

## 1.8 Analisi biomolecolari

*M. Lari, D. Caramelli*

**La possibilità di analizzare da un punto di vista molecolare reperti biologici di interesse storico-archeologico, rappresenta un valido strumento nell'ambito della valorizzazione dei resti scheletrici umani. La paleogenetica<sup>14</sup> è oggi una disciplina matura che fa uso di approcci sperimentali robusti e permette di ottenere dati genomici altamente informativi.**

Tale approccio pertanto è ampiamente utilizzato in particolare sui resti scheletrici umani, per rispondere a domande in ambito filogenetico, evolutivo, popolazionistico, bioarcheologico e paleopatologico. Analogamente al materiale genetico, anche i residui delle proteine antiche presenti nei resti ossei e nei denti possono fornire informazioni utili per ricostruire la storia evolutiva umana. Il principale vantaggio della paleoproteomica rispetto alla paleogenetica risiede nel fatto che nei tessuti mineralizzati i residui proteici sono più stabili rispetto al DNA, permettendo di analizzare da un punto di vista molecolare anche reperti molto antichi; lo svantaggio è dovuto invece alla possibilità di indagare solo i prodotti proteici tessuto-specifici, con finalità quindi più limitate.

### Paleogenetica

L'analisi del DNA antico interessa la ricerca in campo evolutivo, storico e archeologico. I dati paleogenetici concorrono a ricostruire i legami biologici e culturali, la struttura sociale, lo stato di salute e più in generale le condizioni di vita di popolazioni antiche permettendo di raggiungere livelli di risoluzione molto elevati. Nel corso dell'ultimo decennio lo sviluppo di metodiche di analisi e tecnologie *high throughput*<sup>15</sup> ha ampliato enormemente le potenzialità e gli scopi della paleogenetica aprendo di fatto la strada alla paleogenomica. Nella ricerca antropologica, oggi sono molti gli ambiti di indagine che beneficiano dell'approccio molecolare, e grazie all'analisi genetica su resti umani antichi avanzamenti significativi delle conoscenze sono stati raggiunti in particolare riguardo a:

- la ricostruzione delle relazioni filogenetiche e delle dinamiche popolazionistiche dei gruppi di ominini che hanno caratterizzato la storia evolutiva umana recente nel Pleistocene superiore;

---

<sup>14</sup>Con paleogenetica si intende la caratterizzazione e l'analisi del DNA antico endogeno ancora conservato all'interno di un resto scheletrico o di qualunque altro reperto biologico

<sup>15</sup>approccio che permette di analizzare contemporaneamente e in tempi relativamente brevi un numero elevato di campioni/dati attraverso strumenti automatici; in ambito genomico si riferisce a sequenziatori automatici del DNA in grado di processare contemporaneamente decine o centinaia di campioni con target di sequenziamento limitati o selezionati (e.g. genomi microbici, genomi mitocondriali umani, esomi) o, in alternativa, numeri inferiori di campioni con target più ampi o a profondità maggiori (e.g. genomi umani completi ad alta copertura)

- l'indagine dettagliata dei movimenti migratori che hanno determinato il popolamento dei continenti e caratterizzato il diffondersi di innovazioni tecnologiche o specifici aspetti culturali;
- l'identificazione delle componenti genetiche ancestrali nei genomi dei differenti gruppi umani del passato e la ricostruzione dei processi demografici che hanno portato alla formazione dei pool genetici delle popolazioni umane attuali;
- la ricostruzione delle relazioni parentali tra inumati;
- il riconoscimento e la ricostruzione dei genomi di agenti patogeni legati alla diffusione nel passato di determinate malattie.

A causa dei processi degradativi e della continua esposizione all'attacco microbico, il materiale genetico endogeno riconducibile a un individuo antico rappresenta una frazione minima del DNA totale recuperabile da un resto scheletrico dopo la deposizione. Il DNA endogeno inoltre risulta degradato e frammentato in molecole lunghe poche decine di paia di basi. Pertanto la preservazione del DNA rappresenta la principale limitazione alle analisi genetiche sui reperti antichi. Per fare fronte a queste problematiche la scelta del distretto scheletrico oggetto dell'analisi e l'utilizzo di protocolli sperimentali *ad hoc* sono determinanti per massimizzare il recupero delle informazioni genetiche e, parallelamente, ridurre le potenziali interpretazioni erronee dovute alla presenza di DNA umano moderno contaminante.

Sebbene in linea di principio sia possibile estrapolare da ogni frammento scheletrico le stesse informazioni genetiche relative all'individuo, in realtà in alcuni distretti la preservazione del DNA endogeno risulta molto più elevata. In particolare, nella porzione cocleare della rocca petrosa, una parte dell'osso temporale posta alla base del cranio, è presente una regione di tessuto osseo altamente compatto in cui il DNA è più abbondante e rimane meglio protetto dai fattori degradativi, principalmente di tipo microbico, che si verificano durante la deposizione. Se nel DNA estratto da un reperto scheletrico generico conservato a medie latitudini la frazione di DNA endogeno attribuibile all'individuo è estremamente bassa (anche inferiore al 1%), la regione compatta della rocca petrosa può contenere fino al 80% di DNA endogeno. Anche i denti rappresentano una buona fonte di DNA endogeno; in questo caso il prelievo per l'analisi genetica deve essere effettuato dalla zona della radice, più ricca di cellule, preservando la corona.

Le moderne metodologie permettono di limitare significativamente la richiesta di materiale per le analisi e i quantitativi richiesti sono dell'ordine di poche decine di milligrammi. Pertanto, per massimizzare la resa e il contenuto informativo dell'analisi paleogenetica, puntando anche alla ragionevolezza dei costi, in fase di campionamento è fondamentale selezionare accuratamente gli individui privilegiando quelli in cui siano presenti i distretti più favorevoli per la preservazione del DNA.

### Proteine antiche

Lo studio di antichi residui proteici è diventato possibile solo di recente mediante l'applicazione di metodiche di sequenziamento basate sulla spettrometria di massa in tandem (MS/MS)<sup>16</sup>. Mentre il DNA può indagare i processi evolutivi con la massima risoluzione, le proteine possono essere informative su scale temporali più lunghe e in aree geografiche che sono meno favorevoli alla conservazione del DNA.

Analogamente alla paleogenetica, la maggior parte degli studi sulle proteine antiche si è concentrata su ossa e denti. È stato recentemente dimostrato che la stretta interazione tra i residui proteici e la matrice minerale svolge un ruolo cruciale nella stabilizzazione delle proteine antiche. I proteomi delle ossa e della dentina sono simili in quanto entrambi sono dominati da dal collagene di tipo 1<sup>17</sup>. Sebbene il collagene sia una delle proteine più abbondanti e stabili, che sopravvive spesso per milioni di anni nei tessuti biomineralizzati, la sua variabilità limitata la rende inadeguata per le analisi filogenetiche. Lo smalto dentario invece ha un proteoma altamente distinto di circa dieci proteine che non si trovano nella dentina e possono essere analizzate in modo relativamente non distruttivo. Una delle proteine dello smalto dentario è l'amelogenina, che nell'uomo è espressa in due isoforme da due diversi geni situati sulle parti non ricombinanti dei cromosomi sessuali (cromosomi X e Y). L'identificazione di sequenze specifiche dell'amelogenina codificata dal cromosoma Y rappresenta pertanto nei resti dentari umani un'alternativa alle metodiche di determinazione molecolare del sesso su base genetica. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che le proteine dello smalto dentario rappresentano una risorsa biomolecolare utile per indagare fasi più antiche dell'evoluzione umana, in particolare quelle comprese tra Pleistocene inferiore e medio, per le quali l'analisi genetica risulta non applicabile.

### Tartaro

Sebbene il tartaro non costituisca un tessuto umano, non è inusuale osservare sui resti dentari umani depositi di *dental calculus*<sup>18</sup> che, in alcuni casi, possono raggiungere quantitativi ingenti. La varietà di informazioni da esso desumibili e il suo potenziale analitico si sono rilevati elevati.

Inizialmente, lo studio del *dental calculus* ha riguardato soprattutto la caratterizzazione morfologica del suo contenuto batterico e dei microresti vegetali in esso inclusi mediante tecniche di microscopia. L'analisi morfologica dei microresti ha dimostrato la capacità del *dental calculus* di fornire informazioni supplementari rela-

---

<sup>16</sup>Tecnica spettrometrica in due fasi che prevede la separazione dei residui e l'analisi degli spettri di massa dei frammenti ottenuti. Risulta particolarmente utile per l'analisi della composizione di miscele complesse di composti organici.

<sup>17</sup>Il collagene è la principale proteina dei tessuti connettivi; ha un ruolo strutturale e conferisce resistenza alla tensione. Nelle ossa e nella dentina la maggior parte della componente organica è costituita da collagene di tipo 1, una proteina che si presenta in forma di fibrille ordinate composte da una tripla elica di polipeptidi.

<sup>18</sup>Il termine inglese per tartaro, *dental calculus*, si è diffuso nell'ambito degli studi di settore.

tive alla dieta alimentare, permettendo di avanzare ipotesi legate anche alle attività produttive e commerciali dell'uomo nel passato.

Nel tempo sono state esplorate anche le potenzialità informative del *dental calculus* come fonte di DNA antico. In particolare, l'applicazione di tecniche di sequenziamento *high throughput* consente oggi di ricostruire l'intera composizione di comunità microbiche antiche, fornendo l'eccezionale opportunità di indagare in dettaglio l'evoluzione del microbioma orale in relazione ai cambiamenti dello stile di vita delle popolazioni umane. Inoltre tale approccio permette di identificare e ricostruire i genomi di specifici microrganismi antichi associati all'uomo e di valutare i cambiamenti evolutivi avvenuti nel corso del tempo.

È stata inoltre dimostrata la possibilità di recuperare dal tartaro anche molecole di DNA umano. In particolare, usando metodiche di arricchimento specifico, è possibile ricostruire genomi mitocondriali completi. Pertanto, il tartaro potrebbe rappresentare anche una potenziale fonte di molecole di DNA antico umano, soprattutto nel caso in cui non sia consentito l'accesso diretto a determinati resti scheletrici. Naturalmente il quantitativo di DNA umano endogeno che rimane intrappolato nel tartaro risulta significativamente inferiore rispetto alla rocca petrosa e ai denti, pertanto il suo utilizzo per la genomica umana in alternativa ad altri distretti deve essere attentamente valutato nei singoli casi.

Analogamente al materiale genetico, anche i residui delle proteine rimangono preservati all'interno dei depositi di *dental calculus*. In questo caso uno degli interessi principali riguarda la caratterizzazione dei residui proteici legati alla dieta; in diversi contesti è stata infatti dimostrata la presenza delle proteine del latte ma anche di residui proteici legati al consumo di alimenti vegetali. L'identificazione di proteine umane legate alla risposta immunitaria e il confronto con la composizione microbica può inoltre fornire informazioni utili per indagare più in dettaglio lo stato di salute delle popolazioni del passato.

### **Bibliografia essenziale**

1. Adler et al. 2013
2. Amorim et al. 2018
3. Cappellini et al. 2018
4. Orlando et al. 2021
5. Pinhasi et al. 2015
6. Stoneking e Krause 2011
7. Welker et al. 2020