

# Capitolo 10

## Il DNA antico ed il DNA forense

### 10.1 Introduzione

Negli ultimi decenni l'analisi del DNA ha acquistato sempre più importanza nel mondo scientifico divenendo versatile, al centro cioè di attività di ricerca anche molto diverse le une dalle altre e fruibile da gran parte della comunità scientifica. Tutto ciò ha permesso non solo lo sviluppo del campo della genomica, ne è un esempio il mappaggio dei geni, ma anche la nascita di nuovi campi di applicazione come per es. la genetica forense e l'antropologia molecolare. Entrambe infatti utilizzano per i loro studi le informazioni che si possono ricavare dall'analisi della molecola contenuta all'interno del nucleo di tutte le nostre cellule, il DNA, condividendo l'approccio scientifico seppur con differenze e finalità diverse. Quindi, nonostante la genetica forense studi la molecola del DNA per riuscire a ricavare informazioni utili ai fini legali, l'antropologia molecolare per ricercare per es. l'origine della nostra specie, esse condividono spesso gli stessi problemi pratici e le metodologie attuate per risolverli.

### 10.2 DNA antico

L'analisi del DNA antico nasce negli anni '80 ad opera di un gruppo di ricercatori allievi di Allan Wilson, cioè Russell Higuchi, Svante Paabo e Mark Stoneking. L'idea di provare ad estrarre materiale genetico da campioni archeologici e fossili sembra, all'inizio, essere un'utopia e solo un semplice 'gioco' intellettuale ma ben presto diviene un importante campo in continuo sviluppo della moderna biologia molecolare, grazie al quale è oggi possibile studiare il patrimonio genetico di specie estinte mettendolo a confronto con quello delle specie attuali cercando anche di far luce sull'origine dell'umanità. La scoperta della reazione a catena della polimerasi ha permesso

all'antropologia molecolare di continuare e migliorare il suo sviluppo verso analisi sempre più complesse e sofisticate che sono culminate nell'analisi dell'mtDNA di Neandertal. Le problematiche relative all'analisi di campioni antichi sono state analizzate nei dettagli nei capitoli precedenti e spesso la combinazione fra le difficoltà tecniche e la multidisciplinarietà, l'antropologia molecolare infatti si intreccia con una varietà di discipline quale per es. la genetica di popolazioni, l'antropologia, l'archeologia, la linguistica e la paleontologia, ha acceso controversie eccitanti su molti dei risultati ottenuti dagli antropologi molecolari. Un esempio di quanto appena detto è una pubblicazione del 1993, in cui le presunte sequenze ottenute dall'analisi di resti di insetti inglobati in ambra di circa 120-135 milioni di anni fa o da ossa di dinosauro, sono state oggetto di controversie fino a giungere oggi al risultato che le sequenze ottenute erano sequenze contaminanti. Molti scienziati impongono un limite di circa 100.000 anni per la sopravvivenza di DNA amplificabile. Proprio per i problemi di cui abbiamo appena discusso è stato necessario sollevare e risolvere il problema dell'autenticazione dei risultati non solo mediante l'adozione di «Golden Criteria» di cui abbiamo già discusso in precedenza ma anche conoscendo la storia tafonomica del campione e la sua conservazione e tipizzando le persone che in laboratorio maneggiano il campione e tutti quelli, se possibile, che anche all'esterno del laboratorio lo manipolano.

Da sottolineare è anche che il marcatore d'elezione nelle analisi sul DNA antico è, come abbiamo più volte osservato e per questo motivo non ci ritorniamo sopra, il DNA mitocondriale.

### 10.3 DNA forense

La scoperta del DNA e la successiva analisi che rappresenta l'ultimo degli strumenti, in ordine temporale, utilizzati dagli analisti per cercare di attribuire ad una prova un nome, ha aperto le porte ad un comportamento nuovo nei confronti delle scienze forensi. Di identificazione personale infatti si comincia a parlare nei primi anni del secolo scorso con la scoperta dei polimorfismi dell'ABO, studiati da Karl Landsteiner. Anche se scarsamente informativi, questi rappresentano il timido inizio delle analisi forensi in campo biologico. I gruppi sanguigni vengono determinati in base alla presenza o assenza sulle membrane cellulari degli eritrociti di alcuni antigeni. Esistono molti sistemi per determinare il gruppo sanguigno ma quello più utilizzato è il test di Coombs. Il siero di Coombs è composto da anticorpi contro le IgG umane o frazioni del complemento in grado di formare un ponte tra le proteine attaccate agli antigeni della membrana eritrocitaria e di determinare un'agglutinazione visibile. Si sono susseguiti poi lo studio del sistema HLA e lo studio dell'elettroforesi delle proteine quali anticorpi, enzimi, proteine plasmatiche e cellulari. Nel 1953 la scoperta del DNA da parte di Watson e Crick ha cambiato la storia della

biologia, della genetica e di tutto il mondo scientifico e sicuramente ha gettato le basi anche per le successive analisi genetico-forensi anche se dobbiamo ad un genetista inglese, Alec Jeffreys, la scoperta della tipizzazione del DNA, o «DNA fingerprinting», avvenuta nella seconda metà degli anni '80. Tale metodo ha segnato un punto di svolta nei metodi d'indagine migliorando così la capacità da parte della legge di attribuire o di escludere la colpevolezza ad una persona coinvolta in casi d'omicidio o in controversie di paternità. Jeffreys scoprì che alcune regioni del DNA contenevano sequenze altamente ripetute, notando anche che queste non si ripetevano allo stesso modo per ogni individuo, ma che il numero di tali ripetizioni variava se si consideravano individui diversi. Sviluppando quindi una tecnica che mettesse in risalto la differenza di queste ripetizioni, riuscì a creare il primo test che permettesse l'attribuzione di un profilo genetico specifico ad un individuo. Tali ripetizioni sono note con il nome di VNTR, ovvero *numero variabile di ripetizioni in tandem*. Per poterle studiare, Alec Jeffreys, utilizzò una tecnica denominata RFLP (*polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione*) che consisteva nell'impiego di particolari enzimi che tagliavano nelle regioni circostanti le VNTR. Questo metodo venne impiegato nel 1985 per la prima volta in un caso di immigrazione e subito dopo in un caso di stupro nel 1986 anche se nell'87 a New York nel processo contro J. Castro la corte scelse di rendere inammissibile l'analisi del DNA, subendo così quest'ultima una momentanea battuta di arresto. Appurata successivamente l'affidabilità dell'analisi del DNA quale strumento d'indagine, sono stati compiuti notevoli sforzi al fine di trovare nuovi e migliori sistemi di indagine e marcatori molecolari atti a rendere più efficienti e maggiormente discriminanti le analisi. Come è accaduto per il DNA antico, l'avvento della PCR ha segnato un punto di svolta anche nelle analisi genetico-forensi. Per questo motivo e per gli sforzi compiuti nella scoperta degli short tandem repeat o STR, sequenze ripetute più brevi rispetto ai VNTR, il campo dell'identificazione molecolare sembra aver raggiunto un potere 'illimitato' di analisi. Infatti quanto detto ha permesso di raggiungere ottimi livelli sia in termini di velocità di ottenimento dei risultati, sia in termini di *sensibilità*. Se con i metodi precedenti erano necessarie cospicue quantità di materiale biologico di partenza, oggi, mediante lo studio degli STR, sono sufficienti piccole quantità di campione, come ad esempio poche cellule, per ottenere il profilo di DNA desiderato. Ovviamente però quando gli analisti forensi si avventurano nell'analisi di tracce minuscole, i problemi, ben noti all'analisi sul DNA antico, sulla veridicità dei risultati ottenuti assumono anche in questo ambito un'importanza rilevante. In alcuni casi quindi il genetista forense e l'antropologo molecolare condividono l'analisi di campioni 'storici', intendendo per storici campioni che sono stati sottoposti all'azione non solo del tempo ma anche dell'ambiente, dando così la sensazione che i due campi siano molto vicini l'uno all'altro.

Da quanto detto si evince che una grande differenza con il DNA antico consiste nell'utilizzo come marcatori preferenziali degli STR cioè di DNA nucleare dotato di un maggior potere di discriminazione fra gli individui.

#### **10.4 Principali punti d'unione tra le analisi**

Gli analisti forensi focalizzano la loro attenzione principalmente su DNA, sia esso nucleare che mitocondriale, moderno o comunque su DNA non sottoposto ad alterazioni biochimiche importanti, con conseguenti vantaggi nell'ottenimento di un profilo genetico interpretabile. Raramente infatti si trovano a lavorare con DNA altamente degradato che ne impedisce l'analisi. La situazione contraria vale invece per il DNA antico. Per questo motivo quindi l'analisi del DNA antico si rivolge principalmente all'analisi del DNA mitocondriale, segnando così una delle prime importanti differenze fra le due discipline. La genetica forense per l'identificazione studia per lo più il DNA nucleare dato il potere di discriminazione più alto rispetto al DNA mitocondriale, mentre l'antropologia molecolare studia il DNA mitocondriale, in quanto, dato il numero di molecole più alto rispetto al nucleare all'interno delle cellule, aumenta la probabilità di ritrovare molecole di mitocondriale analizzabili nel reperto antico.

A ben guardare comunque, molti sono gli aspetti che queste due discipline condividono: 1. anche il DNA di campioni forensi può essere colpito da un certo grado di degradazione, entrambe infatti molte volte si trovano di fronte a frammenti nucleotidici che non superano le 100-300 bp; 2. la tecnica della PCR è la metodica centrale di entrambe le discipline; 3. il numero di molecole di campione può essere molto basso (LCN); 4. l'autenticità dei risultati è messa seriamente in 'pericolo' a causa della presenza di materiale estraneo, DNA contaminante, al materiale endogeno; 5. rigorosi controlli vengono attuati al fine di analizzare solo il materiale di partenza, lungo tutta la procedura sperimentale; 6. infine ci sono una serie di criteri di autenticazione dei risultati da seguire in modo da conferire loro plausibilità.

#### **10.5 L'autenticità dei risultati: valutazioni e metodiche applicate**

Punto cruciale sia dell'analisi del DNA antico che di quello forense su cui si concentrano molti degli sforzi messi in atto dai ricercatori, è quello di garantire l'autenticità dei risultati che si ottengono in seguito alle analisi genetiche, dove per autenticità si intende semplicemente la fedeltà di copiatura dell'elica stampo, cioè della molecola endogena propria del campione, durante la PCR. Si possono infatti ottenere in seguito alle analisi sperimentali 'falsi' risultati che possono essere accresciuti dalla presenza di DNA esogeno che può oscurare in qualche modo il vero profilo del campione. Nonostante però lo sforzo nel cercare di validare il risultato genetico ottenuto sia proprio di entrambe le discipline, l'approccio che

*Tabella 10.1. Analogie e differenze tra le procedure adottate nell'antropologia molecolare e nella genetica forense.*

Procedure e fasi del processo	Antropologia molecolare	Genetica Forense
Separazione delle superfici di lavoro e dei laboratori	Prevista	Prevista
Racemizzazione degli aminoacidi	Prevista	NON Prevista
Controlli in estrazione ed in PCR	Previsti	Previsti
Clonaggi dei prodotti di PCR	Previsti	NON Previsti
Test filogenetico	Previsto	NON Previsto
Quantificazione del DNA	Prevista	Prevista
Riproduzione indipendente dei risultati	Raccomandata su resti umani	Prevista

ognuna di loro ha nei confronti del problema è differente e dipende dai diversi obiettivi che si propongono.

Quando si analizzano reperti antichi raramente siamo chiamati a confrontare fra di loro nello stesso esperimento campioni che hanno più o meno la stessa età, più spesso invece il confronto viene fatto evidenziando una certa distanza genetica fra le molecole in analisi e quelle moderne scelte come confronti. La validazione quindi dei risultati in seguito all'analisi di DNA antico consiste proprio nel verificare la presenza di questa distanza genetica e nel trovare le appropriate analogie fra le sequenze antiche e la controparte moderna mettendo ovviamente in evidenza i punti di somiglianza che indicano un'origine comune e le differenze che riflettono il trascorrere del tempo. Quanto appena detto serve quindi per aiutare a considerare autentiche le sequenze che si ottengono dai reperti fossili, escludendo così la presenza di contaminazioni dovute a campioni moderni. Un esempio può essere considerata l'analisi delle sequenze del DNA mitocondriale di Neandertal, le differenze trovate, circa 34,9 con le sequenze umane moderne, sembrano infatti soddisfare le relazioni bio-cronologiche fra Neandertal ed uomo moderno.

Nell'analisi del DNA forense invece i risultati dei reperti in esame vengono confrontati per lo più con campioni appartenenti allo stesso periodo e la comparazione viene effettuata per trovare un'identità individuale totale. Ciò che infatti ci aspettiamo di ottenere dall'analisi dei microsatteliti dei cromosomi autosomici è un profilo genetico unico che, paragonato con il profilo di confronto, dia come risultato una sovrapposizione completa. Ovviamente però è possibile ottenere profili simili e non completamente sovrapponibili, due individui per es. possono casualmente condividere alcuni alleli, questo può accadere soprattutto nel caso in cui i due individui in esame appartengano allo stesso gruppo etnico. Purtroppo però quanto detto non è di nessun aiuto nella validazione forense del risultato contrariamente a quanto detto

per il DNA antico, infatti nel forense non esiste nessuna distanza genetica da osservare e se il profilo dei campioni non è sovrapponibile, si pone il problema di capire se questo è dovuto al fatto che la traccia non 'appartiene' al confronto oppure c'è un problema di contaminazione che in qualche modo maschera il risultato reale. Purtroppo quindi nelle analisi forensi l'autenticità del risultato deve essere dedotta indirettamente dai controlli negativi in fase di estrazione ed in fase di amplificazione. Un grosso problema dell'analisi del DNA forense è legato al fatto che vengono analizzati campioni con DNA scarsamente conservato ed in basso numero di copie e poi confrontati con campioni di confronto, ben conservati e molto concentrati, potendosi così ingenerare una falsa inclusione dovuta per es. a contaminazione del reperto da parte del materiale di confronto. Per cercare di evitare l'insorgenza del problema appena accennato è consigliabile analizzare i reperti ed i campioni di confronto in due momenti diversi, prima i reperti e poi i confronti, oppure processare i due tipi di DNA in laboratori diversi, fisicamente separati, e poi confrontare i risultati. Alla luce di quanto detto fino ad ora si evince che non c'è un modo intrinseco per distinguere il DNA endogeno dai contaminanti, si possono solo adottare in laboratorio un insieme di comportamenti atti ad evitare il contatto con possibili fonti di contaminazioni.

Per conferire autenticità ai risultati ottenuti dall'analisi del DNA antico e di quello forense gli scienziati hanno sviluppato tecniche diverse, alcune delle quali si sovrappongono fra le due discipline. Per quanto riguarda l'analisi di campioni fossili, la valutazione dello stato di conservazione della componente biochimica dei reperti può essere considerata una prima stima dello stato di conservazione del DNA, venendo proposto come modo per garantirne il buono stato di conservazione in resti fossili ed archeologici. Infatti i risultati preliminari della racemizzazione degli aminoacidi e la istantanea pirolisi con la gas cromatografia e la spettrometria di massa possono in qualche modo indirizzare gli scienziati nelle analisi successive essendo i risultati che si ottengono correlati con la possibilità di amplificare il DNA. Le analisi biochimiche di cui abbiamo appena discusso sono utili soprattutto nei casi in cui i campioni da analizzare sono tanti e devono essere trovati velocemente i candidati ideali da analizzare, cercando così di evitare inutili sprechi di materiale. Considerando però i costi e le problematiche connesse a questo tipo di analisi è sconsigliabile utilizzare queste tecniche anche in quei rari casi in cui la racemizzazione e la pirolisi potrebbero aiutare. Al fine di rendere il risultato genetico ottenuto dal DNA antico attendibile, è necessario, dal momento che la polimerasi può portare all'introduzione di un cambiamento di nucleotidi nelle sequenze originali stampo, dovuto sia al danneggiamento dell'elica stampo iniziale che alla errata attività dell'enzima durante i primi cicli di amplificazione, è necessario clonare e sequenziare i prodotti di PCR in modo da evidenziare la presenza di queste modificazioni che si presentano come differenti nucleotidi nella stessa posizione della sequenza. La tecnica del clonaggio non viene quasi mai utilizzata in ambito forense.