

Il DNA antico

Marilena Cipollaro

Alcune delle domande cui l'uomo, spinto dall'innata curiosità di conoscere le proprie origini, vorrebbe poter rispondere nella maniera più obiettiva riguardano la ricostruzione sia dell'organizzazione sociale, che delle migrazioni, sia delle espansioni che delle estinzioni delle popolazioni umane del passato. A queste domande si può in parte rispondere attingendo informazioni dalle testimonianze scritte e dal patrimonio culturale. L'osservazione dei resti umani delle popolazioni antiche attraverso un esame morfologico e morfometrico può contribuire a rispondere, anche se talvolta con un margine di errore intrinseco piuttosto elevato, a domande che riguardano il sesso, il tipo di alimentazione e le patologie presenti in epoche passate. La conoscenza di eventi che è impossibile ricostruire solo sulla base delle tradizioni scritte ed orali proprie delle scienze umane è divenuta oggi più facilmente accessibile in seguito alla scoperta che nei tessuti antichi può essere ancora ritrovato, anche se frammentato ed in quantità molto ridotta, il DNA. Nell'analisi di resti antichi questa molecola, oltre ad essere depositaria dell'informazione genetica, assume anche il ruolo di portatrice di molteplici altre informazioni che si possono desumere dalla sua sequenza nucleotidica con l'applicazione di particolari modelli matematici ed algoritmi in cui una delle variabili è il tempo e, più in particolare, l'età del reperto. In tal modo il DNA antico (aDNA) diventa uno strumento per poter studiare l'origine di determinate popolazioni, portando quindi un notevole contributo alla storia evolutiva degli esseri viventi. Negli ultimi decenni, grazie alle tecniche di biologia molecolare, si sono accumulati moltissimi dati su resti antichi di origine

umana, ma anche animale e vegetale.

La tecnica che ha permesso di ottenere tali risultati è costituita dalla PCR (Polymerase Chain Reaction), che consente, partendo anche da una sola molecola di DNA, di ottenere miliardi di nuove molecole tutte identiche a quella originale. È diventato così possibile lo studio sia di geni nucleari, che seguono regole di ereditarietà mendeliana, sia di geni mitocondriali (mtDNA) ereditati solo per via materna, utilizzando campioni di aDNA di diversa provenienza e differente datazione. Le prime ricerche si possono far risalire al 1984 quando alcuni ricercatori [1] di Berkeley riuscirono a clonare il DNA mitocondriale estratto dalla cute del *quagga*, un membro della famiglia *Equus* simile alla zebra attuale, estintosi in Africa meridionale più di un secolo fa. Questa scoperta ha rappresentato il primo recupero di una sequenza di DNA antico filogeneticamente informativa ed ha permesso, attraverso l'analisi comparativa di questa sequenza con quelle di zebre attuali, di dimostrare che il *quagga* aveva una notevole affinità con la zebra e di gran lunga inferiore con altri equidi.

L'anno successivo il gruppo di Paabo, un ricercatore svedese, riuscì ad estrarre e a studiare il DNA di una mummia egizia risalente a 4400 anni or sono [2]. Questa scoperta ha dimostrato che il DNA può conservarsi per lunghi periodi di tempo. Nel 1988 fu, per la prima volta, applicata al DNA umano antico la reazione a catena della polimerasi, amplificando un frammento di DNA mitocondriale estratto da un cervello umano di circa 7000 anni, conservato a Little Salt Spring, in Florida [3].

Il passo successivo fu eseguito da alcuni ricercatori di Oxford [4] che nel 1994

studiarono il DNA estratto dalle ossa umane dei resti presunti della famiglia dello Zar Nicola II, affrontando sperimentalmente il problema del riconoscimento dei vari membri della famiglia e l'esclusione di altri individui che erano stati ritrovati assieme con essi nella stessa caverna.

Nel 1995 furono pubblicati dati sul ritrovamento di spore fungine sui calzari dell'uomo di Similaun, un corpo umano mummificato di 5000 anni fa che fu ritrovato nel 1991 nel comprensorio del Comune di Senales presso Merano a 3270 metri di quota. Nel 1997 furono pubblicati i risultati dello studio del DNA estratto dal *Mammuthus primigenius* estintosi diversi milioni di anni fa. Fece anche molto clamore la pubblicazione delle sequenze di DNA mitocondriale ottenute da un reperto osseo di un uomo di Neandertal. Gli autori confermarono l'ipotesi già sostenuta dagli antropologi secondo la quale l'*Homo sapiens sapiens* non discende dall'*Homo neandertalensis* [5].

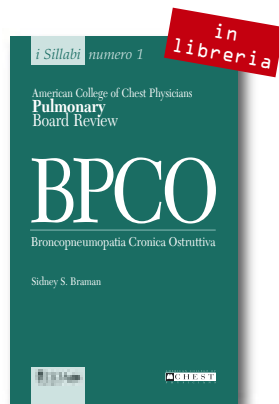
Nel 1997 furono pubblicati i primi dati sull'analisi dell'adna estratto da reperti ossei di Pompei ed Ercolano [6], ricerche proseguite fino ad oggi [7,8,9,10]. Alcune di queste ricerche riguardanti Pompei sono illustrate di seguito.

Principali domande cui può rispondere lo studio dell'adna

Determinazione del sesso:

Quando, per le cattive condizioni o l'incompletezza di un reperto umano non si riesce ad evincerne il sesso, l'analisi del DNA diventa l'unica risorsa possibile. Il gene che codifica per l'amelogenina, una proteina che partecipa alla formazione della dentina. È presente, con sequenza nucleotidica parzialmente diversa, sia sul cromosoma X che sul cromosoma Y. L'amplificazione, attraverso la PCR, proprio del tratto che presenta tali differenze permette di discriminare tra i due cromosomi. Per la determinazione del sesso viene anche amplificato un frammento specifico per il cromosoma Y: solo negli individui di sesso maschile sarà quindi presente un frammento amplificato.

Collana i Sillabi



Per informazioni:

MIDIA srl

Tel. 039 2304440 - Fax 039 2304442

midia@midiaonline.it - www.midiaonline.it

AMERICAN COLLEGE OF
CHEST
PHYSICIANS

Origine etnica

Il genoma mitocondriale [10] è contenuto nei mitocondri, organelli citoplasmatici di antichissima origine endosimbiotica, la cui funzione primaria è di fornire energia alla cellula attraverso la fosforilazione ossidativa. Il DNA mitocondriale (mtDNA) è estesamente e proficuamente utilizzato per comprendere la storia evolutiva della nostra specie e la dinamica delle migrazioni delle popolazioni. Esso è presente in gran numero di copie e per questo, a differenza di quanto avviene per i geni nucleari di cui si hanno solo due copie per cellula, esiste una elevata probabilità di ritrovarlo ancora in campioni antichi.

Nell'uomo l'mtDNA consiste di molecole circolari chiuse di DNA a doppia elica lunghe 16.569 coppie di basi (bp), che corrispondono allo 0,0006% del genoma totale.

Il tasso di mutazione elevato e la trasmissione ereditaria per via materna permettono di studiare le relazioni matrilineari nelle popolazioni umane.

Le regioni del DNA mitocondriale che sono attualmente considerate validi marcatori etnici sono rappresentate da due siti ipervariabili presenti nella regione di controllo della sua replicazione: il segmento I, che si estende dal nucleotide 16.024 al nucleotide 16.400, ed il segmento II che si estende dal nucleotide 40 al nucleotide 390. I numerosi siti polimorfici permettono di distinguere diverse etnie.

Rapporti di parentela

Le tecniche di biologia molecolare permettono oggi, attraverso lo studio di opportuni marcatori genetici, i microsatelliti, di ricostruire anche interi alberi genealogici [11]. Le sequenze microsatelliti presenti sul DNA nucleare vengono infatti ereditate con modalità mendeliana ed il loro numero varia tra individui della stessa specie.

Come si affronta lo studio dell'aDNA e la sua autenticazione

I problemi più specifici legati all'analisi dell'aDNA riguardano fundamentalmente l'autenticità del DNA estratto dal reperto e la possibilità di contaminazioni da DNA esogeno

moderno proveniente in genere da procedure non corrette adottate o in laboratorio oppure dalla manipolazione dei reperti nelle fasi di scavo. Mentre il problema delle contaminazioni da DNA esogeno viene affrontato assumendo in laboratorio precauzioni sempre più accurate da parte dell'operatore ed utilizzando ambienti e strumentazione dedicati, la prova che il materiale in studio sia in effetti DNA endogeno può essere fornita solo da evidenze sperimentali diverse ed indipendenti.

Anche la grande frammentazione del DNA contenuto in reperti archeologici limita l'analisi genetica a tratti di molecole di DNA relativamente piccoli (100-200 nucleotidi). Accanto ai problemi di contaminazione, vi sono anche i problemi connessi alla vita media stessa delle molecole di DNA fortemente dipendente dalle condizioni di conservazione del reperto. Gli acidi nucleici vanno incontro, infatti, a decomposizione spontanea [12]: nel caso del DNA il meccanismo che influisce principalmente sulla sua degradazione è la depurinazione. D'altra parte sono numerosi i parametri fisici quali temperatura, valore del pH, anossia e disidratazione, conosciuti essere in relazione diretta con le alterazioni della doppia elica del DNA, che possono contribuire anche notevolmente a modificarne la vita media. L'alta temperatura ed un valore acido del pH, ad esempio, favoriscono la rottura dei filamenti del DNA, mentre invece l'anossia e la disidratazione favoriscono la sua conservazione.

Lo stato di conservazione del reperto osseo è valutabile attraverso l'osservazione al microscopio. Le alterazioni del tessuto osseo derivano soprattutto dalle condizioni ambientali di seppellimento che ne determinano la colonizzazione da parte di microrganismi (batteri e/o muffe) che in genere ne stravolgono la struttura.

In presenza di un osso ben conservato sarà molto più alta la probabilità di trovare molecole di acidi nucleici all'interno degli osteociti ancora presenti; viceversa un tessuto osseo completamente alterato non fornirà presumibilmente tracce consistenti di aDNA. Risulta evidente che il successo

dell'amplificazione di un DNA proveniente da un osso completamente alterato é una prova a sfavore della origine endogena di quel DNA.

Pretrattamento dei campioni ed estrazione del DNA

I reperti ossei devono essere maneggiati con estrema attenzione con l'ausilio di guanti a perdere e di mascherine per evitare ogni possibile contaminazione. L'osso viene pulito con una spazzola abrasiva, trattato con ipoclorito di sodio e, successivamente, esposto ai raggi UV per 10 minuti a 20 cm di distanza per danneggiare, attraverso la formazione dei dimeri di Timina, e rendere di conseguenza non amplificabile, ogni forma di DNA "contaminante" eventualmente presente sulla superficie dell'osso.

Con l'ausilio poi di un trapano fornito di fresa o di un seghetto metallico, si ricavano i frammenti che serviranno per l'esame istologico e la fase successiva di estrazione. In letteratura vengono descritti diversi protocolli di estrazione ma la scelta del protocollo deve essere ottimizzata rispetto alle caratteristiche del sito archeologico di ritrovamento.

Reazione a catena della polimerasi

La reazione a catena della polimerasi (PCR) ha rivoluzionato la sperimentazione rivolta a risolvere problemi legati alla struttura ed alla sequenza del DNA. Essa costituisce la chiave per comprendere sia la complessità di una singola cellula sia l'evoluzione delle specie [13]. Questa tecnologia ha permesso di affrontare questioni che vanno dall'identificazione di nuovi geni e patogeni, fino alla quantizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche e si é rivelata essenziale per lo studio dei DNA antichi, soprattutto grazie alla sua estrema sensibilità. Anche una sola molecola (o poche molecole) rimasta intatta in un antico tessuto può essere amplificata dalla reazione a catena della polimerasi, mentre le molecole danneggiate, che possono essere migliaia di volte più numerose, non disturbano l'esperimento. I frammenti di DNA da amplificare devono essere più corti di 300 coppie di basi.

Il sito archeologico di Pompei

Durante le prime dodici ore dall'inizio dell'eruzione del Vesuvio nel 79 d.C. la città di Pompei venne ricoperta da una coltre di pomice spessa alcuni metri, il cui peso provocò il crollo parziale di molti edifici e della maggior parte delle coperture. Durante la notte i primi flussi piroclastici raggiunsero Ercolano seppellendo completamente gli edifici. Solo la mattina successiva nuovi flussi raggiunsero Pompei causandone la distruzione definitiva.

Reperti ossei, provenienti da diverse centinaia di individui, sono stati rinvenuti testimoniando da un lato la drammaticità della fuga e i diversi momenti della decisione di sottrarsi alla catastrofe, e suggerendo che alcuni superstiti, tornati forse per recuperare oggetti cari o preziosi, fossero stati seppelliti in una successiva fase dell'eruzione.

L'interesse per i resti umani di Pompei ed Ercolano risale al 1834, quando il re di Napoli Ferdinando I nominò il Prof. Antonio Nanula direttore del Museo di Anatomia ed accettò da questi la collezione di reperti come regalo per il Museo. Tra i reperti che costituivano la collezione c'era il primo gruppo di crani. Più tardi il Re permise al Prof. Stefano Delle Chiaie, professore di Anatomia Comparata presso l'Università di Napoli, di spostare altri crani da Pompei al museo. La collezione include oggi anche alcuni crani provenienti da San Paolo Belsito, località che fu interessata dall'eruzione pliniana del Vesuvio del 3800 a.C. Pochi anni dopo, Giustiniano Nicolucci, professore di Anatomia presso la Scuola Medica dell'Università di Napoli pubblicò un manoscritto intitolato; "Crania Pompeiana ovvero Descrizione dei Crani umani rinvenuti fra le ruine dell'antica Pompei" che conteneva le prime valutazioni antropometriche effettuate sui crani. Non si hanno notizie di altri studi effettuati sui resti umani di Pompei o di Ercolano fino al 1982 quando la dottoressa Sara Biesel ricercatrice dello Smithsonian Institute iniziò a studiare gli scheletri di Ercolano raccogliendo dati sia sulla morfologia che sulla morfometria che sul contenuto di

metalli. Sfortunatamente solo pochi dati relativi alle sue ricerche sono stati pubblicati. La collaborazione che ha in oggetto lo studio del DNA antico tra il gruppo di Biologia Molecolare della 2.a Università di Napoli e la Soprintendenza di Pompei inizia nel 1996 con lo studio del DNA estratto dai tredici scheletri rinvenuti in una casa di Via dell'Abbondanza quella di Caius Iulius Polibius.

All'inizio di questa ricerca i dubbi sulla persistenza del DNA negli osteociti di questi individui erano molto forti; eravamo particolarmente preoccupati in particolare dei valori di temperatura raggiunti durante l'eruzione e delle condizioni di seppellimento. Il ritrovamento di DNA antico in dodici sui tredici individui analizzati provocò grande entusiasmo tra i ricercatori che avevano collaborato al progetto e ci spinse ad interagire direttamente con i vulcanologi che stavano contemporaneamente studiando la dinamica dell'eruzione e del seppellimento all'interno della stessa casa per trovare una possibile spiegazione del buono stato di conservazione dei tessuti ossei come si poteva desumere dall'osservazione al microscopio. Il ritrovamento di una particolare forma di lapilli (lapilli accrezionali) che coprivano gli scheletri nella casa di Polibio e la conoscenza delle condizioni fisiche che ne determinano la formazione ci sembrò fornire una spiegazione molto convincente per spiegare il buono stato di conservazione. I lapilli accrezionali sono infatti aggregati di cenere che si formano a contatto con l'acqua; il vapore d'acqua e, quindi una temperatura superiore ai 100 °C, non avrebbe permesso la loro formazione. Per finire, il Vesuvio coprì con 4/10 metri di materiale piroclastico l'intera città e questo mantello di spessore incredibile ha preservato i resti per i 2000 anni successivi. Per quanto riguarda lo studio dell'evoluzione molecolare, questi reperti hanno un valore assolutamente eccezionale perché sono un campione casuale di una popolazione umana, datato con assoluta precisione, unico al mondo per la peculiarità degli eventi catastrofici che hanno determinato la morte improvvisa della popolazione residente. Questa caratteristica di casualità rende possibile il confronto di sequenze

nucleotidiche di aDNA relative a particolari caratteri genetici con le sequenze nucleotidiche corrispondenti di popolazioni attuali.

Si presenta quindi concretamente la possibilità di effettuare un'indagine genetica su una popolazione antica. Questa indagine in linea di principio permetterà non solo di confermare specifiche patologie che trovino riscontro nella struttura del reperto osseo e di studiare la distribuzione delle patologie genetiche più comuni, ma di acquisire notizie certe circa il popolamento di una determinata area geografica.

Lo studio del gruppo di ricerca da me coordinato prevede l'analisi del DNA estratto da reperti ossei della popolazione di Pompei sepolta dall'eruzione del Vesuvio del 79 d.C. L'analisi dell'aDNA ha riguardato finora lo studio di alcuni individui rinvenuti nella casa di Caius Iulius Polybius ubicata in via dell'Abbondanza in Pompei il cui scavo, iniziato nel 1910, fu ripreso nel 1966 ed ultimato nel 1978.

I reperti umani trovati all'interno della "Casa di Polibio" sono costituiti complessivamente da tredici scheletri. La posizione in cui alcuni di essi furono rinvenuti, come riportato nei quaderni di scavo, suggerisce l'esistenza di una stretta relazione di parentela. Ad esempio due degli scheletri furono ritrovati mano nella mano ed è anche raffigurata la posizione dello scheletro di una giovane donna vicino alla quale furono ritrovati i resti di un feto, molto probabilmente un figlio suo. Il primo compito degli antropologi che hanno collaborato alla ricerca è stato quello di ricostruire gli scheletri e, qualora possibile, di stimare per ciascuno di essi l'età ed il sesso e di individuare eventuali patologie ossee e dentarie.

I risultati degli esami istologici hanno mostrato un differente grado di conservazione. Buona parte di essi mostra una struttura ossea parzialmente alterata con una regione periferica in buono stato con la presenza di numerosi osteociti e osteoni secondari. Qualcuno di essi mostra una struttura ossea talmente ben conservata da essere indistinguibile da un osso fresco.

Qualcun altro risulta, invece, essere completamente alterato. Abbiamo trovato una correlazione diretta tra lo stato di conservazione del tessuto osseo e l'amplificabilità del DNA da essi estratto. Sulla base dei dati vulcanologici la temperatura raggiunta durante gli eventi eruttivi, per quanto riguarda la casa di Polibio, non ha superato 100°C. Infatti, la ricostruzione della dinamica dell'eruzione ha permesso di stabilire la presenza di lapilli accrezionali formati in seguito al contatto della cenere con l'acqua condensata. Se la temperatura fosse stata più elevata, l'acqua, sotto forma di vapore non avrebbe partecipato alla formazione delle accrezioni. Probabilmente anche la disidratazione dei tessuti, conseguente all'innalzamento della temperatura, ha favorito la conservazione degli acidi nucleici.

Dai dati ottenuti con l'amplificazione del locus per l'amelogenina, 4 di questi soggetti sono risultati maschi e 7 femmine. I primi dati sul DNA mitocondriale fanno ritenere che essi appartengono tutti ad una etnia riconducibile a quelle presenti in Europa nonostante la notevole altezza di alcuni individui di sesso maschile avesse suggerito l'appartenenza ad etnie sub-sahariane. I dati su sequenze microsatelliti ottenuti finora hanno permesso di costruire un possibile albero genealogico che vede i soggetti più giovani tra cui un bambino di circa due anni imparentati per via materna perché essi mostrano un DNA mitocondriale identico. Lo studio, ancora in corso, si propone di completare l'analisi dei vari microsatelliti selezionati ed il sequenziamento dei segmenti ipervariabili del DNA mitocondriale. Le stesse indagini saranno eseguite su altri reperti rinvenuti a Pompei ed a Murecine, un sito che si trova nel comprensorio di Pompei dove, in due edifici venuti alla luce durante uno scavo per un raccordo autostradale, sono stati recentemente ritrovati altri resti umani. L'amplificazione di altri geni di particolare interesse per malattie genetiche presenti nel Mediterraneo permetterà di indagare oltre che sulle migrazioni di popolazioni anche sull'evoluzione di tali geni.

Bibliografia

- [1] Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, and Wilson AC. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 1984; 312: 282-284.
- [2] Paabo S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 1985; 314: 44-645.
- [3] Paabo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from a 7000 years old brain. *N.A.R.* 1988; 16 (20): 9775-9787.
- [4] Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, and Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 1994; 6: 130-135.
- [5] Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, and Paabo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997; 90: 19-30.
- [6] Cipollaro M, Di Bernardo G, Galano G, Galderisi U, Guarino F, Angelini F, and Cascino A. "Ancient DNA in human bone remains from Pompeii archaeological site", *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247 (3): 901-904.
- [7] Di Bernardo G, Del Gaudio S, Cammarota M, Galderisi U, Cascino A, and cipollaro M. "Enzymatic repair of selected crosslinked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculaneum remains", *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 4 e 16.
- [8] Di Bernardo G, Galderisi U, Del Gaudio S, D'Aniello A, Lanave C, De Robertis MT, Cascino A, and Cipollaro M. "Genetic characterization of Pompeii and Herculaneum Equidae buried by Vesuvius in 79 A.D." *J. Cell. Physiol.* 2004; 199: 200-205.
- [9] Cipollaro M, e Di Bernardo Giovanni "Ash preserved DNA in pompeian equids buried by the Vesuvius eruption of A. D. 79: "Atti della Accademia Nazionale dei Lincei" 2004; 9 15: 151-157.
- [10] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn HL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, and Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.
- [11] Pena SDJ, and Chakraborty R. Paternity testing in the DNA era. *T.I.G.* 1994; 10 (6): 204-209.
- [12] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362: 709-715.
- [13] Erlich HA, Gelfand D, and Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252: 1643-1651.