

L'analisi del DNA antico in Antropologia

LUCIO MILANI

Estratto dalla tesi di laurea

Introduzione

In questi ultimi anni, un apporto fondamentale agli studi antropologici è venuto da discipline come la genetica che, grazie a innovative tecniche di indagine molecolare, ha permesso la risoluzione di lunghe controversie consentendo agli esperti di poter prediligere una ben precisa ipotesi fra le molte che si erano delineate utilizzando i soli metodi comparativi.

Le applicazioni genetiche trovano quindi una vasta applicazione che possiamo riassumere in:

- determinazione del sesso (informazione fondamentale per la conoscenza della struttura biologica di una popolazione o il sesso degli inumati di una sepoltura);
- studio delle paleopatologie (diffusione di agenti infettivi che sono correlati a fattori socioeconomici o patologie ereditarie di rilevanza a livello popolazionistico);
- riconoscimento individuale e determinazione delle relazioni parentali;
- applicazioni evolutive;
- applicazioni popolazionistiche.

Il modello sull'origine della specie *Homo sapiens* non è rimasto immune da questo tipo di indagine: siamo infatti riusciti a spiegare dove e come tale origine è avvenuta e alcuni rapporti filogenetici all'interno del percorso evolutivo. A tal proposito si possono citare i risultati ottenuti nello studio sull'origine dell'uomo anatomicamente moderno che portano a ritenere essere africana, la caratterizzazione genetica del DNA mitocondriale di *Homo neanderthalensis* e di alcuni uomini anatomicamente moderni che hanno abitato l'Europa contemporaneamente agli ultimi rappresentanti dei neandertaliani: quest'ultimi due studi dimostrerebbero una distanza genetica tale da impedire un incrocio prolifico tra le due specie. Le popolazioni dei primi moderni sarebbero nettamente separate da quella neandertaliana, la quale sembrerebbe essere stata sostituita senza lasciar traccia nel patrimonio genetico dell'umanità attuale.

Occorrerebbe descrivere più in dettaglio i risultati degli studi sopracitati, ma è opportuno prima di addentrarci nelle specificità, chiarire cosa si intenda per DNA antico, accennando anche alle sue tecniche di analisi. Una descrizione approfondita potrà essere argomento di prossimi articoli.

Definizione di DNA antico

Per DNA antico (aDNA) vengono indicati residui di materiale genetico che si possono estrarre da una grande varietà di materiali biologici, di diversa origine, stato di conservazione ed età, come ossa, denti, coproliti, corpi mummificati, sangue coagulato...

Come conseguenza della morte, il DNA contenuto nell'organismo va incontro a una serie di processi degradativi che ne modificano le proprietà chimico-fisiche: processi che sono presenti anche durante le fasi vitali, ma grazie ai meccanismi di riparazione funzionanti gli organismi riescono a sopravvivere. I fattori che contribuiscono alla degradazione della molecola sono:

- idrolisi (porta alla perdita delle basi azotate);
- azione ossidativa dell'ossigeno (produzione di radicali liberi);
- pH non neutro (attacca i legami a idrogeno e i gruppi ossidrilici o provoca la depurinazione);
- temperature elevate (mettono alla prova i legami a idrogeno e le forze di Van der Waals favorendo inoltre il proliferare di batteri, muffe e altri organismi che contaminano in modo molto consistente il materiale genetico), basse temperature invece inibiscono le attività enzimatiche risultando vantaggiose per una conservazione a lungo termine come è avvenuto per l'uomo del Similaun risalente a 5000 anni fa, il quale conserva ancora DNA in maniera soddisfacente;
- radiazioni UV (determinano la comparsa di cross-link intermolecolari);
- attività enzimatiche all'interno della cellula;
- presenza di acidi umici nel terreno.

A causa di questi fattori, è molto raro riuscire a estrarre lunghi filamenti di DNA da resti antichi, sarà utile quindi indagare considerando molecole le cui dimensioni medie non superino le 150-300 bp (base pair).

Specificità delle analisi con il DNA antico

La buona riuscita di una analisi sul DNA antico è legata a informazioni di tipo antropologico, chimico-fisico e geologico che riguardano il campione da studiare: per ossa sottoposte ad una sepoltura è fondamentale conoscere i fattori fisici, chimici e meccanici dovuti alla natura del luogo e alle condizioni climatiche soprattutto per evitare di imbattersi in materiale biologico troppo degradato di cui non sarebbe possibile ottenere risultati attendibili. Occorre tener presente che ossa ricche di tessuto compatto sono preferibili per uno studio molecolare, inoltre l'estrazione di DNA comporta la distruzione, seppur minima, di materiale osseo per cui è bene scegliere parti dello scheletro, ad esempio coste o falangi, di scarsa importanza per lo studio antropometrico oppure ricavare la quantità necessaria operando carotaggi di pochi millimetri di diametro da zone in cui non sia compromessa la possibilità di una successiva analisi morfologica. La raccomandazione di lavorare su reperti immediatamente provenienti dallo

scavo e conservati sterilmente in assenza di umidità è senz'altro da sottoscrivere ma sicuramente di difficile attuazione: nella migliore delle ipotesi si riesce infatti a lavorare su materiale manipolato solo da poche persone e non trattato con consolidanti e fissanti.

Fondamentale poi, una volta prelevato il campione e portato nel laboratorio per attuare l'analisi del DNA, è mantenere sotto controllo i parametri ambientali dei locali stessi onde evitare di provocare azioni che favoriscano gli agenti degradanti del contenuto biologico.

Oltre alle tematiche legate alla degradazione, per poter essere sicuri di effettuare una corretta analisi si deve far fronte a un altro problema fondamentale, quello delle contaminazioni con DNA esogeno. Tale fattore è praticamente sempre presente durante questi tipi di studi, sin dalla deposizione del campione fino a tutta la fase sperimentale molecolare e può essere causato sia da microorganismi del suolo, del laboratorio, ma soprattutto dal DNA umano dei vari operatori che vengono a contatto per molteplici motivi con il reperto in esame. Obiettivo primario diviene dunque la riduzione al minimo degli agenti contaminanti ad esempio procedendo con elevata sterilità durante tutte le varie tappe del lavoro.

Recentemente è stata redatta una lista di procedure a cui attenersi rigorosamente per azzerare il rischio contaminazione nei laboratori di indagine genetica tra cui troviamo:

- mantenere le aree di lavoro fisicamente isolate e dedicate solo allo studio del DNA antico;
- effettuare estrazioni multiple per poter procedere a verifiche positive (chiamati controlli "bianchi" quando si amplifica soluzioni contenenti solo i reagenti senza DNA) e negative cioè amplificazioni di controllo;
- ottenere gli stessi risultati ripetendo le analisi a partire dagli stessi estratti di DNA nonché da estratti differenti dello stesso campione;
- amplificare piccoli frammenti al massimo di 200 bp perché partendo da poche molecole di DNA danneggiate e frammentate, può verificarsi l'amplificazione preferenziale di frammenti di DNA più lunghi, più integri e che in genere non provengono dal campione antico;
- clonaggio degli amplificati nel caso di contaminazioni intervenute nel corso del tempo contro le quali non è più possibile intervenire (permette di determinare il rapporto tra le sequenze endogene/esogene: l'ideale sarebbe trovare frammenti sovrapponibili per accertarsi che l'eventuale variazione della sequenza è reale e non prodotto di errori);
- riproducibilità dell'intera fase sperimentale da un altro operatore e in un altro laboratorio;
- stimare il grado di conservazione biochimico (racemizzazione degli aminoacidi).

Caratteristiche del DNA mitocondriale: il principale strumento per le analisi del DNA antico

Il materiale genetico principale tra tutti i sistemi utilizzati negli studi sull'evoluzione umana, è il DNA mitocondriale (mtDNA). I mitocondri, organelli cellulari di origine endosimbiontica, svolgono un importante ruolo

nel rifornimento energetico della cellula (fosforilazione ossidativa) e utilizzano per la propria attività, oltre ad alcuni geni codificati nel nucleo, anche un proprio patrimonio genetico, il DNA mitocondriale appunto. Quest'ultimo risulta costituito da una doppia elica di forma circolare lunga circa 16.569 e codifica per 37 geni il cui ordine sequenziale è identico nell'uomo, nel topo, nel ratto e nel bovino; la struttura genica comprende: 2 geni per l'RNA ribosomale (12S e 16S), 22 geni necessari per la sintesi proteica mitocondriale e 13 geni che codificano per polipeptidi di quattro subunità enzimatiche della fosforilazione ossidativa (subunità I, II, III, della citocromo ossidasi C, le subunità 6 e 8 dell'adenosintrifosfatasi o ATPasi), il citocromo B e le 7 subunità dell'NADH deidrogenasi della catena respiratoria (ND1, ND2, ND3, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6). Le altre proteine necessarie alle funzioni mitocondriali vengono sintetizzate nel nucleo e trasportate al mitocondrio. Oltre a queste, sono presenti delle regioni non codificanti chiamate regioni di controllo (d-Loop divisa in regione ipervariabile I e II, HVSI HVSII) che accumulano mutazioni con un tasso costante nel tempo e tale da poter costituire un orologio molecolare la cui variabilità è caratteristica per una popolazione. La prima sequenza nucleotidica completa del mitocondriale ottenuta da Anderson nel 1981 (Anderson *et al.*, 1981) è generalmente indicata come "Sequenza di Riferimento di Cambridge" (CRS= Cambridge Reference Sequence) e ha permesso la costruzione di mappe di siti di restrizione estremamente dettagliate; dopo l'avvento della reazione a catena della polimerasi (PCR), ha reso possibile inoltre l'amplificazione in vitro di qualsiasi segmento di DNA per il quale siano note le sequenze delle regioni che lo fiancheggiano.

Il DNA mitocondriale rappresenta solo lo 0.0006% del genoma totale di un individuo; al contrario di quello nucleare è presente in un numero elevato di copie per ogni cellula, circa 10^3 - 10^4 (mentre il DNA nucleare solo una) e ciò è importantissimo per le applicazioni sul DNA antico in quanto le probabilità di trovare frammenti di DNA da resti degradati o molto datati aumenta notevolmente. E' ereditato esclusivamente per via materna, praticamente senza contributo paterno; ciò deriva dal fatto che gli oociti contengono i mitocondri, mentre nello spermatozoo sono presenti solo pochi di questi organelli, per lo più localizzati a livello della coda e con l'unica funzione di fornire energia per il movimento: durante la fecondazione, quando lo spermatozoo entra nella cellula uovo, la coda rimane all'esterno e quindi è molto raro che i mitocondri paterni penetrino all'interno della cellula uovo. In caso contrario si creerebbe una eteroplasmia che comunque sarebbe difficile trovare in resti antichi. Questo modo di ereditare il patrimonio genetico implica che non c'è segregazione, né ricombinazione: la linea di discendenza mitocondriale è dovuta a una sola antenata che ha trasmesso il suo mtDNA inalterato mentre all'eredità nucleare contribuiscono tutti gli avi anche tramite ricombinazione; di conseguenza il numero di differenze nelle sequenze di mtDNA che separa due individui è proporzionale al tempo di divergenza dalla stessa antenata materna. Si

costruiscono, in questo modo, alberi filogenetici-genealogici che riflettono la storia materna degli individui di una popolazione o di una specie dove il grado di somiglianza diminuirà man mano che si risale e il cerchio della parentela che si allarga finché finisce per comprendere l'intera umanità. Tale modello non implica che questa antenata sia stata l'unica femmina presente, ma piuttosto che le altre si siano estinte per fenomeni casuali. Altra decisiva caratteristica di questa molecola è il rapido e costante tasso di evoluzione stimato a partire da gruppi tassonomici per i quali erano disponibili i tempi di divergenza ottenuti da fossili, dati biodemografici e proteici ed è pari all'1-2% di basi mutate per milione di anni, circa 10-20 volte più veloce dei geni del DNA nucleare di funzione paragonabile e inoltre soggetto a fenomeni quali effetto fondatore, deriva genica e ricombinazione. L'mtDNA diviene quindi una sorta di orologio molecolare che batte molto velocemente, estremamente utile nello studio dell'evoluzione di specie diversificatesi in epoca recente, come le popolazioni umane. Il DNA nucleare invece è molto variabile da regione a regione risultando dipendente anche dalla posizione che la sequenza assume (esempio su un tratto codificante, piuttosto che a livello di sequenze introniche o non codificanti), cui consegue una perdita di neutralità da parte di quella regione.

Responsabili della rapida evoluzione del DNA mitocondriale sono:

- la limitata efficienza del sistema di riparazione degli errori;
- l'alto flusso di radicali liberi all'interno della catena respiratoria mitocondriale che generano un danno di tipo ossidativo;
- l'allentamento dei meccanismi che regolano l'apparato di traduzione delle proteine (legato al tipo di proteine che vengono codificate dal DNA mitocondriale).

Fasi Sperimentali

Le diverse fasi sperimentali in cui la ricerca si articola (preparazione del campione, estrazione, purificazione, amplificazione e visualizzazione dei prodotti di PCR) devono essere eseguite in stanze fra loro separate esclusivamente dedicate a questo tipo di analisi.

Esistono dei protocolli standard di procedure da seguire per queste indagini, a cui ogni ricercatore si deve attenere scrupolosamente; cerchiamo qui di riassumere i punti salienti.

Deve essere prelevato un determinato quantitativo di polvere (in genere 0.5-1 grammo) tramite carotaggi sulle ossa; la polvere viene quindi trattata con soluzioni di tensioattivi e chelanti per denaturare le proteine, solubilizzare i lipidi, inattivare gli enzimi che potrebbero danneggiare il DNA. Tutti i passaggi di questa fase hanno lo scopo di liberare il DNA dalle cellule per metterlo in soluzione. Successivamente si deve poter separare il DNA dagli altri composti cellulari e questo avviene con combinazioni di sostanze organiche come fenolo e cloroformio. Il DNA passa nella fase acquosa e concentrato su resine o silice.

Considerati i diversi processi degradativi cui è sottoposto durante il tempo il materiale genetico, potrebbe

succedere che il nostro campione antico non contenga più tracce di DNA; è utile, prima di procedere alle svariate e costose fasi dell'analisi, poter determinare la presenza o l'assenza di DNA nel campione.

La racemizzazione degli aminoacidi può fornire un criterio sul grado di degradazione degli acidi nucleici: sappiamo infatti che gli aminoacidi (tranne la glicina) possono ritrovarsi sotto forma di due isomeri ottici: D- e L-enantiomeri. L'enantiomero L, essendo l'isomero ottico utilizzato nella biosintesi delle proteine, si ritrova con proporzioni maggiori nelle cellule vive rispetto alla forma D. Quando una cellula muore si verifica il raggiungimento dell'equilibrio tra la forma L e la D; il tasso di racemizzazione in queste condizioni dipende dalla presenza d'acqua, dalla temperatura e dalla chelazione di ioni metallici alle proteine, in altre parole le stesse condizioni che determinano la depurinazione del DNA (reazione idrolitica responsabile della degradazione degli acidi nucleici). Misurando la *ratio* D/L dell'acido aspartico, è quindi possibile determinare il grado di degradazione del DNA presente nel nostro campione, riuscendo perciò a predire se un determinato reperto antico possa contenere o no residui di acidi nucleici. Opportuni studi hanno dimostrato che un rapporto D/L Asp maggiore di 0.1 raramente è compatibile con il rinvenimento di DNA antico; è opportuno precisare come il valore 0.1 di D/L Asp non rappresenti una soglia netta.

Se il grado di racemizzazione è soddisfacente, dall'eluito ottenuto dall'estrazione si può procedere con l'amplificazione. Ciò avviene tramite la PCR (Polymere chain reation) che è un'amplificazione in vitro portata avanti da enzimi termostabili (Taq polimerasi), consistente in 3 passaggi che si ripetono ciclicamente:

- 1) denaturazione;
- 2) annealing (appaiamento dei primer);
- 3) allungamento.

Durante la prima fase le molecole di DNA a doppio filamento si denaturano in filamenti singoli; nella seconda i primer si ibridano con i propri siti di riconoscimento. Durante l'allungamento la Taq polimerasi comincia ad allungare il filamento aggiungendo nucleotidi all'estremità 3' dei primer. Questi passaggi vengono ripetuti ciclicamente causando una amplificazione esponenziale.

Per analizzare i prodotti di PCR si ricorre all'elettroforesi che permette di separare frammenti di DNA in base alla loro misura e può essere effettuata su gel posti in lastre oppure all'interno di capillari.

Nella maggior parte degli esperimenti sul DNA antico è fortemente consigliabile non fermarsi al sequenziamento diretto dei prodotti di PCR ma è fondamentale procedere al clonaggio dei vari amplificati e sequenziare più ampliconi. L'analisi di quest'ultimi permette di discriminare tra le mutazioni che sono presenti in tutte le sequenze da quelle che si verificano solo occasionalmente in uno o pochi cloni. Il clonaggio dei prodotti della PCR è stata eseguita utilizzando un plasmide come vettore.

L'analisi della sequenza è l'ultimo passaggio e permette la discriminazione della successione delle basi di un frammento di DNA amplificato: in particolare è possibile discriminare tutti i tipi di polimorfismi, inserzioni e delezioni di basi. La reazione di sequenza con-

siste in due PCR di cui la prima serve ad amplificare esponenzialmente la sequenza target mentre la seconda è una PCR asimmetrica, dove viene utilizzato cioè un solo primer che permette l'amplificazione di un singolo filamento. Il punto principale di questa parte è che tutte le basi vengono marcate con sostanze fluorescenti in maniera che a ogni colore corrisponda una certa base, permettendo di discriminare tra le adenine, le timine, le citosine e le guanine. Inoltre vengono messi nella miscela di reazione, oltre ai classici dinucleotidi che permettono una fase di allungamento normale, i dideossinucleotidi che portano a un immediata interruzione della fase di allungamento. Al termine si ottiene una popolazione di sequenze a singolo filamento di ogni lunghezza possibile che rappresentano l'intera successione. Le sequenze a singolo filamento marcate vengono poi sottoposte ad elettroforesi e raggruppate per lunghezza così da ottenere una successione di picchi differentemente colorati che rappresentano la sequenza in esame.

Una volta ottenuta la sequenza è finalmente possibile, tramite complesse operazioni eseguite da opportuni software, confrontare la nostra successione di basi ed ottenere i risultati dell'analisi.

Bibliografia essenziale

- CARAMELLI D., LALUEZA-FOX C., VERNESI C., LARI M., CASOLI A., MALLEGNI F., CHIARELLI B., DUPANLOUP I., BERTRANPETIT J., BARBUJANI G., BERTORELLE G. 2003. Evidence of Genetic discontinuity between Neandertal and 24,000-year-old anatomically moderns Europeans. *PNAS* 100 (11): 6593-7.
- CARAMELLI D., LARI M. 2004. *Il DNA antico, metodi di analisi e applicazioni*. Pontecorboli
- COOPER A., POINAR HN. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289 (5482):1139.
- KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R.W., KRAINITZKI H., STONEKING M., PAABO S. 1997. Neandertal DNA sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90(1):19-30.
- MANFREDINI A. 2002. *Analisi del DNA mitocondriale (mtDNA) relativo ad un giovane gravettiano del Paleolitico Superiore da grotta Paglicci nel Gargano: un contributo alla diatriba neandertaliani e sapiens – una o due specie?*. Tesi di Laurea Università degli Studi di Pisa.
- MILANI L. 2004. *Caratterizzazione genetica di reperti di Homo sapiens del Paleolitico Superiore (22.000 B.P.) da Grotta delle Veneri (Le): ulteriori evidenze di discontinuità genetica con l'uomo di Neandertal*. Tesi di Laurea Università degli Studi di Firenze.
- MIRAGLIA C. 2004. *L'analisi del DNA antico in bioarcheologia, applicazione su resti umani antichi*. Tesi di Laurea Università degli Studi di Palermo.
- ROLLO F. 1999. *Il DNA nello studio dei resti umani antichi. Principi, metodi e applicazioni*. Ed. Medical Books.