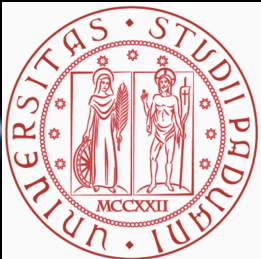


# DNA Profiling e Genetica Forense

Laurea Magistrale in Scienze Biomolecolari e dell'Evoluzione  
Curriculum: BIODIVERSITA' ED EVOLUZIONE

**Dr.ssa Boscari Elisa**  
[elisa.boscari@unife.it](mailto:elisa.boscari@unife.it)



# Outline of the course

- ✓ Uno sguardo alle **basi della moderna Genetica Forense**
- ✓ La **rivoluzione del DNA**
- ✓ I **marcatori molecolari**
- ✓ La **visione statistica e probabilistica** nell'uso dei marcatori molecolari
- ✓ La **rivoluzione del DNA BARCODING** – applicazioni, vantaggi e svantaggi
- ✓ **Problematiche giuridiche e deontologiche**
- ✓ **Casi di studio**



# Genetica Forense

## La GENETICA come “strumento” in ambito investigativo

- Identificare individui che abbiano commesso dei crimini
- Risolvere casi di paternità incerta
- Predire la popolazione di origine di un DNA (es. Africano, Asiatico, Europeo ecc.)
- Ottenere informazioni fenotipiche di un soggetto (es. colore degli occhi)
- Identificare e “ricostruire” cadaveri la cui identità sia ignota (vittime di catastrofi naturali, disastri aerei, guerre, genocidi)
- Investigazioni su persone scomparse
- Identificare tracce di sostanze illegali
- Identificare DNA appartenente a specie a rischio di estinzione in crimini legati al loro contrabbando
- .....

# Genetica Forense

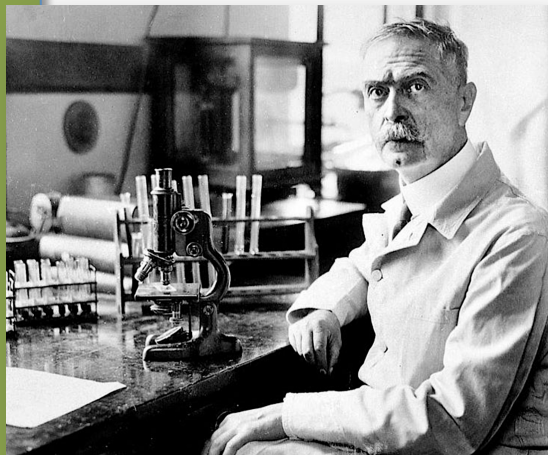
Il FENOMENO BIOLOGICO sul quale si basa la genetica forense è:

**DIVERSITA' GENETICA**

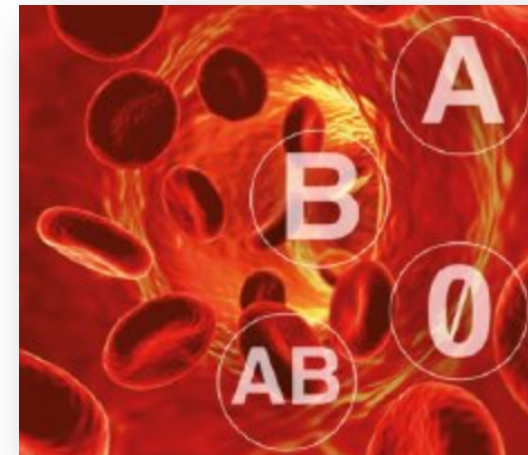


# GENETICA FORENSE

**1900** – Scoperta dei gruppi sanguigni ABO (Karl Landsteiner)



Indagini per l'identificazione personale di tracce e resti biologici umani e la ricerca della paternità



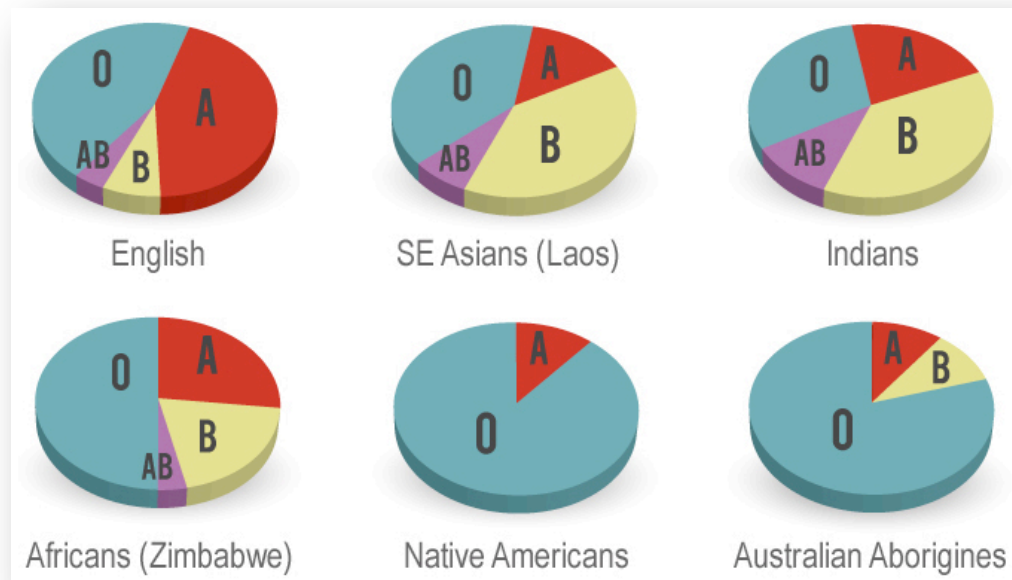
**Primo sistema polimorfico usato nelle scienze forensi**

*Utilizzato per la prima volta in un processo nel 1915 in Italia (Lattes) e successivamente utilizzato in casi di identificazione e paternità incerta anche in altri paesi europei ed in US*

# GENETICA FORENSE

**1900** – Scoperta dei gruppi sanguigni ABO (Karl Landsteiner)

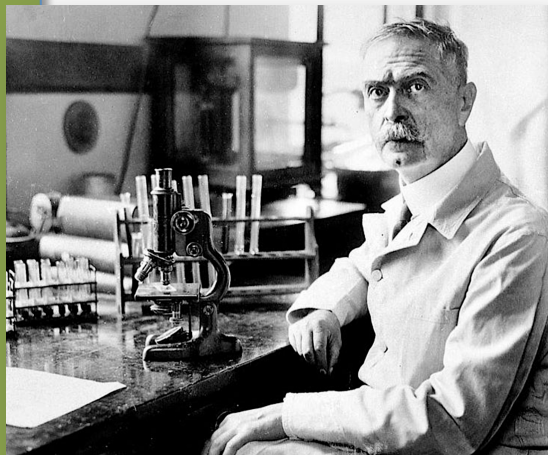
- *4 fenotipi (gruppi sang. A, B, AB, O)*
- *Rapidità di esecuzione*
- *Possibilità di esclusione*
- *Limitato potere di discriminazione*



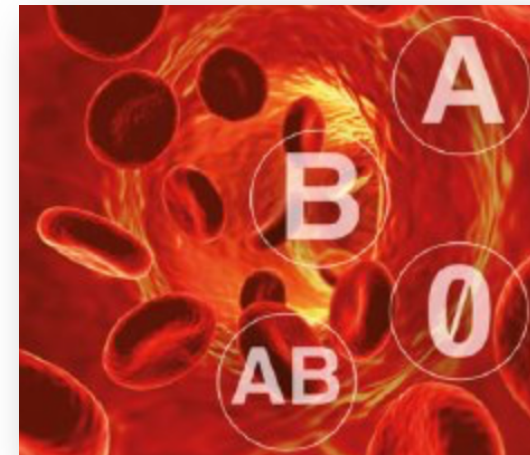


# GENETICA FORENSE

**1900** – Scoperta dei gruppi sanguigni ABO (Karl Landsteiner)



Indagini per l'identificazione personale di tracce e resti biologici umani e la ricerca della paternità



**1923** – Concetto di “Individualità del sangue” (Leone Lattes)

Scoperta dell'esistenza della membrana dei globuli rossi con numerosi marcatori individuali (MNSs e Rh)

# GENETICA FORENSE

**>1945** – Estensione delle conoscenze genetiche per un utilizzo nel sistema penale più consapevole

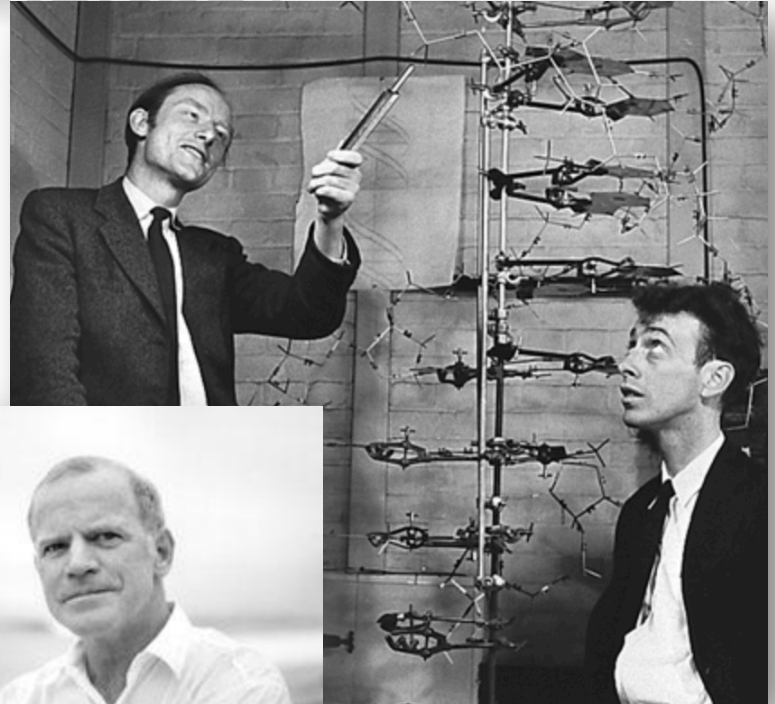
**Analisi forensi basate su polimorfismi ematici eritrocitari e sierici**

- Necessità di utilizzare una pluralità di metodi molto costosi
- Tempi lunghi di isolamento
- Scarsa sensibilità dei metodi
- Deteriorabilità dei marcatori (utilizzo di materiali freschi)
- Scarsa affidabilità dei metodi statistici per attribuzione/  
esclusione probabilistica



# GENETICA FORENSE

**1953** – Scoperta della struttura molecolare del DNA (Watson e Crick)



**1983** – Scoperta della Reazione a catena della Polimerasi (PCR) (Mullis)



**1985** – Utilizzo forense del DNA

# GENETICA FORENSE

Disciplina che utilizza le più moderne **tecniche di biologia molecolare** per l'**IDENTIFICAZIONE** personale degli autori di reati, l'attribuzione individuale di resti umani sconosciuti e la verifica dei rapporti di parentela (indagini di paternità).

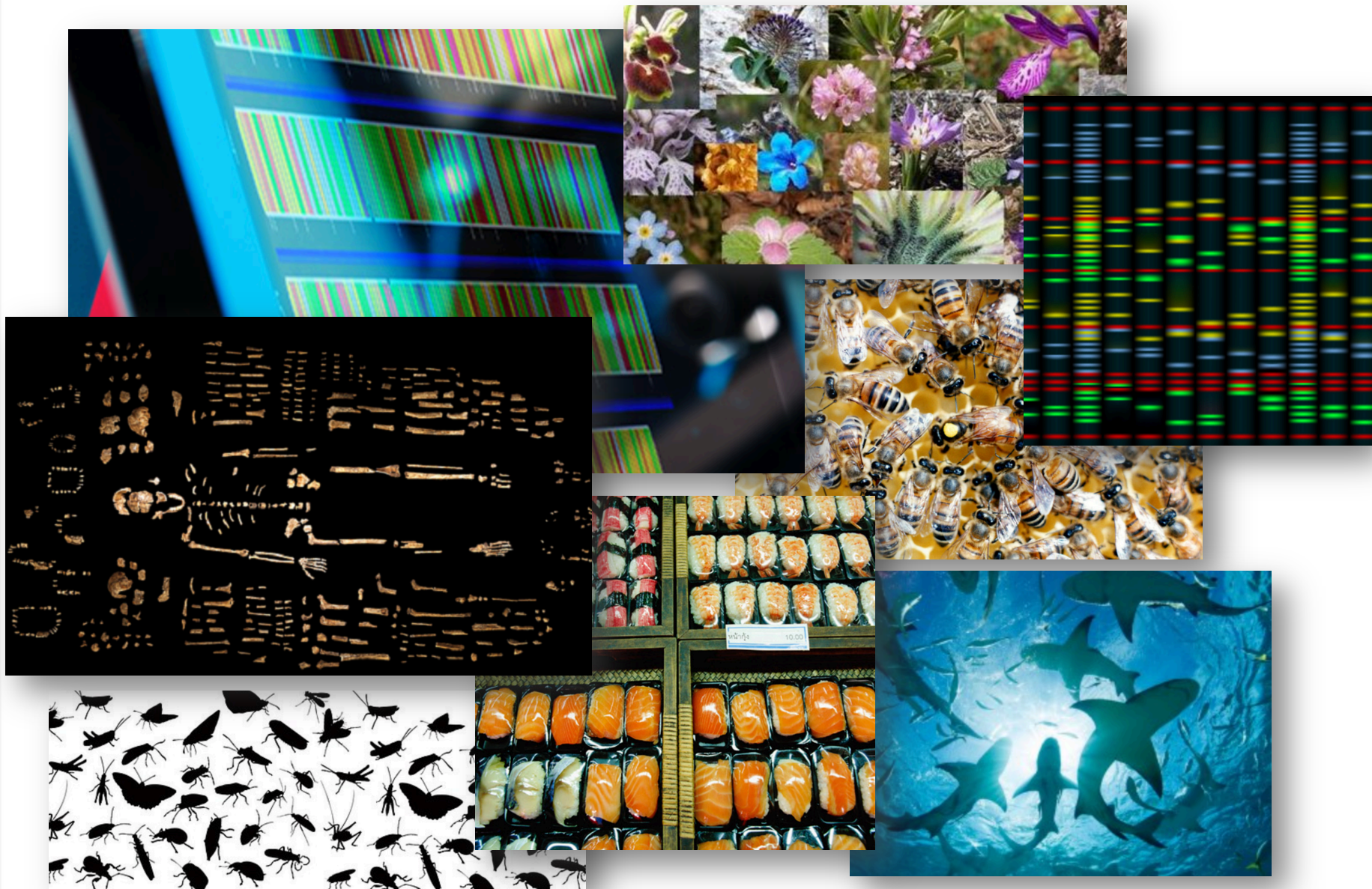


Identificazione molecolare delle **differenze tra soggetti** sulla base di **tratti genetici individuo-specifici**



**Identificazione di specie/soggetti/luoghi**

# “L’Identificazione Molecolare”





# “L’Identificazione Molecolare”

---

## Diversità biologica e biodiversità



Evoluzione  
di milioni  
d’anni



Influenza  
umana

Numero, varietà e variabilità di  
tutte le forme di vita sulla Terra  
e delle reti naturali da esse  
costruite

**Nessuno sa quante specie ci siano!**

# “L’Identificazione Molecolare”

---

## Diversità biologica e biodiversità

Diversità INDIVIDUALE



Differenze tra individui

Diversità DI POPOLAZIONE



Differenze tra popolazioni

Diversità DI SPECIE



Differenze in numero e  
abbondanza di specie

Diversità DI ECOSISTEMI

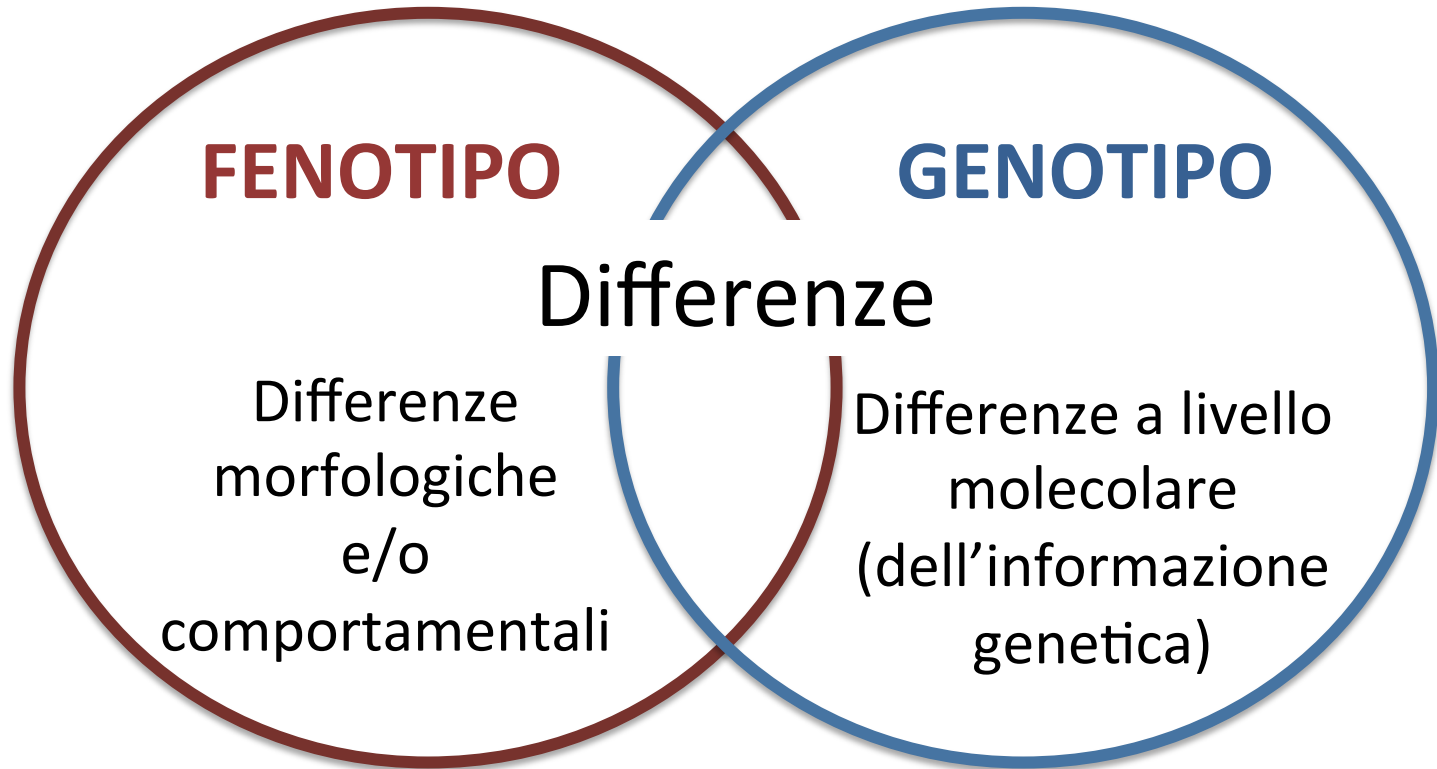


Differenze nella struttura di relazioni e funzioni tra specie di località diverse e le differenze ambientali chimico-fisiche (di habitat) nelle quali le specie interagiscono



# “L’Identificazione Molecolare”

---



In natura la **biodiversità** ha una **DISTRIBUZIONE DISCRETA** grazie all’esistenza di organismi con attributi simili MA ciascuno diverso dall’altro

Unità discrete → **SPECIE**

# L'identificazione di specie/soggetti

---

## Qual è la **DEFINIZIONE** DI **SPECIE**



- Quanto grande deve essere la diversità dei caratteri?
- In che misura (in termini qualitativi e quantitativi) può la specie tollerare la diversità?
- Come definire i caratteri e quali preferire per la definizione e classificazione delle specie?

# L'identificazione di specie/soggetti

---

Concetto **BIOLOGICO** di specie

Concetto **MORFOLOGICO** di specie

Concetto **FORENSE** di “specie”

Una volta identificata la specie, a livello intraspecifico vi è una **distribuzione CONTINUA di differenze**.

Grazie alla capacità di identificare in modo univoco e standardizzato queste differenze si è arrivati alla possibilità di **IDENTIFICAZIONE INDIVIDUALE**.



## Pre-DNA world in species identification

- ✓ **Morfologia** = forma, struttura, aspetto di un organismo/ soggetto, tessuto, cellula ecc.

Tutt'oggi applicazione in larga scala per tassonomia e identificazione.  
In passato, indispensabile in criminologia (testimoni oculari, identificazione di cadaveri, identificazione di tracce ecc)

- ✓ **Caratteristiche comportamentali** (preferenze di habitat, riproduzione, epidemiologia)
- ✓ **Caratteristiche fisiologiche** (tassi di crescita, composizione biochimica)

**Evidenti incertezze tassonomiche**



# Pre-DNA world in species identification

Svantaggi:

- Esistenza di **SIBLING SPECIES**
- ✓ Quasi totale identità morfologica
- ✓ Isolamento riproduttivo



(*Oncoforo peripatus*)



Over 100 local species compared to the 7 previously recognized in Australia

TUATARA (*Sphenodon punctatus*)



2 species instead of 1,  
In New Zeland



# Pre-DNA world in species identification

## Svantaggi:

- Existence of **INTERSPECIFIC HYBRIDS**
  - ✓ Individui fertili e in grado di riprodursi, ottenuti dall'incrocio di due "specie".
  - ✓ Caratteristiche morfologiche intermedia
  - ✓ Frequenti sia nelle piante che negli animali.
  - ✓ Frequenti in natura (**ibridazione naturale**)
  - ✓ Incremento esponenziale in allevamento grazie alle migliori performance (**ibridazione artificiale**)





# Pre-DNA world in species identification

## Svantaggi:

- Existence of **CONVERGENT EVOLUTION**
- ✓ Stesse caratteristiche fenotipiche evolute **INDIPENDENTEMENTE** in organismi filogeneticamente distanti.
- ✓ Effetto della SELEZIONE NATURALE su caratteri favorevoli in specie che condividono stesso habitat o nicchia ecologica
- ✓ Confusione nella collocazione filogenetica della specie.



Cactacea



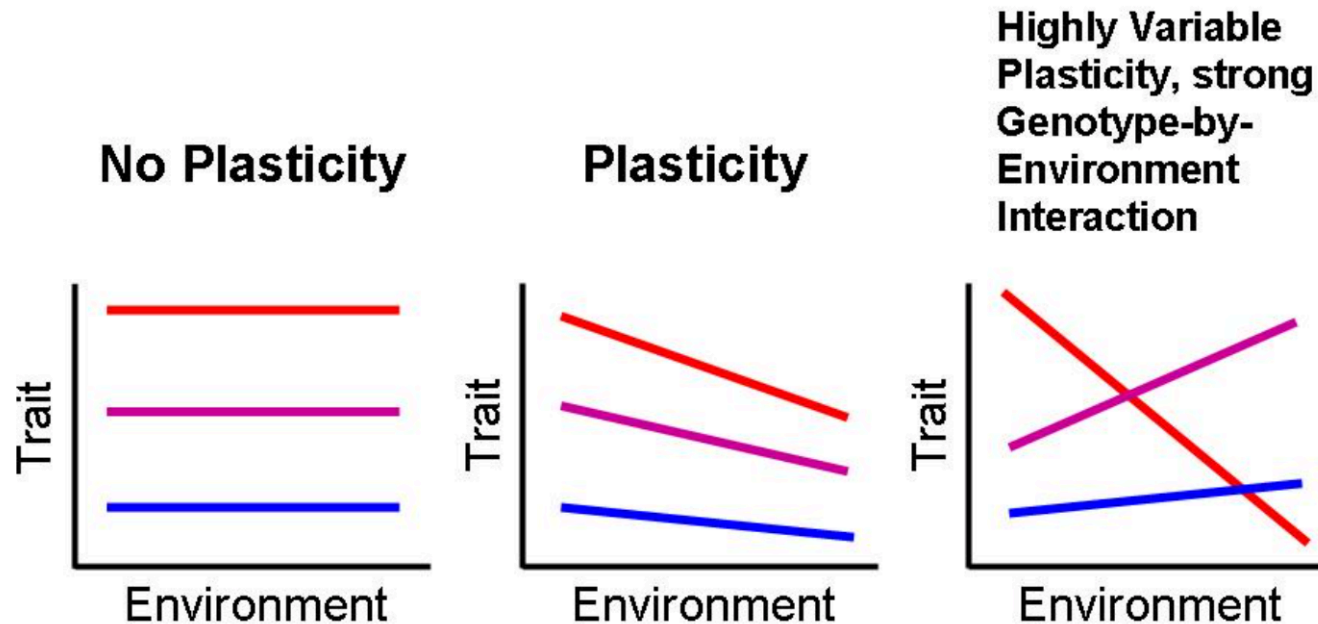
Euphorbiacea

# Pre-DNA world in species identification

Svantaggi:

- Existence of a considerable **MORPHOLOGICAL PLASTICITY**

The ability of one **genotype** to produce more than one phenotype when exposed to different environments.





# Pre-DNA world in species identification

Svantaggi:

- Existence of a considerable **MORPHOLOGICAL PLASTICITY**





## Pre-DNA world in species identification

### Svantaggi:

- **Piccole quantità o porzioni** dell'organismo da individuare
- Materiale di **bassa qualità** (degradato)
- **Assenza del soggetto** (es. in criminologia assenza di testimoni oculari, mancato rinvenimento di cadavere ecc)
- Basato sull'osservazione – influenzato da **componente soggettiva**

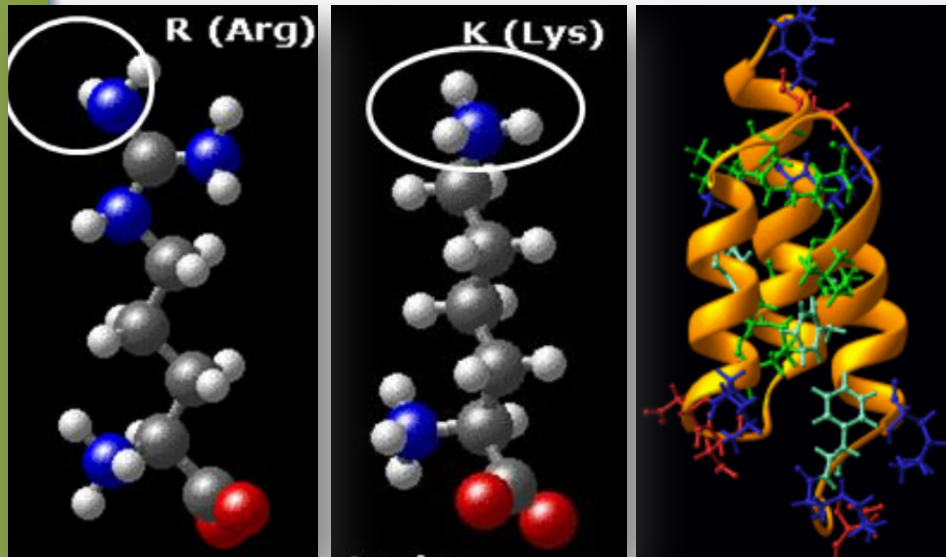
Dalla seconda metà dello scorso secolo l'identificazione di specie/soggetti inizia ad avvalersi di informazioni sulle componenti molecolari delle cellule

# Molecular revolution

## Analisi di proteine - ALLOZIMI

- 1° metodo molecolare impiegato per l'identificazione di specie
- **ALLOZIMI** = varianti genetiche di proteine codificate da uno stesso locus
- **ALLOZIMI**  $\neq$  **ISOZIMI**

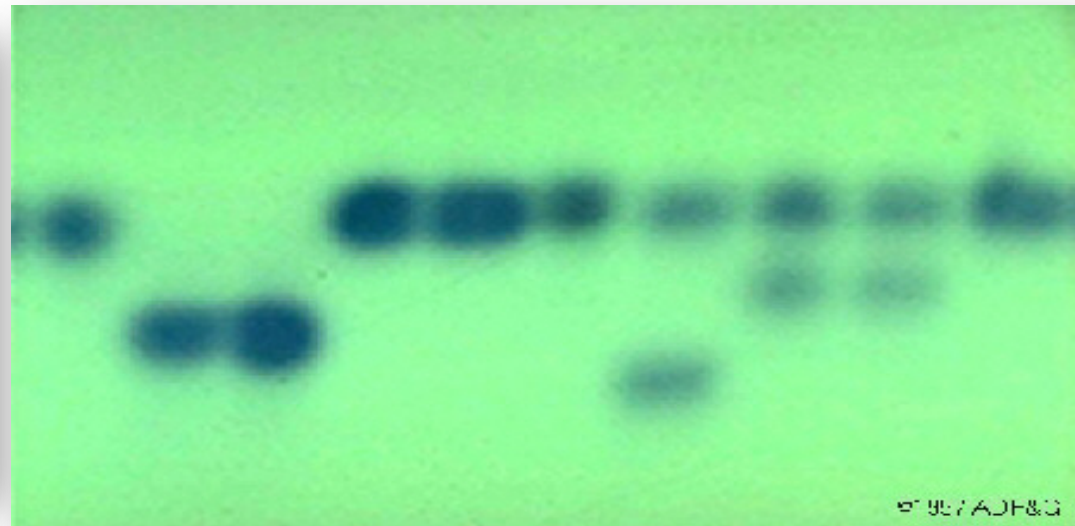
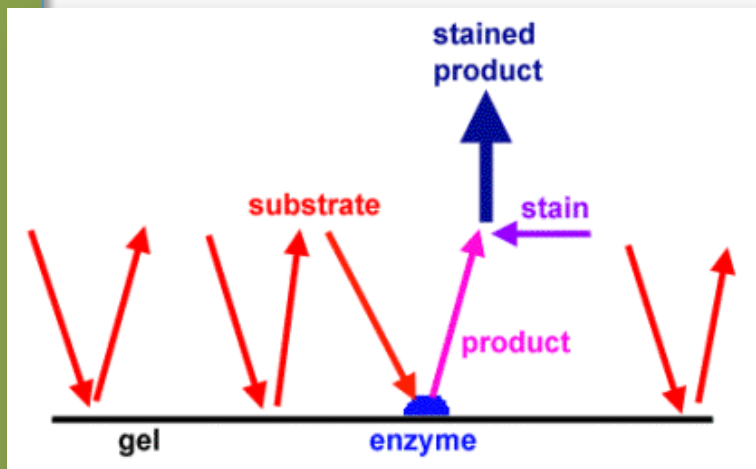
- ✓ Le differenze dipendono da mutazioni di singoli aa che presentano differente carica elettrica.
- ✓ Differenti varianti della proteina presentano differente carica netta evidenziabile mediante una elettroforesi proteica.



# Molecular revolution

## Analisi di proteine - ALLOZIMI

- **Omogenizzazione dei tessuti** → Lisi cellulare e fuoriuscita degli enzimi
- Il surnatante viene fatto correre in un gel
- **Ciascuna proteina migra in una DIREZIONE e ad una VELOCITA'** che dipendono dal rapporto tra carica netta e massa.
- Visualizzazione tramite elettroferogramma grazie a marcatura degli enzimi con sonde colorate.



# Allozimi



## Vantaggi:

- ✓ Codominante
- ✓ Facile da usare
- ✓ Basso costo



## Svantaggi:

- ✓ Numero limitato di loci polimorfici preclude uso su larga scala
- ✓ Scarsa informazione (variazioni nucleotidiche mascherate a livello aa)
- ✓ Grandi quantità di tessuto richieste
- ✓ Rapida degradazione
- ✓ **Falsi positivi** con proteine di specie filogeneticamente vicine (Isozimi)
- ✓ Espressione differenziale tessuto-specifica
- ✓ Scarsa disponibilità di anticorpi per reazioni immunologiche

## DNA revolution



- **STABILE** anche se sottoposto a condizioni estreme (mummificazione, produzione alimentare . . .)
  - Purificazione anche da materiale danneggiato o antico
- **UNIVERSALE** = Presente in tutti i tessuti e fluidi biologici con cellule nucleate (o cellule non-nucleate in caso di plastidi e mitocondri)
  - Purificazione da ogni tipo di residuo/traccia
- Più **INFORMATIVO** rispetto alle proteine
  - Codice degenerato
  - Presenza di lunghe porzioni non codificanti (tasso di mutazione più elevato)



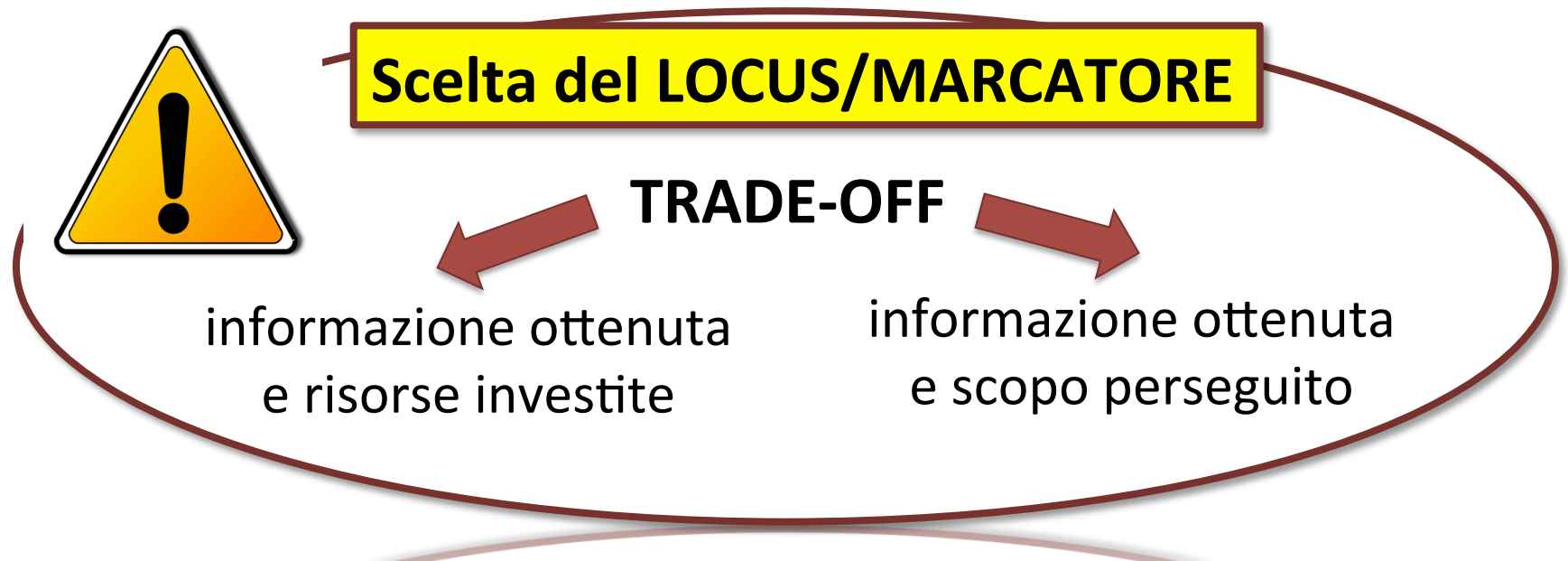


## DNA revolution

Ricerca di **differenze molecolari** specie/individuo-specifiche

**Come identificare e misurare queste differenze?**

- ✓ Caratterizzare le varianti alleliche a diversi loci
- ✓ Caratterizzazione di MARCATORI MOLECOLARI



## DNA revolution

### Scelta del LOCUS/MARCATORE

#### AIM

## Identification - Description - Quantification

of genetic variation

within and among **individuals, populations** or **species**.

Loci that present an adequate level of polymorphism for the characterization of a given genetic system.

## DNA revolution

### Different levels of genetic variation that can be the object of conservation genetics

- **Identity versus non identity** (e.g. forensic analyses, genetic tagging, ... )
- **Related individuals** (e.g. ex situ conservation, breeding plans, parental allocation, ...)
- **Population level** (e.g. genetic structure, gene flows, effective population size, identification of source populations, bottleneck, expansions...)
- **Species level** (e.g. taxonomic uncertainties, forensics, introgressions...)
- **Hybrids identification** (e.g. escape controls, impact of alien species, careless artificial reproductions or reintroductions...)

## Scelta del LOCUS/MARCATORE

### Mutation rate

Measure of the rate at which various types of mutations occur over time.

It is influenced by genetics and environment.

SLOW

Few polymorphisms due to negative selection

FAST

The differences accumulated in the past can be masked by more recent ones.  
Underestimation of the genetic diversity.

The closer are the organisms that I have to study,  
the more the marker to use should be variable.

Costs

What do you want analyze?

## **DNA revolution**

Categories of DNA molecular markers based on the type of information provided:

### **mitochondrial - plastidial - nuclear:**

Depending on the genome they map.

### **single locus - multilocus:**

Providing information on one or several loci respectively.

### **co-dominant - dominant:**

In which all states/alleles are detectable - in which one state/allele is masked by another.

### **neutral - adaptive:**

If the observed polymorphism is the result of neutral evolution or is due to selective processes.

## DNA revolution

# Marcatore genetico ideale





## DNA revolution

# Marcatore genetico ideale

- Non influenzato dall'ambiente
- Neutrale
- Stabile
- Facile da monitorare
- Numeroso
- Codominante
- Polimorfico
- Presente in qualsiasi tessuto
- Indipendente da sesso ed età
- Analisi automatizzabile



**ESISTE ?**

# The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?

Christian Schlötterer

In less than half a century, molecular markers have totally changed our view of nature, and in the process they have evolved themselves. However, all of the molecular methods developed over the years to detect variation do so in one of only three conceptually different classes of marker: protein variants (allozymes), DNA sequence polymorphism and DNA repeat variation. The latest techniques promise to provide cheap, high-throughput methods for genotyping existing markers, but might other traditional approaches offer better value for some applications?

- They can take their name from a **property of the locus** (e.g. **microsatellites, minisatellites, SNPs, ...**)
- or from the **experimental procedure** used for their characterization (e.g. **RFLP, RAPD, AFLP, ...**)

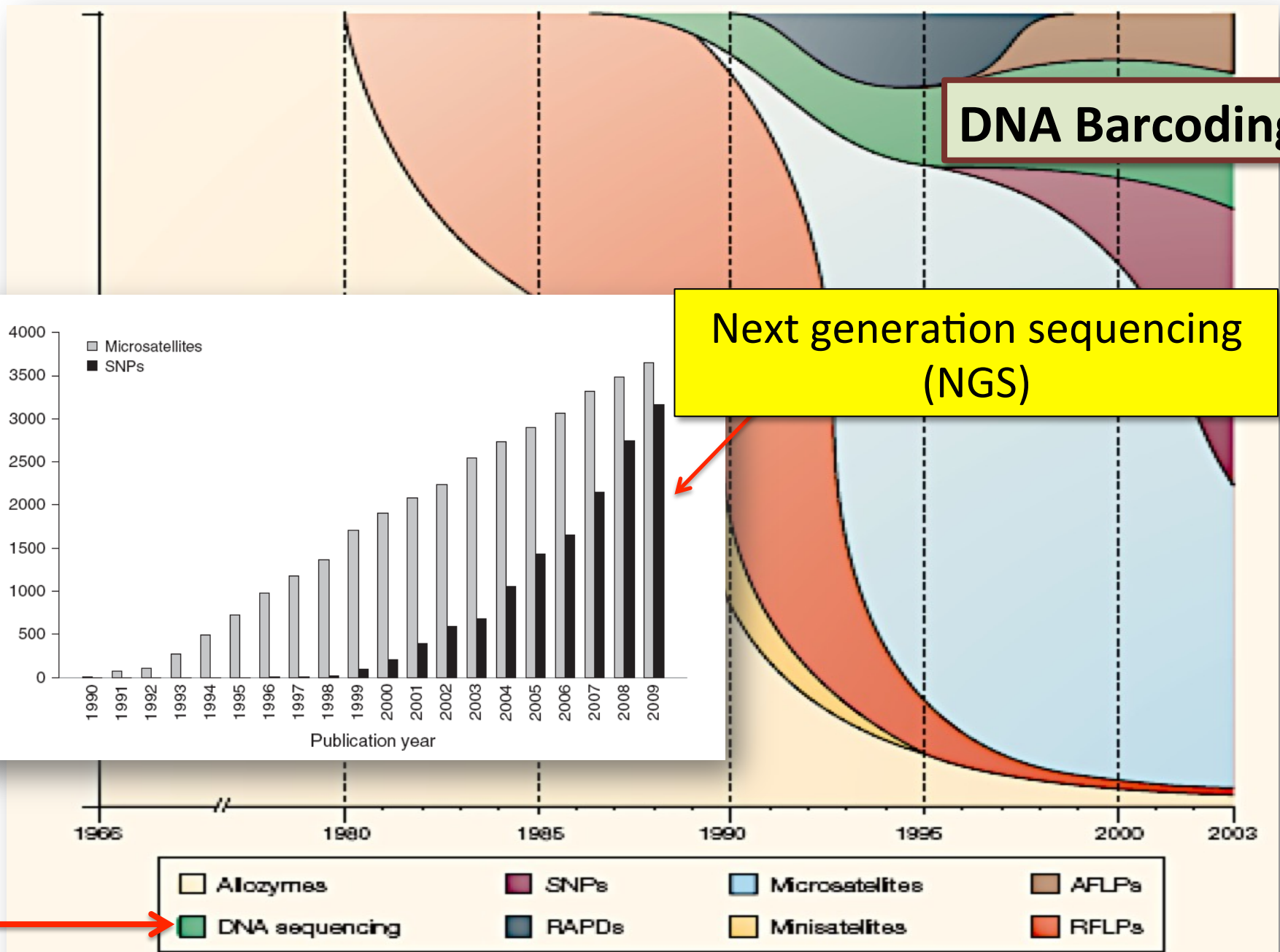
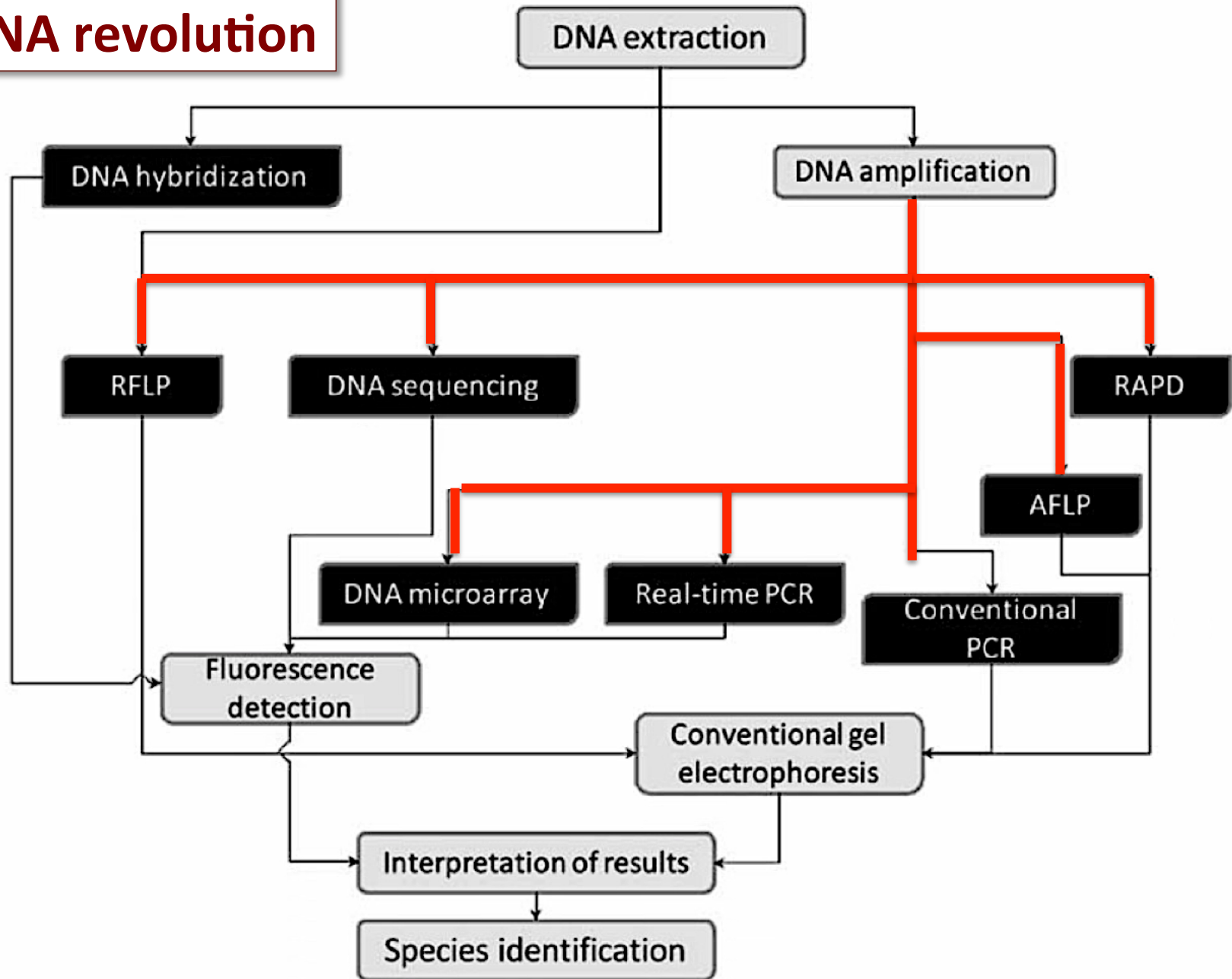
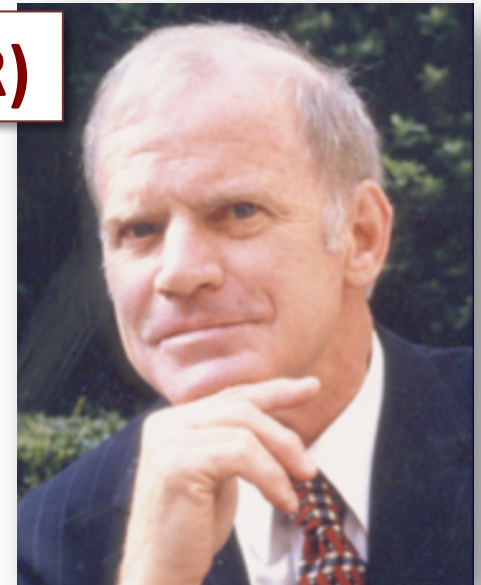


Figure 1 | Subjective view of the the changing relative importance of different molecular markers.

# DNA revolution



# Reazione a catena della polimerasi (PCR)



## ✓ Dr. Kary Mullis

1985 scopre e pubblica la tecnica della PCR

1993 Premio Nobel per la Chimica

## ✓ Replicazione esponenziale di una regione di DNA

$$N = N_0 \times 2^n$$

Numero di ampliconi

Numero iniziale di molecole di DNA

Numero di cicli della reazione di PCR

The diagram shows the equation  $N = N_0 \times 2^n$  with three arrows pointing to its components: one from 'Numero di ampliconi' to 'N', one from 'Numero iniziale di molecole di DNA' to ' $N_0$ ', and one from 'Numero di cicli della reazione di PCR' to ' $2^n$ '.



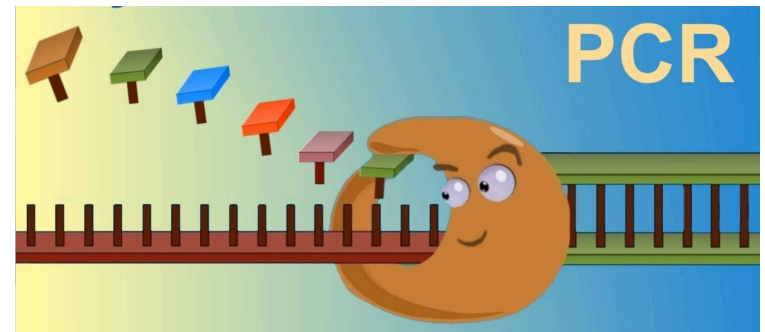


## Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ Replicazione esponenziale di una regione di DNA
- ✓ Reazione enzimatica

### DNA polimerasi termostabile di *Thermus aquaticus* (Taq polimerasi)

Permette di lavorare a temperature elevate senza denaturarsi e garantendo specificità di annealing

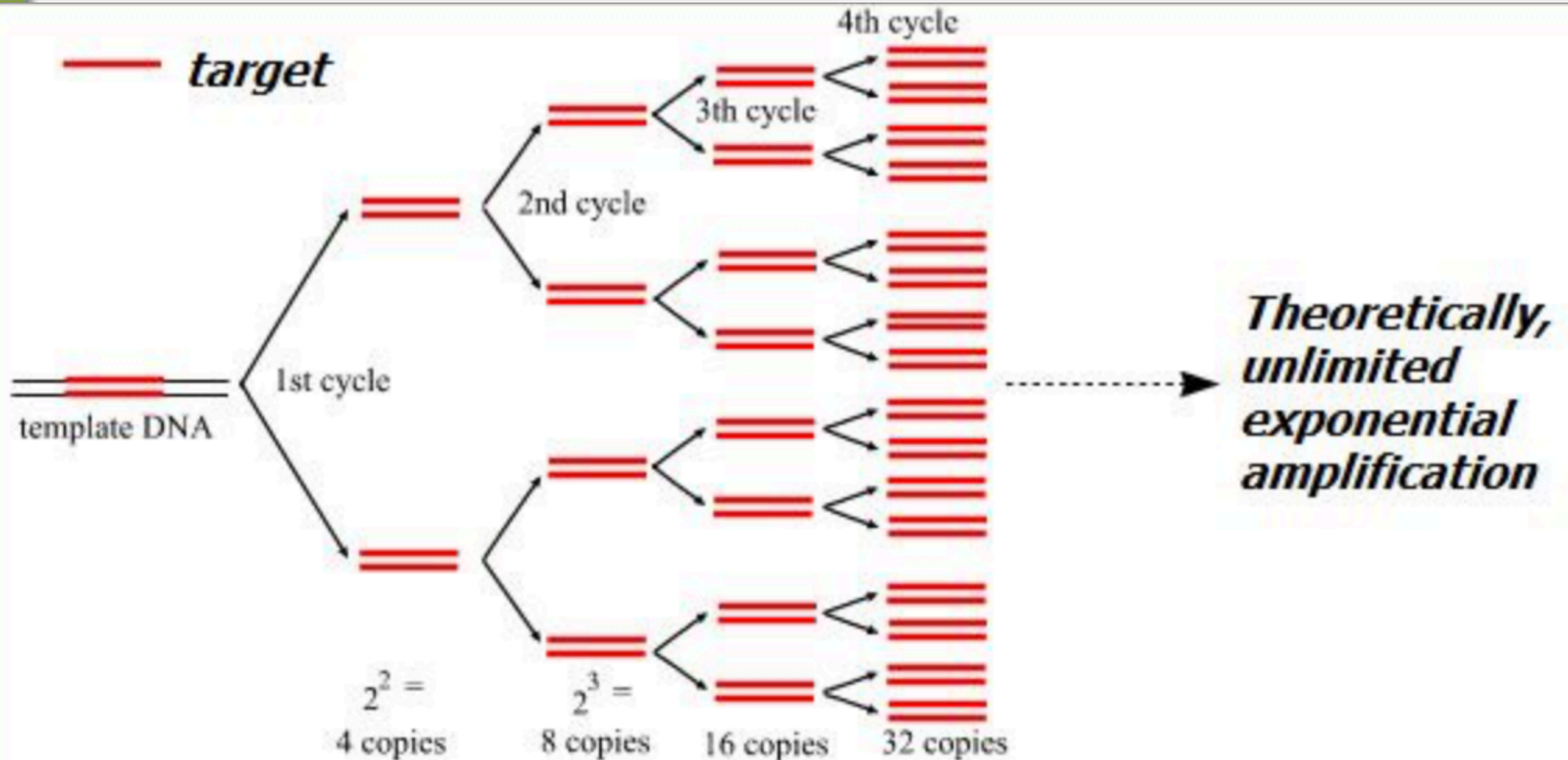


No attività 3'-5' esonucleasica (proofreading o correzione di bozze)

**Tasso di errore  $1 \times 10^{-4} < X < 1 \times 10^{-5}$**

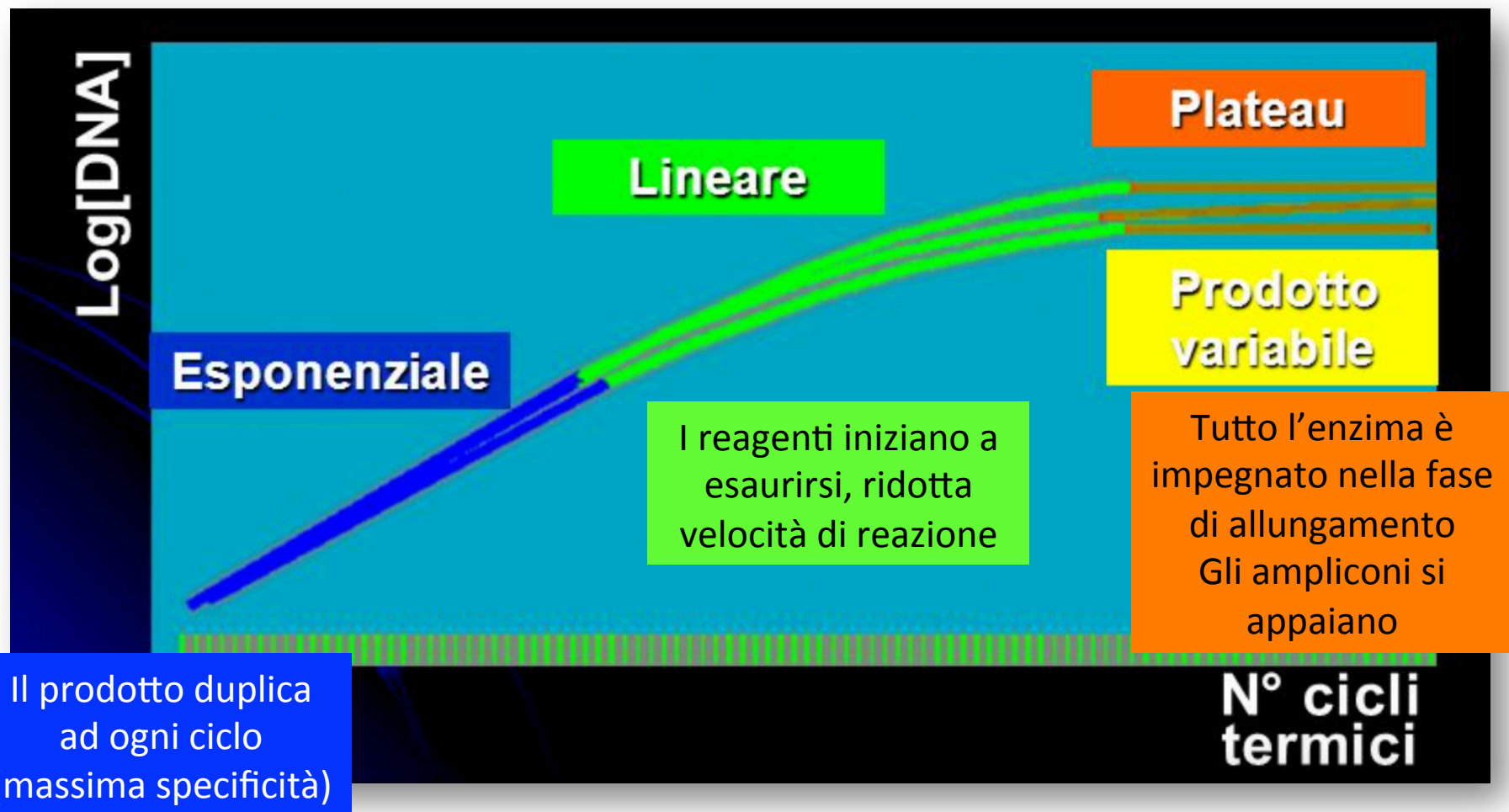
# Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ Replicazione esponenziale di una regione di DNA
- ✓ Reazione enzimatica



# Reazione a catena della polimerasi (PCR)

- ✓ Replicazione esponenziale di una regione di DNA
- ✓ Reazione enzimatica



# DNA revolution

