



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**La quantificazione del DNA e il suo ruolo nelle
indagini forensi:
validazione di una metodica in Real-Time PCR per la
stima della quantità e qualità del DNA in reperti
forensi**

Relatore: Chiar.ma

Prof.ssa Chiara Turchi

Tesi di Laurea di:

Roberto Fossi Torri

Correlatore:

Dott.ssa Filomena Melchionda

A.A. 2020/2021

Indice

INTRODUZIONE.....	4
1. Capitolo 1- Analisi del DNA in genetica forense.....	10
1.1. Il DNA nucleare e il DNA mitocondriale: caratteristiche ed analisi in Forense.....	10
1.2. La degradazione del DNA e l'indice di degradazione (DI).....	15
1.3. Metodi di quantificazione del DNA in genetica forense.....	19
2. Capitolo 2- Real Time PCR nella pratica forense	24
2.1. PCR quantitativa in Real Time (qPCR)	24
2.2. Parametri della reazione di qPCR	27
2.3. Validazione del saggio in qPCR.....	30
2.4. Kit di qPCR utilizzati in ambito forense.....	31
3. Capitolo 3- Scopo della tesi	37
4. Capitolo 4- Materiali e Metodi	38
4.1. Estrazione di campioni forensi con metodica automatizzata con Maxwell 16.....	38
4.2. Allestimento qPCR tetraplex.....	39
4.3. Amplificazione mini ampliconi mitocondriali.....	45

5. Capitolo 5- Analisi e Discussione dei risultati.....	51
5.1. Risultati del saggio qPCR tetraplex.....	51
5.2. Risultati dell'amplificazione dei mini-ampliconi mitocondriali.....	56
6. Capitolo 6- Conclusioni.....	62
7. Bibliografia.....	64

INTRODUZIONE

La Genetica forense è una disciplina che si interfaccia tra la genetica, la biologia molecolare e la medicina legale; in altri termini è una branca della genetica che si applica a quesiti di natura legale e giudiziaria, come l'identificazione personale di autori di reati, l'attribuzione individuale di resti umani sconosciuti e la verifica dei rapporti di parentela. L'identificazione personale, in particolare, consiste nell'individuare un profilo genetico unico che possa differenziare un individuo da un altro, tramite l'utilizzo di marcatori. La genetica forense è una disciplina relativamente recente, nasce primi anni '80, e si sviluppò in seguito all'individuazione di geni polimorfici, diversi per ciascun individuo. Il processo di analisi che parte dalla repertazione della traccia fino all'ottenimento di un profilo si svolge attraverso diverse fasi.

Campionamento delle tracce: il campionamento delle tracce sulla scena del crimine o da reperti deve rispettare una serie di regole ben precise. È importante, infatti, pensare a quali analisi fare e a come conservare il campione. In genetica forense si utilizza materiale genetico, principalmente DNA. Il DNA è contenuto in ogni cellula nucleata del corpo umano e in ogni tessuto, si può prelevare anche da oggetti che sono stati toccati (Touch DNA), per i processi fisiologici di esfoliazione e sudorazione. Tuttavia, non sempre la quantità è sufficiente e la traccia può essere mista e/o degradata. Ogni cellula nucleata diploide contiene circa 6 pg di DNA, e per un'analisi genetico-forense ne serve almeno una quantità di 1ng (1000 pg), per cui sono necessarie almeno 150 cellule in buono stato per permettere di eseguire l'identificazione. La raccolta delle tracce deve essere accurata sennò si possono compromettere tutte le analisi successive. È importante stabilire una catena di custodia, cioè sapere chi ha preso la traccia, come è stata conservata, trasportata, ed infine analizzata. Se non viene mantenuta la catena di custodia non è possibile utilizzare la traccia in tribunale. Ci sono inoltre delle accortezze che bisogna tenere durante un sopralluogo, nel momento in cui si raccoglie la traccia da cui si vuole estrarre il DNA: evitare di contaminare l'area con il proprio DNA, utilizzare sempre dei guanti puliti, ogni reperto deve essere

conservato in un contenitore diverso. Inoltre, le tracce di sangue, di sperma e altre tracce umide devono essere asciugate all'aria aperta. Questo perché l'umidità in buste di plastica dove vengono inserite le tracce può accelerare la degradazione del DNA; quindi, per tracce umide, è possibile usare supporti in carta, come le FTA cards, utilizzate per tracce ematiche e saliva. Le tracce rilevate su oggetti non trasportabili, per esempio tracce su arredi o sul pavimento, devono essere prelevate mediante l'uso di appropriati tamponi sterili, che possono essere inumiditi con acqua DNAasi-free per asportare una quantità maggiore. Le tracce crostose, invece, vengono raccolte tramite raschiamento. Durante l'ispezione di un reperto non sempre è possibile visualizzare ad occhio nudo tutte le tracce presenti, ma questo dipende dal colore e tipo di tessuto e dal materiale di cui il reperto è costituito e dalla traccia in sé (ad esempio sangue su tessuto scuro o sperma su tessuto chiaro non sono sempre visibili). Per questo è possibile utilizzare delle luci forensi, si tratta di lampade UV che sfruttano la fisiologica fluorescenza di alcuni liquidi biologici che, se eccitati, riemettono luce nel visibile. Il sangue non ha una propria fluorescenza, per questo è necessario utilizzare sostanze chimiche che possano rendere visibile tale matrice biologica, come ad esempio il luminol, composto alcalino che reagisce con l'emoglobina producendo una emissione blu brillante visibile maggiormente al buio. Quando un reperto proveniente dalla scena del crimine arriva in laboratorio, viene valutata la presenza o meno di materiale biologico e ne viene determinata la natura, ci sono quindi test presuntivi di primo livello, che servono a identificare il liquido biologico in sé, e test di conferma di secondo livello, volti a confermare che tale matrice sia di origine umana.

Estrazione del DNA: l'estrazione del DNA è fondamentale per effettuare indagini molecolari, ma non basta che l'acido nucleico sia nella giusta quantità, bensì è fondamentale che sia di buona qualità: ossia bisogna purificare il materiale genetico dalle sostanze superflue contenute nel campione da analizzare che potrebbero costituire un ostacolo nelle fasi successive. Tra queste si possono annoverare le proteine che legano il DNA, l'RNA, enzimi (DNasi) che potrebbero portare alla frammentazione del materiale genetico rendendolo così inutilizzabile, sali (come lo ione Ca^{2+} , presente in abbondanza nelle ossa, che per questo devono essere innanzitutto decalcificate), residui organici,

detergenti, tinture (come il colorante Denim dei Jeans). L'estrazione può avvenire da qualsiasi cellula nucleata, ma deve essere differenziata a seconda dal tipo di campione in esame. Tutte le estrazioni prevedono la lisi delle membrane, la deproteinizzazione, la separazione e l'isolamento del DNA. Tra le metodiche di estrazione utilizzate in genetica forense abbiamo l'estrazione con fenolo e cloroformio, attualmente di scarso utilizzo poiché, sebbene abbia una buona resa, è una metodica molto laboriosa e prevede l'utilizzo di reagenti potenzialmente tossici. Le tecniche più utilizzate al giorno d'oggi prevedono la separazione cromatografica tramite colonnine con una resina di silice capace di assorbire gli acidi nucleici in presenza di sali caotropici, i quali distruggono i legami idrogeno e denaturano le proteine, oppure l'uso di una resina magnetica, la resina CHELEX™, è una resina a scambio ionico che lega atomi metallici, tra cui lo ione magnesio, che è necessario per l'attivazione di enzimi come le endonucleasi; in questo modo protegge il DNA dalla degradazione. Molto utilizzati in ambito forense sono sistemi automatici di estrazione, poiché, seppur prevedendo gli stessi passaggi di quella manuale, possono essere impostati per eluire il DNA in un volume molto piccolo, di circa 20-30 µl. Questo rappresenta un grosso vantaggio per i campioni molto degradati, in quanto permette di estrarre la massima concentrazione di DNA possibile.

Quantificazione del DNA: la quantificazione del DNA in ambito forense è importante per la buona riuscita dell'amplificazione. Il DNA estratto deve essere sufficiente, di buona qualità ed esclusivamente umano, tralasciando il materiale genetico estraneo proveniente da possibili contaminazioni in relazione a dove la traccia è stata reperita. Ulteriori aspetti ed approfondimenti relativi a questa fase verranno trattati in questo lavoro di tesi.

Amplificazione di marcatori genetici: l'amplificazione viene effettuata in PCR, tecnica descritta per la prima volta da Kary Mullis nel 1985 e che gli permise di ottenere il Nobel per la chimica nel 1993. La PCR è una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi che amplifica sia il filamento forward che il filamento reverse. Tramite questa tecnica si amplificano dei marcatori di interesse (marcatori polimorfici) ed è la più indicata perché presenta numerosi vantaggi: è sufficiente una quantità ridotta di DNA; si possono usare primers corti, che riescono ad amplificare

anche del DNA degradato; si possono rilevare più sequenze target contemporaneamente; i primers sono specifici per il DNA umano. Tuttavia, ci sono anche degli svantaggi: ci possono essere sostanze inibitrici nei campioni; i primers sono disegnati con sequenze di riferimento, ma possono esserci dei polimorfismi nelle sequenze in esame; se c'è più di un DNA umano, la traccia è mista, il profilo ottenuto sarà di conseguenza misto, in quanto tutto il DNA verrà amplificato durante la reazione.

Post PCR: una volta avvenuta l'amplificazione, i vari microsatelliti devono essere rilevati tramite elettroforesi capillare. L'elettroforesi capillare è il sistema per eccellenza per la detection dei microsatelliti (STR). La separazione dei frammenti di DNA avviene all'interno di capillari, attraverso una matrice che separa i frammenti in base alla loro lunghezza e in base al loro peso molecolare. Dal momento che il DNA è sempre negativo, la carica è ininfluente in quanto migreranno sempre verso il polo positivo (anodo). Questa tecnica è effettuata su degli strumenti che hanno diversi capillari, al cui interno, durante la migrazione, avviene la separazione. Il capillare presenta una fenestrazione, attraverso cui un laser eccita i fluorocromi. Il rilevatore traduce poi la fluorescenza emessa in un elettroferogramma, che è un grafico su cui compare una serie di picchi che corrispondono agli alleli presenti nel campione, per i quali abbiamo inserito i primers e i fluorocromi ad essi associati in fase di amplificazione. L'insieme dei picchi fornisce il profilo genetico individuale. I prodotti della PCR, prima di essere caricati nello strumento, devono essere preparati. Si utilizza 1 µl di DNA amplificato addizionato con 10 microlitri di formammide e il size standard. La formammide è un agente denaturante, serve a mantenere il campione a singolo filamento, mentre il size standard fornisce uno parametro di misura per l'ampiezza dei picchi. Il software che assegna la taglia al nostro frammento usa un algoritmo che si basa sul confronto dei tempi della migrazione del frammento con i picchi a taglia nota del size standard. In ogni reazione, inoltre, deve essere presente anche un allelic ladder. Il ladder allelico è una libreria di tutti i più comuni alleli che ritroviamo nella popolazione per il locus in esame. Serve per dare un confronto tra l'allele ottenuto e quelli presenti nella popolazione.

In questo lavoro di tesi verrà approfondita la fase della quantizzazione del DNA. La quantizzazione del DNA in genetica forense ha un ruolo fondamentale, dal momento che i campioni rinvenuti sulla scena del crimine non si presentano sempre in condizioni ideali, ma possono essere altamente degradati e sottoposti a contaminazione con DNA estraneo, come batterico, fungino, animale o vegetale. Inoltre, varie matrici biologiche possono rappresentare la fonte da cui viene estratto tale DNA: sangue, urina, sperma, saliva, capelli, unghie, frammenti ossei e resti umani. Solo dopo che il DNA è stato isolato tramite tecniche di estrazione, si procede alla quantificazione, il cui scopo primario è quello di determinare l'appropriata quantità di template da includere nelle successive analisi mediante tecnica PCR. Un eccesso di DNA stampo, infatti, può portare alla produzione di prodotti di amplificazione troppo elevati, che potrebbero compromettere la corretta interpretazione in elettroforesi capillare, mentre una ridotta quantità di template può invece condurre all'insuccesso dell'amplificazione, poiché la polimerasi non riesce ad agire correttamente per effetti stocastici e all'ottenimento di profili incompleti [1].

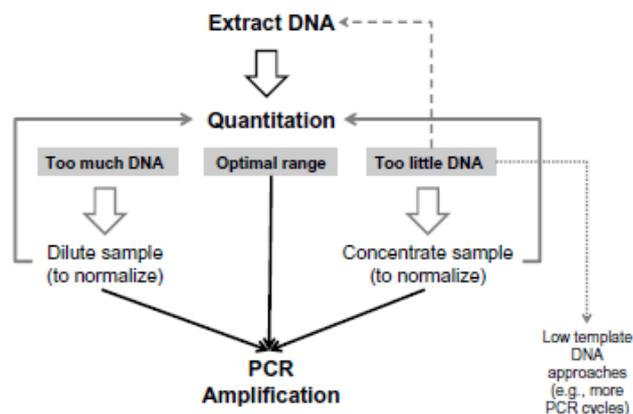


Figura 1 Processo della quantificazione del DNA in genetica forense dopo l'estrazione (Butler, 2010)

Un eccesso di DNA può essere correlato alla comparsa, in seguito ad analisi in elettroforesi capillare, di picchi troppo larghi e troppo alti (*off-scale peaks*) o frastagliati (*split peaks*). In questo caso, è necessario raggiungere un range ottimale di concentrazione tramite diluizione dell'estratto. Partendo da un DNA scarso, invece, si otterranno picchi

tendenzialmente piccoli, bassi o si può assistere alla perdita di uno dei due alleli (*allele dropout*): questa è una situazione grave, perché il profilo delinea un'omozigosi quando in realtà l'individuo potrebbe essere eterozigote. Una delle possibilità per ovviare a questo problema è la concentrazione del DNA estratto, che tuttavia, seppure possibile, è sconsigliata, poiché può determinare allo stesso tempo un aumento della concentrazione di agenti contaminanti indesiderati presenti nel campione. Quindi l'opzione migliore è, se possibile, riestrarre il campione, modificando alcuni parametri della metodica. Un'altra alternativa è quella di modificare i parametri della PCR, come aumentare il numero dei cicli o aumentare la detection dell'elettroforesi capillare, ipotesi, quest'ultima, tuttavia controversa. L'insieme di questi processi volti a raggiungere una concentrazione di DNA che sia in un range ottimale per le analisi successive è denominato *normalizzazione* [2].

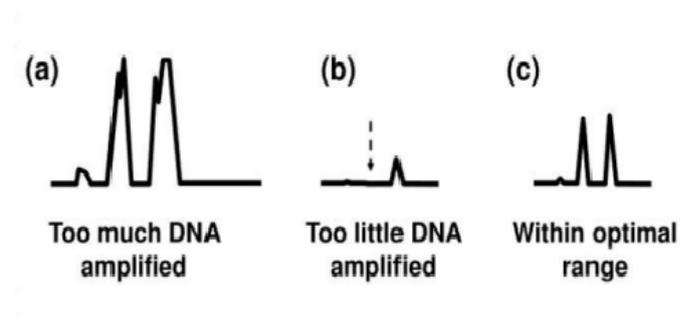


Figura 2_ esiti di elettroforesi capillare in base alla quantità di DNA nel campione (Butler,2010)

La determinazione della giusta quantità di DNA è stabilita in base alla metodica e ai kit in commercio, tipicamente si tratta di 0.5 ng-2.0 ng di DNA umano per la maggior parte dei kit di ricerca di STRs (short tandem repeats) comunemente utilizzati nei laboratori di genetica forense.

Capitolo 1

1.1 Il DNA nucleare e il DNA mitocondriale: caratteristiche ed analisi in ambito forense

Il DNA, o acido desossiribonucleico, è una macromolecola costituita da subunità, i nucleotidi, ciascuno dei quali è costituito a loro volta da uno zucchero a cinque atomi di carbonio, il desossiribosio, a cui sono legati una base azotata e un gruppo fosfato. La struttura del DNA è a doppia elica: i filamenti di pentoso e fosfato si alternano in maniera regolare, mentre nell'asse centrale dell'elica si legano le basi azotate tramite legami idrogeno. I legami avvengono tra una base purinica, adenina o guanina, e una base pirimidinica, timina o citosina. I legami sono specifici tra adenina e timina e guanina e citosina; questo assume rilevanza anche in ambito analitico, in quanto il legame tra guanina e citosina è un triplo legame idrogeno, con una forza di legame maggiore rispetto al doppio legame idrogeno tra adenina e timina. L'alternarsi di queste basi è il fondamento della variabilità interindividuale: sebbene la stragrande maggioranza di individui della stessa specie condividano più del 99% dell'intero genoma, tramite il sequenziamento del genoma, sono state scoperte delle differenze, con circa 88 milioni di varianti. Questo è alla base del diverso fenotipo tra due individui diversi, con una forbice di variabilità tra lo 0,1-0,6% dell'intero genoma. Il DNA nucleare è contenuto all'interno di tutte le cellule nucleate dell'organismo, solitamente in strutture condensate chiamate cromosomi. Il genoma è infatti costituito da un corredo diploide di circa 3,2 miliardi di paia di basi, organizzato in 46 cromosomi, di cui 22 autosomi in doppia copia e due cromosomi sessuali, diversi tra maschio (XY) e femmina (XX). Il cromosoma rappresenta il massimo stadio di condensazione del DNA, altrimenti sarebbe lungo più di due metri per ciascuna cellula. Il DNA despiralizzato è presente solo in alcune zone del nucleo o in alcuni tempi funzionali della cellula, e solo in questa forma può essere trascritto in RNA ed è geneticamente attivo. Nella Figura 3, si può osservare un cariotipo, che è la sistemazione ordinata di tutti i

cromosomi, dove ciascun cromosoma viene appaiato al suo omologo.

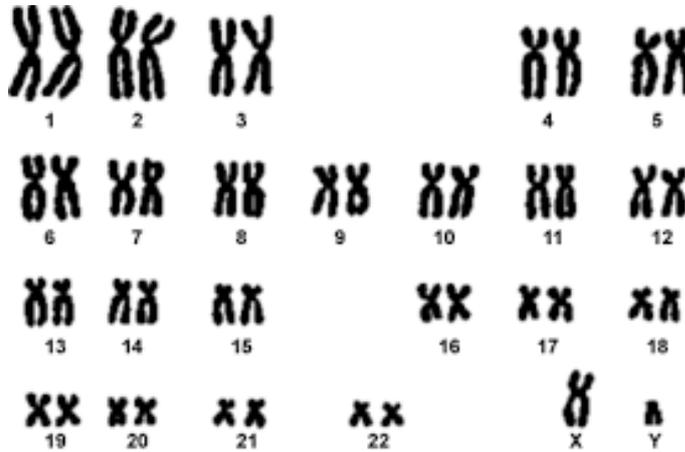


Figura 3 Cariotipo umano di individuo di sesso maschile (<https://www.diagnosiprenatale.com/diagnosi-prenatale/cariotipo-tradizionale-anomalie-cromosomiche.aspx>)

Non tutto il DNA è rappresentato da geni che codificano per proteine, infatti la cromatina, ossia l'insieme di DNA condensato con proteine istoniche, si suddivide in eucromatina, geneticamente attiva e che si despiralizza durante l'interfase cellulare, e l'eterocromatina, porzione che non codifica per nessuna proteina e rimane condensata per tutta la durata del ciclo cellulare. Se è vero che i geni determinano le caratteristiche fenotipiche, è però altresì necessario specificare che l'insieme delle caratteristiche complesse che determinano poi le differenze tra individui è legato a meccanismi di regolazione, di interazione con altri geni, così come da influenze ambientali.

Nella pratica forense, assume particolare rilievo la ricerca di microsatelliti, o STR, che compongono circa il 3% del genoma e sono costituiti da piccole sequenze di 1-6 paia di basi, ripetute decine o centinaia di volte [3]. La ragione per la quale questi marcatori sono ideali per le principali analisi di genetica forense, come l'identificazione individuale ed i test di paternità, sono molteplici: gli STR in elevato numero nel genoma, sono multiallelici e hanno un elevato polimorfismo; quindi, hanno un grande potere informativo e discriminativo nell'identificazione personale. Inoltre, si possono ricercare amplificando frammenti di piccola taglia (intorno a 400bp) dunque possono essere utilizzati anche per DNA degradato.

I microsatelliti possono essere utilizzati per avere un profilo da pochissimo DNA (1 ng) ed in reazioni di PCR multiplex. I microsatelliti più utilizzati in ambito forense sono gli STR tetranucleotidici (formati da quattro nucleotidi ripetuti n volte) poiché si è osservato come siano quelli con la resa migliore, soprattutto in caso di DNA degradato, dal momento che, utilizzandoli, si riduce la possibilità di eventi di *dropout*, ossia la perdita di un allele nell'elettroferogramma. Inoltre, viene ridotta la formazione di stutter, prodotti di PCR aspecifici causati da uno slittamento della polimerasi che toglie, o più raramente aggiunge, un'unità ripetitiva. Per consentire lo scambio dei profili genetici tra laboratori anche in diverse parti del mondo, la comunità scientifica ha scelto dei microsatelliti principali da usare nell'analisi forense, per far sì che un profilo genetico eseguito in Italia deve poter essere eseguito con gli stessi marcatori anche negli USA, in Francia o Australia e per favorire, se necessario, uno scambio di informazioni su quel profilo per un confronto attendibile. Già dagli anni '90 negli USA si è iniziato a creare il CODIS (è un database dell'FBI, "Combined DNA Index System") all'inizio includeva 13 sistemi, ma ad oggi sono stati ampliati a più di 20 [4].

Sl. no.	STR locus	Chromosome position	Nucleotide repeats	Sl. no.	STR locus	Chromosome position	Nucleotide repeats
1	D1S1656	1q42	Tetra	11	D10S1248	10q26.3	Tetra
2	TPOX	2p25.3	Tetra	12	TH01	11p15.5	Tetra
3	D2S441	2p14	Tetra	13	vWA	12p13.31	Tetra
4	D2S1338	2q35	Tetra	14	D12S391	12p13.2	Tetra
5	D3S1358	3p21.31	Tetra	15	D13S317	13q31.1	Tetra
6	FGA	4q31.3	Tetra	16	D16S539	16q24.1	Tetra
7	D5S818	5q23.2	Tetra	17	D18S51	18q21.33	Tetra
8	CSF1PO	5q33.1	Tetra	18	D19S433	19q12	Tetra
9	D7S820	7q21.11	Tetra	19	D21S11	21q21.1	Tetra
10	D8S1179	8q24.13	Tetra	20	D22S1045	22q12.3	Tri

Tabella 1_ELENCO DEGLI STR INCLUSI NELL'ULTIMA VERSIONE DEL CODIS (H.R. DASH ET AL, SPRINGER SINGAPORE 2018)

Analogamente, in Europa si è istituito l'ESS (European Standard Set), che ha molti loci in comune con il CODIS [5]. Oggi ci sono dei sistemi validati, dei kit che includono i primer per i

microsatelliti, il ladder e il size standard. Ci sono moltissimi kit che posso essere utilizzati in genetica forense, tra questi c'è il PowerPlex® Fusion 6C. Questo kit viene utilizzato sia per la formulazione di profili individuali che nei test di parentela, in quanto permette la ricerca di ben 27 loci, di cui 18 sono localizzati negli autosomi umani (CSF1PO, FGA, TH01, vWA, D1S1656, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433 e D21S11), gli altri invece sono il gene dell'amelogenina e il DYS391, che permettono la determinazione del sesso. L'amelogenina, in particolare, non è un STR, ma un gene che è espresso in modo diverso in maschi e femmine. Permette di discriminare il sesso, poiché nel cromosoma X questo gene ha una delezione di 6 paia di basi, non presente nel cromosoma Y. Nel Fusion 6C sono inclusi inoltre anche il Penta D, Penta E, D22S1045, TPOX, SE33 e due loci altamente polimorfici del cromosoma Y, DYS570 and DYS576. Questo esteso pannello di microsatelliti è pensato per soddisfare sia il sistema CODIS che l'ESS, in modo da poter essere utilizzato in tutto il mondo [6].

Un altro kit utilizzato frequentemente in genetica forense è il PowerPlex® ESX 17 Fast. Questo kit ha il vantaggio di essere molto utile con campioni in cui il DNA è molto degradato. Infatti, è dotato di un pannello di 17 marcatori, tra cui ci sono dei mini-STR, i quali hanno un'ampiezza inferiore alle 125 paia di basi (D2S441, D10S1248 e D22S1045) e che verranno amplificati anche quando il DNA è molto degradato. Inoltre, presenta anche dei midi-STR, che hanno un'ampiezza contenuta tra 125 e 185 paia di basi (D1S1656 e D12S391). Grazie a questi sistemi, viene massimizzata la possibilità di ricavare informazioni alleliche su campioni molto degradati e si possono confrontare i risultati con quelli ottenuti tramite altri kit [7].

Il DNA mitocondriale (mtDNA) rappresenta una piccola porzione di genoma di 15659 paia di basi, con forma circolare, ereditato per via esclusivamente materna poiché l'oocita ha molti mitocondri, mentre lo spermatozoo ha solo il mitocondrio alla base del flagello, necessario per il movimento. Al momento della fecondazione solo la testa dello spermatozoo è diversamente da quella del DNA nucleare ed è presente in più copie all'interno dei mitocondri cellulari spermatozoo entra nella cellula uovo, il flagello viene perso. La sua struttura, fino a

1000-10000 copie. Nelle cellule umane, l' mtDNA codifica per 37 geni, tra cui 13 proteine, 2 RNA ribosomiali e 22 tRNA [8]. Il doppio filamento circolare è costituito da due catene di diverso peso molecolare, un filamento "pesante" (filamento H, dall'inglese "heavy"), ricco in ed un filamento "leggero" (filamento L, dall'inglese "light"). Il differente peso molecolare è legato al fatto che il filamento H ha una maggiore componente di guanine, mentre nel filamento L è prevalente la componente di citosine.

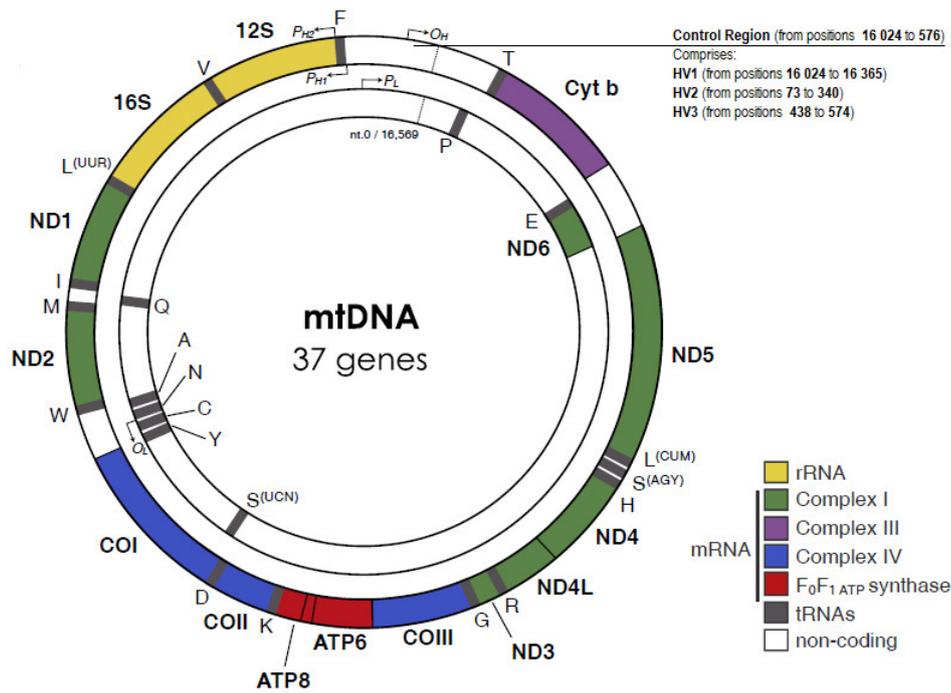


Figura 4. Dna mitocondriale umano (<https://peerj.com/articles/7314/>)

Il materiale genetico del mtDNA è quasi completamente codificante, per una percentuale del 93-95%, mentre la zona più polimorfica è denominata "regione di controllo". La regione di controllo è una zona di circa 1200 basi, molto grande, ed è l'unica non è codificante. In questa zona distinguiamo tre porzioni, chiamate *ipervariabili*: HV1, HV2, HV3. Le regioni ipervariabili 1 e 2 sono quelle ad oggi più conosciute e studiate a fini forensi, poiché contengono più del 90% dei polimorfismi del mtDNA. Il motivo per cui l'utilizzo del DNA mitocondriale in genetica forense è utile ed efficace risiede nel fatto che è presente in un

numero di copie molto elevato e, dal momento che si tratta di una molecola circolare, è protetto dalla degradazione enzimatica rispetto al DNA nucleare, essendo meno suscettibile all'attività delle nucleasi, ci sono meno possibilità che venga degradato. Per questo, risulta ideale per reperti forensi come: resti ossei, denti, capelli e fusti di capelli. Il fusto di capello contiene solo cellule cheratinizzate, senza nucleo, da cui si può estrarre solo il mtDNA, mentre il nucleare si trova solo nel bulbo. Tuttavia, il ciclo vitale del capello è importante nel determinare la possibilità di rinvenire del DNA nucleare anche a livello del bulbo pilifero: si distinguono infatti tre fasi vitali: fase di crescita (Anagen), fase di regressione (Catagen) e fase di caduta (Telogen). Mano a mano che il capello va incontro alla fase Telogen, si troverà sempre meno DNA nucleare all'interno del bulbo, poiché le cellule saranno maggiormente differenziate e cheratinizzate [9]. Il limite maggiore nell'utilizzo del mtDNA in ambito forense è che non può essere utilizzato per l'identificazione personale: dal momento che viene ereditato solamente da linea materna, individui della stessa linea materna erediteranno lo stesso DNA mitocondriale. Tuttavia, presenta vari ambiti in cui può essere un prezioso ausilio, come per l'esclusione di identità; se infatti un profilo di DNA mitocondriale non corrisponde a quello di un sospettato o un parente di stessa linea materna, si può escludere che la il contribuente della traccia sia la stessa persona sospettata. Un'altra applicazione del mtDNA è quella del test di maternità, nei casi di identificazione di persone scomparse o disastri di massa (confronto di resti umani). Numerosi sono i lavori in tal senso, anche di grande eco mediatico, come l'attribuzione di resti umani alla famiglia Romanov, su reperti rinvenuti in Russia nel 1991 [10].

1.2 La degradazione del DNA e l'indice di degradazione (DI)

Sebbene la molecola di DNA sia dotata di una certa stabilità chimicofisica, ci sono molti processi che intervengono nella sua degradazione. Il DNA estratto da campioni forensi è, inoltre, proveniente da individui deceduti, in cui i processi riparativi fisiologici non avvengono più, o da tracce biologiche, in cui le cellule vanno incontro a morte una volta la traccia viene depositata. Tra i fattori che inducono una degradazione della molecola di DNA

ci sono meccanismi enzimatici, che includono le nucleasi intracellulari e l'azione di microrganismi che si diffondono nei tessuti in putrefazione [11], e meccanismi chimici e fisici, come frammentazione, reazioni di idrolisi, ossidazione, alchilazione, e fenomeni di *crosslinking* [12].

I meccanismi enzimatici, sia endogeni che esogeni (soprattutto batterici e fungini), sono legati all'attività di enzimi specifici chiamati nucleasi. Tra questi, particolare rilievo hanno le endonucleasi, proteine che vengono prodotte come risultato del processo di apoptosi e di altri processi, come la necrosi, riguardanti la morte cellulare [13]. La più abbondante è sicuramente la DNasi I. La DNasi I è una nucleasi che scinde il DNA preferenzialmente in corrispondenza di legami fosfodiesterici adiacenti a un nucleotide pirimidinico, producendo polinucleotidi con terminazione 5'-fosfato con un gruppo ossidrilico libero in posizione 3'. Agisce sul DNA a singolo filamento, sul DNA a doppio filamento e sulla cromatina [14]. Altri enzimi partecipano al processo degradativo, come le caspasi. Le caspasi, strettamente associate all'apoptosi, sono una famiglia di enzimi chiamati proteasi. La loro azione si svolge a cascata, con una serie di attivazioni biomolecolari che portano la cellula alla morte. Ciò avviene anche in vivo, infatti giocano un importante ruolo nel controllo del volume cellulare dell'organismo [15].

I meccanismi chimici e fisici, invece, riguardano la degradazione meccanica del DNA tramite l'azione di particolari meccanismi molecolari che intervengono nella rottura della struttura elicoidale dell'acido nucleico. La frammentazione del DNA è strettamente legata all'idrolisi dei legami N-glicosidici tra le purine e il desossiribosio, fenomeno conosciuto come depurinazione [11]. Questa reazione comporta la formazione di un gruppo definito "abasi", ossia un sito dove un gruppo ossidrilico sostituisce la purina eliminata. Questa reazione è influenzata sia dalla temperatura che dal pH. L'idrolisi della purina contribuisce all'instabilità della struttura, infatti, il sito abasi viene ulteriormente scisso con conseguente degradazione del filamento. Un'altra conseguenza dell'idrolisi sulle basi del DNA è la deaminazione delle basi, che ne comporta la conversione, ad esempio, della citosina in uracile. Un ulteriore processo di degradazione del DNA è l'ossidazione, che è legata alla comparsa di ROS, le forme reattive dell'ossigeno o radicali liberi. Questi

fenomeni ossidativi riguardano sia le basi puriniche che quelle pirimidiniche, seppure con una maggiore frequenza sulla guanina, con formazione di forme aberranti come la 8-ossiguanina [16]. L'alterazione di basi azotate compromette la struttura del DNA e ne favorisce la degradazione. La formazione dei ROS è legata sia a meccanismi chimici, ma anche fisici, come l'esposizione del DNA a radiazioni ultraviolette (come gli UV solari). Le radiazioni, infatti, sono in grado di ionizzare le molecole d'acqua, producendo radicali liberi. Un altro effetto legato alle radiazioni UV è la comparsa di fenomeni di *crosslinking* molecolari: in seguito alla rottura del filamento di DNA, si formano legami covalenti tra le basi del frammento e quelle di altri filamenti complementari presenti lungo la doppia elica. L'alchilazione, invece, è in grado di agire a livello della catena del DNA provocando appaiamenti errati e rotture all'interno dei filamenti. Questa reazione consiste nell'aggiunta di un gruppo alchilico alle basi azotate, alterando la struttura del DNA stesso, con effetti citotossici.

Anche il DNA mitocondriale è soggetto al fenomeno della degradazione, sebbene, per la conformazione peculiare e il fatto di essere in numero di copie maggiore nel genoma, risulti più resistente ad alcuni meccanismi degenerativi, come l'azione delle nucleasi. Il DNA mitocondriale è però particolarmente suscettibile all'azione dello stress ossidativo, in quanto è privo di istoni nella sua struttura e di meccanismi riparativi [11]. Nella maggior parte delle cellule il mtDNA viene eliminato insieme ai mitocondri grazie al processo della mitofagia, un evento cellulare selettivo che avviene nel momento in cui si genera un danno, come per l'appunto ad opera dei ROS. Tuttavia, ai fini forensi, il DNA mitocondriale sembra più conservato nei reperti più antichi, come ad esempio in resti archeologici, ed in quantità notevolmente superiore rispetto a quello nucleare; la maggior parte delle analisi genetiche sui resti ossei umani antichi si sono basate sulla caratterizzazione della regione ipervariabile 1 (HV1) del genoma mitocondriale [17].

La qualità del DNA estratto durante le analisi in genetica forense è un parametro importantissimo, e quindi molti kit, tra cui il Quantifiler Trio DNA Quantification Kit [18], permettono la determinazione dell'indice di degradazione (o *degradation index*, DI). L'indice di degradazione è un parametro che viene valutato secondo la seguente

$$DI = \frac{1/ \text{Concentration of Small DNA Target}}{\text{Concentration of Large DNA Target}}$$

equazione:

Il risultato ottenuto tramite l'applicazione di questo indice può essere così riassunto:

- Se il DI è <1 , tipicamente il DNA non è degradato in quanto il rapporto tra le sonde corte e le sonde lunghe non evidenzia uno sbilanciamento.
- Se il DI è compreso tra 1 e 10, può indicare che il DNA è leggermente o moderatamente degradato.
- Se il $DI > 10$, il DNA appare molto degradato e devono essere messe in atto delle azioni per poter ricavare un profilo interpretabile.

Conoscere sia la concentrazione che il livello di degradazione del DNA in esame è fondamentale per indirizzare le analisi successive. Infatti, se il DNA è molto degradato, quando si procede all'elettroforesi capillare per ricavare un profilo individuale, si può assistere alla formazione di picchi difficilmente interpretabili, con un pattern chiamato "ski-slope pattern" [18].

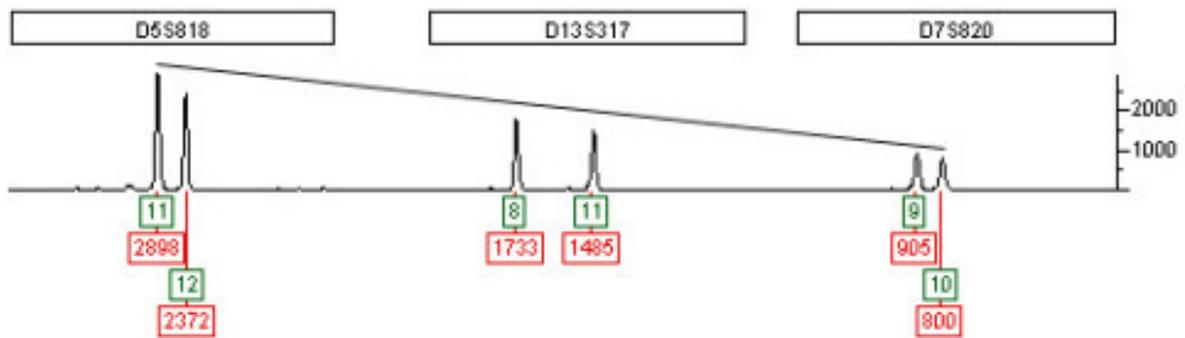


Figura 5_ elettroferogramma di campione di dna degradato, con pattern "ski-slope " (<http://www.bioforensics.com/dna-testing-issues/>)

Il pattern risulta evidente nella figura 5, in cui i frammenti di minore dimensione riescono ad essere amplificati bene, mentre i frammenti maggiori sono danneggiati e non si amplificano. Quindi, con un DNA più degradato, si cerca di amplificare le regioni polimorfiche con ampiezza minore, in modo da avere almeno alcuni loci su cui poter lavorare, oppure, se il DNA è troppo degradato per poter ricercare STR, possono essere

utilizzate tecniche di sequenziamento come l'Ion Torrent PGM sequencing [18].

1.3 Metodi di quantificazione del DNA in genetica forense

Le tecniche per l'identificazione individuale in ambito forense hanno avuto una forte evoluzione nel corso degli ultimi 20 anni. Queste metodiche sono iniziate con l'analisi di polimorfismi da lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) di VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*, numero variabile di ripetizioni in tandem) e si sono evolute fino agli attuali metodi basati sulla PCR (reazione a catena della polimerasi) di STR (*Short Tandem Repeats*). Con l'evoluzione delle tecniche di identificazione, si evidenziò la necessità di tecniche analitiche quantitative che potessero identificare solo il DNA umano, tralasciando eventuale altro materiale genetico che non fosse pertinente all'identificazione individuale in esame: inizialmente, queste metodiche si basavano sulla valutazione di tutto il materiale genetico presente; successivamente, si sono sviluppate tecniche di ibridazione del DNA con sonde più specifiche, e, con l'avvento della PCR e della real-time PCR, sono comparsi saggi che hanno permesso l'utilizzo di primers altamente specifici solo per il DNA umano [19]. Questi test di quantificazione del DNA includono la spettrofotometria di assorbimento in UV, separazione elettroforetica su gel d'agarosio, slot blot, PicoGreen, AluQuant™, infine, qPCR in Real Time.

I primi approcci alla quantificazione in genetica forense consistevano nella separazione di frammenti di DNA su gel d'agarosio, marcati con agenti intercalanti, come etidio bromuro, e poi analizzati grazie ad un transilluminatore. Il supporto su cui viene eseguita la corsa elettroforetica è una vasca o cella, disposta orizzontalmente, ai cui poli sono presenti due elettrodi. Una volta connesso un generatore di corrente, tra i due poli si creerà una differenza di potenziale tra anodo e catodo. Il gel utilizzato è di agarosio ad una concentrazione che varia dallo 0,8% al 2%. Può essere pronto all'uso oppure necessitare di un tampone salino, come il TBE, costituito da Tris, acido borico e EDTA. La corsa elettroforetica dura circa 20-30 minuti ad un voltaggio di 100V. Il DNA migrerà verso il polo positivo, separandosi, e, una volta sospesa la corsa, potrà essere rilevato grazie ad un transilluminatore, una lampada UV che può essere collegata ad un computer per l'analisi

dei dati. Il DNA non emette una fluorescenza naturale, ma deve essere colorato con sostanze intercalanti; se inizialmente veniva utilizzato l'etidio bromuro, che tuttavia presenta un rischio per la salute dell'operatore, nel corso degli anni sono stati sviluppati coloranti molto più sicuri, come SYBR Green, Gel Red, Sali di argento. Questa tecnica può essere anche automatizzata, infatti sono oggi presenti sul mercato anche macchinari automatici, come il sistema TapeStation dell'azienda Agilent. Questo macchinario è dotato di cards che mimano il gel stesso; grazie alle ridotte dimensioni, riescono ad effettuare una corsa con 1 μ l di campione in 1-2 minuti. È possibile, inoltre, caricare fino a 16 campioni contemporaneamente [20]. L'elettroforesi su gel ha una sensibilità relativamente bassa, tuttavia ancora oggi viene utilizzata perché è molto economica rispetto alle tecniche odierne, è veloce, in quanto una corsa dura pochi minuti e, qualora la quantità di DNA sia apprezzabile, può anche fornire informazioni sulla degradazione del DNA: infatti, un campione degradato apparirà con uno *smear*, ossia strisciato, sul gel [21].

Un ulteriore sistema di analisi degli acidi nucleici è la spettrofotometria. Questo perché il DNA ha uno spettro di assorbimento noto, alla lunghezza d'onda di 260 nm. Questa metodica, tuttavia, presenta alcune criticità, dovute alla bassa sensibilità e al fatto che non sia specifica per il DNA umano, nonché alla necessità di una quantità non trascurabile di campione da consumare per poter permetterne l'analisi, problematica che ha notevole rilevanza in ambito forense, poiché i campioni sono molto spesso esigui e il risparmio della quantità necessaria per poter permettere l'analisi del profilo individuale è diventato negli anni uno dei punti chiave nella ricerca dello sviluppo di metodiche e kit innovativi. La ragione della bassa sensibilità risiede nel fatto che non si può distinguere tra DNA a singolo filamento (ssDNA) e DNA a doppio filamento (dsDNA). Nel DNA a doppio filamento, tuttavia, l'assorbimento della luce UV a 260nm è minore rispetto al risultato atteso per il fenomeno dello stacking delle basi azotate. Questo meccanismo comporta che le basi risultino "impilate" (da cui l'inglese *stacking*) come se fossero accoppiate tra loro, e ciò riduce l'assorbimento dei raggi UV, tanto che nel DNA a singolo filamento risulta aumentato del 20-30% [19]. Inoltre, è richiesta anche un'ulteriore analisi spettrofotometrica per verificare la purezza dell'estratto tramite l'indice di densità ottica

tra l'assorbimento a 260 e 280 nm. Campioni con indice 260/280 nm tra 1.8 e 2.0 sono considerati puri e relativamente liberi da contaminanti.

Per superare questi problemi, successivamente vennero adottate delle tecniche che potessero essere più specifiche e sensibili, tra le quali figura lo Slot Blot. L'analisi Slot Blot è una tecnica che utilizza una sonda specifica per l'uomo (ma anche per altri primati) di circa 40 bp che lega una regione all'interno del cromosoma 17 chiamata D17Z1. Questa metodica è molto più specifica della spettrofotometria in UV, grazie all'utilizzo della sonda, nonché molto più sensibile: può arrivare a rilevare meno di 150 pg di DNA umano [22]. Seppure inizialmente fu sviluppata con sonde radioattive, negli anni è stata commercializzata con metodi di rilevazione in chemiluminescenza o colorimetrici. Il principio della metodica è costituito dall'ibridazione della sonda composta da un oligonucleotide biotinilato con un campione di DNA immobilizzato su una membrana di nylon. La sequenza D171 è presente in un gran numero di copie per ciascun cromosoma 17 (circa 500- 1000 copie) e può essere rilevata in chemiluminescenza aggiungendo una perossidasi (*horseradish peroxidase*) come substrato, che lega il complesso streptavidina-biotina già presente sulla sonda ibridata al DNA in esame, e un reagente chemiluminescente a base di luminolo. L'ossidazione del luminolo da parte della perossidasi comporta un'emissione di fotoni. L'intensità di emissione registrata è quindi proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione. Come nella maggior parte delle tecniche di quantificazione, anche nello slot blot è necessario utilizzare degli standard a concentrazione nota per poter misurare il segnale dei campioni. Questi standard vengono preparati tramite una serie di diluizioni da un DNA di partenza. Per ottenere risultati validi da questa tecnica è opportuno utilizzare strumenti di analisi informatici, che eliminano la componente di errore umano dovuta all'osservazione soggettiva dell'operatore.

Con il passare degli anni e degli avanzamenti tecnologici in campo analitico, iniziarono a comparire delle procedure più automatizzate che potessero garantire una quantificazione più rapida e meno laboriosa rispetto alle metodiche precedenti. Su questa base, a metà degli anni '90, si sviluppò il saggio PicoGreen, capace di rilevare concentrazioni di DNA fino a 25 pg/ml [23]. Il saggio PicoGreen prevede l'utilizzo di un colorante intercalante

fluorescente utilizzabile soprattutto per il dsDNA, in quanto la fluorescenza è aumentata di circa mille volte rispetto al DNA a singolo filamento. Anche nel caso in cui si avesse la necessità di quantificare DNA a singolo filamento, esiste una variante chiamata OliGreen. I vantaggi del PicoGreen sono riscontrabili nella velocità di esecuzione del saggio e nella sua buona sensibilità: si utilizzano solitamente piastre a 96 pozzetti contenenti calibratori e standards, e i campioni di nostro interesse. In questo caso, possiamo analizzare, in una mix composta da 5µl di campione e 195µl di soluzione PicoGreen, fino a 250 pg/µl di dsDNA [24]. Il principale svantaggio di questa metodica è invece che il PicoGreen si intercala in tutto il DNA del campione e non è specifico per il DNA umano. Una volta avvenuta l'incubazione, la fluorescenza del campione può essere misurata tramite spettrofotometro o lettore di micropiastre a fluorescenza. La lunghezza d'onda da impostare è la stessa della fluoresceina (eccitazione a circa 480 nm, emissione a circa 520 nm) [24].

Agli inizi degli anni 2000 si è quindi provato ad utilizzare un sistema di quantificazione enzimatico, chiamato AluQuant™, introdotto dall'azienda Promega. Questo kit sfrutta il fatto che nel DNA umano ci sono un gran numero di sequenze chiamate "Alu". La metodica di analisi tramite AluQuant consiste in una prima ibridazione del campione con una sonda Alu. Successivamente, tramite specifici enzimi viene effettuata una pirofosforillazione (operazione inversa della polimerizzazione), che scompone il DNA in dNTPs e pirofosfato. Il pirofosfato, il quale, grazie ad una chinasi, permette la produzione di ATP da ADP. L'ATP, a sua volta, interviene nella reazione di ossidazione della luciferina grazie all'enzima luciferasi, con conseguente produzione di segnale luminoso che viene captato da un luminometro per permettere la quantificazione del DNA, proporzionale all'intensità del segnale luminoso. Grazie a questo sistema si riesce a quantizzare un DNA in un range ottimale che va da 0.1 a 50 ng di DNA [25]. Sebbene molto più specifica delle tecniche utilizzate negli anni precedenti, lo svantaggio del saggio AluQuant™ è l'incapacità di dare informazioni sullo stato di degradazione del DNA, nonché della contaminazione batterica. Per questi motivi ormai viene considerato obsoleto ed è stato soppiantato dalla qPCR in real-time. La PCR in Real Time risulta essere ormai lo standard per la quantificazione in genetica forense, perché ha svariate possibilità: si può utilizzare specificatamente per il

DNA umano, per indagare il DNA mitocondriale, si possono ottenere informazioni sul cromosoma Y, si può rilevare la presenza di sostanze inibitrici e di DNA degradato. Sono tuttora in fase di ricerca nuove applicazioni

Capitolo 2

2.1 PCR quantitativa in Real Time (qPCR)

L'utilizzo della PCR classica, end point, ha sicuramente rivoluzionato le tecniche analitiche e la ricerca biomedica nella seconda parte del '900. Ad oggi, è uno strumento indispensabile per la maggior parte delle metodiche eseguite in biologia molecolare. Tuttavia, presenta uno svantaggio: pur essendo eccezionale dal punto di vista qualitativo, non è adatta a fornire delle informazioni di tipo quantitativo. Il motivo risiede nel fatto che la quantità dei prodotti di amplificazione non dipende soltanto del numero di molecole di DNA target presenti nel campione all'inizio della reazione, bensì una serie di fattori, tra i quali: una inadeguata quantità di DNA, la presenza di sostanze inibitrici della PCR, DNA altamente degradato o una combinazione di tutti questi elementi. Quindi, tali eventi possono influire in questo processo e sono difficilmente controllabili, poiché piccole variazioni nell'efficienza di reazione possono avere ripercussioni notevoli sugli amplificati a fine reazione [3].

Si è resa dunque evidente la necessità dello sviluppo di una tecnica che possa valutare l'efficienza di reazione e la quantità di amplificati durante la fase esponenziale di reazione, non soltanto basandosi sul prodotto finale. Agli inizi degli anni '90, un lavoro di Higuchi et al [26] riconosceva che il processo della PCR poteva essere monitorato durante l'esecuzione tramite l'aggiunta di un marcatore fluorescente che si lega al prodotto di PCR durante i vari cicli di amplificazione: all'aumentare della concentrazione di tal prodotti, aumenta anche il segnale fluorescente. Questo lavoro gettò le basi per l'allestimento della moderna qPCR (PCR quantitativa in Real Time). La Real Time PCR rappresenta il metodo più sensibile di quantizzazione del DNA in ambito forense. Per poter rilevare il segnale fluorescente vengono comunemente utilizzati macchinari che consentono sia l'eccitazione di fluorocromi sia la loro rilevazione tramite fotocamere CCD che raccolgono la fluorescenza di ritorno, il tutto in tempo reale [3].

La marcatura dei prodotti di amplificazione attraverso molecole fluorescenti avviene attraverso l'utilizzo di sonde specifiche fluorogeniche o di coloranti intercalanti. Il colorante più utilizzato per la PCR in Real Time è il SYBR® Green 1. Questo colorante è un intercalante della doppia elica del DNA, analogamente all'etidio bromuro, ed ha un profilo di eccitazione ad una lunghezza d'onda di 488 nm mentre l'emissione avviene ad una lunghezza d'onda di circa 520-530 nm. Non è specifico, si intercala in ogni doppia elica, ma non reagisce invece quando il DNA è a singolo filamento. Il segnale fluorescente viene meno, dunque, se il DNA è denaturato. Il principale vantaggio di questa tecnica è che è relativamente economica e può essere usata per tutti i primers indistintamente [27]. Tuttavia, la presenza di eventuali DNA a singolo filamento riduce moltissimo la specificità del saggio a causa dell'amplificazione di prodotti di PCR aspecifici e di dimeri di primers [28]. Questa caratteristica rende difficilmente utilizzabile il SYBR® Green 1 per reazioni di PCR multiple, mentre è più indicato per le reazioni in singleplex. Un metodo per poter ovviare a questa problematica è la creazione di curve di melting. Le curve di melting prevedono l'analisi dei picchi di amplificazione in base alla temperatura. I picchi specifici per il DNA in esame si distingueranno dunque dai picchi che avvengono a temperature minori e con picchi più larghi. L'analisi delle curve di melting con il SYBR® Green 1 è possibile poiché si intercala in tutto il DNA in maniera aspecifica, e rappresenta invece uno svantaggio nell'uso di sonde

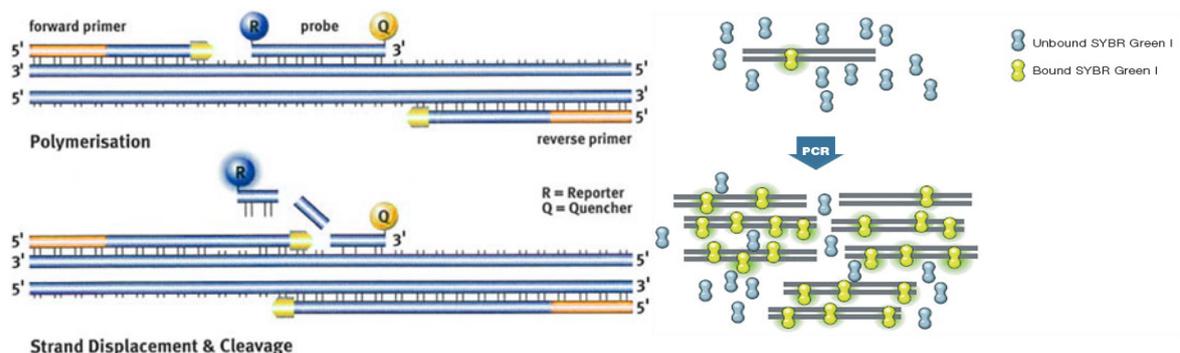


Figura 6_confronto TAQMAN E Sybr green (<https://eurofinngenomics.eu/en/dna-rna-oligonucleotides/optimised-application-oligos/qpcr-probes/dual-labeled-probes/>)

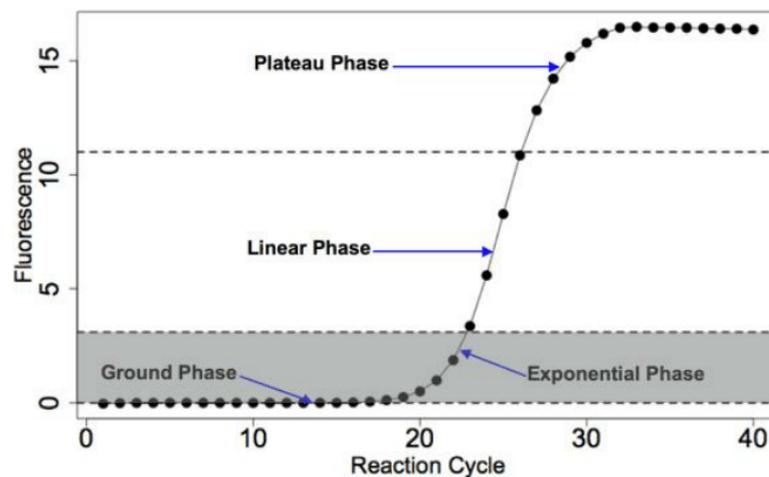
specifiche, in cui l'eventuale presenza di dimeri non può essere analizzata con tale curva, in quanto ogni coppia di primers ha sonde diverse. Le sonde specifiche per la realizzazione di saggi in qPCR sono invece di diverso tipo: le sonde TaqMan sono sonde oligonucleotidiche complementari alla sequenza target, a differenza del colorante intercalante. Sono sonde ad idrolisi, la sequenza oligonucleotidica specifica è marcata con due molecole: alla sequenza 5' è presente un *reporter*, ossia un fluorocromo che è in grado, se eccitato, di emettere fluorescenza; all'estremità 3', invece, si trova un *quencher*, ossia una molecola in grado di spegnere la fluorescenza del reporter, poiché i fotoni emessi dal fluoroforo vengono assorbiti da tale molecola. Durante la reazione di PCR, la DNA Polimerasi agisce allungando il filamento stampo, mentre la sonda riconosce il sito specifico tramite la sequenza oligonucleotidica. La scissione per idrolisi della sonda permette l'estensione dei primer fino alla fine del template senza che ci sia un'interferenza con l'accumulo esponenziale dei prodotti di PCR. Con l'idrolisi, anche le molecole quencher e reporter vengono scisse dalle rispettive sonde ad ogni ciclo, comportando un aumento dell'intensità della fluorescenza proporzionale all'ammontare di ampliconi prodotti [27]. Oltre alle TaqMan, altre sonde ad idrolisi sono le sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Il loro meccanismo è simile, in quanto la fluorescenza è prodotta dopo il legame al DNA bersaglio e in seguito all'idrolisi, ma funzionano tramite una coppia di sonde, ciascuna marcata da un solo fluorocromo (che in questo caso vengono chiamati "accettore" e "donatore"). Quando le sonde non sono legate alle sequenze bersaglio, il segnale fluorescente non viene rilevato. Una volta che avviene l'annealing, invece, entrambe le sonde FRET si ibridizzano e l'accettore e il donatore entrano in contatto, trasferendo energia dall'uno (il donatore) all'altro (l'accettore). Questo trasferimento di energia tra le due molecole comporta l'emissione di segnale fluorescente. Le sonde Molecular Beacons e Scorpions™ invece, pur avendo la struttura di base che comprende sia un frammento oligonucleotidico che un quencher ed un reporter, non agiscono grazie al meccanismo dell'idrolisi. Le sonde Molecular Beacons sono a forma di forcina, in cui la parte apicale o "loop" contiene la sequenza di riconoscimento per il target di DNA, mentre la parte terminale, "stem", è formata da segmenti complementari che legano un quencher ed un reporter. In assenza

della sequenza bersaglio, la sonda rimane chiusa e il quencher blocca l'emissione del vicino fluoroforo. Durante la fase di denaturazione della PCR, anche la sonda si denatura, potendo così ibridizzarsi alla sequenza in fase di annealing. Quando avviene l'estensione del neo-filamento, la sonda si dissocia dal target, ma, a differenza delle sonde TaqMan, le molecular beacons non vengono distrutte durante la reazione di amplificazione per cui possono ibridizzarsi nuovamente durante il successivo ciclo. Si tratta di sonde molto specifiche, per cui anche il mismatch di una sola base può impedirne l'appaiamento [29]. La sonda Scorpions™ è formata da una sequenza che lega all'estremità 5' un fluoroforo. Durante la PCR, la sequenza della Scorpions™ viene estesa e lega la sequenza complementare che si trova all'interno dello stesso filamento di DNA. Come per la sonda Molecular Beacons, l'ibridazione apre l'ansa e allontana il reporter dal quencher e si ha emissione di fluorescenza misurabile [30].

2.2 Parametri della reazione di qPCR

La PCR, sia end point che in Real Time, è una reazione di amplificazione enzimatica, prevede l'utilizzo di una polimerasi termoresistente (TaqPolimerasi) al fine di amplificare del materiale genetico, DNA o RNA, in un susseguirsi di tre fasi a cicli: denaturazione, *annealing* o ibridazione, estensione. Il numero di cicli può variare in base alla metodica, ma solitamente si effettuano 30 cicli, in grado di amplificare la regione target di circa un miliardo di volte per ogni molecola di DNA di partenza [1]. La fase di denaturazione serve a separare i due filamenti, in modo da permettere ai primers di riconoscere la sequenza. La denaturazione è operata tramite l'innalzamento della temperatura, fino a circa 95°C, rompendo i legami idrogeno che legano le coppie di basi. La fase di annealing avviene invece ad una temperatura minore, che è legata alla tipologia di primers utilizzati. Infatti, la temperatura di annealing è strettamente connessa a quella di melting. La temperatura di melting è quella temperatura in cui il 50% del DNA si trova nello stato a doppia elica e l'altra metà a singolo filamento. La temperatura di annealing è calcolata sottraendo 5°C alla temperatura di melting, e può oscillare in un range di 48°C- 72°C [31]. L'ultima fase, quella di estensione, avviene a 72°C in modo da permettere alla polimerasi di lavorare in

condizioni ottimali, allungando il filamento tramite l'aggiunta di nucleotidi. Ognuna di queste fasi viene ripetuta per ogni ciclo di amplificazione. L'andamento della reazione segue quindi uno schema ben preciso, in cui in una fase iniziale, con il massimo della disponibilità dei reagenti, in condizioni ideali, l'efficienza della reazione è massima e segue l'equazione $N = N_0 2^n$, dove N è il numero di amplificato prodotto, N_0 è il numero iniziale di molecole di DNA e 2^n indica il raddoppio esponenziale. Infatti, nella prima fase della reazione l'andamento dell'amplificazione è esponenziale ed è qui che risiede il principale vantaggio della tecnica in Real Time: se nella end point possiamo valutare solo il prodotto finale, nella qPCR possiamo osservare l'amplificazione in tempo reale della sequenza



target, ed è la fase esponenziale il momento in cui possiamo ricavare le maggiori informazioni quantitative.

Figura 7_ reazione di amplificazione in qpcr (Page, Robert B.; Stromberg, Arnold J. (2011).

Come osservabile nella figura 8, la prima fase di reazione è quella esponenziale, a cui segue una fase lineare, e una fase di plateau. Col procedere della reazione, e alla saturazione della stessa, l'efficienza diminuisce e non si possono ricavare informazioni attendibili per quanto riguarda la quantificazione del prodotto. Per questo, è necessario osservare dei parametri che possano, in modo chiaro e statisticamente attendibile, fornire gli strumenti per un'adeguata quantificazione.

Baseline: la baseline, o linea di base, è riferita al livello del segnale durante i cicli iniziali della PCR, solitamente tra il terzo e il quindicesimo ciclo, in cui c'è un piccolo cambiamento nel segnale fluorescente, ma che non è specifico. Può essere accostata al "rumore di fondo" ed è determinata empiricamente per ogni reazione. La linea di base è importante, in quanto è necessaria per determinare il Ct, ciclo soglia, altro fondamentale parametro. Per determinare la baseline bisogna tenere in considerazione abbastanza cicli da eliminare il rumore di fondo, ma senza includere il segnale reale dell'amplificazione della sonda target [32].

Linea Threshold: la linea Threshold rappresenta graficamente il livello in cui il segnale fluorescente aumenta ad un livello statisticamente significativo sopra la linea di base. Lo scopo dell'utilizzo di questo parametro è quello di distinguere il segnale di amplificazione specifico rispetto al rumore di fondo. Solitamente viene stabilita dal software calcolando dieci volte la deviazione standard rispetto al valore della fluorescenza della baseline. Tuttavia, la posizione della linea Threshold può essere modificata dall'operatore in qualunque punto della fase esponenziale della PCR.

Ct (ciclo soglia): il ciclo soglia, o threshold cycle, è il numero di ciclo nel quale il segnale fluorescente della reazione supera la linea Threshold. Il Ct è il parametro più importante riferibile alla quantificazione in qPCR, in quanto il suo valore è inversamente proporzionale alla quantità di DNA target iniziale. In altre parole, minore è il Ct, maggiore è la quantità di DNA nel campione.

Curva Standard: per poter quantificare il DNA in esame, è necessario costruire una curva standard a partire da una serie di campioni a concentrazione nota, che vengono inseriti nella reazione secondo una serie di diluizioni. Grazie a questa curva, vengono confrontati i Ct degli standard e dei campioni; inoltre, possono essere ricavate informazioni riguardo la performance della reazione stessa.

2.3 Validazione del saggio in qPCR

Oltre ai parametri analitici relativi ai risultati della seduta, è necessario valutare ulteriori elementi che possano validare il saggio, ossia definire che i risultati ottenuti tramite l'esecuzione della qPCR siano affidabili e ripetibili.

Coefficiente di correlazione (R^2): il coefficiente di correlazione è un indice statistico che esprime la correlazione tra i dati e la curva standard, ossia la linearità della curva. Idealmente, se la correlazione questi due elementi è perfettamente lineare, il valore di R^2 è uguale a 1. In realtà, questo valore assume un massimo di 0,999, in quanto c'è comunque un'approssimazione della relazione.

Limite di determinazione (y-intercetta): il limite di determinazione è il limite teorico di quanto la reazione possa rilevare, o, in altre parole, il numero massimo di Ct che può essere rilevato (e quindi il valore minimo di DNA presente nel campione), in modo che la fluorescenza rilevata sia statisticamente attendibile. Teoricamente, la PCR può rilevare anche una singola copia di DNA amplificato, tuttavia un valore realisticamente accettabile è di 2-10 copie. L'y-intercetta è un valore che esprime la sensibilità del saggio.

Efficienza e pendenza della curva: la pendenza della curva di reazione è proporzionale all'efficienza della reazione stessa. Per ottenere risultati accurati e riproducibili, con un'efficienza più vicina possibile al 100%, la pendenza dovrebbe avere un valore di -3,22 [32]. L'efficienza è uno dei parametri più importanti nell'analisi di un saggio in qPCR, in quanto è condizionata da fattori sperimentali, come la lunghezza degli ampliconi, contenuto in guanina e citosina, presenza di inibitori o dimeri di primers. Se l'efficienza non risulta ottimale, numerose sono le operazioni che possono essere messe in atto per ottimizzare la metodica: modificare il numero di cicli di reazione, aumentare il tempo di estensione dei filamenti, aumentare il tempo di ibridazione, aumentare la temperatura per la denaturazione o abbassarla, utilizzare reagenti adatti, escludere la presenza di inibitori o dimeri di primers, ottimizzare il disegno dei primers [33]. Se la concentrazione dei reagenti non è ottimale, solitamente l'efficienza è minore del 90%. Contrariamente, la presenza di inibitori della PCR può comportare un'efficienza maggiore del 110% [32].

La quantificazione tramite qPCR può essere assoluta, se i campioni in esame vengono quantificati confrontandoli con una curva standard generata tramite l'inserimento di campioni a concentrazione conosciuta in una serie di diluizioni per formare una curva standard. Oppure la quantificazione è chiamata relativa quando si analizza l'espressione di un gene con quella dello stesso gene ma su un altro campione di riferimento, che può essere amplificato nella stessa reazione.

La qPCR è ad oggi una delle tecniche più utilizzate non solo per la quantificazione forense, bensì trova applicazione in molte aree medico scientifiche, dalla microbiologia all'oncologia. Per questo, la comunità scientifica internazionale ha proposto delle linee guida dettagliate che potessero essere la base per poter validare la sperimentazione, e quindi la pubblicazione di nuovi saggi e nuove sperimentazioni. Su questo presupposto nascono le linee guida del MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR) [34]. Le linee guida MIQE puntano ad assicurare l'integrità della letteratura scientifica, promuovendo la trasparenza dei dati laboratoristici e permettendo ai ricercatori nel mondo di poter utilizzare parametri oggettivi per il confronto tra dati sperimentali. Queste indicazioni riguardano tutto il processo dell'allestimento del saggio, a partire dai reagenti, sequenze dei primers, metodi di analisi, fino all'invio del manoscritto all'editore.

2.4 Kit di qPCR utilizzati in ambito forense

In genetica forense c'è la necessità di ottenere più informazioni a partire da una piccola aliquota di campione. Per questo, sono stati sviluppati dei kit commerciali che hanno diversi target e che permettono in una sola reazione di indagare vari parametri. Le reazioni di PCR multiplex in Real Time richiedono l'utilizzo di saggi basati quindi su sonde marcate ciascuna con un fluorocromo unico, in modo da ottenere diversi colori per ogni singola sonda. Il segnale di ognuna di queste sonde è utilizzato per rilevare la quantità di ciascun parametro separatamente ma nella stessa seduta [35]. È dunque importante che la singola sonda sia molto specifica e che non presenti appaiamenti crociati per evitare la formazione di dimeri di primers, in quanto, incrementando il numero di sonde, è necessaria una maggiore ottimizzazione dei reagenti. Infatti, non solo i primers possono essere fonte di

errore, ma anche i fluorofori devono essere tra loro compatibili, inoltre la strumentazione deve essere dotata di specifiche caratteristiche sia per l'eccitazione che per la rilevazione del segnale fluorescente: da qui si intuisce come non tutti i kit potranno essere utilizzati su tutti i macchinari di qPCR, ma andranno considerate le specifiche riportate nei manuali per poter decidere l'opzione adatta. La PCR Multiplex, tuttavia, offre numerosi e importanti vantaggi: potendo effettuare varie amplificazioni in un'unica reazione si riduce il quantitativo di campione da utilizzare; inserendo tutti i reagenti in un'unica provetta, si riducono di molto gli errori manuali dovuti all'operatore; ha un elevato livello di precisione rispetto alla singleplex: se venissero indagate in reazioni separate, le quantità riscontrate non sarebbero accurate come nel caso della PCR Multiplex [32]. I kit per la quantificazione contengono diversi elementi indispensabili per far avvenire la reazione:

PCR Master Mix: la Master Mix è contenuta in tutti i kit poiché ha al suo interno tutti gli elementi necessari per poter far avvenire una reazione di amplificazione: include buffer, dNTPs, DNA polimerasi e MgCl₂. Inoltre, può contenere altri elementi, a seconda del kit. La Master Mix può essere anche riprodotta ricreando le concentrazioni dei singoli componenti, che, seppure sia una prospettiva che punta verso il risparmio di risorse, può risultare problematica, in quanto si perde la standardizzazione offerta dall'azienda produttrice del kit.

Primer Mix: sebbene la Master Mix possa presentare delle differenze tra kit e kit, sicuramente l'elemento distintivo di ciascuno è la Primer Mix, che contiene il pool di primers con le sonde marcate.

Buffer di diluizione: un buffer che viene utilizzato per la diluizione degli standard.

Standard: dal momento che i risultati della qPCR devono essere valutati quantitativamente, nei kit commerciali viene incluso anche il DNA Standard, per la formulazione della curva standard. Ogni kit prevede uno standard a differente concentrazione, tuttavia è sempre necessario diluirlo in una serie di diluizioni, in quanto la formulazione di una curva prevede l'utilizzo di più punti di riferimento.

Tra i kit maggiormente in uso in ambito forense abbiamo:

Plexor® HY System: il kit Plexor viene utilizzato per la quantificazione in contemporanea del DNA umano totale (su target autosomico) e per il DNA maschile (cromosoma Y) ed è prodotto dall'azienda Promega. Il sistema si basa sull'interazione di due specifici nucleotidi collocati sulla sonda fluorescente: uno di questi è un nucleotide modificato (iso-dC) collegato all'estremità 5' della sonda. Solo uno dei primer è marcato. La mix di reazione include invece dNTPs normali e anche iso-dGTP, ossia un tipo di nucleotide modificato con un quencher, il dabcyil. Quando il nucleotide con il quencher viene incorporato e lega l'iso-dC, c'è di conseguenza una riduzione della fluorescenza. Con la tecnologia Plexor quindi, l'accumulo del prodotto è accompagnato da un decadimento della fluorescenza [36].

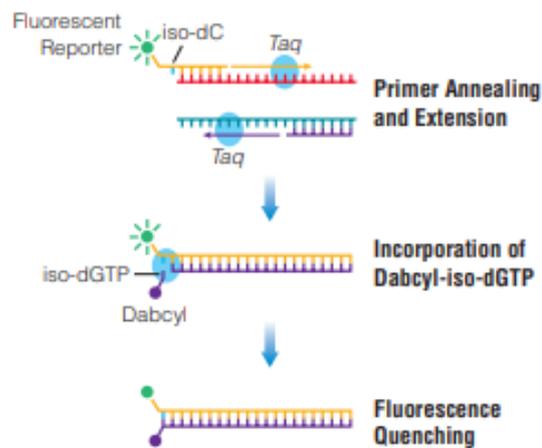


Figura 8_chimica di reazione del kit plexor [36].

Il kit Plexor utilizza la fluoresceina per determinare il target autosomico del DNA. I primers amplificano un gene multicopia di 99 paia di basi presente sul cromosoma 17. I dati ottenuti tramite questa reazione sono utilizzati per quantificare il DNA umano totale presente nel campione. Il fluoroforo CAL Fluor® Orange 560, invece, è utilizzato per ricercare il target sul cromosoma Y. I primers amplificano una regione multicopia di 133 paia di basi, e ciò serve a ricercare il quantitativo totale di DNA maschile nel campione. Il CAL Fluor® Red 610 è infine utilizzato per la ricerca dell'IPC, o "internal positive control", un controllo positivo interno presente in ogni reazione. I dati ottenuti amplificando questo target servono a monitorare la presenza di inibitori e l'efficacia della reazione di amplificazione stessa. Nel kit Plexor è

infine presente anche l'IC5 Dye e si tratta di un riferimento passivo: il segnale dei tre fluorocromi specifici viene normalizzato grazie al segnale emesso dall'IC5. Il kit Plexor richiede un sistema di Hot PCR. Dal momento che la Taq polimerasi presenta un'attività polimerasica anche a temperature più basse, potrebbe amplificare sequenze aspecifiche e dimeri di primers. L'Hot-start PCR è una tecnica che risolve questo problema utilizzando una Taq polimerasi inattiva a temperatura ambiente, per poi aggiungere un passaggio all'inizio della PCR di attivazione della polimerasi a circa 95°C (da cui "hot start"), evitando che la polimerasi si attivi fino a quel momento [37]. Altri sistemi per raggiungere altri risultati sono stati studiati nel tempo, inizialmente si utilizzavano delle piastre riscaldate, ma era una metodica laboriosa e non sempre adeguata, successivamente si è scelto di utilizzare polimerasi specifiche o barriere fisiche tra reagenti, in modo da standardizzare il processo [38].

Quantifiler® Duo: il kit Quantifiler Duo, analogamente al Plexor, contiene dei primers specifici per la ricerca del DNA umano totale e del DNA maschile. Tuttavia, presenta delle differenze rispetto al Plexor. La più evidente è che la chimica di reazione è differente, in quanto viene valutata l'emissione della fluorescenza e non il suo decadimento. Inoltre, ha target diversi rispetto al precedente kit.

Target	Gene Target	Location	Amplicon Length	Gene ID	Ploidy
Human Target	Ribonuclease P RNA Component H1 (RPPH1)	14q11.2	140 bases	85495	Diploid
Human Male Target	Sex-determining region Y (SRY)	Yp11.3	130 bases	6736	Haploid

Tabella 2_target del kit quantifiler duo [39]

Il target dei primers per rilevare il DNA umano totale è il gene RPPH1, che si trova sul cromosoma 11 ed ha una dimensione di 140 paia di basi; il gene utilizzato per il DNA maschile invece si trova sul cromosoma Y e si tratta del gene SRY, ampio 130 paia di basi. Inoltre, è incluso anche un IPC che è formato da un oligonucleotide sintetico non presente

in natura [39]. La chimica di reazione di questo kit si basa sull'utilizzo di sonde TaqMan® MGB. L'utilizzo di queste sonde permette di massimizzare la specificità di reazione in reazioni multiplex. Infatti, la sonda è così costituita: all'estremità 5' viene collegato un fluorocromo (FAM™, VIC® o NED™), mentre all'estremità 3' sono presenti due molecole, un MGB, o *minor groove binder*, e un NFQ, o *non fluorescent quencher*. L'effetto che si produce utilizzando queste sonde è quello di aumentare la temperatura di melting, ma senza aumentare la lunghezza delle sonde.



Figura 9_struttura di una sonda taqman mgb (MGB-Eclipse Probes for 5' nuclease real-time PCR assays, eurofin genomics)

La molecola MGB si inserisce nel solco minore del DNA, aumentando la stabilità e la specificità della sonda, mentre l'NFQ è essenzialmente un accettore di elettroni, non emette una propria fluorescenza, ma la assorbe dalla molecola reporter. Quando la sonda non è legata alla sequenza target, la vicinanza tra fluoroforo e NFQ sopprime la fluorescenza del fluorocromo. Nel momento in cui invece la sonda si ibridizza alla sequenza target, la molecola MGB si ripiega all'interno del solco minore del DNA, stabilizzando fortemente il legame sonda-sequenza. Proprio per questo, la temperatura di melting si innalza di circa 10°C, in quanto il legame risulta molto più forte. Quindi, si possono utilizzare anche sonde molto corte, di circa 10-20 nucleotidi, e questo è un ulteriore fattore che aumenta la specificità per la sequenza target.

Quantifiler™ Trio: il kit Quantifiler Trio rappresenta una sostanziale evoluzione rispetto al precedente in quanto combina diverse reazioni: una sonda per il DNA autosomico più lunga e una sonda corta, una sonda per il DNA umano maschile e infine un IPC di controllo. Il kit ha un limite di rilevazione tra i 24pg/μl e i 50 ng/μl di DNA.

Target	Amplicon length	Ploidy	Copy Number	Dye/Quencher
Human Target, small autosomal	80 bases	Diploid	multicopy	VIC™ dye with MGB quencher
Human Target, large autosomal	214 bases	Diploid	multicopy	ABY™ dye with QSY™ quencher
Human Male Target†	75 bases	Haploid	multicopy	FAM™ dye with MGB quencher
Internal PCR Control	130 bases	NA	Synthetic IPC template is included in the primer mix	JUN™ dye with QSY™ quencher

Tabella 3_target del kit quantifiler trio [40]

Come si evince dalla Tabella 2, questo kit utilizza un target autosomico corto, di circa 80 paia di basi, simile alla taglia dei tipici mini-STR, rendendolo particolarmente adatto a campioni molto degradati. Analogamente, la presenza di un target più lungo, sempre autosomico, permette di ricavare il Degradation Index, o indice di degradazione, informazione particolarmente utile in ambito forense. Un ulteriore target si trova a livello del cromosoma Y, permettendo di quantificare la porzione di DNA maschile presente nel campione, soprattutto in caso di profili misti maschili e femminili.

Il controllo positivo interno (IPC) è rappresentato da un oligonucleotide sintetico, non presente in natura, di 130 paia di basi. Le sonde utilizzate da questo kit sono TaqMan® dotate di fluorofori all'estremità 5' e di QSY™ quencher all'estremità 3'. Le molecole QSY™ sono dei NFQ (non-fluorescent quenchers) [40].

L'uso del kit Quantifiler Trio rappresenta un'evoluzione delle tecniche di quantificazione in ambito forense, in quanto permette di orientare le analisi successive grazie all'indice di degradazione del DNA nucleare. Tuttavia, presenta degli svantaggi: l'utilizzo di questo kit non è possibile su tutti i macchinari di Real Time PCR, ma solo su alcuni macchinari come il Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR, per i quali il kit è stato ottimizzato.

Capitolo 3

Scopo della tesi

Sebbene siano presenti molti kit in commercio per la quantizzazione del DNA nucleare, i quali presentano target che permettono di ricavare informazioni come l'indice di degradazione oppure la quantità di DNA maschile presente nel campione, ancora pochi sono i lavori sul DNA mitocondriale. La grande sensibilità del sistema di PCR Real Time ha permesso di ridurre al minimo la quantità di campione consumato e al contempo di ricavare tutte queste informazioni in un'unica seduta. Sicuramente la rilevazione del DNA nucleare umano permette la formulazione di un profilo identificativo unico, ma a volte questo non è possibile, in quanto il tessuto è molto degradato, come ad esempio nel caso di reperti ossei molto datati, oppure quando si ha a che fare con campioni come fusti di capelli, in cui è possibile ritrovare solo DNA mitocondriale.

In questo lavoro di tesi viene proposto un saggio in Real Time PCR che prevede sia un target per il DNA nucleare sia due target per il DNA mitocondriale, uno corto e uno lungo, per poter calcolare l'indice di degradazione del materiale genetico in campioni dove è possibile riscontrare solo mtDNA; un'ulteriore sonda, poi, è dedicata all'amplificazione di un controllo positivo interno, necessario per escludere la presenza di inibitori della reazione di PCR.

Il saggio è stato validato su campioni di DNA estratto da diverse tipologie di materiale biologico (ossa, denti, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), unghie e capelli). I risultati ottenuti dai fusti di capelli sono stati successivamente valutati tramite l'amplificazione di specifiche regioni del DNA mitocondriale, al fine di correlare l'indice di degradazione con l'efficacia della reazione di PCR.

Capitolo 4

Materiali e Metodi

4.1 Estrazione di campioni forensi con metodica automatizzata con Maxwell 16

Nel saggio tetraplex oggetto di studio si è scelto di indagare la quantificazione del DNA su una serie di campioni forensi, quali ossa, denti, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), unghie e capelli.

Tutti i campioni in esame sono stati estratti con lo strumento Maxwell 16, utilizzando il kit DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 [44].

I fusti di capelli necessitano un pretrattamento prima dell'estrazione vera e propria, al fine di eliminare tutti i contaminanti presenti sulla superficie esterna. Tutti i campioni sono stati immersi in una soluzione al 70% di etanolo per cinque minuti. In seguito, sono stati effettuati due lavaggi con acqua ultrapura. I fusti di capelli sono poi stati tagliati per ottenere una dimensione di circa 0,5 cm di modo che possano essere contenuti nelle provette e ricoperti dai reagenti.

Il primo passaggio si svolge manualmente, mentre la seconda fase dell'estrazione è automatica e avviene nello strumento.

- Primariamente si inseriscono i capelli sminuzzati nelle provette e vengono aggiunti 386 µl di Casework extraction buffer, 10 µl di Proteinasi K e 4 µl di 1-Tioglicerolo.
- Una volta aggiunti i reagenti, si agita la provetta con il vortex a massima velocità.
- Il preparato deve essere posto in agitazione nel termomixer a 56°C per 1 ora, in modo da favorire la deproteinizzazione e il rilascio dell'acido nucleico.
- Si aggiungono 200 µl di Lysis Buffer e 100 µl di DTT.

-
- Si inizia la preparazione dello strumento: per prima cosa si posizionano le cartridges del Maxwell 16 nell'apposito supporto e si aggiunge il campione nel primo pozzetto, mentre nel pozzetto numero 8 viene sistemato un plunger

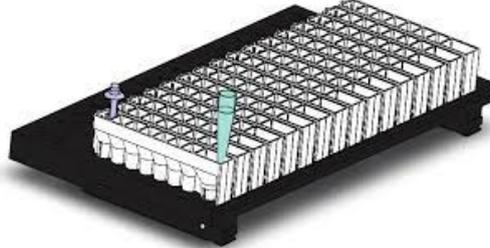


Figura 10_cartridges maxwell 16, posizione campione e plunger [44]

- Si posiziona un elution tube su cui vengono pipettati 50 μ l di Elution Buffer
- Procedere ad impostare lo strumento e premere "start" per iniziare la seduta di estrazione.

Una volta terminata la seduta, l'eluato contenente il DNA viene conservato a -20°C o a $+4^{\circ}\text{C}$ se analizzato in breve periodo. È di fondamentale importanza la conservazione dei campioni e dei reagenti, dal momento che una conservazione non ottimale può degradare il DNA, le sonde e può risultare in un'invalidazione di tutta la metodica. Il DNA estratto, i primers, le sonde, le mix per la PCR utilizzati in questo studio vengono conservati a -20°C . È raccomandabile evitare cicli di scongelamento ed esposizione a fonti luminose e di calore.

4.2 Allestimento qPCR tetraplex

Il saggio di qPCR prevede la simultanea amplificazione di quattro target: due regioni del DNA mitocondriale, una regione del DNA autosomico e un oligonucleotide sintetico (IPC). L'allestimento della reazione di qPCR ha richiesto l'attenta selezione di primers e sonde per il mtDNA e dell'oligo IPC che sono stati tratti dalla letteratura [41-42-43], mentre il target nucleare è stato creato appositamente per lo studio. Le sonde utilizzate (probe) sono sonde TaqMan[®] MGB, scelte per la loro migliore resa in reazioni di PCR multiplex.

Le sequenze dei primers e delle sonde sono riportate nella Tabella 4.

Vengono di seguito descritti i target amplificati:

mtND1: il target del DNA mitocondriale corto ha un'ampiezza di 69 paia di basi ed è una regione del gene MT-ND1, il quale codifica per una ossidoreduttasi (NADH-ubichinone ossidoreduttasi catena 1) di 318 amminoacidi. Questa proteina è coinvolta in numerosi pathways della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, specialmente catalizza il trasferimento di elettroni e di protoni dal NADH all'ubichinone. [Gene ID: 4535].

mt143bp: il target del mitocondriale lungo è invece formato da 143 paia di basi e si localizza sul gene MT-ATP8. Questo gene codifica per l'ATP sintetasi 8 mitocondriale. Questa proteina ha un'attività nella fase finale della catena di trasporto degli elettroni, in quanto permette la sintesi di ATP da ADP+fosfato, tramite il trasferimento di protoni da un lato della membrana all'altro, secondo la reazione $ADP + H_2O + phosphate + H^+ \rightarrow ATP + H^+$ [Gene ID: 4509].

nuRNU2_181bp: la sonda del DNA nucleare è stata progettata identificando come target il gene RNU2-1 (U2 small nuclear 1) [Gene ID: 6066]. Questo gene codifica per una porzione della subunità U2 dello spliceosoma ed è posizionato sul braccio lungo del cromosoma 17. La scelta di questo gene è legata al fatto che è caratterizzato da regioni molto conservate tra i primati ed è un gene multicopia, che può essere quindi utilizzata anche qualora ci fosse una variazione nella sequenza di riconoscimento del primer.

Per la progettazione dei primer e delle sonde è stato utilizzato il software Primer3Plus v.2.4.2 (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), uno specifico software online che permette di ottenere una serie di primer e sonde disegnati per la sequenza desiderata. Per il disegno dei primer sono stati curati in particolar modo parametri quali la T_m con valori compresi tra 57-63°C, con differenza di temperatura tra le coppie dei primers di 2-3°C e di massimo 5°C tra i primers all'interno della multiplex. La lunghezza è stata contenuta tra 18 e 27 nucleotidi, con un intervallo di percentuale GC tra 20-80%. Le potenziali sequenze di primer e sonde sono state confrontate con le sequenze disponibili sul sito web del NCBI utilizzando il Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). La valutazione dei dimeri e degli hairpin è stata fatta tramite sia il software Autodimer ([40](https://www</p></div><div data-bbox=)

s.nist.gov/dnaAnalysis/primerToolsPage.do) e sia tramite il software Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/it/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>, Thermo Fisher Scientific)

IPC-oligo: il controllo positivo interno ha la funzione di rilevare l'eventuale presenza di inibitori nella reazione ed è costituito da un oligonucleotide tratto dalla letteratura [41]. La sequenza è riportata nella Tabella 5.

TARGET	Sequenze primer e probe	Taglia amplicone (bp)	Rif
MtND1	F_5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-3'	69	[41-42]
	R_5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3'		
	Probe_5'-VIC-CCA TCA CCC TCT ACA TC-MGBNFQ		
mt143bp	F_5'-CCA CTG TAA AGC TAA CTT AGC ATT AAC C-3'	143	[42-43]
	R_5'-GTG ATG AGG AAT AGT GTA AGG AGT ATG G-3'		
	Probe_5'-FAM-CCA ACA CCT CTT TAC AGT GAA-MGBNFQ		
nuRNU2_181bp	F_5'-GTG TGG ACT CTG GTG ACC TG-3'	181	-
	R_5'-CTC AGC TAT CAC CTC TGC CG-3'		
	Probe_5'-Quasar 705-TCC CAG GGC CAC CCG TAA CT-BHQ-2		
IPC	F_5'-ATC AGC TTA GCG TGC AGT CA-3'	70	[41]
	R_5'-TCT TCG TCG TAA CGG TGA GC-3'		
	Probe_5'-Cy5-GTT GCA CTA CTT CAG CGT CCC A-BHQ-2		

Tabella 4_ ELENCO DEI PRIMERS E DELLE SONDE CON RELATIVE SEQUENZE E BIBLIOGRAFIA E LUNGHEZZA DELL'AMPLICONE PER L'ALLESTIMENTO DELLA REAZIONE TETRAPLEX.

Inoltre, per la determinazione del DNA mitocondriale, viene amplificato un oligonucleotide (mitoligo) progettato per il target mtND1, la cui sequenza è riportata nella Tabella 5.

	Concentrazione finale	Sequenza oligo	Rif.
OLIGO IPC	0.001 nM	5'-ATC AGC TTA GCG TGC AGT CAG ATA ATG TTG CAC TAC TTC AGC GTC CCA AGC TCA CCG TTA CGA CGA AGA G-3'	[41]
		F_5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG TCG GGG CGG TGA TGT AGA GGG TGA TGG TAG ATG TGG CGG	

OLIGO MITO	Da 600000a 960 cps/ μ l	GTT TTA GGG-3'	[41]
		R_ 5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CTA CCA TCA CCC TCT ACATCA CCG CCC CGA CCT TAG CTC TCA CCA TCG CTC-3'	

Tabella 5__Sequenze dell'oligonucleotide sintetico dell'IPC e del genoma sintetico mitocondriale

La prima operazione effettuata consiste nella preparazione degli standard per formare la curva della reazione. Secondo le linee guida MIQE, sono necessari almeno 5 punti per effettuare tale curva, effettuati in triplicato per garantire una corretta ripetibilità dei risultati [34].

Lo Standard utilizzato per la quantificazione del DNA nucleare è il G1521 Human Genomic DNA Female, commercializzato dalla ditta Promega. Questo standard è stato poi preparato in 8 diluizioni seriali (Tabella 6) per arrivare da una concentrazione iniziale di 62,5 ng/ μ l fino a 0,0008 ng/ μ l.

Conc. [ng/ μ l]	Volume G1521
62.5 ng/ μ l	Diluizione basata sullo standard G1521
12.5 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 62,5 ng/ μ l
2.5 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 12,5 ng/ μ l
0.5 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 2,5 ng/ μ l
0.1 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 0,5 ng/ μ l
0.02 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 0,1 ng/ μ l
0.004 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 0,02 ng/ μ l
0.0008 ng/ μ l	5 μ l della diluizione 0,004 ng/ μ l

Tabella 6__ diluizioni seriali dello standard

Oltre allo standard è necessario preparare anche l'oligonucleotide che funge da template per la reazione IPC. È necessario prima di tutto diluire l'oligonucleotide ad una concentrazione di 100 μ M, corrispondente a 6×10^{13} copie/ μ l, successivamente si preparano delle ulteriori diluizioni seriali fino ad ottenere la quantità ottimale di 600.000 copie/ μ l.

Per quanto riguarda il DNA mitocondriale, si è presentata la necessità di capire quante copie equivalenti di DNA mitocondriale (mtGE) fossero presenti in ciascuna delle diluizioni dello standard G1521. Per questo si è allestita una reazione singleplex, in cui è stato inserito un oligonucleotide sintetico, riprodotto da un precedente studio [42], complementare alla sonda mtND1, progettato per mimare la doppia elica del DNA mitocondriale, il mitoligo. L'oligonucleotide è stato acquistato ad una concentrazione di 100µM, corrispondente a 6×10^{13} copie/µl. Sono state effettuate poi delle diluizioni per arrivare alla concentrazione iniziale utilizzata nella reazione, ossia 600.000 copie/µl. Infine, da questa diluizione, sono state utilizzate ulteriori 5 diluizioni seriali per arrivare a 960 copie/µl, come riportato in Tabella 7. Nella reazione, oltre alla master mix, sono state aggiunte le cinque diluizioni del mitoligo utilizzato come standard ed effettuate in triplicato, e il G1521, in diluizione da 1 a 8 (con le stesse concentrazioni riportate nella Tabella 6), in duplicato, e l'H₂O per portare ad un volume di 20 µl.

Mitoligo	Concentrazione
100 µM (come acquistato dalla ditta)	$6,0 \times 10^{13}$
1 ^a diluizione	600.000 copie/µl
2 ^a diluizione	120.000 copie/µl
3 ^a diluizione	24.000 copie/µl
4 ^a diluizione	4800 copie/µl
5 ^a diluizione	960 copie/µl

Tabella 7__Diluizioni mitoligo

Protocollo della reazione tetraplex: Tutte le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 20 µl, contenente 2 µl di campione o standard e tutti i reagenti riportati nella Tabella 8. La Quantinova DNA polimerasi presenta un enzima che richiede un'attivazione hot start, ossia che a temperatura ambiente è nella forma inattiva e non ha attività enzimatica, grazie alla tecnologia Q-bond, un sistema di anticorpi che bloccano l'enzima in modo da mantenerlo inattivo fino al raggiungimento dei 95°C, temperatura a cui gli

anticorpi si denaturano lasciando libera la polimerasi di agire. Questo meccanismo previene la formazione e l'estensione degli aspecifici durante la fase di denaturazione. Dal momento che il target mitocondriale risulta molto più abbondante di quello nucleare, essendoci più copie di mtDNA in una stessa cellula, è stata utilizzata la tecnica della "primer limitation" per individuare la concentrazione corretta di ciascuna coppia di primers. Questo procedimento comporta la riduzione della quantità di primer per il target più abbondante. La concentrazione dei primer limitati dovrebbe essere sufficiente per consentire l'amplificazione ma sufficientemente bassa da permettere alla coppia di primer di essere rapidamente utilizzata per la reazione andando a plateau precocemente e lasciando, così, una quantità sufficiente di reagenti per il target meno espresso.

	Volume (μl)	Con. finale
4x Quantinova Multiplex PCR MM	5	
IPC- primer Fw	1	100
IPC- primer Rv	1	100
IPC-probe	1	100
IPC-oligo	1	600.000
nuRNU2_181bp- primer Fw	0,9	900
nuRNU2_181bp- primer Rv	0,9	900
nuRNU2_181bp- probe	1	500
mtND1-primer Fw	1	312.5
mtND1-primer Rv	1	312.5
mtND1-probe	1	100
mt143bp- primer Fw	0,5	312.5
mt143bp- primer Rv	0,5	312.5
mt143bp- primer probe	0,5	100
Standard o campione	2	
H ₂ O	1,7	

La preparazione di tale reazione è stata eseguita dapprima scongelando gli estratti di DNA dei campioni, conservati a -20°C. I campioni sono stati prima sottoposti a vortex e centrifuga, così come tutti i reagenti. Si è inizialmente preparata una mix di reazione contenente la Master Mix, i primer Fw e Rv, l'oligonucleotide IPC e i probes. Successivamente, tale mix di reazione è stata dispensata in tutte le provette da 0,2 ml. Infine, si è aggiunto lo standard o il campione in ogni provetta. Dopo un vortex e la centrifuga, tutti i campioni sono stati allocati nel rotore dello strumento Rotor-Gene 6000 Corbett (Qiagen). Le condizioni della PCR sono state impostate nel seguente modo: 95°C per 2 minuti, per la denaturazione e l'attivazione della polimerasi, come indicato nel manuale del kit QuantiNova Multiplex PCR Kits [45] utilizzato per lo studio, e 40 cicli a 95°C per 3 secondi e 60°C per 30 secondi.

Il vantaggio dell'utilizzo di questo strumento è la possibilità di utilizzare dei rotori circolari che scaldano uniformemente i campioni, che vengono colpiti dalla luce di un LED in fondo alla camera di reazione, comportando l'eccitazione dei fluorocromi, la cui fluorescenza viene catturata da un fotomoltiplicatore. Inoltre, questo strumento presenta la capacità di acquisire fino a 6 canali diversi di fluorescenza, rendendolo particolarmente prestante per reazioni in multiplex.

4.3 Amplificazione dei mini-ampliconi mitocondriali

I risultati ottenuti grazie al saggio tetraplex hanno permesso di individuare il numero di copie di DNA mitocondriale sia per la sonda corta che per la sonda lunga, che ha consentito la stima dell'indice di degradazione di suddetti campioni. Al fine valutare l'informatività dell'indice di degradazione in termini di resa dell'amplificazione del DNA mitocondriale ai fini del sequenziamento, gli estratti di DNA da fusto di capello sono stati sottoposti ad amplificazione di frammenti molto corti, chiamati Mitomini. Tali frammenti presentano un range di ampiezza compreso tra le 144 e le 237 paia di basi e, sovrapponendosi, riescono a coprire l'intera regione di controllo mitocondriale. Tradizionalmente, il protocollo di amplificazione prevedrebbe l'utilizzo di frammenti di circa 300-400 paia di basi ma, dal

momento che molti dei campioni hanno un elevato indice di degradazione, tale amplificazione potrebbe essere debole se non totalmente fallimentare. Questo approccio, già descritto in letteratura da C. Eichmann et al. [46-47], è stato quindi scelto per correlare, tramite amplificazione multiplex in end point e successiva elettroforesi, i risultati raggiunti tramite qPCR. I primers ed i parametri della reazione sono stati ricavati dal lavoro precedente [46].

Inizialmente, sono stati diluiti i primers, acquistati ad una concentrazione di 100µM, fino ad arrivare ad una concentrazione di 10µM. Si sono poi suddivise le dieci coppie di primers in due reazioni distinte: MN1 e MN2.

Nome primer	Taglia amplicone	
F15989	164	CCCAAAGCTAAGATTCTAAT
R16152		AGGTGGTCAAGTATTTATGGTAC
F16197	237	CTTACAAGCAAGTACAGCAATCAAC
R16433		TTGTGCGGGATATTGATTTAC
F16450	172	GCTCCGGGCCATAAACACTTG
R52		AAATGCATGGAGAGCTCCC
F109	185	GCACCCTATGTCGCAGTATCTGTC
R293		AATTTTTTGTATGATGTCTGTGTGG
F317	144	CTTCTGGCCACAGCACTTAAAC
R460		AGGGGAAAATAATGTGTTAGT

Tabella 9_elenco primers reazione MN1 [46].

Nome primer	Taglia amplicone	Sequenza primer 5'-3'
F16094	155	TCGTACATTAAGTCCAGYC
R16248		GTTGCAGTTGATGTGTGATAG

F16363	147	CCCCATGGATGACCCCCC
R16509		AGGAACCAGATGTCGGATAC
F16533	217	TAGCCCACACGTTCCCCTT
R180		AATATTGAACGTAGGTGCGATAAAT
F220	170	TGCTTGARGACATAATAAYA
R389		CTGGTTAGGCTGGTGTAGGGT
F402	218	ATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTA
R619		AACATTTTCAGTGTATTGCTTTGAG

Tabella 10_elenco primers reazione MN2 [46].

Protocollo di reazione: La reazione multiplex di PCR è stata allestita per tutti i sedici campioni presenti nella Tabella 4. I dieci mini-frammenti sono stati amplificati tramite due differenti reazioni di PCR multiplex. Entrambi saggi sono stati effettuati in un volume finale di 50 μ l. I reagenti necessari per far avvenire la reazione sono l'1 \times BD Advantage 2 SA PCR Buffer, contenente diversi elementi per la reazione di amplificazione, dNTPs ad una concentrazione di 40 μ M, l'Advantage polimerasi, il DNA del campione, i primers, diversi per ciascuna mix e H₂O per portare a volume di 50 μ l. Inizialmente sono state preparate le due mix di primers, con le seguenti concentrazioni:

MN1	Volume per ciascun campione (μ l)	MN2	Volume per ciascun campione (μ l)
F15989	1	F16094	1,5
R16152	1	R16248	1,5
F16197	0,75	F16363	0,35
R16433	0,75	R16509	0,35
F16450	0,6	F16533	1,5
R52	0,6	R180	1,5

F109	0,5	F220	1,5
R293	0,5	R389	1,5
F317	0,5	F402	1,5
R460	0,5	R619	1,5

Tabella 11_primer mix mitomini

Una volta ottenute le mix, si è allestita la reazione finale in un volume di 50µl così composta:

	Multiplex1 (MN1)	Multiplex2 (MN2)
2 SA Buffer	5	5
dNTPs (40µM)	1	1
Advantage Polimerasi	1	1
Primer Mix	6,7	12,7
DNA	*	*
H ₂ O	*	*

Tabella 12_protocollo reazione mitomini

*Il DNA, ossia il campione, e l'H₂O sono stati inseriti a seconda dei parametri descritti nello studio [46] per raggiungere una quantità ideale di copie/µl, che corrisponde a 1000 copie/µl. Tuttavia, non è sempre stato possibile inserirne questo numero, in quanto non presenti nell'estratto. Si discuteranno in sede di analisi anche le ripercussioni osservate sull'esito dell'amplificazione e quindi, della rilevazione dei frammenti legate alla diversa quantità di copie/µl presenti nei campioni.

La quantità di copie inserita nella reazione per ciascun campione è di seguito riportata nella Tabella 14, insieme alla quantità di campione (DNA) utilizzato.

ID CAMPIONE	MtGE/μL	DNA utilizzato (in μl)
1_H1.1	1000	6,6
1_H1.5	675	18
1_H1.9	23,9	18
1_H2.1	100	17
1_H2.5	238	18
1_H2.9	1000	16,3
1_H3.1	427	19,25
1_H3.5	20,8	17,5
1_H3.9	156	19,5
M5 GHEP 2016	1000	9,5
6864-3	1000	0,65
5898	1000	1
5899-1	1000	1,3
5899-2	602	9,5
5900- 1	1000	1,8
5900-2	1000	0,65
Standard 3 (controllo)	76.000	1

Tabella 13_copie di mtGE/ μ l utilizzate nella reazione multiplex dei mini-amplificoni mitocondriali

Le due reazioni multiplex sono poi state amplificate in termociclatore VeritiPro Thermal Cycler, secondo letteratura [46]: una denaturazione iniziale a 95°C per 2 minuti, seguita da 39 cicli di amplificazione, ciascuno composto da 95°C per 15 secondi, 57°C per 10 secondi e 72°C per 10 secondi. Una volta terminata l'amplificazione, il prodotto può essere conservato a +4°C.

Dopo l'amplificazione, i frammenti amplificati sono stati separati su gel d'agarosio, prodotto in laboratorio. La concentrazione del gel scelta è del 2%. La preparazione del gel è stata effettuata utilizzando del TE Buffer 1x, diluito da una concentrazione iniziale 10x, a cui sono stati aggiunti 3 g di agarosio in polvere. Il composto è stato scaldato su piastra magnetica in agitazione, ad una temperatura di circa 250°C per pochi minuti, ed infine è stato aggiunto un colorante intercalante per la rilevazione delle bande. Il gel è stato infine solidificato su apposito supporto.

Una volta pronto, nei vari pozzetti del gel sono stati inseriti gli amplificati ed i loading buffer (2 µl buffer di corsa+ 5µl di campione amplificato) ed è stata effettuata una corsa elettroforetica di 1 ora e 15 minuti, ad un voltaggio di circa 150V.

Inoltre, un'ulteriore conferma è stata eseguita tramite strumento TapeStation della ditta Agilent. Questo strumento permette di effettuare corse elettroforetiche molto brevi, rendendo digitalmente i picchi presenti sul gel sotto forma di grafico. Per effettuare questa ulteriore corsa, sono stati inseriti 2µl di buffer dedicato e 2µl di campione, per un volume finale di 4µl. I campioni sono stati vortexati e caricati negli specifici alloggi, insieme ai puntali richiesti dallo strumento e la card contenente i vari lane di reazione, che mimano un gel in pochissimo spazio.

Al fine di avere un controllo di reazione positivo in entrambe le corse elettroforetiche, è stato amplificato come campione di controllo lo Standard 3 della reazione tetraplex in qPCR, la cui quantizzazione di DNA era già nota, e corrispondente a 76.000 mtGE/µl.

Capitolo 5

Analisi e Discussione dei Risultati

5.1 Risultati del saggio qPCR tetraplex

La quantificazione in qPCR utilizzando il saggio tetraplex ha avuto esito positivo, rientrando nei parametri di validazione richiesti dalle linee guida MIQE [34]. Tra i parametri che sono stati valutati possiamo elencare:

L'assenza di inibizione della reazione di PCR: la presenza di inibitori che possano inficiare la reazione è stata scongiurata inserendo un IPC nella reazione. La cinetica della curva viene evidenziata nella Figura 11, e mostra un andamento coerente con quanto atteso, in quanto la curva sia degli standard che dei campioni assume un andamento estremamente simile, indicando un'efficace reazione sia per gli standard che per i campioni inseriti.

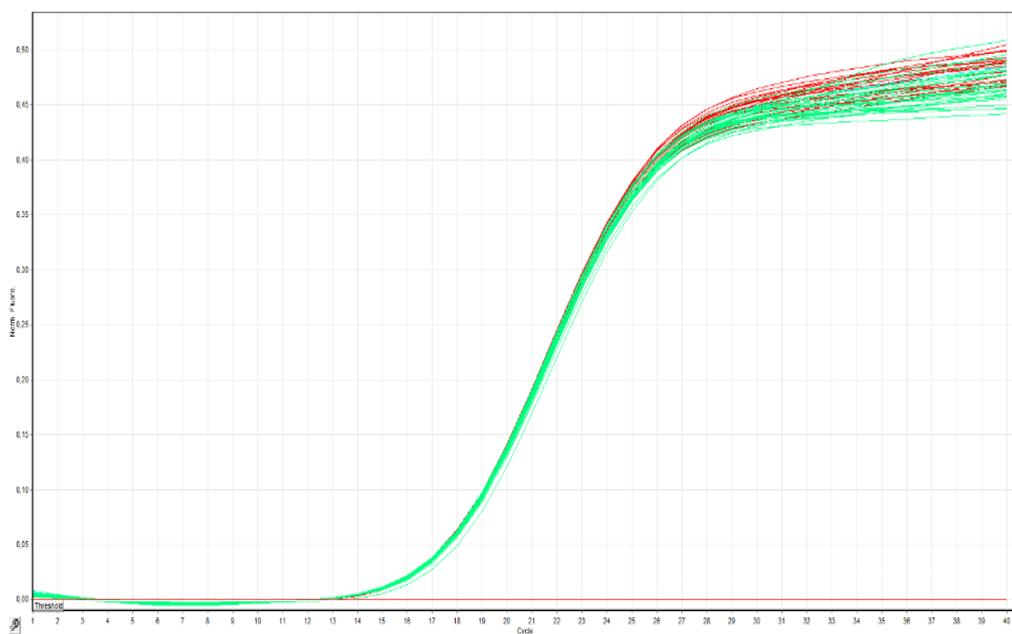


Figura 11_curva della cinetica di reazione dell'IPC.

Parametri della curva: la curva standard per la quantificazione nucleare è stata costruita con una serie di diluizioni seriali dello standard G1521 Human Genomic DNA Female, a partire da 62,5 ng/μl fino ad una concentrazione di 0,0008 ng/μl. L'efficienza di reazione, la linearità della curva e l' R^2 sono stati confermati essere all'interno del range indicato nelle linee guida, indicando così la robustezza del saggio (Tabella 14).

Target	R ²	Efficienza PCR	Slope
Mitocondriale corto	0.983	1.12	-3.066
Mitocondriale lungo	0.995	0.99	-3.348
Nucleare lungo	0.980	1.00	-3.556

Tabella 14_parametri efficienza della reazione tetraplex per le varie sonde.

Una volta verificati i requisiti di idoneità del saggio, si procede all'analisi dei risultati ottenuti. L'amplificazione della sonda nucleare, per quanto riguarda i capelli, non è avvenuta, ma ciò non sorprende. I capelli sono una di quelle matrici in cui non è possibile DNA nucleare nel fusto, per cui il lavoro di quantizzazione si è concentrato nella rilevazione del DNA mitocondriale nei campioni appartenenti a sette diversi individui. In particolare, i capelli 1_H1.1, 1_H1.5, 1_H1.9 (analogamente a 1_H2 e 1_H3) sono stati prelevati in modo che rappresentino il primo, il quinto e il nono frammento del fusto di uno stesso capello, in modo da evidenziare le differenze nel contenuto di DNA mitocondriale a mano a mano che ci si allontana dal bulbo. I risultati dell'amplificazione sono evidenziati nella Figura 12, dove viene proposto un confronto tra l'amplificazione della sonda mitocondriale corta e del target nucleare. Le curve marcate in verde sono relative ai campioni, mentre le rosse agli standard. Gli standard sono stati amplificati in triplicato ed alcuni valori sono stati rimossi per migliorare l'efficienza della reazione, seppur mantenendo i principi delle linee guida.

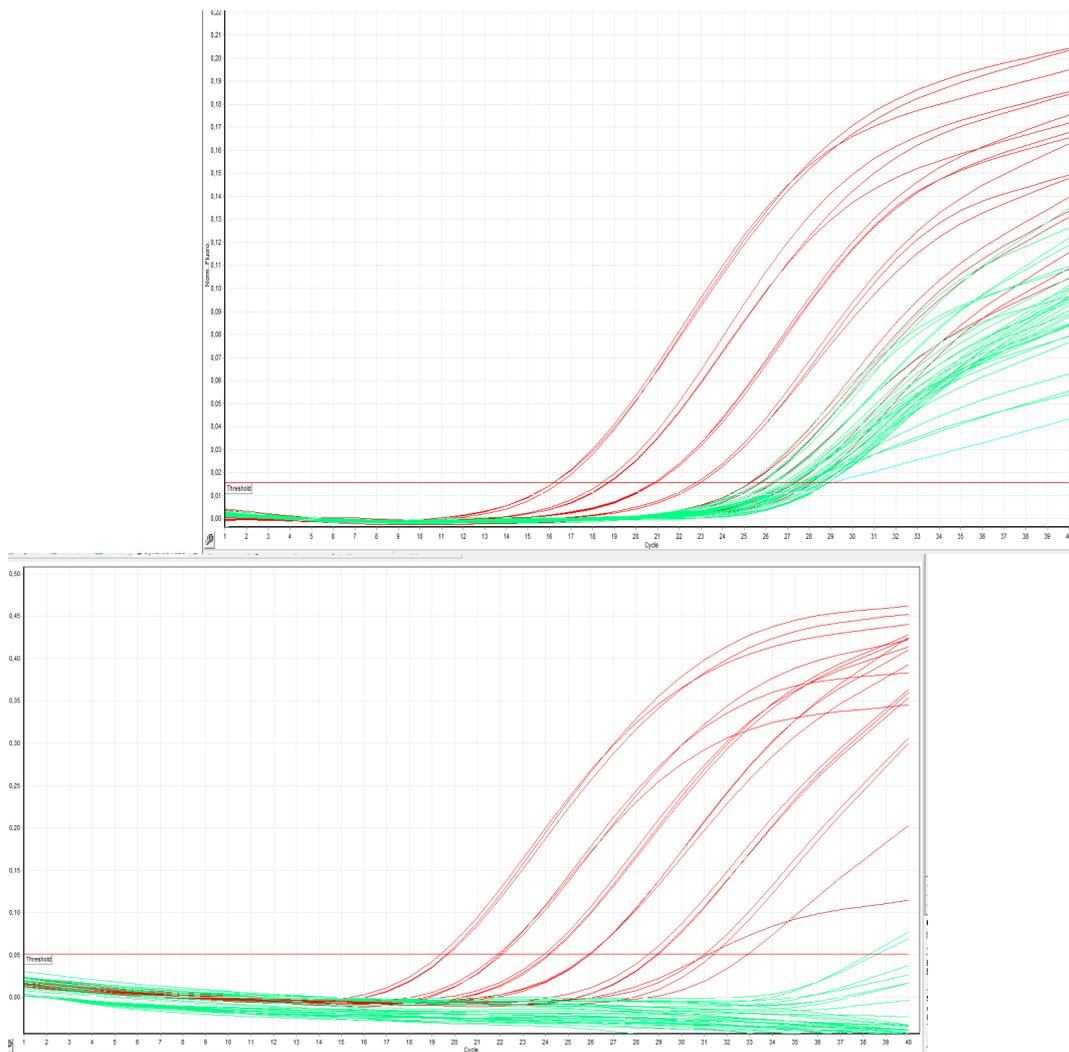


Figura 12_ confronto tra l'amplificazione del target mitocondriale corto (in alto) e quella nucleare (in basso) per campioni di capelli.

I risultati così ottenuti hanno permesso di calcolare il numero di copie presenti nei campioni, a partire dai valori degli standard precedentemente calcolati nella reazione in singleplex. Lo strumento di analisi ha provveduto ad effettuare un calcolo automatico in base ai parametri inseriti (copie mtGE/ μ l degli standard) e quelli ottenuti nella reazione. Dal momento che i campioni sono stati effettuati in doppio, il risultato finale è il prodotto della media ottenuta dalla quantificazione della coppia di ciascun campione.

Nella Tabella 15, dunque, troviamo i valori medi del numero di copie di DNA mitocondriale sia per quanto riguarda la sonda corta, sia per quanto riguarda la sonda lunga. In aggiunta, questi valori sono stati rapportati tra loro per ricavare l'indice di degradazione. Ciò che si è quindi osservato è l'aumento della quantità di DNA mitocondriale frammentato in modo

direttamente proporzionale all'allontanamento dal bulbo pilifero. Di conseguenza, all'aumentare della distanza della radice, aumenta anche l'indice di degradazione. Le copie di mtDNA riscontrate variavano da 401,07 a 3.543,71 (mtGE/ μ l) per il target corto e 1.19 a 2.642,92 (mtGE/ μ l) per il target lungo.

Campioni	mtND1 69 bp (mtGE/ μ l)	mt143bp (mtGE/ μ l)	Indice di degradazione
1_H1.1	960,43	151,88	6.32
1_H1.5	665,34	37,50	17.74
1_H1.9	401,07	1,33	301.02
1_H2.1	411,19	23,65	17.39
1_H2.5	666,03	13,24	50.29
1_H2.9	696,58	1,19	583.62
1_H3.1	634,37	61,48	10.32
1_H3.5	742,78	22,19	33.48
1_H3.9	1.159,83	8,00	144.93
M5 GHEP 2016	871,99	110,54	7.89
6864-3	3.543,71	1.602,13	2.21
5898	2.945,82	2.642,92	1.11
5899-1	1.106,26	818,75	1.35
5899-2	991,52	63,44	15.63
5900- 1	1.670,00	599,25	2.79
5900-2	1.880,13	1.639,55	1.15

Tabella 15_Confronto valori di quantizzazione per il target mitocondriale corto (mtND1) e il target mitocondriale lungo (mt143bp) per i fusti di capelli. Nell'ultima colonna è calcolato l'indice di degradazione per il DNA mitocondriale (rapporto mtND1/mt143bp).

I risultati del saggio tetraplex sui campioni di DNA estratti da ossa, denti, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), e unghie sono riportati in tabella 16. Nella stessa tabella 16 sono riportati anche i risultati di quantificazione relativi al DNA nucleare ottenuti utilizzando il kit commerciale Plexor® HY System (Promega) e per il campione 1989-A, con il Quantifiler™ Trio DNA Quantification kit (Thermo Fisher Scientific).

Matricce	Campione	Metodo quantificazione	Plexor HY[] ng/μl	Tetraplex[] ng/ μl
Denti	5877	Plexor® HY System	0,19 3	0,13 9
	6587-2	Plexor® HY System	0,32 0	0,00 5
	6587-1	Plexor® HY System	0,03 4	0,00 2
	5672-2	Plexor® HY System	0,05 4	0,02 2
	7220-A	Plexor® HY System	0,06 0	0,00 7
	7253-1	Plexor® HY System	3,33 0	0,13 9
	5876	Plexor® HY System	0,02 6	NEG
	7064-A	Plexor® HY System	0,024	0,008
Tessuti FFPE	6244	Plexor® HY System	0,023	0,007
	6950 A	Plexor® HY System	8,490	0.700
	6950 F	Plexor® HY System	0,440	0,006
	6267-B	Plexor® HY System	0,887	0,682
Unghie	6295	Plexor® HY System	4,540	1,841
	6413-B	Plexor® HY System	0,418	0,067
	6170-1	Plexor® HY System	0,610	0,128
	6863-1	Plexor® HY System	0,840	0,219
	6290-A	Plexor® HY System	1,500	0,263
	5869	Plexor® HY System	4,660	1,146
	1989-A	Quantifiler™ Trio DNA	26,551	18,782
Ossa	6344	Plexor® HY System	0,603	0,508
	2576	Plexor® HY System	1,800	0,897
	5894-B	Plexor® HY System	8,061	5,543
	5883	Plexor® HY System	20,030	7,076
	7065- A2	Plexor® HY System	41,170	51,098
	6259 D	Plexor® HY System	80,200	70,285
	6259 A	Plexor® HY System	110,00 0	96,909
	6916	Plexor® HY System	0,024	0,111
	5903	Plexor® HY System	0,024	0,003
	6001-C	Plexor® HY System	0,022	0,003
	5775	Plexor® HY System	0,019	0,017

5.2 Risultati dell'amplificazione dei mini-ampliconi mitocondriali

L'analisi dei mini-ampliconi mitocondriali è avvenuta tenendo in considerazione i valori rappresentati nella Tabella 14. Infatti, si è inserita una quantità di DNA diversa a seconda del campione, tenendo in considerazione il numero di copie di DNA per microlitro, cercando di arrivare al valore di 1000 mtGE. Tuttavia, non tutti i campioni sono risultati in quantità sufficiente per poter raggiungere tale concentrazione. Il significato dell'amplificazione, ciò nonostante, è stato quello di verificare il rapporto tra la quantificazione, l'indice di degradazione e la possibilità di ritrovare tali prodotti di amplificazione, in modo da poter fornire, in sede successiva, un profilo del genoma mitocondriale a partire dal campione in esame.

n. pozzetto	Campioni
1	1_H1.1
2	1_H1.5
3	1_H1.9
4	1_H2.1
5	1_H2.5
6	1_H2.9
7	1_H3.1
8	1_H3.5
9	1_H3.9
10	M5 GHEP 2016
11	6864-3
12	5898
13	5899-1
14	5899-2
15	5900- 1
16	5900-2

La separazione su gel di agarosio ha permesso di osservare importanti elementi. Innanzi tutto, come da Figura 13, è possibile vedere come lo standard ST3 ed i campioni M5 GHEP 2016, 6864-3, 5900-2 (rispettivamente pozzetto 10 ,11, 16) presentino delle intense e con mobilità elettroforetica attesa, relativamente alla taglia degli ampliconi (min. 144 bp – max. 237bp). Questo è un risultato atteso, infatti il numero di copie di DNA mitocondriale è ottimale in questi campioni e l'indice di degradazione prossimo a 1 è sintomatico dell'assenza di degradazione. Per quanto riguarda invece i campioni n. 12, 13 e 15, nonostante presentino delle caratteristiche simili a quelli sopra descritti (non degradati e DNA ottimale) hanno prodotto un pattern elettroforetico molto debole, con una discreta proporzione di dimeri di primers.

I campioni dal n. 1 al n. 9 e il campione n.14 (tabella 17) non hanno mostrato nessuna banda corrispondente ai prodotti di amplificazione attesi, se non la banda più corta corrispondente ai dimeri dei primers. Considerando l'elevato indice di degradazione e il numero basso di copie di genoma mitocondriale amplificate, questo risultato era del tutto atteso, tranne che per il campione H1.1 (pozzetto N. 1), che presentava un numero di copie e un indice di degradazione simile al campione M5.

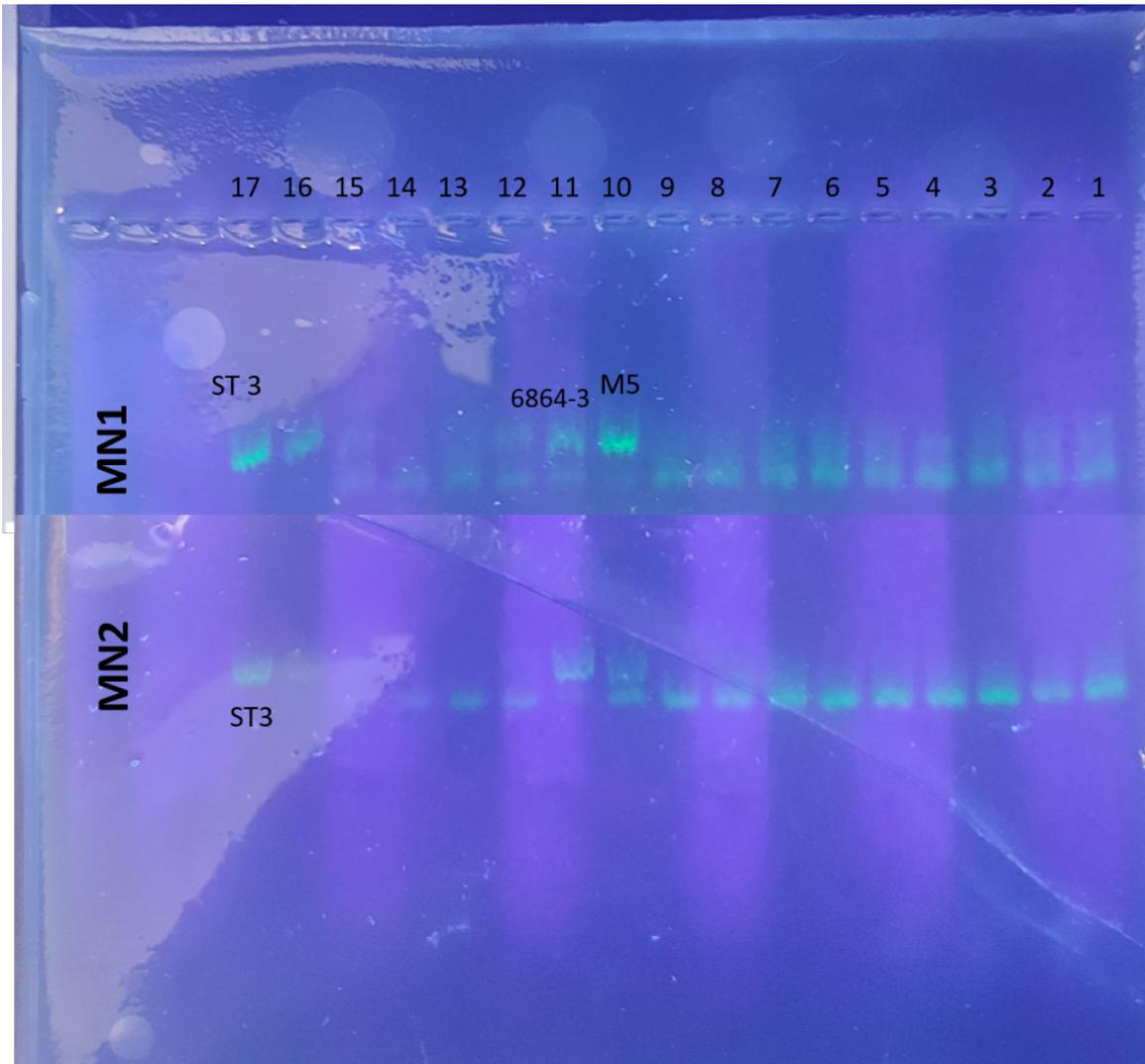


Figura 13_corsa elettroforetica su gel di agarosio mitomini.

Al fine di valutare i risultati dell'amplificazione in maniera più specifica, i campioni amplificati H3.5, H3.9, M5, 6864-3, 5898 e ST3 sono stati sottoposti a elettroforesi capillare mediante lo strumento Agilent tape Station. Il vantaggio di tale tecnica risiede nel fatto che è molto più sensibile e ha un'elevata capacità di separazione e quindi ha maggiori capacità di discriminare ampliconi che presentano taglie simili.

AI: MN1_ST3

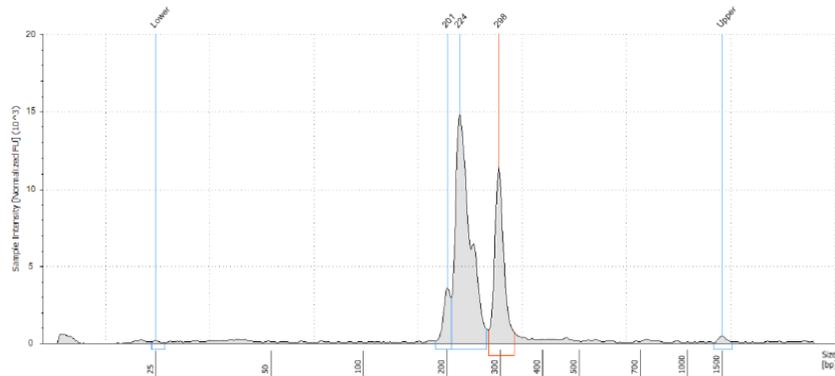


Figura 14_elettroforesi tramite TapeStation dello st3_MN1

Come è possibile osservare nel grafico di analisi per la reazione MN1 dello Standard 3, l'amplificazione è avvenuta correttamente e la separazione dei frammenti restituisce dei picchi sovrapponibili a quelli del pattern atteso secondo il precedente lavoro in materia [46]. Lo stesso discorso vale per la reazione MN2, come riportato nella Figura 15.

B1: MN2_ST3

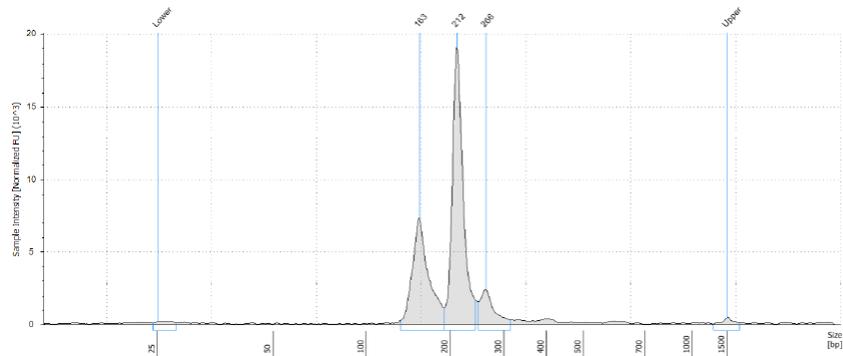


Figura 15_elettroforesi tramite TapeStation dello st3_MN2

Confrontando questo campione di riferimento con i campioni analizzati nella stessa seduta, è possibile osservare degli importanti elementi:

- Campioni con un alto indice di degradazione, come ad esempio 1_H3.9, presentano un'alta presenza di dimeri di primer, confermando quanto visualizzato anche su gel di

agarosio. Dal momento che il numero di copie di mtDNA non è ottimale ed è molto degradato, la reazione fallisce e non si amplificano i mini-ampliconi. Considerando che le sonde mitocondriali inserite nel saggio tetraplex di qPCR amplificano regioni di 69 paia di basi e 143 paia di basi, il risultato è coerente in quanto l'ampiezza di queste piccole regioni è comunque superiore e va da un range compreso tra 144 e 237 paia di basi.

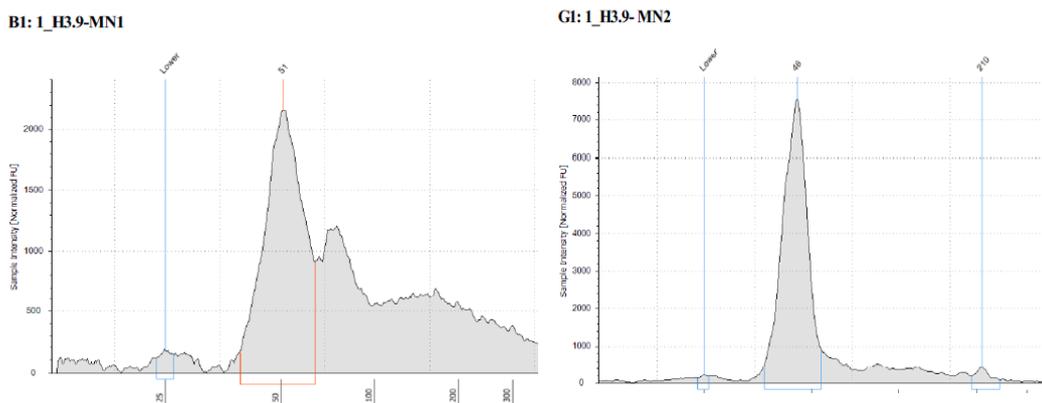


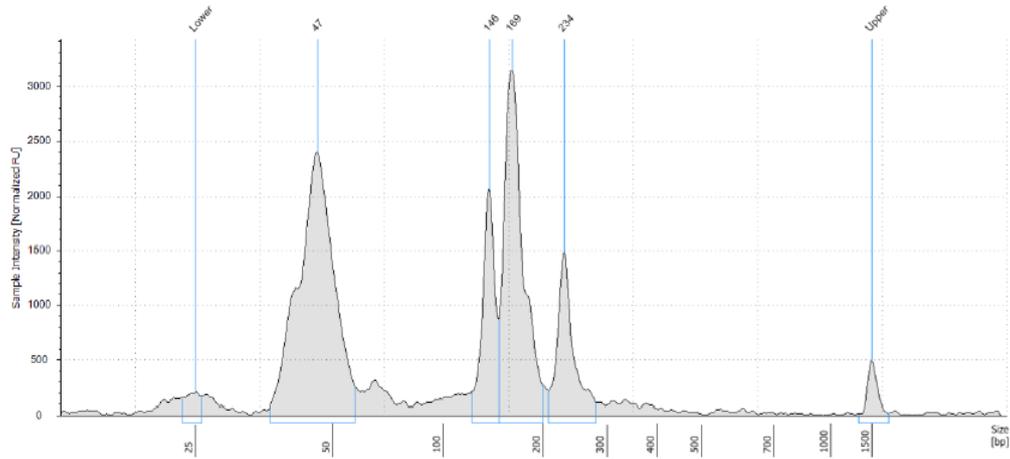
Figura 16_ separazione tramite TapeStation del campione 1_H3.9, in cui si evidenzia un picco in corrispondenza ai dimeri di primer, mentre non ci sono picchi specifici per quanto riguarda l'amplificazione dei mini-ampliconi.

- Campioni con un ottimale rapporto mtGE/ μ l e un basso indice di degradazione, invece, mostrano un pattern di amplificazione molto simile a quello dello Standard 3, utilizzato come controllo. Dai risultati ottenuti, si è evinto come entrambi i parametri relativi al numero di copie presenti e all'indice di degradazione agiscano in realtà insieme nel determinare il successo dell'amplificazione.

Nella Figura 17 viene mostrato il risultato ottenuto riguardo al campione 5898; sebbene compaia un picco a circa 47 basi, corrispondente a dimeri di primers, l'amplificazione

dei mini-amplificoni ha avuto comunque esito positivo.

E1: 5898- MN1



B2: 5898- MN2

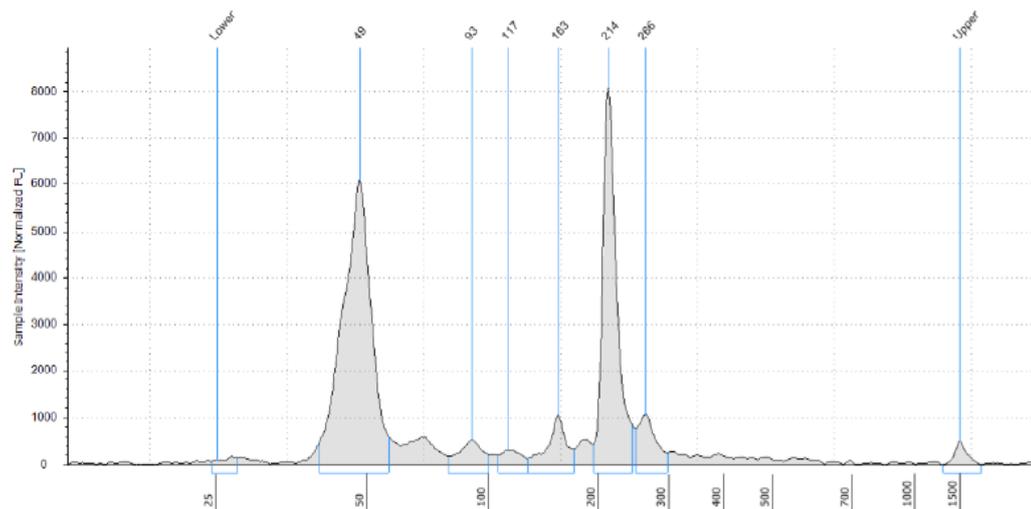


Figura 17_separazione elettroforetica tramite TapeStation del campione 5898_MN1 e MN2.

Capitolo 6

Conclusioni

Il saggio tetraplex sviluppato per questo studio ha permesso di quantificare sia il DNA nucleare, utilizzando un target di 181 paia di basi, che il DNA mitocondriale, tramite l'utilizzo di due sonde, una corta e una lunga, che amplificano target di 69 paia di paia e di 143 paia di basi, rispettivamente; inoltre, per identificare la presenza di inibitori si è inserito nella reazione un IPC da 70 paia di basi. La conformità alle linee guida indicate per questo tipo di studio, le linee guida MIQE [34], hanno permesso di confermare la robustezza di questo saggio: tutti i valori, come la linearità (R^2), l'efficienza di PCR, l'intercetta Y e slope, sono rientrati nel range indicato, in modo da poter dimostrare l'attendibilità dello studio. Per il target nucleare, non sorprende che nessuno dei fusti di capelli ha mostrato copie di DNA nucleare rilevabile ed i risultati ottenuti sono stati valutati esclusivamente dal punto di vista del DNA mitocondriale. Infatti, nonostante il DNA nucleare sia più indicato per la tipizzazione di profili individuali in casi forensi, è altresì necessario ricordare che quando i campioni sono altamente degradati o si tratta di capelli, denti ed ossa, la possibilità di ritrovare del DNA nucleare sono molto scarse. Nel saggio, al fine di poter utilizzare solo una curva standard valida sia per il nucleare che per il mitocondriale, sono state stimate il numero di copie di DNA mitocondriale/ μ l sullo standard G1521 Human Genomic Female DNA. Il calcolo è stato eseguito mediante l'inserimento di uno standard a doppia elica a concentrazione nota. Anche in questo caso, i parametri di PCR indagati hanno stabilito l'attendibilità della reazione, con un'efficienza del 89% e un $R^2 > 0,998$.

I campioni presi in esame sono costituiti da campioni di DNA estratto da diverse tipologie di materiale biologico (ossa, denti, tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), unghie e capelli). Sui fusti di capelli si è osservato che l'aumento della quantità di DNA

mitocondriale frammentato è direttamente proporzionale all'allontanamento dal bulbo pilifero. Di conseguenza, all'aumentare della distanza della radice, aumenta anche l'indice di degradazione. Grazie alla presenza di una sonda mitocondriale lunga e di una corta, è stato possibile ricavare l'indice di degradazione relativo ai campioni di fusti di capelli. Al fine di poter mettere in relazione questo risultato con altre metodiche validate in letteratura [46-47], il passo successivo è stato quello di allestire una reazione per la rilevazione di mini-ampliconi mitocondriali.

I risultati dell'amplificazione in multiplex dei mini-ampliconi mitocondriali sono stati analizzati sia tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%, sia tramite lo strumento TapeStation (Agilent), al fine di identificare l'ampiezza dei frammenti amplificati. Il risultato ottenuto conferma la correlazione tra la quantificazione ottenuta con la PCR tetraplex e l'amplificazione di questi marcatori. Ciò che inoltre è stato osservato è che la capacità di tali marcatori di essere amplificati non è legata semplicemente al numero di copie di mtDNA presenti, ma c'è una stretta relazione tra l'esito dell'amplificazione e l'indice di degradazione. Infatti, se entrambi i parametri, secondo quanto risulta dal saggio tetraplex, sono ottimali, l'amplificazione dei marcatori avviene correttamente; al contrario, seppure il numero di copie inserite nella reazione sia sufficiente ma il DNA appare molto degradato, si osserva una maggiore comparsa di dimeri di primers e una insufficiente amplificazione dei marcatori. Questo risultato non è incongruente con quello ottenuto con la tetraplex, bensì è legato al fatto che le sonde utilizzate hanno come target regioni molto piccole, di 69 paia di basi e di 143 paia di basi, mentre l'ampiezza dei mini-ampliconi mitocondriali ricercati va dalle 144 alle 237 paia di basi.

In conclusione, è possibile affermare che il saggio tetraplex messo a punto sia affidabile e robusto ed i risultati ottenuti tramite il suo utilizzo sono coerenti con quelli espressi da metodiche già validate nella letteratura di ambito forense.

BIBLIOGRAFIA

[1] A. Tagliabracci, F. Alessandrini, L. Mazzarini, V. Onofri, N. Onori, C. Turchi, *Introduzione alla genetica forense: indagini di identificazione personale e di paternità*, 2010, Springer; DOI: 10.1007/978-88-470-1512-8.

[2] J. M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Elsevier, 2012; <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04189-3>.

[3] M. Genuardi, G. Neri, *Genetica umana e medica* (2017), Edra.

[4] Oldt, Robert F.; Kanthaswamy, Sreetharan (2019). Expanded CODIS STR allele frequencies - evidence for the irrelevance of race-based DNA databases. *Legal Medicine*, (), 101642-. doi:10.1016/j.legalmed.2019.101642.

[5] L.A. Welch; P. Gill; C. Phillips; R. Ansell; N. Morling; W. Parson; J.U. Palo; I. Bastisch (2012). European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. , 6(6), -. doi:10.1016/j.fsigen.2012.03.005.

[6] PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Promega, Revised 12/18 TMD045.

[7] PowerPlex® ESX 17 Fast System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Promega, Revised 1/21 TMD040.

[8] Yan, Duanmu, Zeng, Liu, Song, *Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination*. (2019). *Cells*, 8(4), 379-. doi:10.3390/cells8040379.

[9] R. Saferstein, *Forensic Science: From the Crime Scene to the Crime Lab*, 4th Edition, Pearson, 2019.

[10] Ivanov, Pavel L.; Wadhams, Mark J.; Roby, Rhonda K.; Holland, Mitchell M.; Weedn, Victor W.; Parsons, Thomas J. (1996). Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II., *12*(4), 417–420. doi:10.1038/ng0496-417.

[11] Dabney, J.; Meyer, M.; Paabo, S. (2013). Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(7), a012567–a012567. doi:10.1101/cshperspect.a012567.

[12] Peter Rossmannith; Barbara Röder; Karin Frühwirth; Claus Vogl; Martin Wagner (2011). Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. , *89*(2), 407–417. doi:10.1007/s00253-010-2943-2.

[13] Fahmi, Tariq; Wang, Xiaoying; Zhdanov, Dmitry D.; Islam, Intisar; Apostolov, Eugene O.; Savenka, Alena V.; Basnakian, Alexei G. (2020). DNase I Induces Other Endonucleases in Kidney Tubular Epithelial Cells by Its DNA-Degrading Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8665–. doi:10.3390/ijms21228665.

[14] Samejima, Kumiko; Earnshaw, William C. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis., *6*(9), 677–688. doi:10.1038/nrm1715.

[15] Ting-Jun FAN; Li-Hui HAN; Ri-Shan CONG; Jin LIANG (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis., *37*(11), 719–727. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x.

[16] Amente, Stefano; Di Palo, Giacomo; Scala, Giovanni; Castrignanò, Tiziana; Gorini, Francesca; Coccozza, Sergio; Moresano, Angela; Pucci, Piero; Ma, Bin; Stepanov, Irina; Lania, Luigi; Pelicci, Pier Giuseppe; Dellino, Gaetano Ivan; Majello, Barbara (2018). Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian

cells. *Nucleic Acids Research*, (), -. doi:10.1093/nar/gky1152.

[17] M. Thomas P. Gilbert; Eske Willerslev; Anders J. Hansen; Ian Barnes; Lars Rudbeck; Niels Lynnerup; Alan Cooper (2003). Distribution Patterns of Postmortem Damage in Human Mitochondrial DNA., *72*(1), 0–47. doi:10.1086/345378.

[18] A. Lackey, How To Evaluate Forensic DNA Quality With Quantifiler Trio DNA Quantification Kit, ThermoFisher, <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-to-evaluate-forensic-dna-quality-with-quantifiler-trio-dna-quantification-kit/>.

[19] Steven B. Lee, Bruce McCord and Eric Buel, Advances in Forensic DNA Quantification: A Review, *Electrophoresis*, 2014 Nov;35(21-22):3044- 52; DOI: 10.1002/elps.201400187.

[20] Agilent 4200 TapeStation System System Manual, Agilent Technologies, Document No: SD-UF0000087 Rev. D EDITION 02/2021.

[21] Lincoln, Patrick J.; Thomson, Jim (1998). Forensic DNA Profiling Protocols Volume 98 | | Manual Electrophoretic Methods for Genotyping Amplified STR Loci. , 10.1385/0896034437(), 181–192. doi:10.1385/0-89603-443-7:181.

[22] J. A. Nicklas, E. Buel, Quantification of DNA in forensic samples, *Anal Bioanal Chem* (2003) 376: 1160–1167; DOI: 10.1007/s00216-003-1924-z.

[23] P S Walsh, J Varlaro, R Reynolds, A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA, *Nucleic Acids Res.* 1992 Oct 11;20(19):5061-5; DOI: 10.1093/nar/20.19.5061.

[24] Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits, Thermo Fisher Scientific, Revised: 10-June-2008 | MP 07581, 2008.

[25] M N Mandrekar, A M Erickson, K Kopp, B E Krenke, P V Mandrekar, R Nelson, K Peterson, J Shultz, A Tereba, N Westphal, Development of a human DNA quantitation

system, *Croat Med J* 2001 Jun;42(3):336-9.

[26] Fockler, Carita; Dollinger, Gavin; Watson, Robert; Higuchi, Russell (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions., 11(9), 1026–1030. doi:10.1038/nbt0993-1026.

[27] Arya, Manit; Shergill, Iqbal S; Williamson, Magali; Gommersall, Lyndon; Arya, Neehar; Patel, Hitendra RH (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR., 5(2), 209–219. doi:10.1586/14737159.5.2.209.

[28] Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154–160 (1997).

[29] Chaoyong James Yang, Weihong Tan, Application of Molecular Beacons in Real-Time PCR., 2013 Jul 18. doi: 10.1007/978-3-642-39109-5_3.

[30] Thelwell, N. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research*, 28(19), 3752–3761. doi:10.1093/nar/28.19.3752.

[31] Taq PCR Kit, Version 4.0_1/20, NEB #E5000S, New England BioLab.

[32] Thermo Fisher Scientific, Real-Time PCR handbook; <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time- pcr-handbook.pdf>.

[33] Bio Rad Laboratories, PCR Troubleshooting; <https://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S>.

[34] Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Shipley, G. L. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments., 55(4), 611–622.

doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

[35] Hawkins, S. F. C., & Guest, P. C. (2016). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods in Molecular Biology*, 125–133. doi:10.1007/978-1-4939-6730-8_8.

[36] Plexor1 HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems Technical Manual #TM293, Promega Corporation, 2007.

[37] Lebedev, A. V.; Paul, N.; Yee, J.; Timoshchuk, V. A.; Shum, J.; Miyagi, K.; Kellum, J.; Hogrefe, R. I.; Zon, G. (2008). Hot Start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance. *Nucleic Acids Research*, 36(20), e131–e131. doi:10.1093/nar/gkn575.

[38] Green, Michael R.; Sambrook, Joseph (2018). Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), pdb.prot095125–. doi:10.1101/pdb.prot095125.

[39] Quantifiler™ Duo DNA Quantification Kit, Pub. No. 4387913 Rev. F, Thermo Fisher Scientific.

[40] Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits, Publication Number 4485354 Revision H, Thermo Fisher Scientific.

[41] Xavier, Catarina; Eduardoff, Mayra; Strobl, Christina; Parson, Walther (2019). SD quants – Sensitive Detection Tetraplex-system for nuclear and mitochondrial DNA quantification and degradation inference. *Forensic Science International: Genetics*, (), S1872497319301784–. doi:10.1016/j.fsigen.2019.06.004.

[42] Timken, M.D., et al., Quantitation of DNA for Forensic DNA Typing by qPCR (quantitative PCR): Singleplex and Multiplex Modes for Nuclear and Mitochondrial

Genomes, and the Y Chromosome. 2005, U.S. Department of Justice.

[43] Niederstatter, H., et al., A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 2007. 1(1): p. 29-34.

[44] DNA IQ™ Casework Pro Kit for Maxwell® 16 Technical Manual, Revised 12/16 TM332, Promega.

[45] QuantiNova Multiplex PCR Kit, Revised 06/2016, Qiagen.

[46] Cordula Eichmann; Walther Parson (2008). 'Mitominis': multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. , 122(5), 385–388. doi:10.1007/s00414-008-0227-5.

[47] Cordula Berger; Walther Parson (2009). Mini-midi-mito: Adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. , 3(3), 149–153. doi:10.1016/j.fsigen.2009.01.011.