Number Tandem Repeat), o sequenze minisatellite.

Queste ripetizioni vennero studiate da Jeffreys mediante la tecnica RFLP (polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione), che prevedeva l'impiego di particolari enzimi (enzimi di restrizione) in grado di tagliare il DNA nelle zone vicine alle VNTR. Le

sequenze di DNA minisatellite sono poi sottoposte ad analisi mediante la tecnica del Southern Blot, una procedura che permette l'identificazione di un frammento di DNA in mezzo a milioni di altri (un metodo analogo, il Northern Blotting, serve invece per l'analisi dell'RNA). Il Southern Blotting fa sì che un frammento di una molecola di DNA contenente una sequenza specifica di basi possa essere identificato mediante l'ibridazione con una sonda di DNA marcata (con radioisotopi o altri metodi di marcatura non radioattivi).



D1 e S1 figli biologici; D2 sorellastra; S2 figlio adottivo.



I frammenti di restrizione

Un frammento di restrizione è una porzione di DNA che si ottiene in seguito all'azione degli enzimi di restrizione, enzimi di origine batterica che vengono utilizzati proprio per tagliare il DNA in pezzi più piccoli per scopi diagnostici o di ingegneria genetica (ad esempio per isolare un gene da inserire in un plasmide). Diversi enzimi di restrizione agiscono su sequenze diverse di nucleotidi e quindi tagliano il DNA in frammenti diversi e, poiché le diverse sequenze di nucleotidi sono situate in posizione diversa in ogni individuo, i frammenti di restrizione che si ottengono sono diversi da individuo a individuo e consentono perciò (tramite confronto mediante elettroforesi del DNA) l'identificazione personale richiesta.

Ibridazione

Per ibridazione si intende la formazione di una doppia catena di nucleotidi di cui uno è il frammento del DNA in esame e l'altro la sonda marcata. L'ibridazione si ottiene grazie alla complementarietà dei due frammenti di DNA.

Il DNA genomico viene dapprima tagliato con specifici enzimi e i frammenti ottenuti separati mediante elettroforesi. In seguito il DNA viene denaturato per ottenere la separazione dei filamenti complementari che verranno fissati a un supporto prima della fase di ibridazione con la sonda marcata.

In pratica, separate le due catene del DNA, la sonda marcata, che è costituita da una precisa sequenza di nucleotidi (la cui lunghezza varia dai 6 ai 100 nucleotidi) ed è resa riconoscibile perché radioattiva, si legherà ai frammenti di DNA che hanno la sequenza di nucleotidi complementare alla sonda, formando ibridi costituiti dalla catena singola dei frammenti del DNA da analizzare legata alla catena (anch'essa singola) della sonda.

LA PCR: Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi)

Un'altra metodica molto utile atta allo studio dei polimorfismi è la PCR (Polymerase Chain Reaction), inventata nel 1983 da Kary B. Mullis (premio Nobel proprio per questa scoperta), grazie alla quale è possibile effettuare la ricerca in ogni sorta di campione biologico, in quanto il DNA è presente in tutte le cellule nucleate ed è più resistente alla degradazione termica. La PCR è una tecnica basata su una DNA polimerasi (enzima prodotto ed estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*), detta **Taq polimerasi** in grado di lavorare a temperature elevate.

La scoperta di questa polimerasi termo-resistente ha reso estremamente veloce il processo di amplificazione del DNA: infatti, una normale DNA polimerasi viene denaturata dal calore, per cui quando si riscalda il DNA per separare le due catene complementari occorre aspettare che la soluzione si raffreddi prima di aggiungere la DNA polimerasi e procedere alla duplica-

zione del DNA; con la Taq polimerasi termoresistente l'enzima può essere inserito insieme al DNA senza attendere che la soluzione si sia raffreddata e il processo può essere ripetuto pressoché all'infinito ottenendo in breve tempo migliaia di copie della sequenza di nucleotidi del DNA, da utilizzare per successive analisi.

Grazie all'introduzione della PCR è stato possibile individuare nuovi tipi di polimorfismi (Short Tandem Repeat) non rivelati mediante Southern Blot.

4. Scelta del DNA: nucleare o mitocondriale?

Il genoma di un individuo è composto dal DNA nucleare e dal DNA mi-

tocondriale (mtDNA), i quali vengono trasmessi dai genitori ai figli in maniera differente.

Il **DNA nucleare** è trasmesso come combinazione del DNA nucleare di entrambi i genitori e varia in ogni soggetto (tranne nei gemelli omozigoti nei quali è identico).

Il **DNA mitocondriale** è trasmesso inalterato dalla madre al figlio, senza ricombinazione genetica.

In genere le tecniche che utilizzano il DNA per l'identificazione personale si avvalgono di quello nucleare in cui è possibile riscontrare variazioni nelle sequenze, a causa della ricombinazione genetica del DNA dei genitori (schemi a pagina seguente).

La famiglia Romanov

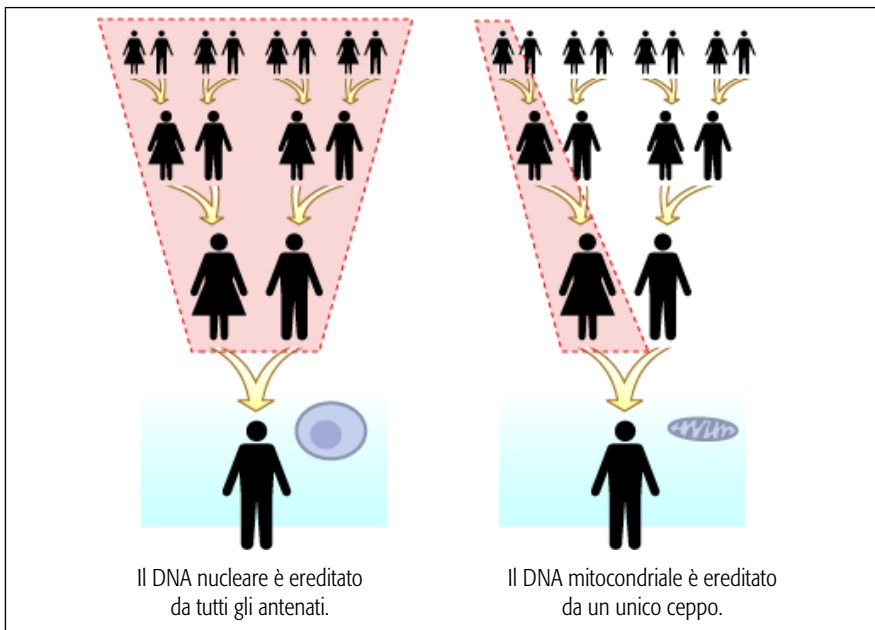
Mediante la PCR è possibile studiare il polimorfismo a carico dell'mtDNA (DNA mitocondriale), analisi effettuata per la famiglia dello zar Nicola II Romanov.

Nel 1917, nel corso della rivoluzione bolscevica, lo zar e la sua famiglia vennero esiliati e giustiziati l'anno successivo. Si vociferava però che una figlia dello zar, la principessa Anastasia, fosse riuscita a scappare evitando così l'esecuzione. Nel 1922, una donna proveniente da Berlino, sosteneva di essere la principessa Anastasia. La mancanza di informazioni non permise né di confutare né di confermare quanto affermato dalla donna, fino a che nel 1993 fu condotta un'analisi sul DNA mitocondriale proveniente dalle ossa dei Romanov, ritrovate in una fossa nella località in cui vennero esiliati. I campioni di DNA furono così confrontati con quello del principe Filippo duca di Edimburgo, pronipote dell'ultima zarina Alessandra. La principessa Vittoria, sorella di Alessandra, è infatti la nonna di Filippo. I risultati dimostrarono che le ossa ritrovate nella fossa erano quelli della zarina e di tre dei suoi cinque figli. Allo stesso modo venne dimostrato che la donna che sosteneva di essere Anastasia in realtà non era la principessa.



LA FAMIGLIA DELL'EX ZAR DI RUSSIA.

Il DNA alla ricerca... del colpevole



Quando le analisi sul DNA nucleare non sono possibili perché i reperti ne contengono una quantità esigua o si rivelano essere degradati, allora si ricorre ad analisi basate sul DNA mitocondriale che è anche più resistente nel tempo.

Ad eccezione dei gemelli omozigoti, l'identificazione di un individuo mediante l'analisi del DNA nucleare è basata sul fatto che è unico per ciascuna persona, quindi anche da un frammento è possibile effettuare l'identificazione del soggetto a cui quel campione appartiene.

Caratteristiche	mtDNA	DNA nucleare
Struttura	chiusa, circolare	Lineare, organizzata in cromosomi
Dimensioni	16.569 bp	circa 3.000.000.000 bp
Numero di copie per cellula	Da 50 a migliaia copie per cellula	2 copie per cellula
Trasmissione	Matrilineare	Biparentale
Ricombinazione	No	Sì
Regioni non codificanti	Circa 7%	Circa il 99%
Tasso di mutazione	5-10 volte più alto rispetto al DNA nucleare	Basso

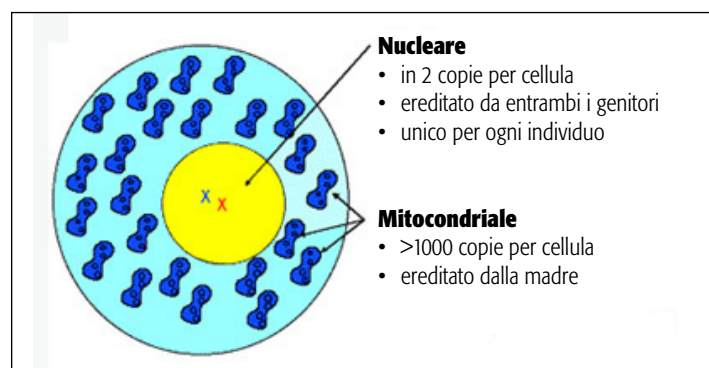
DNA mitocondriale

Un tipo di DNA molto utile alle analisi forensi è quello mitocondriale (mtDNA). I mitocondri sono organuli citoplasmatici presenti in tutte le cellule animali, negli organismi unicellulari aerobi e nei vegetali; sono fondamentali per la cellula, poiché attraverso i processi di respirazione cellulare consentono la produzione di gran parte dell'energia (ATP) che la cellula utilizza per tutte le sue attività vitali. I mitocondri possiedono un genoma proprio, rappresentato da una molecola circolare di DNA a doppia catena, composta da una catena pesante e una leggera. La differenza fra il mtDNA e il DNA nucleare consiste nella diversa composizione nelle basi azotate

GC (guanina e citosina) e che nel DNA mitocondriale vi sono associate poche o addirittura nessuna proteina.

La dimensione del genoma mitocondriale è variabile, ma la quantità di

DNA a singola elica che codifica per i prodotti funzionali è sempre la stessa in ogni organismo. Il valore informativo del DNA mitocondriale è molto piccolo rispetto a quello del DNA nucleare.

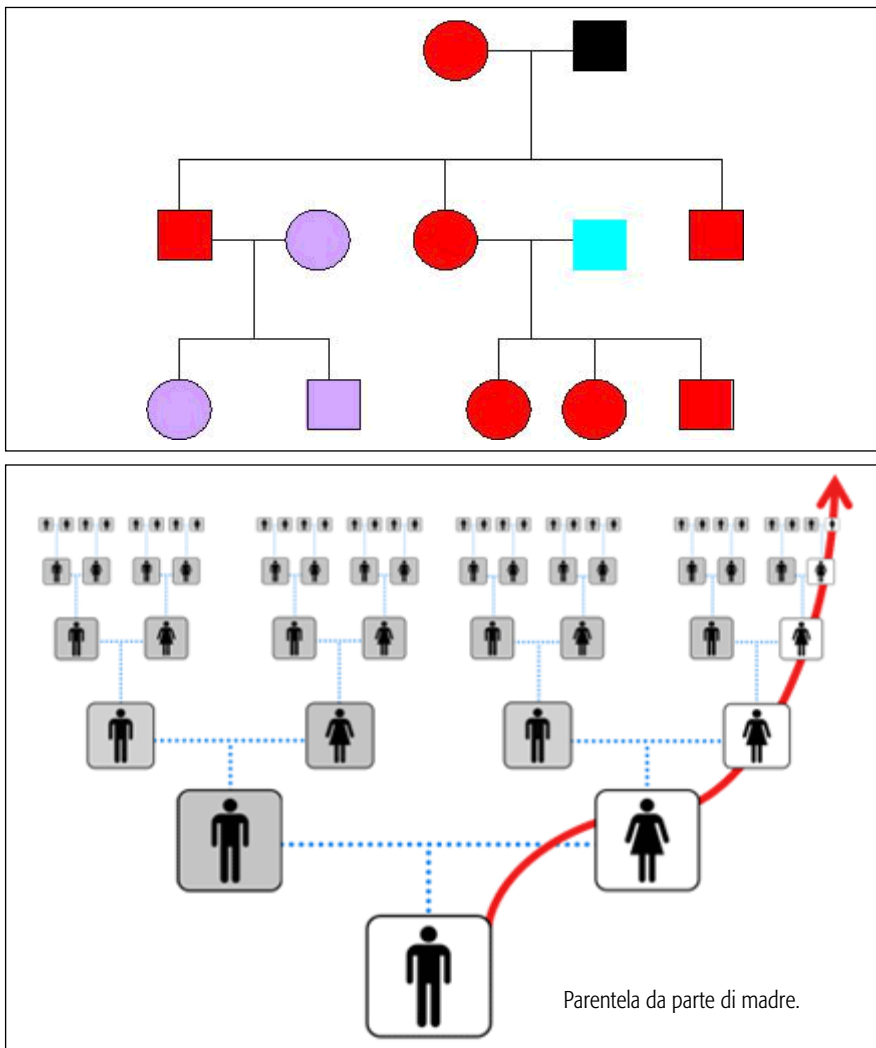


Benché il DNA mitocondriale abbia dimensioni nettamente inferiori rispetto a quello nucleare, bisogna considerare che il genoma mitocondriale è presente in 1000-10.000 copie per cellula (il genoma nucleare solo in due copie) e questo comporta il vantaggio di disporre di grandi quantità di mtDNA da utilizzare durante le analisi.

Un problema che spesso si presenta nelle indagini forensi è quello dell'analisi di un campione di capelli caduti, nel fusto dei quali è contenuta una quantità insufficiente di DNA nucleare per eseguire le analisi, quindi ciò che viene preso in esame è il DNA mitocondriale contenuto all'interno di regioni nucleoidi (regioni di forma irregolare all'in-

terno della cellula che contengono materiale genetico). Molti metodi per l'analisi di questo DNA (mtDNA) si basano anch'essi sul polimorfismo presente nelle sue sequenze, infatti anche nel genoma mitocondriale umano esiste una regione estremamente polimorfica (ossia variabile).

Poiché i mitocondri sono nel citoplasma, vengono trasmessi ereditariamente attraverso le cellule uovo, perché nella fecondazione il citoplasma dello zigote con i relativi mitocondri proviene tutto dalla cellula uovo. Ciò permette di stabilire linee di discendenza femminile uniche, poiché l'mtDNA è ereditato da una generazione all'altra esclusivamente dalla madre (schema qui di seguito).



L'impronta genica derivata dall'mtDNA viene usata per le comparazioni col profilo di DNA della vittima e/o dell'indagato e, perché si sia certi dell'identificazione, è necessario che i due campioni abbiano in comune almeno 13 punti.

L'analisi di sequenza dell'mtDNA serve:

- per determinare se fratello/sorella hanno la stessa madre;
- per determinare la parentela da parte di madre della famiglia;
- quando il campione di DNA nucleare è scarso o degradato.

Analisi del DNA mitocondriale

La tecnica di analisi mitocondriale si basa sull'amplificazione di frammenti e sul loro sequenziamento mediante il metodo di F. Sanger, messo a punto nel 1977.

Il sequenziamento è un processo che consente di determinare l'ordine delle basi, quindi la struttura primaria, di un acido nucleico (nel caso delle proteine, la sequenza di amminoacidi).

Nell'ambito forense l'mtDNA è molto utile perché si dimostra essere più resistente a quei fattori ambientali che invece degradano il DNA nucleare. È il caso di capelli senza radice, di ossa o denti o di campioni esposti a situazioni limite dai quali è impossibile l'estrazione e l'amplificazione del DNA nucleare (esempi sono corpi carbonizzati o cadaveri rinvenuti dopo anni dal loro decesso).

Nel caso di capelli il cui bulbo sia rovinato o assente, la quantità di DNA nucleare è bassa comparata a quella di altri tessuti, questo perché le cellule del capello subiscono un processo di cheratinizzazione, che comporta disidratazione e degradazione degli acidi nucleici e degli organuli cellulari. Nel fusto pilifero, invece, sono presenti molti mitocondri che rendono possibile la tipizzazione dell'mtDNA e la successiva comparazione tra soggetti.

Cromosoma Y

L'analisi del cromosoma Y è invece molto importante sia negli studi di paternità oltre che in quelli di criminologia. Le applicazioni dell'analisi del cromosoma Y spaziano dalla ricostruzione degli alberi genealogici agli studi d'evoluzione, a quelli forensi.



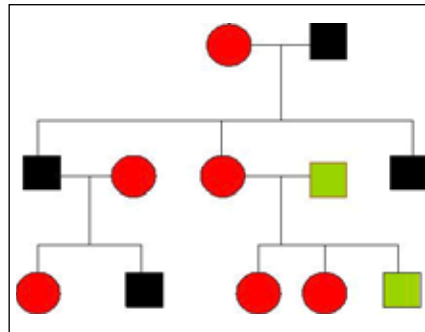
Cromosomi X (a sinistra) e Y (a destra).

Il cromosoma Y è piccolo e acrocentrico, caratterizzato da una consistente parte eterocromatica (cromatina condensata e trascrizionalmente inattiva) e da una eucromatica (parte della cromatina meno condensata con intensa attività trascrizionale), che contiene almeno trenta geni che possono essere suddivisi in:

- geni specificamente espressi nel testicolo, i quali mostrano una tendenza a essere presenti in copie multiple, organizzati in cluster (ovvero gruppi di geni che codificano per prodotti proteici simili o correlati);
- geni espressi ubiquitariamente e con omologhi sul cromosoma X.

Il cromosoma Y possiede geni e famiglie di geni che svolgono un ruolo cruciale nella determinazione del sesso, nel differenziamento del testicolo e nella maturazione degli spermatozoi.

In ambito criminologico gli aplotipi (cioè una combinazione di varianti alleliche) del cromosoma Y sono usati unicamente per identificare gli uomini responsabili di un crimine, poiché questo cromosoma si rivela essere un elemento determinante in certe indagini. Nei test di laboratorio presenta diversi vantaggi, primo fra tutti il fatto che è un cromosoma che viene trasmesso solo tramite linea paterna e, eccetto che per le due piccole regioni nelle quali può dare appaiamento col cromosoma X, esso non è soggetto a ricombinazione.



Nei casi di violenze sessuali, sono utilizzati dei marcatori per l'Y nell'analisi del miscuglio di fluidi corporei, in modo tale che i risultati del test diano informazioni sul numero di individui maschi che hanno partecipato.

Il cromosoma Y è quindi utilizzato per scoprire il padre biologico nei test di paternità o per individuare un soggetto maschio responsabile di un crimine, seguendo una procedura generale che implica diverse fasi:

1. isolamento del DNA da campioni del presunto padre e del figlio (o anche del reperto sulla scena del crimine e del presunto colpevole);
2. amplificazione del DNA con PCR o altra tecnica;
3. trattamento del DNA con enzimi di restrizione;
4. isolamento degli specifici frammenti di restrizione;
5. elettroforesi dei frammenti confrontandoli con DNA.