

CRISTIANO VERNESI - DAVID CARAMELLI - BARBARA BRAMANTI
SILVIA CARBONELL SALA - GIOVANNI TILOTTA - LETIZIA PARIGI - GIUSEPPE ARDITO
BRUNETTO CHIARELLI - ELSA PACCIANI*

ESTRAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA
DA RESTI OSSEI ETRUSCHI:
APPLICAZIONE ALLA DETERMINAZIONE DEL SESSO

INTRODUZIONE

In tutti gli studi antropologici ed archeologici la determinazione del sesso sui reperti scheletrici è importante per la corretta interpretazione di altri caratteri antropologici dell'individuo, quali caratteri morfometrici, età presunta alla morte, eventuali situazioni patologiche. Da un punto di vista archeologico conoscere il sesso del defunto è decisivo per le correlazioni con il corredo funerario. Quando si disponga poi di un numero consistente di individui riferibili ad una popolazione unica, si può arrivare, utilizzando questi dati, a ricostruire con una buona approssimazione la struttura demografica ed una serie di aspetti culturali della popolazione stessa.

Il classico metodo morfologico e metrico mostra però i suoi limiti in diverse situazioni: in presenza di un campione frammentario, in mancanza dei distretti ossei più informativi, e nel caso di individui sub-adulti e bambini. Inoltre i parametri dovrebbero essere calibrati ogni volta sulla popolazione in esame, perché la variabilità inter-popolazionistica dei caratteri è spesso consistente, soprattutto quando si confrontino popolazioni lontane nel tempo. Risulta perciò evidente la necessità di metodologie nuove capaci di ovviare a queste limitazioni.

Un decisivo passo in avanti nell'ambito degli studi antropologici si è compiuto grazie allo sviluppo della biologia molecolare che permette di estrarre il DNA da resti antichi, offrendo così un nuovo strumento per lo studio del passato (1, 2).

L'analisi del DNA antico presenta problemi del tutto particolari rispetto alle indagini che si possono fare sul DNA attuale. Le molecole di DNA che si pos-

Istituto di Antropologia, Università di Firenze, via del Proconsolo 12, 50122 Firenze.

* Soprintendenza Archeologica per la Toscana, via della Pergola 65, 50121 Firenze.

sono estrarre dai resti antichi (ossa, denti, tessuti mummificati, etc.) oltre ad essere scarsamente rappresentate in termini quantitativi, risultano anche qualitativamente compromesse per i molti processi degradativi intervenuti nel corso del tempo. Senza entrare nel dettaglio dei singoli meccanismi di degradazione (enzimatica, idrolitica, ossidativa, causata da radiazioni), è sufficiente ricordare come l'esito finale sia quello di doversi confrontare con poche molecole frammentate in segmenti di dimensioni assai ridotte (dell'ordine, mediamente, di 150-300 paia di basi, bp).

Per l'analisi di molecole di questo tipo si utilizza una tecnica di amplificazione genica *in vitro* nota come PCR (Polymerase Chain Reaction) (3) che, grazie alla sua estrema sensibilità, permette, anche a partire da un numero molto basso di molecole, di ottenere quantità discrete di DNA. Tuttavia il grande potere risolutivo della PCR costituisce anche un fattore limitante nell'analisi del DNA antico; enormi sono, infatti, i rischi di contaminazione con il DNA moderno il quale, data la sua integrità e la sua elevata concentrazione, può prendere il sopravvento sul DNA antico all'interno di una reazione competitiva come la PCR. A livello sperimentale esistono, tuttavia, le possibilità di ovviare al problema della contaminazione durante la PCR; le stesse possibilità non sussistono però per l'eliminazione delle altre fonti di contaminazione cui può esser andato incontro il DNA col passare dei secoli. Per ridurre al minimo ulteriori fonti di contaminazione, sarebbe opportuno che gli operatori adottassero semplici precauzioni durante lo scavo e il recupero dei campioni (come l'uso di guanti e mascherina), e durante la conservazione (in contenitori sterili, preferibilmente tenuti a - 20° C).

In questo lavoro presentiamo l'applicazione dell'analisi del DNA a resti archeologici per la determinazione del sesso. Sebbene in una fase preliminare, i risultati incoraggianti dimostrano l'effettiva validità di questo nuovo metodo a disposizione di tutte quante le discipline interessate a ricostruire e capire il passato dell'uomo.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 29 individui, conservati presso il Centro di Restauro della Soprintendenza Archeologica per la Toscana. Tali reperti provengono dalle necropoli di Magliano in Toscana (11 da Cancellone I, 3 da Cancellone II, 9 da Cancellone III) e di Volterra (2 da Osteriaccia, 2 da Badia, 2 dalla proprietà Bruci). Sono stati selezionati frammenti di ossa lunghe in accettabile stato di conservazione (tibiae, ulne, femori, omeri) appartenenti ad individui inumati singolarmente in tombe a camera. I campioni sono stati accuratamente puliti, abrasati in superficie ed irradiati perpendicolarmente ad ogni lato con raggi U.V. (254 nm) prima della fase di macinazione, preliminare a quella di estrazione. Questa si è ottenuta con il metodo fenolo cloroformio (4) a partire da 1 g di

polvere ossea. Successivamente il DNA è stato purificato con elettroforesi su gel di agarosio (5). Per la nostra ricerca ci siamo avvalsi dell'amplificazione mediante PCR di particolari regioni del genoma umano. Per la determinazione del sesso abbiamo amplificato sia una sequenza ripetuta di 154 bp appartenente alla sequenza alfoide di 3.4 kb del braccio lungo del cromosoma Y (6), sia l'omologo del gene dell'amelogenina localizzato sui cromosomi X e Y (Y 112 bp; X 106 bp; 7). Il profilo termico utilizzato per entrambe le amplificazioni consta di una prima fase di denaturazione (1 min. e 30 sec.) a 94°C, seguita da trenta cicli a 94°C (30 sec.), 58°C (30 sec.), 59°C (1 min. e 30 sec.) con un ciclo finale a 94°C (30 sec.), 58°C (30 sec.) e 59°C (2 min. e 30 sec.). I risultati dell'amplificazione dell'Y-repeat sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio, mentre i prodotti d'amplificazione del gene dell'amelogenina sono stati risolti su gel di acrilammide.

Si è usato particolare attenzione al problema delle contaminazioni: per ogni passaggio è stata verificata l'assenza di DNA eterologo mediante l'uso di controlli negativi, ovvero preparati in cui fossero presenti tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Sono state considerate valide solo le prove ripetute almeno tre volte in assenza di contaminazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

È stato possibile estrarre il DNA da 23 dei 29 campioni esaminati, con una resa elevata, pari al 79%, a testimonianza della validità delle tecniche utilizzate. Di questi 23, 12 campioni hanno dato esito positivo per l'amplificazione; il fatto che solo il 41.3% del campione iniziale abbia funzionato da templatato per la *Taq* polimerasi per entrambi i *loci* non deve sorprendere. Infatti questa percentuale, peraltro perfettamente in accordo con i dati della letteratura, è del tutto congruente con la natura stessa del DNA antico che, come già detto, non si conserva nella sua integrità.

I risultati mostrano che 5 individui appartengono al sesso femminile e 7 a quello maschile. La certezza di questa attribuzione risiede nel fatto che l'analisi contemporanea di *loci* sia X che Y specifici permette una verifica incrociata dei risultati. Comunque la presenza per la maggior parte dei casi analizzati di una precedente indagine morfometrica (8) ha permesso *a posteriori* un'ulteriore conferma.

CONCLUSIONI

Il metodo da noi usato, a differenza di quelli classici morfologici e metrici, non fa affidamento sull'integrità scheletrica del campione, e consente perciò di estendere l'analisi anche a resti parziali. Questo offre, con una minima perdita

di materiale, grandi possibilità sia per l'indagine su resti isolati, anche frammentari sia su individui completi provenienti da tombe e necropoli.

Le condizioni di conservazione, unitamente all'età dei reperti sono indubbiamente il fattore limitante per lo studio del DNA antico; tuttavia l'entità dei risultati da noi ottenuti con campioni dell'età del Ferro rappresenta una sicura riprova delle opportunità offerte dallo studio diretto del materiale genetico.

L'incoraggiante percentuale dei campioni per i quali è stato possibile determinare il sesso (41.3 %) ci induce a pensare che tale metodica possa, entro breve, diventare uno strumento routinario in campo archeologico e antropologico, da affiancare alle consuete analisi; è da notare che, comunque, in alcuni casi l'indagine sul DNA può costituire l'unico mezzo per risolvere problemi di attribuzione.

Ulteriori e importanti informazioni possono essere fornite agli studiosi della storia umana dall'analisi del DNA antico: ricostruzione dei pattern di migrazione e delle distanze genetiche fra le popolazioni, come pure indicazioni su eventuali patologie.

Studi di popolazione applicati all'antico possono risultare decisivi per stabilire l'origine, non solo dei gruppi attuali (9), ma anche di quelli del passato (10): anche le ipotesi sulla provenienza degli Etruschi potrebbero arricchirsi di nuove prove offerte dall'analisi del DNA. Consapevoli di questa opportunità abbiamo iniziato uno studio sul DNA mitocondriale (molecola particolarmente informativa) degli stessi campioni: sebbene si siano ottenuti i primi risultati, il numero degli individui indagati dovrà essere esteso perché i risultati siano confrontabili con quelli già a disposizione in letteratura.

BIBLIOGRAFIA

1. PÄÄBO S., 1985, *Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA*, *Nature* 314: 644-5.
2. HAGELBERG E. and CLEGG J. B., 1993, *Genetic polymorphism in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA*, *Proc.R.Soc.Lond. B* 252:163-70.
3. SAIKI R. K., et al., 1988, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, *Science* 239: 487-491.
4. SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T., 1989, *Molecular cloning*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory press.
5. VARGAS R., SANCHEZ R., 1995², *Material genético de restos óseos humanos*, in *Estudios de Antropología Biológica*, vol. 5, Rodríguez R. M. e Alonso S., Città del Messico Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Antropología e Historia, pp. 199-217.
6. KOGAN S. C. and GITSCHIER J., 1990, *Genetic prediction of haemophilia A*, in *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., San Diego, Academic Press, pp. 288-99.
7. MANNUCCI A. et al., 1994, *Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin*, *Int.J.Leg.Med.*, 106: 190-3.

8. OLAH S. *et al.*, 1993, *Anthropological examination of the Etruscan bone material from Magliano in Toscana, Cancellone I, Grosseto, Italy*, *Int.J.Anthr.* 8: 155-161.
9. PIAZZA A. *et al.*, 1988, *A genetic history of Italy*, *Ann.Hum.Genet.* 52: 203-213.
10. HAUSWIRTH W. W. *et al.*, 1994, *Inter- and intrapopulation studies of ancient humans*, *Experientia*, 50: 585-591.