

Chi ha ucciso Christin Kitt?

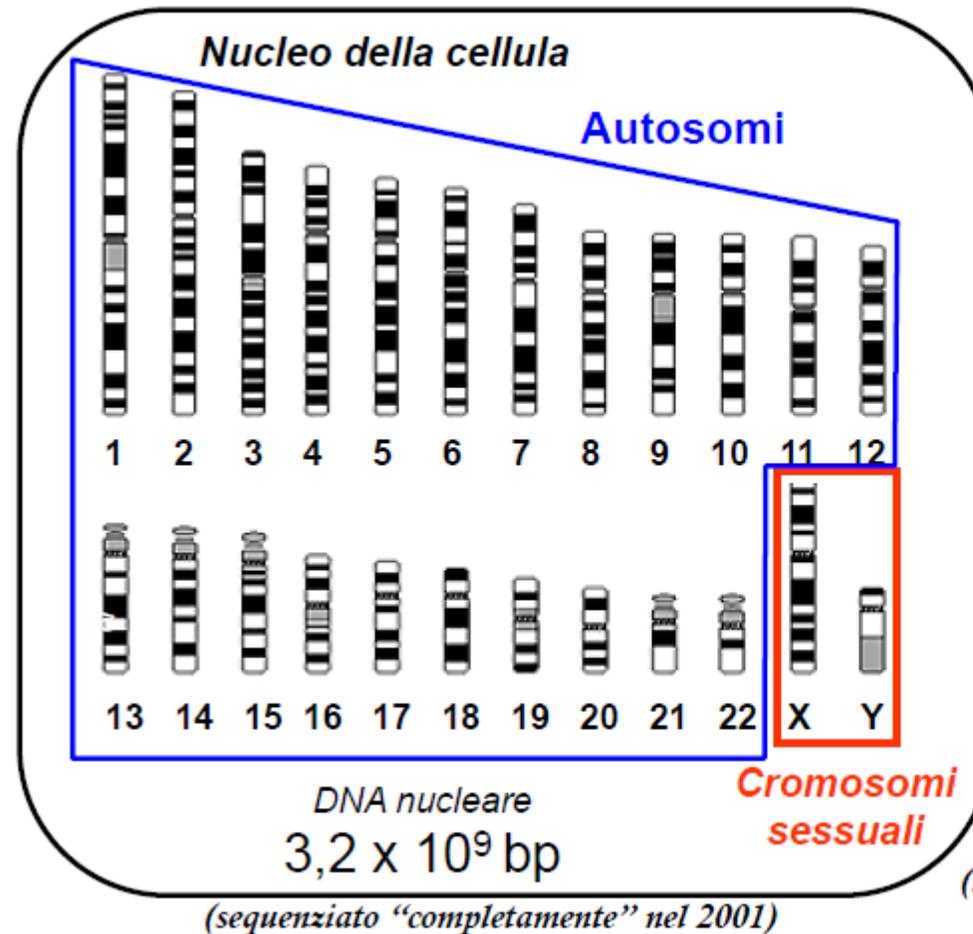
Scopri il colpevole con il DNA fingerprinting



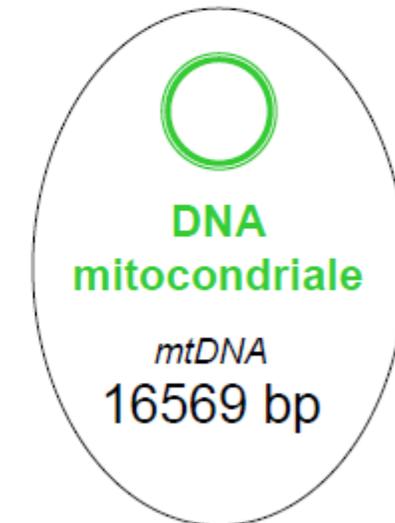
Richiami teorici...

bp= base pair, ovvero paia di basi, è l'unità di misura della lunghezza di sequenze di acidi nucleici a doppio filamento, che indica il nucleotide e il suo complementare sul filamento opposto.

23 coppie di cromosomi + DNA mitocondriale (mtDNA)



Localizzato nei
mitocondri



(sequenziato completamente nel 1981)

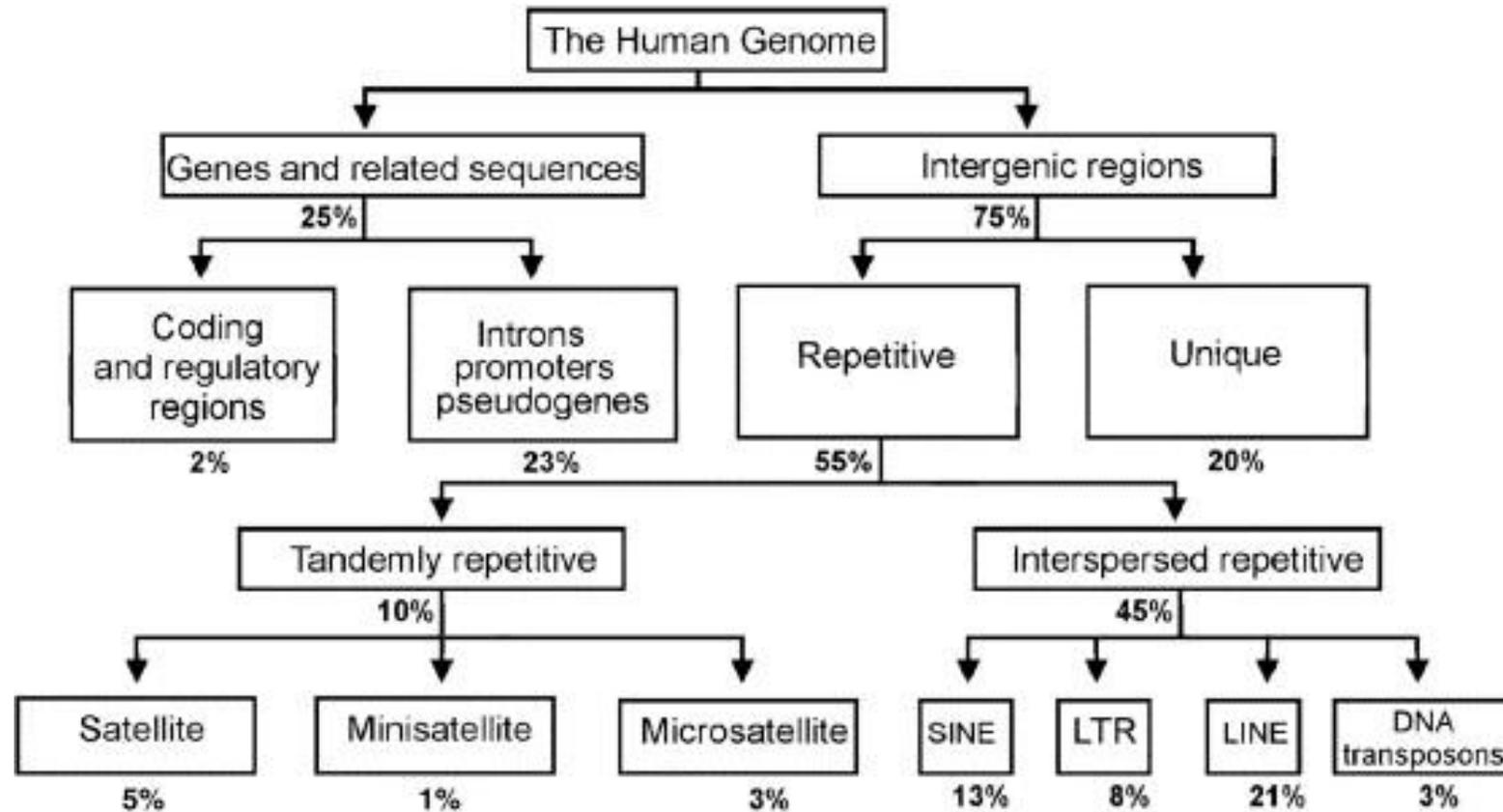
“A prerequisite to understanding the complete biology of an organism is the determination of its entire genome sequence” - Fleischmann et al. 1995

Il **Progetto Genoma Umano** è stato un progetto di ricerca internazionale durato più di 10 anni, al quale hanno collaborato un ente pubblico statunitense, il National Institutes of Health (NIH), ed un'azienda privata, la Celera Corporation, fondata e diretta dal biochimico Craig Venter. A questi due gruppi si sono aggiunte collaborazioni di altri enti in USA, Canada, Gran Bretagna e Nuova Zelanda. Il sequenziamento completo del genoma umano ha permesso di ottenere un quadro dettagliato della sua organizzazione, in modo da definire la mappa dei nostri geni.

Ciò ha comportato una rivoluzione in campo medico, ponendo le basi per cure personalizzate, strategie mirate e innovative, e soprattutto «per un nuovo modo di fare scienza», secondo quanto affermato dagli scienziati che hanno sviluppato il progetto.

1990-2001





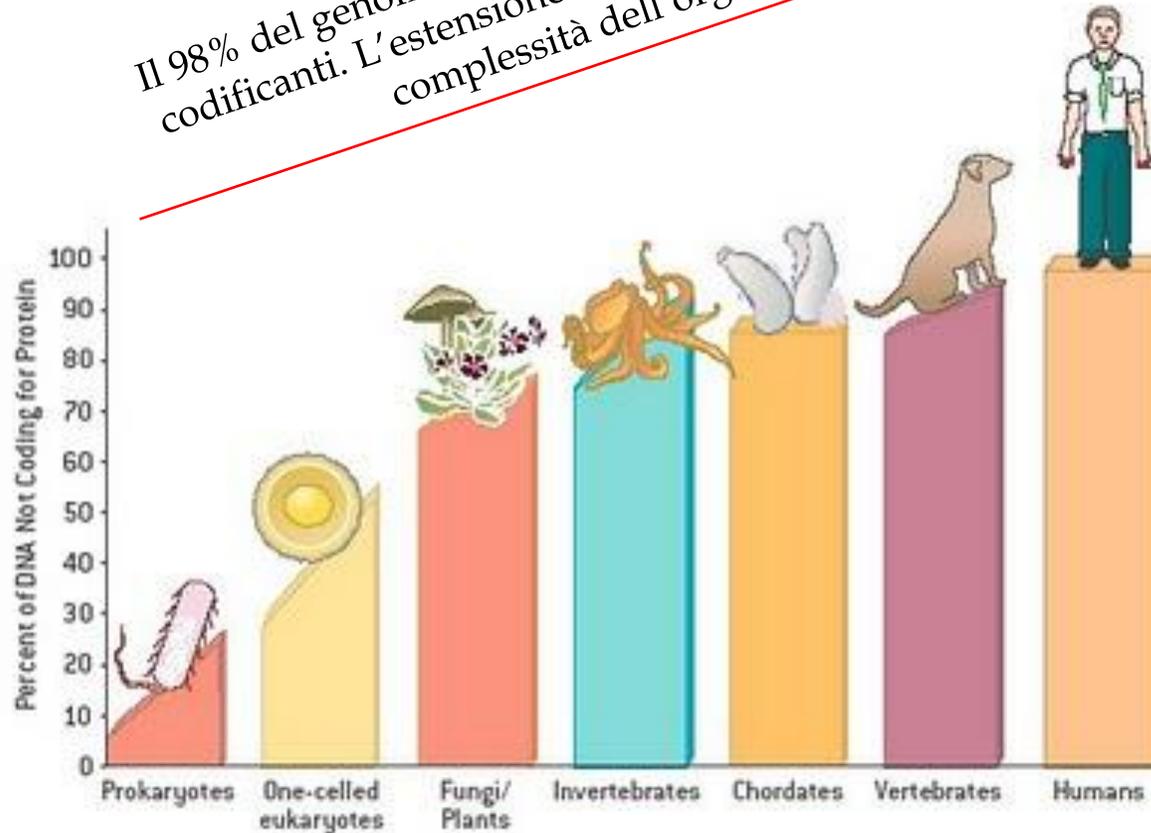
Anna Jasinska, Wlodzimierz J. Krzyzosiak - **Repetitive sequences that shape the human transcriptome.**
FEBS Letters, 2004, 567(1):136-41.

	Cellule di lievito	6 000 geni	
	Insetto	13 500 geni	
	Drosophila melanogaster	14 000 geni	
	Caenorhabditis elegans	19 000 geni	
	Riso	50 000 geni	
	Uomo	20 000-30 000 geni	

**La complessità di
un organismo
NON
dipende dal
numero di geni**

Il sequenziamento del genoma umano ha permesso di scoprire che le sequenze codificanti occupano solo il 2% di tutto il genoma umano; sono stati individuati circa 20.000 geni, contro i 100.000 che gli studiosi avevano ipotizzato.

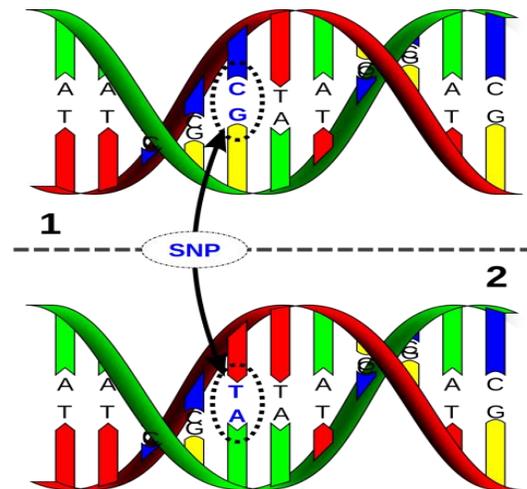
Il 98% del genoma umano è costituito da sequenze non codificanti. L'estensione di tali regioni aumenta con la complessità dell'organismo.



NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

Nella popolazione umana il 99,9% del DNA è identico in tutti gli individui. Solo lo 0,1 % mostra variabilità. In particolare, variazioni nelle sequenze di DNA presenti in una popolazione con una frequenza maggiore dell'1% vengono chiamate **polimorfismi genetici**. Ciascuno di noi eredita un'unica combinazione di polimorfismi dai propri genitori.

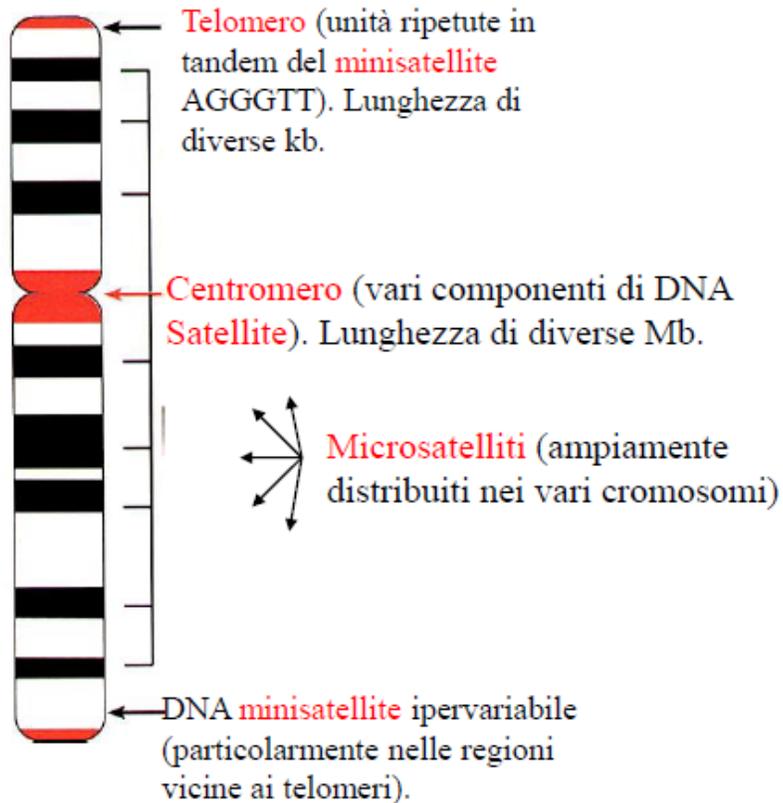
La fonte principale della variabilità genetica fra gli individui è rappresentata dai polimorfismi a singolo nucleotide (**SNP, single nucleotide polymorphism**), ovvero variazioni di 1 posizione nucleotidica, presenti ogni 500-1000 bp. Gli SNPs sono responsabili della diversa suscettibilità degli individui alle malattie e della diversa risposta ai farmaci.



“If were not for the great variability between individuals, Medicine might be a Science, not an Art”

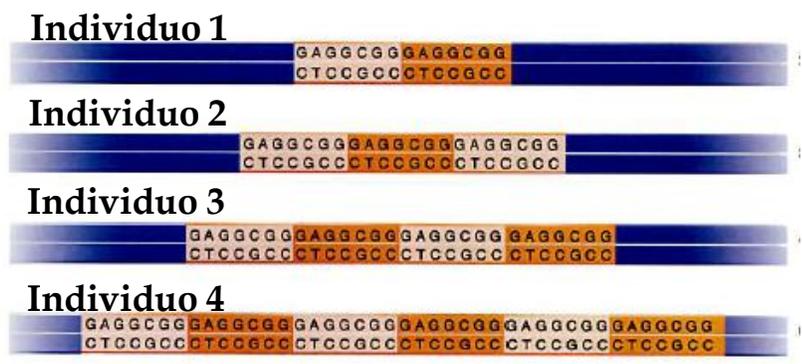
Sir William Osler “The principles and practice of Medicine, 1892

Oltre ai polimorfismi di sequenza, di notevole importanza sono anche i polimorfismi di lunghezza, ovvero sequenze ripetute in tandem in numero variabile. In ogni individuo, tali sequenze, basate sullo stesso motivo ripetuto, possono comparire soltanto una volta o più volte nel genoma, con diverse lunghezze su differenti cromosomi.



Minisatelliti
(VNTR, variable number tandem repeat)
Unità costituite da 6 a 100 bp ripetute migliaia di volte

Microsatelliti
(STR, Short Tandem Repeats)
Unità costituite da 1 a 5 bp ripetute 10-30 volte.

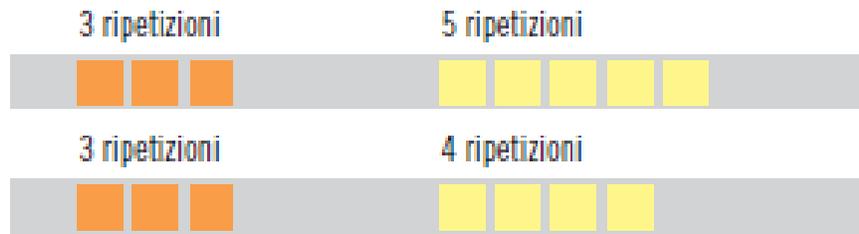


Satelliti
Unità costituite da 5 a 50 bp ripetute fino ad un milione di volte.

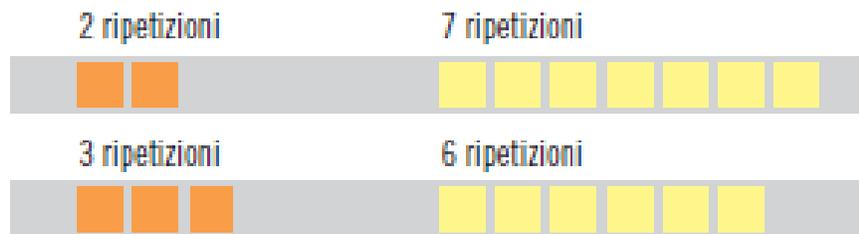
I polimorfismi sono allelici e vengono ereditati in modo mendeliano

Come per tutti i loci genetici, anche per i microsatelliti gli individui possono essere omozigoti (sui due cromosomi omologhi è presente lo stesso numero di ripetizioni, **individuo A**) o eterozigoti (il numero di ripetizioni sui due cromosomi omologhi è diverso, **individuo B**).

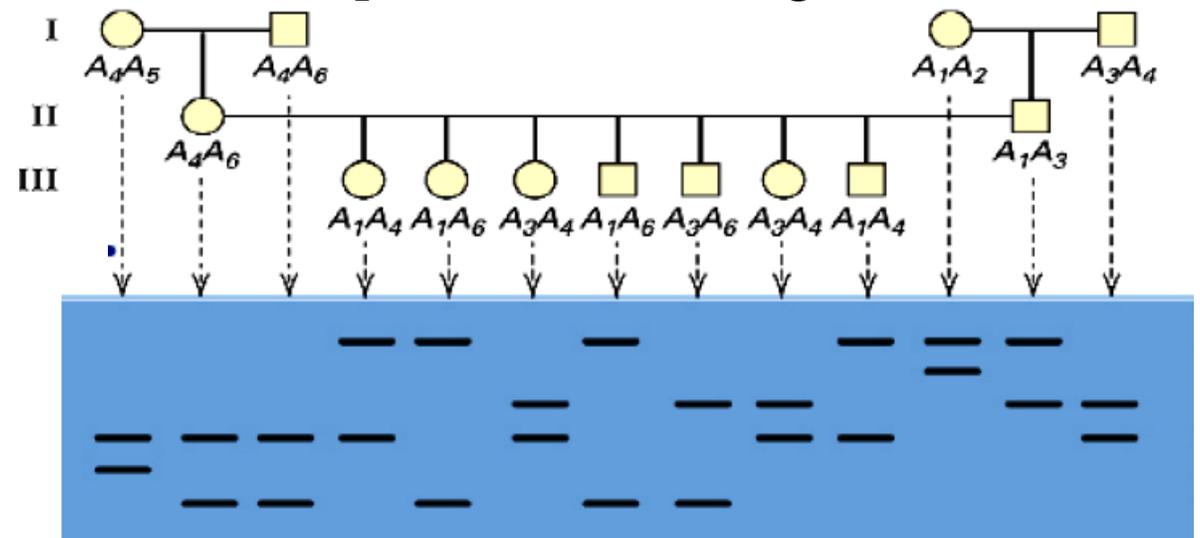
Individuo A



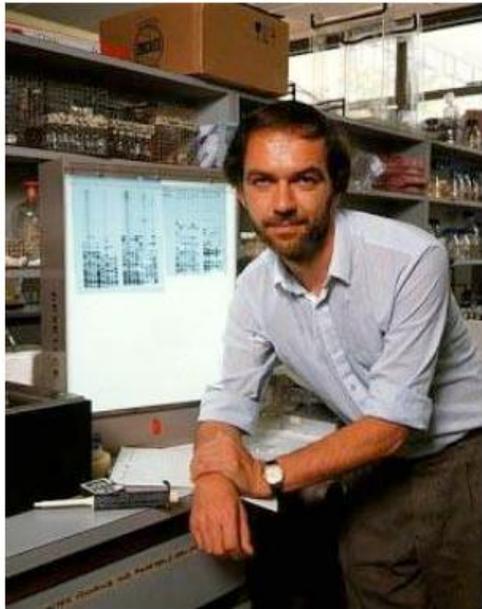
Individuo B



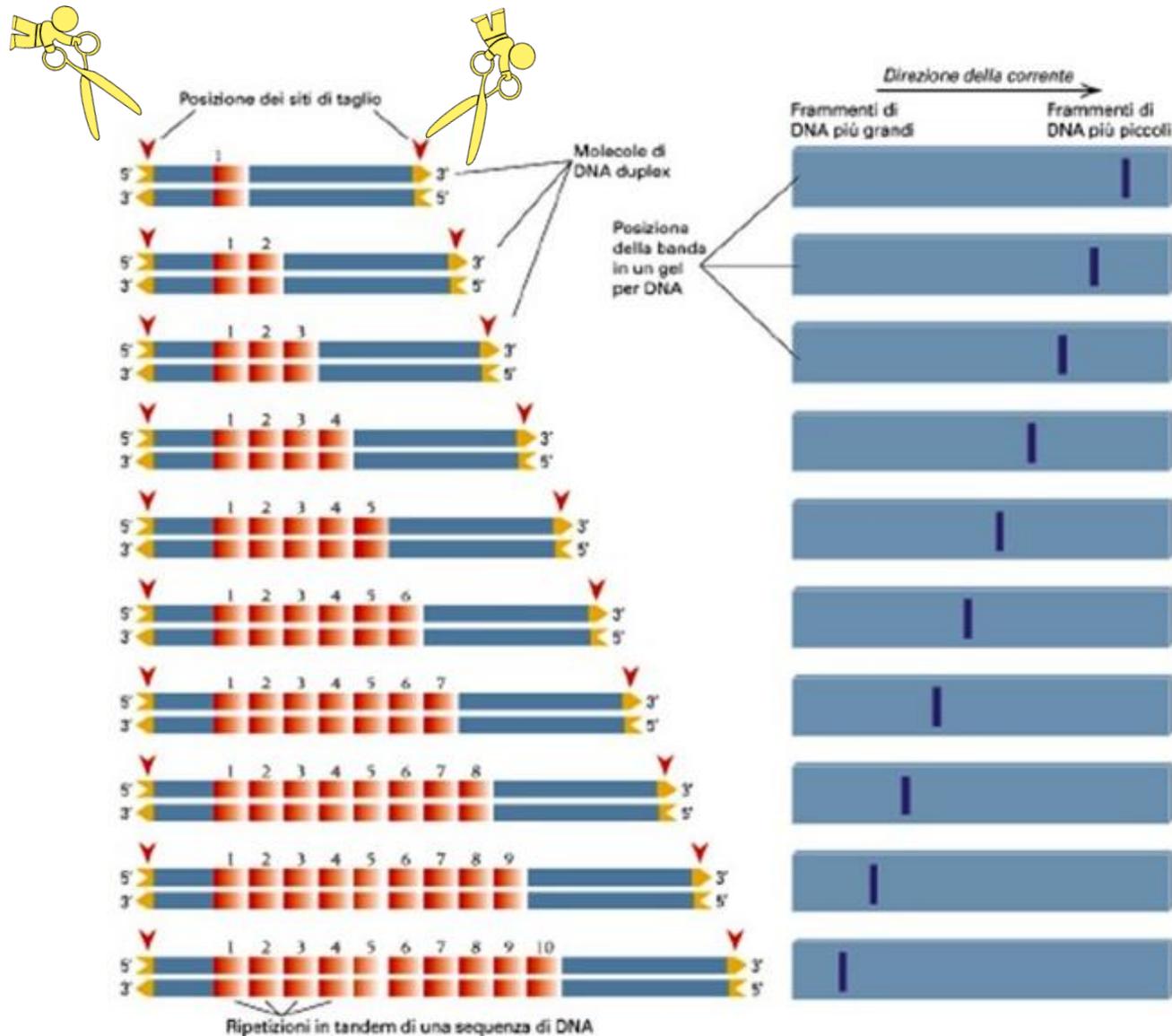
In questo albero genealogico sono stati presi in considerazione due polimorfismi di lunghezza



Indipendentemente dal ruolo biologico, i polimorfismi del DNA sono importanti *marcatori genetici*, utilizzati a scopo clinico (individuazione di patologie e diagnosi prenatale), forense (identificazione dei colpevoli di un crimine) e per studiare l'evoluzione delle popolazioni umane. Nel 1985 Alec Jeffreys, biochimico presso l'Università di Leicester in Inghilterra, scoprì che le sequenze ripetute VNTRs altamente polimorfiche possono essere utilizzate per individuare in maniera univoca un individuo, determinando la sua impronta genetica (DNA finger-printing).



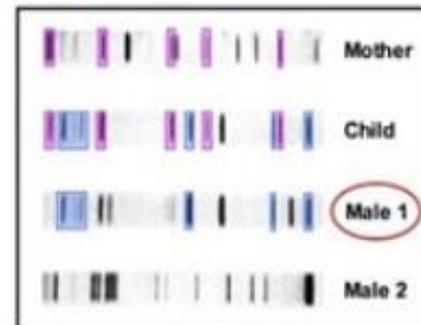
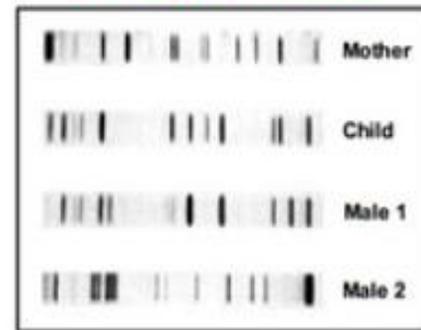
Il **DNA finger-printing** è un metodo di identificazione che consiste nel comparare frammenti di acido deossiribonucleico (DNA) provenienti da diversi individui.



Digerendo le porzioni di DNA di diversi individui con opportuni *Enzimi di restrizione* (forbici molecolari), ovvero enzimi capaci di tagliare il DNA in punti specifici, fiancheggianti le sequenze altamente ripetute VNTRs, si ottengono frammenti di DNA di diversa lunghezza. Confrontando i frammenti ottenuti dall'analisi di diverse VNTRs è possibile identificare una persona (Southern blotting).

Applicazioni del DNA **F**ingerprints

Test di paternità



In ambito forense





1983: Lynda Mann, 15 anni, viene violentata e uccisa nel Leicestershire (UK)

1986: Dawn Ashworth, 15 anni, viene violentata e uccisa nella stessa zona

Il *modus operandi* nei due delitti era lo stesso ed il gruppo sanguigno (gruppo A), determinato dalle tracce di liquido seminale, era il medesimo.

1986: Richard Buckland, un ragazzo del posto, venne incriminato dei due delitti, ma l'analisi del DNA mediante fingerprinting con i minisatelli (da poco scoperti) rivelò che egli era innocente.

Circa 5000 individui nel Leicestershire possedevano il gruppo sanguigno A. Si organizzò uno screening di massa ed in nessun caso il DNA fingerprinting dei 5000 individui corrispondeva a quello dell'assassino.

1987: per un puro caso, si venne a sapere che una persona del posto, un certo Colin Pitchfork, aveva chiesto ad un amico di partecipare allo screening al suo posto.

Il signor Pitchfork venne invitato a donare il sangue ed il profilo del suo DNA risultò identico a quello del DNA raccolto sulla scena dei due delitti.



ready
My arm is all good. My arm is all good. My arm is all good.



Marlee Matlin, Mario, Penn Jillette and Monica Seles meet on Dancing with the Stars, 6B

Tuesday, February 19, 2008

Newsline

Elder Bush backs McCain



Former president presses GOP hopeful early boost with endorsement Monday.



U.S. recognizes Kosovo

Britain, France, Germany also back secession from Serbia. Thousands of angry Serbs protested; above in Mitrovica, 2A



Factories try to go green

Subaru plant is part of trend to be energy conscious, recycle on assembly line, 5A

Injured student ran back for girlfriend

After fleeing classroom gunman, Jan. 26, 2007, he turned back to rescue his girlfriend, 6A

Tornado rips through Alabama town

Two people were critically injured and 200 homes damaged or destroyed as storm hit Dadeville, Ala., 4B

Money: 143M pounds of beef recalled

Officials say the beef, used in school lunch programs, may have already been eaten, 5A

Sports: Baseball icons wait for call

Barry Bonds, Roger Clemens and other older free agent stars await pending offers, 3B

Life: Superstar pair gets historic

Partners and jobsmen served as each other's anchor during filming of The Other Woman Girl, 6B

Dollar exchange rates

Currency	Midday	Change
100 U.S. dollars per euro	\$1.4077	▲ 0.0005
100 yen per dollar	107.89	▲ 0.00
100 U.S. dollars per pound	\$1.5081	▲ 0.0001

► Complete report, 5A

USA TODAY Snapshots®

Car dealership

Victory was team effort

Daytona 500 Ryan Newman does a burnout to celebrate winning the 'Great American Race' after a final-lap push from Penske teammate Kurt Busch, 1B



Served time for a crime he didn't commit: Charles Chatman, shown at his new apartment in Carrollton, Texas, was convicted of sexual assault in 1981, when DNA testing was available.

DNA tests fuel urgency to free the innocent

New efforts underway nationwide to identify wrongful convictions

By Kevin Johnson
USA TODAY

CARROLLTON, Texas — After spending nearly 27 years behind bars in the state prison system for a crime he did not commit, Charles Chatman's first weeks of freedom have been overwhelming.

Each of the six rooms in his new apartment, including the bathroom, is larger than any of his prison cells. The glowing entertainment system and sleek laptop (his friends and attorney's gift) as well as fellow prisoners in prison set. Chatman, 47, has little idea how to operate them — testimony to more than a generation lost behind bars.

Chatman was exonerated last month by DNA

Dozens of cities spared war dead

Data show sporadic nature of Iraq conflict

By Rick Hempson and Paul Overberg
USA TODAY

As the Iraq war approaches its fifth anniversary and 4,000th U.S. military death, about three dozen cities with populations above 50,000 have not lost a servicemember in the conflict, according to the Pentagon's list of the deceased's hometowns.

The fact that so many relatively large cities have been spared a fatality in Iraq underscores how sporadic the war has affected much of the American home front.

Cities without a reported loss include seven that have more than 150,000 residents, among them Oakland and Fort Lauderdale.

Analysts offer two explanations for why such cities could have avoided military losses:

► Recruitment to enlist from less-populated areas — small towns and rural areas. David Segal, a sociologist who directs the University of Maryland's Center for Research on Military Organization, says the fact that some relatively large cities have been spared a loss "is a reflection of where much of the military's recruiting has been done. Cities tend to have more viable economies than those places."

Urban residents, however, are less apt to need the economic opportunity offered by military service.

► In a nation of 300 million, the U.S. military death toll in Iraq is small enough to make chance a factor in which cities lose a son or daughter.

"There's a big random element in this," says William O'Brien, a University of New Hampshire demographer who has studied U.S. deaths in Iraq. "Even in a city of 100,000, you're talking about a fairly small pool of military-age people."

Cities that have so far escaped a fatality in Iraq have suffered significantly in other wars. During the Vietnam War, for instance, Oakland lost at least 36 people. In all, the nation sustained more than 58,000 military deaths in Vietnam.

The list of cities with the most killed in Iraq is headed by New York City (52), Houston (38) and San Antonio (33). Los Angeles, No. 2 in population, has fourth in Iraq fatalities with 30. Chicago, No. 3, has seven deaths.

The absence of a listed war death doesn't mean a city hasn't been affected by the war's toll.

The Pentagon's records of those killed from a servicemember's "hometown of record" — usually where the

Spring fares to Europe will take off

Airlines' skyrocketing fuel costs expected to push up ticket prices

Fares have seen the biggest percentage increase over the last year, the effectuality of fuel surcharges. "You better have two pizza hands set aside this year."

Il DNA scagiona un innocente

Charles Chatman fu accusato di un reato sessuale nel 1981, il test del DNA ha rivelato la sua innocenza dopo 27 anni di carcere

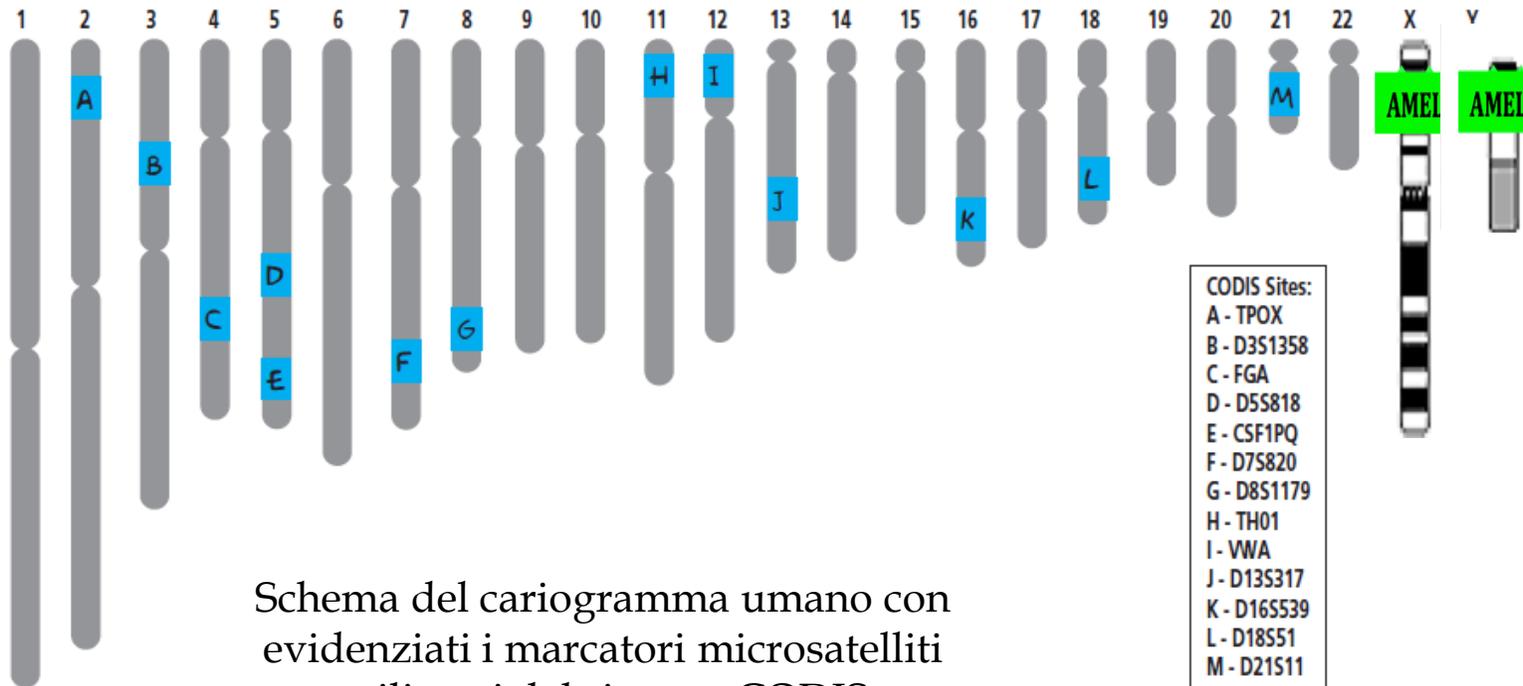
Oggi la genetica forense utilizza i **microsatelliti (STRs)** e non più i **minisatelliti (VNTs)**, dal momento che i primi sono distribuiti in maniera più omogenea nel genoma rispetto ai secondi ed i risultati delle analisi sono ottenibili da piccole quantità di DNA, anche se parzialmente degradato

Nel genoma umano:

128000 STR dinucleotidici
8740 STR trinucleotidici
23680 STR tetranucleotidici
4300 STR pentanucleotidici
230 STR esanucleotidici

Esaminando un certo numero di sequenze STR si possono riconoscere combinazioni che caratterizzano univocamente un individuo.

Negli anni 90 l’FBI ha messo a punto un protocollo di identificazione personale ed ha sviluppato un database nazionale per lo scambio di informazioni tra laboratori, denominato **CODIS (Combined DNA Index System)**. Confrontando 13 sequenze microsatelliti di cromosomi autosomici e 1 sequenza all’interno di un gene presente sui cromosomi sessuali (per stabilire il sesso dell’individuo da cui proviene il materiale biologico), si ha la probabilità di uno su un milione di miliardi (1 su 10^{15}) che lo stesso DNA appartenga a due individui contemporaneamente. La distinzione fra gemelli omozigoti, che hanno lo stesso DNA, è possibile solo in base alle impronte digitali.

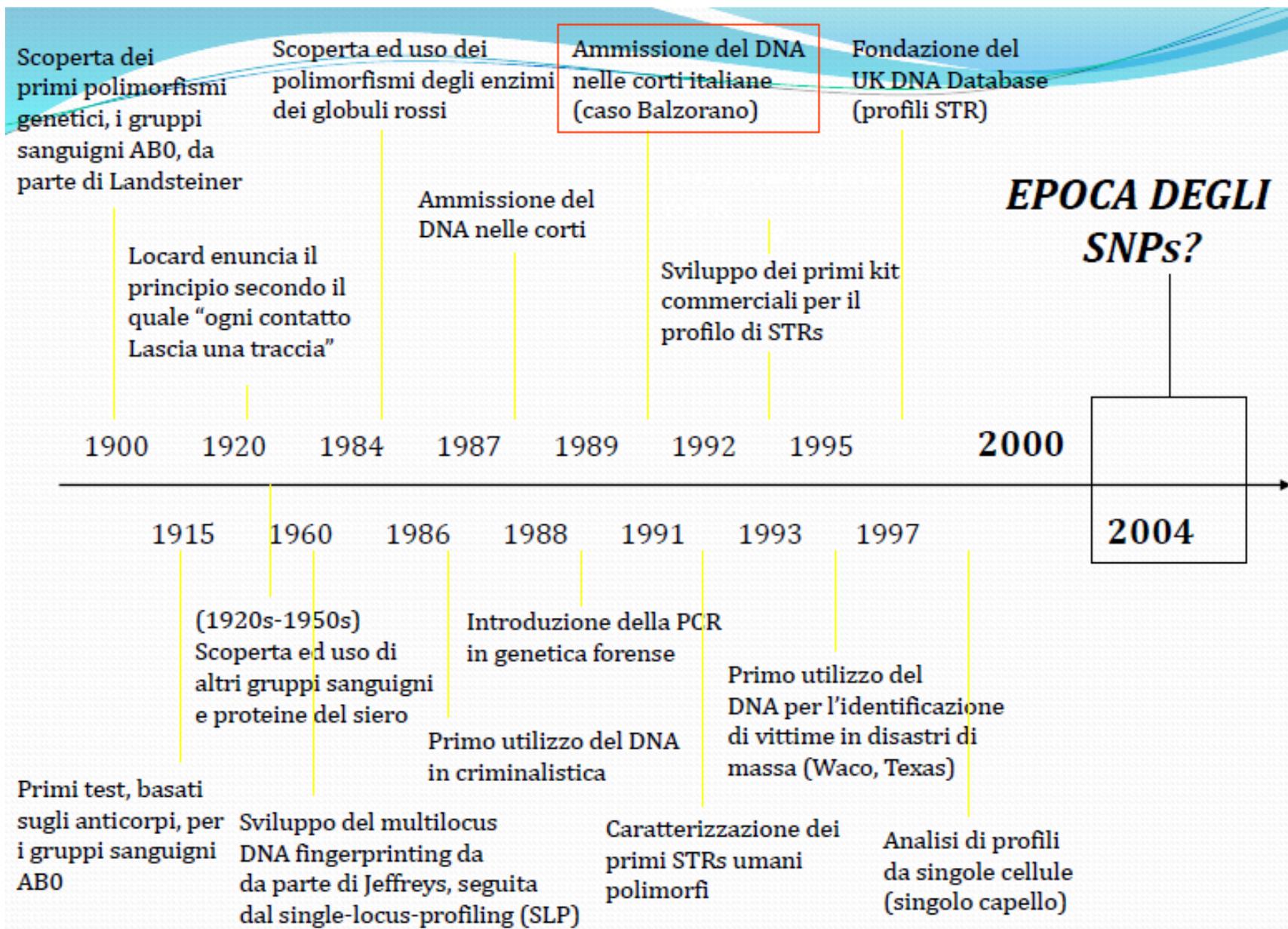


Schema del carigramma umano con evidenziati i marcatori microsatelliti utilizzati dal sistema CODIS

CODIS Sites:
 A - TPOX
 B - D3S1358
 C - FGA
 D - D5S818
 E - CSF1PQ
 F - D7S820
 G - D8S1179
 H - TH01
 I - VWA
 J - D13S317
 K - D16S539
 L - D18S51
 M - D21S11

Oggi il CODIS raccoglie i dati genetici di 1,6 milioni di persone condannate negli Stati Uniti, oltre ad 80 mila tracce genetiche raccolte su luoghi di delitti ancora irrisolti.







Il 7 dicembre 2018 è stato rinvenuto il corpo senza vita della Dott.ssa Christin Kitt. La polizia scientifica ha ritrovato tracce di sangue non appartenenti alla vittima.

I sospettati sono 3 uomini, a cui la polizia ha chiesto un campione di DNA per confrontarlo con quello trovato sulla scena del crimine mediante la tecnica del DNA fingerprinting.

I campioni prelevati sulla scena del crimine e quelli richiesti ai sospettati sono stati portati in laboratorio per essere analizzati.



Il luminol viene utilizzato per rilevare tracce di sangue

(Virtual Lab consigliato: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>)

Il DNA utilizzato per le analisi forensi può essere estratto da diversi tipi di campioni : piccole macchie di sangue, capelli, cicche di sigaretta, reperti ossei, piccoli frammenti di pelle o unghie, tracce di liquido seminale su indumenti, etc.

In laboratorio eseguiremo l' **estrazione del DNA dalla mucosa boccale**

Protocollo di lavoro

- 1) Mettere un pò di acqua in bocca ed agitarla vigorosamente per 1 minuto, in modo da staccare alcune cellule dalle guance, quindi porre 3 ml acqua in un tubo da 15 ml.
- 2) Aggiungere all'acqua 2 ml di buffer di lisi, contenente un detergente che destabilizza le membrane cellulari in modo da liberare il DNA, ed agitare delicatamente la provetta 5 volte.
- 3) Aggiungere 5 gocce di una soluzione che contiene proteasi (enzimi capaci di degradare le proteine, tra cui gli istoni che sono legati al DNA e le nucleasi che degradano il DNA) ed NaCl (lo ione sodio, legandosi al DNA, determina la rottura dei legami del DNA con l'acqua, favorendone la successiva precipitazione) ed agitare nuovamente la provetta 5 volte.
- 4) Riscaldare la provetta a 50°C per 10 minuti in modo da facilitare la rottura delle membrane e disattivare gli enzimi che attaccano il DNA.
- 5) Aggiungere 10 ml di etanolo freddo inclinando la provetta di 45°C e lasciare incubare per 5 minuti: ciò determina la precipitazione del DNA.
- 6) Agitare la provetta delicatamente per 5 volte: a questo punto il DNA sarà evidente come un filamento biancastro

(Virtual Lab consigliato: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>)

Tale tecnica, che permette di amplificare *in vitro* una regione di DNA posta all'interno di sequenze note, viene utilizzata per amplificare due loci STR. A tale scopo è necessario utilizzare oligonucleotidi specifici (primers) complementari alle regioni di DNA fiancheggianti i microsatelliti scelti.



Per ciascun primer si calcola la temperatura di Melting (T_m), ovvero la temperatura a cui il DNA risulta al 50% denaturato (quindi 50% a doppio filamento e 50% a singolo filamento). La formula più semplice per calcolarla è:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Il contributo di G e C è maggiore rispetto a quello delle A e delle T poiché tra G e C si instaurano tre legami ad idrogeno, mentre fra A e T solo due. Le T_m di ciascuna coppia di primer devono essere uguali o comunque non differire di più di 4 °C.

La mix di reazione deve contenere:

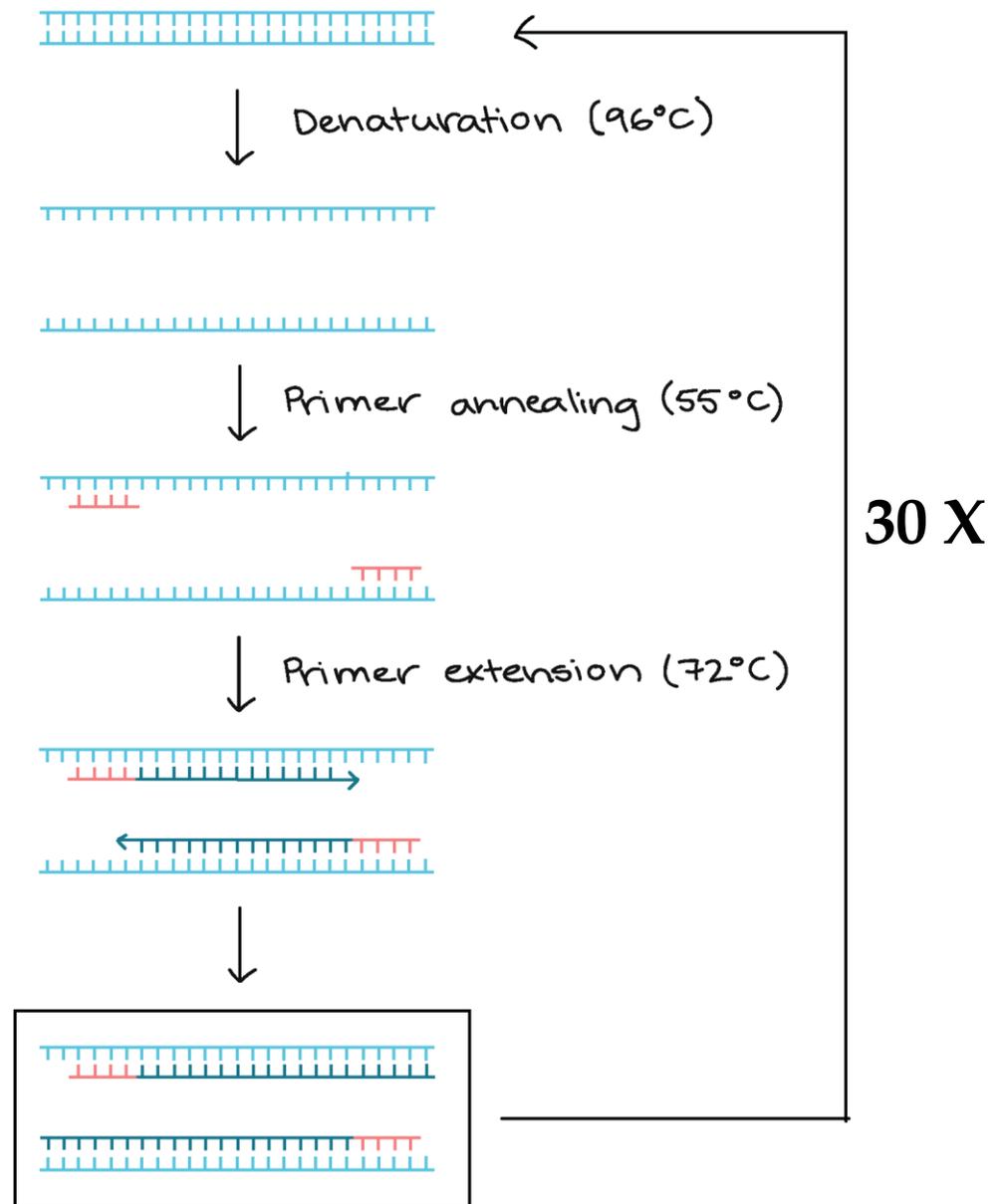
- DNA stampo
- Soluzione tampone contenente $MgCl_2$ (cofattore della Taq polimerasi)
- Primer forward
- Primer reverse
- Deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs)
- Taq polimerasi (DNA polimerasi termostabile, estratta dall'organismo termofilo *Thermus aquaticus*).

La mix di reazione, preparata contemporaneamente per tutti i campioni, viene posta in ciascuna provetta, all'interno delle quali viene aggiunto il DNA stampo. Quindi le provette vengono agitate, centrifugate brevemente ed inserite nel termociclatore, uno strumento che permette di variare rapidamente la temperatura, in modo da far avvenire la reazione di PCR.



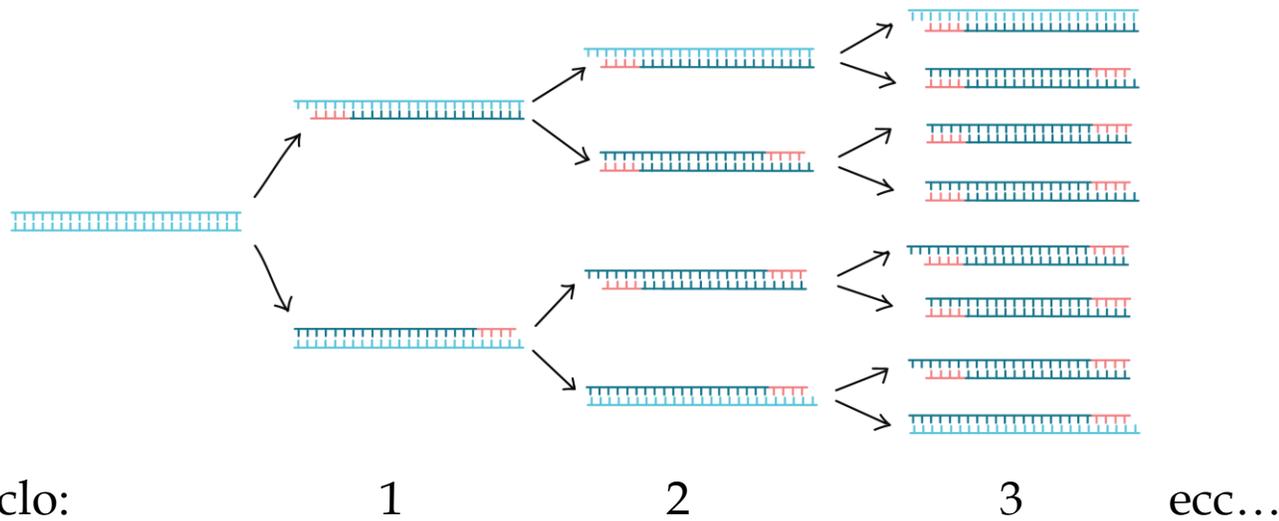
Un esperimento di PCR consiste in una serie di cicli reiterati (compresi tra 30 e 40), ciascuno dei quali è suddiviso in tre stadi.

- ✓ **Denaturazione** del DNA stampo effettuata di solito a 94-95°C: i filamenti di DNA si separano per effetto del calore che rompe i legami ad idrogeno tra le coppie di basi.
- ✓ **Ibridazione (annealing)** dei primers alle estremità 3' di ogni filamento denaturato, effettuata ad una temperatura pari a quella di Melting dei primers o al massimo 2-4 °C più bassa (una temperatura troppo bassa favorirebbe appaiamenti aspecifici, mentre una temperatura troppo alta potrebbe impedire l'appaiamento dei primers alla sequenza bersaglio).
- ✓ **Allungamento** del filamento complementare mediante la Taq polimerasi, ad una temperatura generalmente compresa tra 68-72°C. La Taq polimerasi possiede un'attività polimerasica 5'-3', ma manca dell'attività 3'-5' esonucleasica (proofreading o correttore di bozze), per cui non è in grado di correggere eventuali errori di inserimento dei nucleotidi, commettendo così un errore ogni $10^4 - 10^5$ nucleotidi aggiunti. Alcune DNA polimerasi termostabili, quali la Pfu polimerasi, isolata dall'organismo *Pyrococcus Furiosus*, possiedono l'attività esonucleasica 3'-5' di correzione di bozze, quindi il loro tasso di mutazione è ridotto.



Dopo un ciclo di reazione da una molecola di DNA se ne otterranno 2.

I cicli della reazione sono preceduti da una fase di denaturazione prolungata e seguiti da una fase di estensione prolungata, in modo da consentire una completa polimerizzazione di tutte le molecole.



Resa teorica di una reazione di PCR

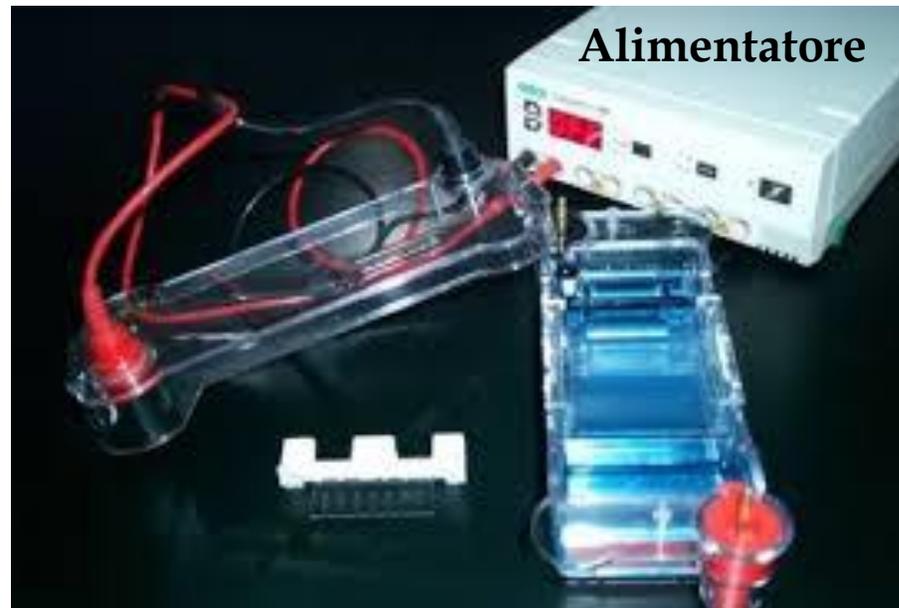
$$Y = N \cdot 2^n$$

Y= numero molecole di DNA amplificato
 N= numero molecole di DNA di partenza
 n= numero dei cicli di PCR

Numero di cicli	Numero di molecole di amplificati
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824

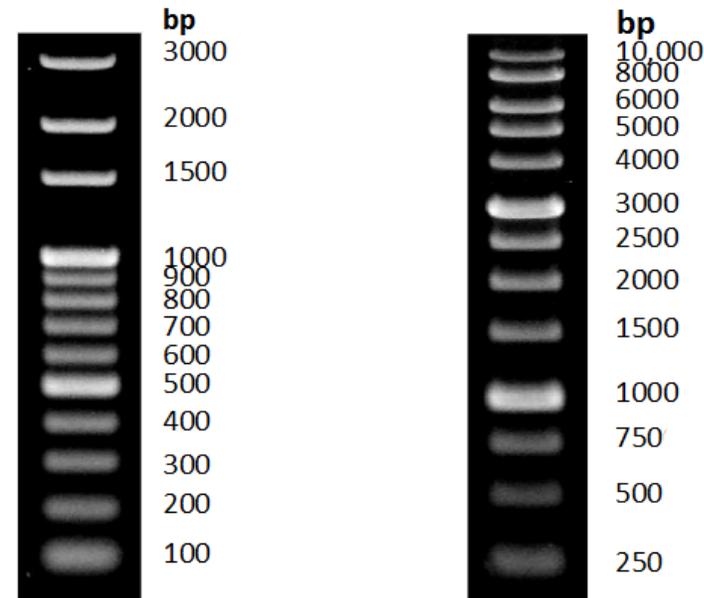
(Virtual Lab consigliato: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>)

Il termine **elettroforesi** descrive la migrazione di molecole cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Molte molecole di interesse biologico, come acidi nucleici e proteine, ad un dato valore di pH presentano una carica netta positiva o negativa, di conseguenza, sotto l'azione di un campo elettrico, migreranno rispettivamente verso il catodo (-) o l'anodo (+), con una velocità direttamente proporzionale alla loro carica e inversamente proporzionale alla loro massa. L'apparecchiatura per l'elettroforesi comprende due componenti principali: una cella elettroforetica, nella quale si pone il gel, ed un alimentatore, che fornisce un flusso di corrente costante agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica.



Cella elettroforetica

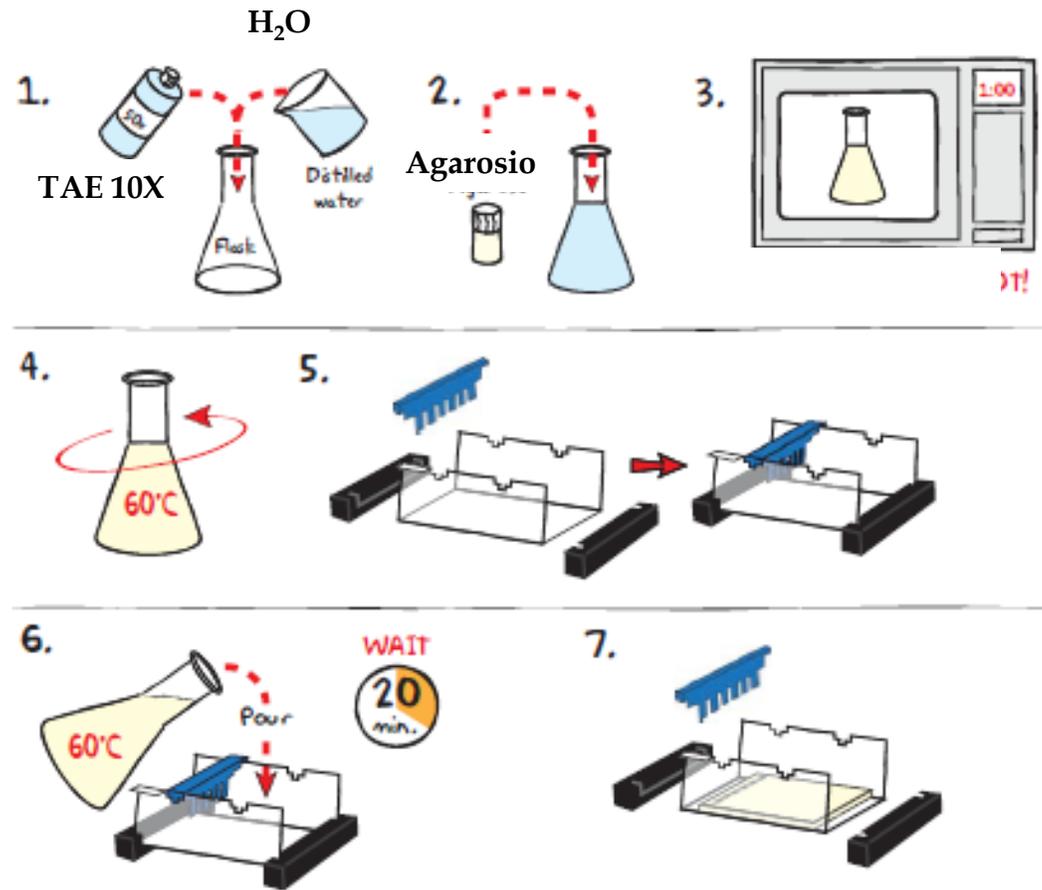
Per separare frammenti di DNA di lunghezza compresa fra 100 bp (bp = "base pair, indica il numero di coppie nucleotidiche complementari) e 10 kb (1 kb = 1000 bp) è l'elettroforesi su gel d'agarosio, un polisaccaride lineare neutro purificato dall'agar-agar delle alghe rosse. Per risalire alla dimensione dei campioni di DNA analizzati si utilizza una miscela di frammenti di DNA a lunghezza nota (markers). Il campione di DNA, prima di essere caricato su gel, viene trattato con una soluzione tampone costituita da un appesantente, come il saccarosio, necessario per aumentare la densità del DNA, e da un colorante che permette di visualizzare la corsa elettroforetica.



2% Agarose Gel

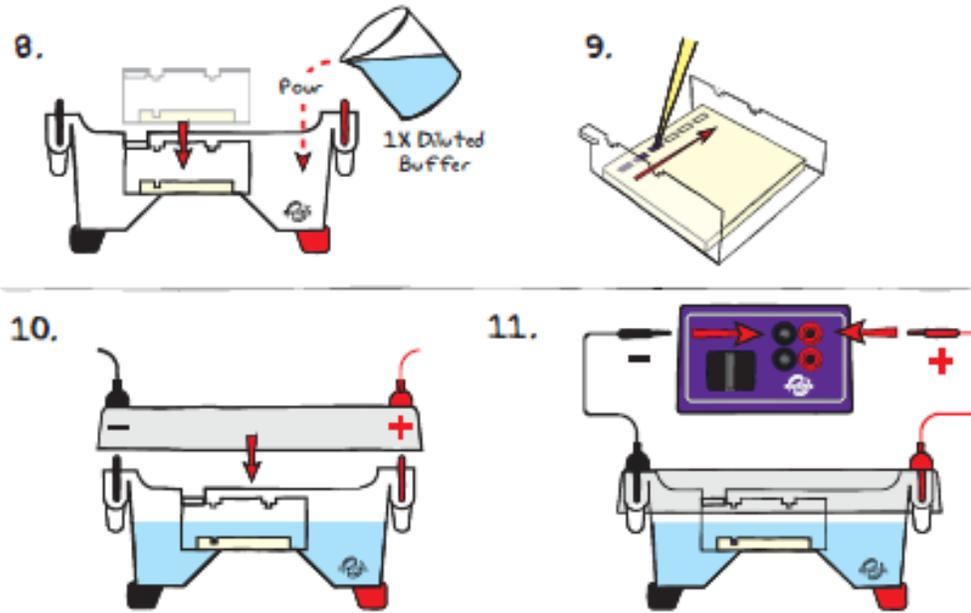
0.8% Agarose Gel

**Esempi di marcatori di
peso molecolare
(markers)**



La preparazione di un gel d'agarosio all'1% consiste nel solubilizzare 1 grammo di agarosio in 100 ml di tampone TAE 1X (Tris 40mM - Acido acetico 0.12% (V/V) - EDTA 1mM, pH 8) su un agitatore magnetico riscaldato o all'interno di un forno a microonde. Solitamente in laboratorio le soluzioni tampone vengono preparate più concentrate, per diluirle solo al momento dell'uso con acqua distillata.

La soluzione ancora calda viene versata in una vaschetta nella quale è inserito un pettine che servirà a creare dei pozzetti utili per caricare il DNA.

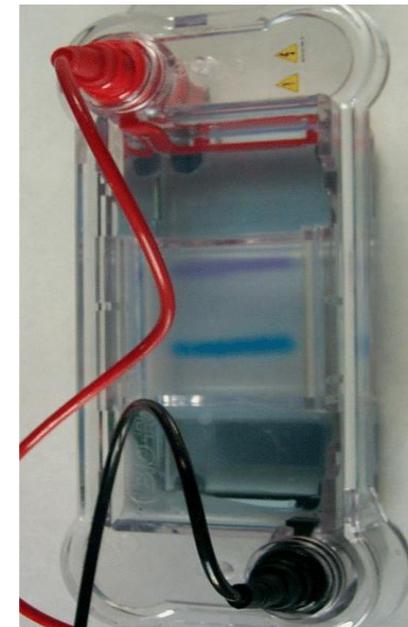


Quando il gel si è solidificato, si estrae il pettine ed il gel viene posto in una vaschetta da elettroforesi, immerso in un tampone di corsa, sempre TAE 1X. Quindi si caricano i campioni e la corsa elettroforetica avviene a voltaggio costante (80/100 Volt)



Caricamento del gel con una multipipetta.

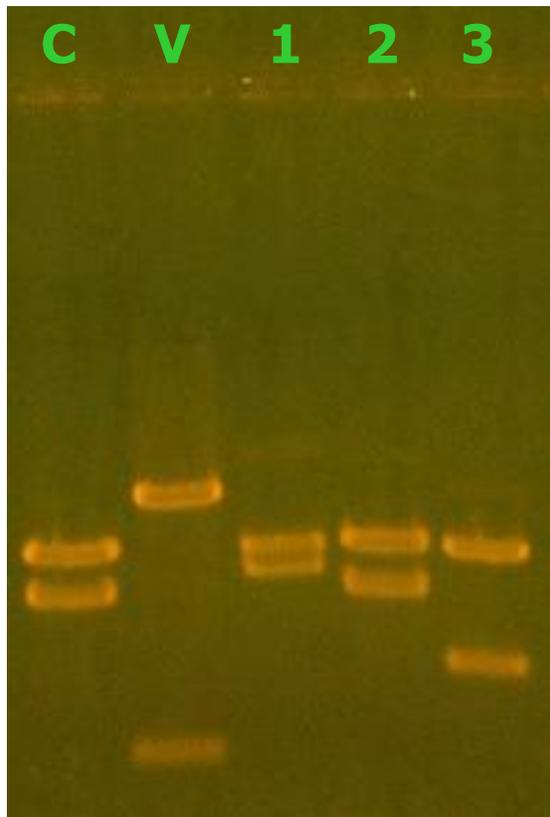
Il colore blue dei campioni è dovuto alla presenza del colorante che consente di seguire la corsa elettroforetica.



Per visualizzare il DNA, il gel viene immerso in una soluzione contenente il colorante SYBERGREEN (che si intercala nella doppia elica del DNA) per 20 min e le bande visualizzate sotto la lampada UV.



Chi è il colpevole ?



C = DNA del colpevole trovato sulla scena del crimine

V = DNA della vittima

1 = DNA del sospettato 1

2 = DNA del sospettato 2

3 = DNA del sospettato 3

Ricapitolando...

