

Articoli/Articles

MEDICINA MOLECOLARE E STORIA
DELLA MEDICINA: DALLA PALEOPATOLOGIA
ALLA GENETICA DELLE POPOLAZIONI

FABIO VERGINELLI[§], LAURA OTTINI[¶], DIANA ESPOSITO[§],
ALESSANDRO CAMA[§], PASQUALE BATTISTA[§], ROSALBA CIRANNI[§],
KATIA ZAVAGLIA^{**}, RENATO MARIANI-COSTANTINI[§], GINO FORNACIARI[§]
[§]Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Sezione di Patologia Molecolare,
Università "Gabriele D'Annunzio", Chieti.

[¶]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia,
Sezione di Storia della Medicina, Università di Roma "La Sapienza", I.
[§]Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina,
Sezione di Storia della Medicina e Paleopatologia e
^{**}Laboratorio di Oncologia Molecolare, Università di Pisa, I.

SUMMARY

ANCIENT DNA STUDIES: FROM PALEOPATHOLOGY
TO POPULATION GENETICS

We discuss the relevance of ancient DNA studies for novel approaches to a variety of fields of scientific inquiry, including population and evolutionary genetics, prehistoric archaeology, paleopathology and history of human diseases. To exemplify the potential of ancient DNA research, we provide accounts of studies currently conducted at our laboratories in four different areas: 1) origins of the dog and phylogeny of prehistoric Italian canids; 2) paleogenetics of ancient Rome; 3) antiquity for variant alleles implicated in disease predisposition; 4) molecular investigation of pathologic lesions in Italian mummies of Renaissance age. The implications of the results obtained are briefly outlined.

Sin dai primi anni '80 ricerche pionieristiche misero in evidenza che residui di DNA endogeno potevano conservarsi in re-

Key words: Ancient DNA - Population genetics - Dog - Domestication - Ancient Rome - Mummies - Paleopathology - Thrifty genotype

sti antichi di origine animale, umana e vegetale. Le prime sequenze di DNA cosiddetto "antico" furono pubblicate nel 1984 dal gruppo di Higuchi e Wilson, i quali isolarono DNA mitocondriale (mtDNA) endogeno da un frammento di pelle di quagga (*Equus quagga*), un equide sudafricano estintosi nella seconda metà del secolo XIX¹. In Italia, già nel 1985 Franco Rollo analizzava acidi nucleici da semi di *Lepidium sativum* conservati con il corredo funerario di una mummia egizia risalente a circa 3.300 anni fa², mentre venivano resi noti i primi studi effettuati su mummie egizie³. Successivamente, l'introduzione della tecnica di replicazione *in vitro* del DNA tramite reazione polimerasica a catena (PCR), che permette di generare milioni di copie di una sequenza partendo, in teoria, da una molecola di DNA, rese possibile il progresso della paleogenetica⁴. Nel 1988 il gruppo di Alan Wilson, di cui faceva parte lo svedese Svante Pääbo, all'epoca negli Stati Uniti, descriveva un aplotipo di mtDNA ottenuto dall'encefalo mummificato di un paleoindiano di 7.000 anni fa⁵, mentre nel 1989 Hageberg e Sikes ottenevano mtDNA suino dal femore di un prosciutto affondato all'inizio del secolo XVI alla foce del Tamigi con la "Mary Rose", ammiraglia di Enrico VIII d'Inghilterra⁶. Questo studio dimostrava la possibilità di ottenere mtDNA endogeno da resti scheletrizzati⁷, di gran lunga più abbondanti rispetto ad altri tipi di reperti biologici antichi. Su questa linea, altre ricerche, tra cui specialmente quelle di Höss e Pääbo, dimostravano che era possibile analizzare mtDNA di ossa molto antiche, come quelle dei grandi mammiferi della fine dell'Era Glaciale^{8,9,10}.

Il mtDNA si è rivelato di fondamentale importanza per la paleogenetica, perché, oltre al vantaggio di essere di limitata estensione e ben caratterizzato, presenta copie multiple per cellula, fatto che ne assicura una conservazione di gran lunga migliore nel tempo rispetto al DNA nucleare^{11,12,13}: il genoma mitocondriale umano, ad esempio, si estende per 16.569 coppie di basi, solo lo 0,0006% del genoma umano totale, ma è presente in un numero di copie variabile tra 1.000 e 10.000 genomi per cellula, a seconda del tipo cellulare e delle richieste metaboliche, rispetto ai due genomi per cellula mediamente presenti per il DNA nucleare.

Un'altra caratteristica del mtDNA estremamente importante per gli studi paleogenetici è l'ereditarietà materna: il genoma mitocondriale è infatti ereditato quasi esclusivamente dall'ovocita¹⁴. Questo comporta assenza di fenomeni di ricombinazione e segregazione allelica, cosicché il numero di differenze nucleotidiche nel mtDNA di due individui che condividano una stessa antenata, in linea di discendenza femminile, è direttamente proporzionale al numero di generazioni che li separano da essa. Perciò, lo studio del mtDNA permette di costruire alberi filogenetici interpretabili come genealogie matrilineari di una popolazione, di una specie, o di specie diverse derivate da un comune antenato¹⁵. Una ulteriore vantaggiosa caratteristica è che per il mtDNA la dimensione della popolazione effettiva è minore di quella del DNA nucleare, ereditato da entrambi i genitori: una coppia di riproduttori diploidi presenta infatti quattro genomi aploidi nucleari, ma un solo mtDNA trasmissibile alla prole¹⁵. Questo porta ad un più alto tasso di differenziazione per deriva genetica. Pertanto il mtDNA è un ottimo indicatore di effetti fondatore, di colli di bottiglia genetici e di colonizzazioni. Infine, nonostante l'organizzazione genomica semplice e filogeneticamente conservata, il mtDNA evolve da dieci a venti volte più velocemente del DNA nucleare di funzione comparabile¹⁶. Il tasso di evoluzione medio per l'intera molecola è stimato dell'ordine di 1-2% di basi mutate per milione di anni: il mtDNA può fungere quindi da "orologio molecolare" per "datare" eventi macro- e micro-evolutivi.

In anni recenti, i risultati di maggior impatto ottenuti dalle ricerche sul DNA antico riguardano proprio il mtDNA: tra il 1997 e il 2000 l'analisi di alcuni famosi fossili neandertaliani, come l'olotipo dalla grotta Feldhofer nella valle del Düsselbach, chiamata Neanderthal, e reperti dalla grotta di Vindija in Croazia e dal Caucaso, ha consentito al gruppo di Svante Pääbo di stimare la distanza genetica tra *Homo sapiens* e *Homo neanderthalensis*, dimostrando oggettivamente che queste due forme umane devono essere considerate alla stregua di specie separate^{17,18}.

Le ricerche sul DNA antico non si sono però limitate allo mtDNA, ma hanno riguardato, in misura e con rilievo scientifico forse minori, anche il DNA nucleare ed il genoma di nume-

rosi microrganismi, come pure cloroplasti e DNA nucleare vegetale. Con lo sviluppo di severi criteri di validazione dei dati, in grado di discriminare contaminazioni recenti, che avvengono sempre ove non vi sia personale esperto e disponibilità di laboratori adeguatamente attrezzati, le ricerche sul DNA antico possono contribuire a discipline estremamente diverse, quali l'antropologia, la paleontologia, l'archeologia preistorica, la genetica di popolazione, la paleopatologia, la storia della medicina, la medicina legale e la microbiologia¹⁹.

Le ricerche condotte presso i nostri laboratori possono fornire un esempio delle potenzialità offerte dallo studio del DNA antico nei settori dell'archeologia preistorica, della paleogenetica e della paleopatologia. Nel presentare i nostri studi, ci proponiamo l'obiettivo di far comprendere come la paleogenetica molecolare, integrandosi con la genetica di popolazione e con la patologia molecolare, possa costituire il substrato di fertili interazioni tra campi d'indagine tradizionalmente diversi.

1. Ricerche paleogenetiche sull'origine dei cani

Daremo qui una panoramica delle nostre ricerche su canidi preistorici italiani, che hanno l'obiettivo di far luce su una fase critica della preistoria, quella della domesticazione animale, che si ritiene iniziare con il cane (*Canis familiaris*), in un'epoca tuttora dibattuta e senz'altro remota^{20,21}. Al tempo stesso, ci siamo proposti di fornire dati diretti utili alla ricostruzione della storia evolutiva dei cani, che, come oramai provato, discendono dai lupi (*Canis lupus*, Fig. 1). Nei nostri studi abbiamo inizialmente analizzato 8 canidi fossili o subfossili rinvenuti in siti preistorici italiani, di età compresa tra la fine del Paleolitico Superiore (XII-X millennio a.C.) e la prima Età del Ferro (IX secolo a.C.). Lo studio molecolare è stato effettuato su 299 paia di basi della regione ipervariabile del mtDNA. Cinque degli 8 canidi (Tab. 1), che comprendevano i tre reperti più antichi, inizialmente attribuiti a lupi del tardo Pleistocene/primo Olocene, hanno fornito dati di sequenza confermati con criteri di verifica severamente stringenti, mentre i restanti tre non hanno fornito dati molecolari. L'analisi statistica intra-gruppo, effettuata con il software *Arlequin 1.1*, mostra un indice di diversità genetica di $1,0 \pm 0,13$.



Fig. 1 - Lupo del tardo Pleistocene, esempio di arte parietale del Paleolitico Superiore dalla grotta di Les Combarelles, Dordogna. I primi cani associati agli accampamenti paleolitici dovevano avere questo aspetto.

La media del confronto a coppie assume nel campione dei canidi antichi un valore pari a $1,40 \pm 1,01$ con un indice di diversità nucleotidica pari a $0,011 \pm 0,010$. Nell'insieme, questi valori indicano una forte variabilità genetica interna al gruppo dei 5 canidi preistorici. Sulla base dei dati di sequenza è stata possibile un'analisi di confronto con i dati genetici in letteratura e in *GenBank*. Sono state utilizzate le sequenze di 140 cani, rappresentativi di 67 razze, e di 162 lupi, rappresentativi di 27 popolazioni di Europa, Asia e Nord America. Le nostre sequenze antiche si ripartiscono in 3 dei 4 maggiori cladi di sequenze mitocondriali di cane, in particolare i cladi I, II, e IV (Fig. 2). Un grosso canide della taglia di un lupo pleistocenico, rinvenuto a Palidoro presso Roma in associazione con la facies culturale romanelliana dell'epigravettiano (tardo Paleolitico Superiore), datato al radiocarbonio a 14.670 ± 130 anni prima del presente (presente = 1950 d.C.), ha un aplotipo nuovo che si situa in posizione basale nel clado II, che comprende aplotipi canini trovati in razze antiche del Vecchio e del Nuovo Mondo, come l'*husky*

Tabella 1 - Datazione assoluta dei canidi preistorici dell'Italia centro-meridionale (dal Paleolitico Superiore all'Età del Bronzo) positivi all'analisi del DNA.

Campione	Provenienza	Datazione (anni/C ¹⁴ -AMS)	Elemento osseo
AW1	Palidoro (Lazio)	14.670 +/- 130	Emimandibola
AW2	Grotta Romanelli (Puglia)	9670 +/- 40	Tibia
AW3	Grotta Romanelli (Puglia)	9860 +/- 50	Metapodiale
AD5	Casale del Dolce (Lazio)	4.110 +/- 40	Tibia
AD15	Vejano (Lazio)	3.040 +/- 40	Femore

siberiano e lo xoloitzcuintli messicano²². Un secondo canide fossile di dimensioni minori, compatibili con quelle di un lupo di piccola taglia o di un cane, associato con la cultura romanelliana nel sito eponimo di Grotta Romanelli in Terra d'Otranto, datato al radiocarbonio a 9.860 ± 50 anni prima del presente, si situa nel clado IV, un clado ritenuto di origine relativamente recente per la presenza di un aplotipo condiviso da cani e lupi. Un altro canide di dimensioni comparabili a quelle dei grossi lupi pleistocenici, rinvenuto nello stesso sito e strato del precedente ("Terre Brune" di Grotta Romanelli) e datato a 9.670 ± 40 anni prima del presente, si situa in posizione basale nel clado I, condividendo l'aplotipo eurasiatico attuale D3, che corrisponde ad uno dei 5 aplotipi canini fondatori che invasero l'America Settentrionale con i cacciatori del Paleolitico Superiore, attraverso la Beringia²². Gli aplotipi di due cani preistorici più recenti, uno dei quali datato a 4.110 ± 40 anni prima del presente e rinvenuto in un contesto Eneolitico laziale, l'altro datato a 3.040 ± 40 anni prima del presente e rinvenuto in un sito della tarda Età del Bronzo, sempre nel Lazio, corrispondono rispettivamente agli

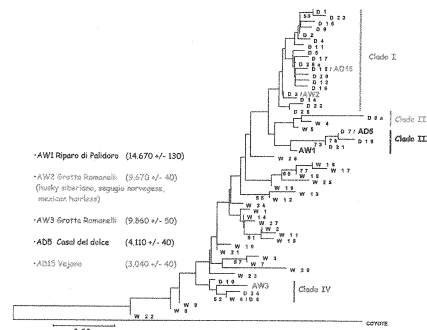


Fig. 2 - Relazioni genetiche tra 5 canidi preistorici dell'Italia centro-meridionale e 140 cani (di 67 razze) e 162 lupi (di 27 popolazioni) attuali: "neighbor-joining" tree basato su 261 bp della regione HVRI del DNA mitocondriale.

aplotipi attuali D7 nel clado II e D15 nel clado I, oggi comuni in una varietà di razze canine eurasiatiche²².

Il fatto che grossi canidi simili a lupi, datati al Pleistocene terminale/primo Olocene, si situano in cladi dominati da cani suggerisce che proto-cani di morfologia lufesca, geneticamente divergenti dai lupi per effetto di selezione umana, fossero associati con gli accampamenti romanelliani. Va inoltre notata la marcata eterogeneità genetica dei nostri cani preistorici, apprezzabile tenendo conto del fatto che i tre esemplari più antichi, tutti associati con il Paleolitico Superiore, si situano in ben tre su quattro dei cladi che comprendono i cani attuali (per confronto, i lupi attuali italiani non solo si situano in unico clado, ma hanno un solo aplotipo)²³. Quindi, la popolazione canina della penisola italiana era già altamente diversificata nel tardo Pleistocene, il che depone per una domesticazione molto più antica e probabilmente multicentrica, da più di una delle popolazioni

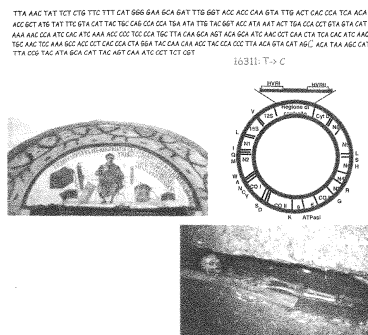


Fig. 3 - Paleogenetica di un romano del IV sec. d.C.: aplotipo della regione HVR1 del DNA mitocondriale di *Asellus*, figlio adolescente di *Honorata Severina* e dell'imprenditore edile *Trebius Justus* morto a 16 anni, raffigurato in un affresco dell'Ippogeo di Trebio Giusto in Roma.

olartiche di lupo del Pleistocene. A questo riguardo, è interessante speculare sul fatto che per le popolazioni preistoriche il cane probabilmente svolgeva funzioni molteplici, che comprendevano sia quelle cui noi oggi lo associamo (guardia, caccia, difesa, compagnia) sia funzioni molto diverse, ma forse più importanti per gruppi di cacciatori nomadi, come quella dell'impiego per trasporto di slitte e carichi e quella di fornire carne a scopo alimentare²⁴.

2. Paleogenetica di un sepolcro familiare di età romano-imperiale: l'Ippogeo di Trebio Giusto

Passando a ricerche attinenti antiche popolazioni umane, diamo qui un resoconto delle nostre indagini sulla paleogenetica degli inumati rinvenuti in un sepolcro monumentale di età imperiale, l'Ippogeo di Trebio Giusto, sito presso la Via Latina a

Roma. Riteniamo che questi studi aprano uno spiraglio di luce sul popolamento della più grande megalopoli dell'antichità, insuperata per numero di abitanti sino all'età moderna. L'Ippogeo di Trebio Giusto è un sepolcro scavato nel tufo, costruito da una ricca famiglia di imprenditori edili della Roma del IV secolo d.C.. L'ambiente è decorato di interessanti e ben conservati affreschi, che raffigurano i componenti della famiglia e le loro attività, con un particolare riferimento, ingenuamente e profondamente commovente, ad un giovane figlio di Trebio Giusto, il fondatore del sepolcro, affettuosamente soprannominato "Asinello" (*Asellus*), che premorì al padre all'età di 16 anni (Fig. 3). Asinello, nonostante il soprannome poco appropriato, è raffigurato assiso in mezzo a rotoli di papiro e tavolette scritte, a significare il suo impegno nello studio e l'orgoglio e l'amore dei genitori, ricchi ma provenienti da famiglie forse di origine servile o di bassa estrazione sociale, per il figlio che studia.

L'Ippogeo conteneva 39 individui scheletrici in deposizioni spesso multiple, 24 dei quali da noi studiati a livello molecolare. Prima di effettuare l'analisi del DNA, cinque scheletri sono stati sottoposti al test di racemizzazione degli aminoacidi. L'analisi ha mostrato rapporti di racemizzazione degli enantiomeri D ed L tra 0,072-0,172 per l'asparagina, 0,013-0,73 per l'alanina e 0,002-0,020 per la leucina. Questi rapporti indicavano che, nonostante l'umidità dell'ambiente di sepoltura, la conservazione di mtDNA endogeno poteva essere relativamente adeguata²⁵. L'analisi dell'intera regione ipervariabile 1 del DNA mitocondriale (HVR1), condotta amplificando tre regioni parzialmente sovrapposte, rispettivamente di 182 paia di basi per il primo segmento (nt 15996 - nt 16139), di 183 per il secondo (nt 16131 - nt 16271) e di 180 per il terzo (nt 16263 - nt 16401), ha fornito risultati positivi per 9 dei 24 scheletri analizzati. Le sequenze sono state risolte per tratti variabili dal nt 15997/16051 al nt 16362/16400 e confrontate con l'aplotipo di riferimento di Anderson.

Sulla base dei dati di sequenza, è stato possibile procedere ad analisi di confronto tra aplotipi attuali ed antichi. L'individuo scheletrico T.2A, presumibilmente di sesso femminile e con età alla morte tra 18 e 24 anni, era parte di una sepoltura multipla di 6 individui, rimaneggiata dopo la deposizione. L'individuo

scheletrico T.3A, presumibilmente di sesso maschile, deceduto tra i 30 ed i 40 anni, era parte di una sepoltura bisoma. Dalle analisi di sequenza appare evidente che T.2A e T.3A condividono un aplotipo corrispondente a quello di riferimento europeo descritto da Anderson, presente, secondo nostri studi, nel 16% circa della popolazione attuale dell'Italia centrale. Perciò questo aplotipo non permette di stabilire relazioni di parentela, anche se il dato ottenuto è compatibile con una comune origine materna di T.2A e T.3A. L'analisi di sequenza dell'individuo scheletrico T.1A, corrispondente ad Asinello, figlio di Trebio Giusto, ha dato un aplotipo pure largamente diffuso nelle popolazioni attuali europee (Fig. 3). La sostituzione di una timina con una citosina in posizione 16311, che caratterizza questo aplotipo, è stata riscontrata anche negli aplotipi di altri 3 individui scheletrici dell'ipogeo (T.2D, T.7A e T.8), seppure in combinazione con altre varianti nucleotidiche. Nelle popolazioni attuali la distribuzione della transizione in posizione 16311 mostra un gradiente di frequenza dall'Africa verso l'Europa e l'Asia, mentre non è stata riscontrata in popolazioni indiane americane (Fig. 4). L'aplotipo dell'individuo T.3B, la cui sepoltura era situata nella camera principale del sepolcro, è caratterizzato da una transizione in posizione 16223, molto comune in popolazioni africane ed eurasiatiche attuali. Attualmente questa transizione mostra gradienti di frequenza, da valori elevati (90%) nelle popolazioni africane a valori intermedi nelle popolazioni asiatiche (29% nei turchi) fino a valori bassi negli europei. L'individuo scheletrico T.7A, in deposizione primaria nella camera principale, presenta un aplotipo con varianti in posizione 16293 e 16311, descritto in popolazioni attuali della Gran Bretagna, Norvegia, Cornovaglia e Marocco. Interessante risulta pure l'aplotipo dell'individuo T.7B, caratterizzato da sostituzioni in posizione 16093 e 16293, descritte esclusivamente in popolazioni attuali dell'Anatolia. Infine l'individuo T.9 presenta un aplotipo caratterizzato da una variante nucleotidica in posizione 16290, descritto unicamente nella popolazione berbera del Marocco.

In conclusione, l'analisi del DNA mitocondriale ha permesso di ottenere limitati ma significativi dati genetici riguardanti un nucleo di individui di tarda età imperiale associati in un conte-

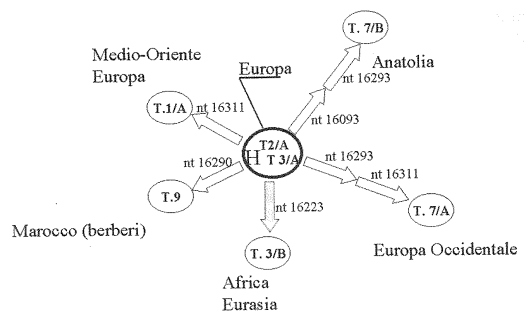


Fig. 4 - Sharing tra le sequenze HVRI di 7 individui scheletrici inumati nell'Ipogeo di Trebio Giusto e gli aplotipi frequenti nelle popolazioni attuali.

sto funerario familiare. Nei 9 individui scheletrici che hanno dato mtDNA sono rappresentati 8 aplotipi diversi, il che documenta una notevole eterogeneità di linee materne. Le sequenze determinate includono aplotipi descritti in popolazioni attuali di aree dell'Europa Occidentale, del Nord Africa e del Medio Oriente che erano allora entro i confini dell'impero (Fig. 4). I dati molecolari del ristretto campione dell'Ipogeo di Trebio Giusto sembrerebbero perciò riflettere la probabile eterogeneità genetica della Roma imperiale.

3. Antica origine di un allele mutato: indagini su una popolazione alto-medievale

Le malattie ereditarie comprendono patologie dovute a mutazioni germinali a carico di uno specifico gene, il quale è localizzato nel DNA nucleare o, più raramente, nel mtDNA. Essendo la mutazione presente in tutte le cellule dell'individuo, il DNA proveniente da qualsiasi tessuto, incluso l'osso, può essere utilizzato per la diagnosi. Nel caso di patologie dovute a mutazio-

ne di geni nucleari, la diagnosi molecolare su campioni scheletrici antichi è resa difficile dal fatto che questi geni sono di norma rappresentati da due sole copie per cellula, mentre la mutazione responsabile di predisposizione a malattia è localizzata in un allele. Pertanto, questo tipo d'indagine presenta notevoli difficoltà tecniche ed interpretative, che devono essere tenute presenti, anche se non è possibile esporle in dettaglio in questa sede²⁶. In questo campo porteremo l'esempio delle nostre ricerche su scheletri altomedievali, che documentano direttamente l'antichità di un allele implicato nella predisposizione al diabete e nel cosiddetto "genotipo frugale".

Le nostre indagini erano dirette a verificare l'antichità dell'origine di specifici polimorfismi di sequenza del gene IRS-1, codificante il substrato-1 del recettore dell'insulina, coinvolto nella trasduzione del segnale del recettore insulinico. IRS-1 è stato il primo substrato del recettore dell'insulina ad essere caratterizzato. Sono state clonate le corrispondenti molecole umane, di ratto, topo, cercopiteco etiope e pollo. La molecola contiene residui di tirosina, serina e treonina la cui fosforilazione media il segnale intracellulare. Mutazioni di IRS-1 sono coinvolte nella patogenesi del diabete mellito non-insulino dipendente.

Varianti aminoacidiche di IRS-1 oggi diffuse nelle popolazioni occidentali perché potrebbero aver conferito nelle popolazioni antiche vantaggi selettivi nelle condizioni di "stress" nutrizionale cronico, esacerbato da ricorrenti carestie, che erano allora prevalenti. In particolare, una mutazione al codone 971 (IRS-1 G971R), che riduce l'interazione di IRS-1 con la PI3-chinasi, causando deficit nella fosforilazione di substrati a valle, potrebbe essere funzionalmente implicata nel cosiddetto "genotipo frugale". Questa variante di IRS-1, definita G971R, perché caratterizzata da sostituzione aminoacidica glicina-arginina al residuo 971, è stata identificata nel 1993²⁷ e successivamente studiata in varie popolazioni. Almind e collaboratori hanno osservato che nei danesi la frequenza della mutazione era più alta nei diabetici (11.6%) rispetto ai controlli (3.9%). Tuttavia, diversamente dai danesi, in una popolazione italiana da noi studiata la frequenza della G971R era simile nel gruppo con diabete mellito non-insulino dipendente e nei controlli sani. Il nostro studio

però mostrava che la G971R era associata a resistenza all'insulina, sia nei pazienti con diabete mellito non-insulino dipendente che nei controlli portatori della mutazione (dati non pubblicati).

Abbiamo voluto verificare se portatori della mutazione fossero identificabili tra gli individui scheletrici altomedievali (VII-XIII sec. d.C.) rinvenuti in una necropoli di Teramo (presso la chiesa di S. Anna). Le analisi sono state effettuate su 36 individui scheletrici. Per verificare le condizioni tafonomiche di preservazione del DNA, 10 scheletri sono stati sottoposti al test di racemizzazione degli aminoacidi, che ha mostrato rapporti degli enantiomeri D ed L compresi tra 0,09-0,13 per l'asparagina, 0,03-0,052 per l'alanina e 0,002-0,033 per la leucina. Questi valori erano indicativi della possibile presenza di DNA endogeno. Sono state effettuate amplificazioni di due regioni nucleotidiche, rispettivamente comprendenti il codone 971 e il codone 234, sito di un polimorfismo che, in base a dati di cosegregazione, sembrerebbe insorto sull'allele mutato al codone 971. Si tratta nello specifico di un polimorfismo silente GGG->GGA, che non comporta alcun cambiamento aminoacidico, in quanto ambedue le triplette codificano per la glicina. Le reazioni di PCR, effettuate in *nested* utilizzando la tecnica *touch-down* per la PCR primaria, hanno fornito prodotti di amplificazione per 18 sui 36 scheletri analizzati per la regione nucleotidica comprendente il codone 971, dei quali 15 risultavano anche positivi per la regione comprendente il codone 234. I prodotti di PCR sono stati sottoposti a digestione con gli enzimi di restrizione BstNI, per l'analisi della mutazione al codone 971, e AVA I, per il polimorfismo al codone 234. Per il codone 971 l'allele *wild-type* (GGG) non presenta il sito di restrizione, mentre la mutazione, una transizione G->A, introduce il sito di taglio CCCAGG. Per il codone 234 è il genotipo *wild-type* (GGG) che presenta un sito di restrizione riconosciuto da AVA I, eliminato dalla transizione G->A che caratterizza l'allele mutato (GGA). I campioni con *pattern* di digestione indicativo di mutazione sono stati sottoposti a sequenziamento. La mutazione al codone 971 è stata riscontrata in 5/18 degli scheletri che hanno dato DNA antico, con una frequenza del 28% circa. Questa alta frequenza può tuttavia essere considerata solo indicativa della presenza di IRS-1 G971R

F. Verginelli, L. Ottini, D. Esposito, A. Cama, P. Battista, R. Ciranni, et al.

nell'Abruzzo altomedievale, non potendosi escludere che i portatori della mutazione fossero legati da relazioni familiari. Nel campione relativo ad un individuo scheletrico è stato possibile mettere in evidenza sia la transizione G->A al codone 971 che la transizione G->A al codone 234. Questo indica che l'allele portatore delle due mutazioni si era già originato in Italia centrale intorno al X secolo d.C.

4. Paleopatologia molecolare delle mummie rinascimentali di San Domenico Maggiore a Napoli

Infine toccheremo il campo più specifico della paleopatologia molecolare, mostrando dati molecolari riferiti alle malattie di nobili personaggi della corte napoletana di epoca rinascimentale, presenti tra le famose mummie della Basilica di San Domenico Maggiore in Napoli. Ci soffermeremo su due mummie rivelatesi di eccezionale interesse, quella di Ferrante I d'Aragona (Fig. 5) re di Napoli (1431-1494) e quella di Maria D'Aragona (Fig. 6), marchesa del Vasto (1503-1568).



Fig. 5 - Bassorilievo raffigurante Ferrante I d'Aragona, re di Napoli (1431-1494), Porta Capuana, Napoli.

Medicina molecolare e storia della medicina



Fig. 6 - Incisione coeva che ritrae Maria d'Aragona, marchesa del Vasto (1503-1568), all'età di 33 anni.

L'autopsia della mummia di Ferrante I d'Aragona, deceduto all'età di 63 anni, ha evidenziato un adenocarcinoma del colon estesamente infiltrante la muscolatura striata del piccolo bacino. L'istologia ha consentito di evidenziare cellule neoplastiche eccezionalmente ben conservate (Fig. 7), disposte in cordoni solidi o formanti lumi pseudo-ghiandolari, disseminate in un tessuto fibroso contenente fibre muscolari striate. Le cellule apparivano alte, disposte su più file, con citoplasma abbondante e nucleo ipercromatico ma abbastanza regolare. L'eccellente conservazione della struttura istologica di questo tumore, unico finora descritto in paleopatologia, è con ogni probabilità dovuta alle favorevoli condizioni microclimatiche della chiesa in cui il corpo fu sepolto e, sicuramente, al processo di imbalsamazione²⁸. Attualmente il tumore del colon incide sulla mortalità nelle popolazioni occidentali in misura molto significativa. I dati epidemiologici suggeriscono che un elevato consumo di carni rosse e/o un elevato apporto dietetico di grassi animali possono

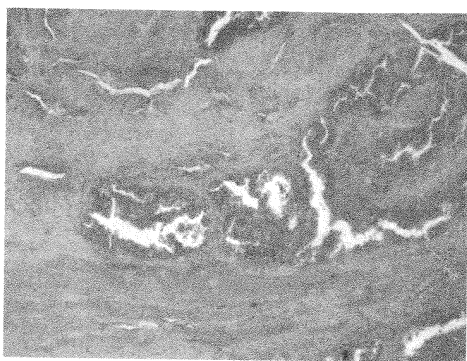


Fig. 7 - Adenocarcinoma infiltrante di probabile origine coloretale documentato dall'esame istologico dei tessuti muscolari del piccolo bacino della mummia di Ferrante I d'Aragona.

aumentare il rischio di insorgenza di questo tumore²⁹ anche se è ormai accettato il concorso di un certo numero di alterazioni genetiche³⁰. Fra queste è importante una mutazione che crea una deregolazione del proto-oncogene K-ras. Studi molecolari effettuati tramite PCR sul DNA estratto dal tessuto neoplastico di Ferrante I hanno evidenziato una mutazione puntiforme nel codone 12 del gene K-ras, in cui la normale sequenza GGT (glicina) è mutata in GAT (acido aspartico)³¹. Questa alterazione rappresenta la più frequente mutazione del gene K-ras riscontrata nel cancro sporadico del colon ed è tipicamente indotta da agenti alchilanti³².

In questi ultimi anni gli agenti alchilanti sono stati ampiamente usati per studiare i meccanismi mutageni e cancerogeni. La loro presenza nell'ambiente è ubiquitaria e l'esposizione umana alle sorgenti naturali e artificiali è universale. Gli alchilanti artificiali includono un grande numero di sostanze farma-

cologiche di origine industriale che, essendo stati introdotti nell'ambiente molto di recente, non possono evidentemente essere chiamati in causa nel caso del tumore di re Ferrante. I composti azotati organici (composti N-nitroso o NOC) e i loro precursori, che sono stati ampiamente studiati per la loro diffusione e per la loro rilevanza nei tumori gastro-intestinali, vanno presi in debita considerazione visto che la loro cancerogenicità è associata all'alchilazione del DNA^{33,34}. Nel caso di Ferrante I è invece possibile escludere, come possibile fonte di nitriti, il salnitro che fu introdotto come additivo per preservare il colore della carne negli insaccati soltanto fra il 1600 ed il 1750³⁵.

Studi recenti hanno sottolineato l'importanza dei composti azotati organici endogeni. È provato che nella dieta è contenuto un grande numero di elementi che possono essere nitrosati nel tratto gastro-intestinale e soprattutto nello stomaco per cui i nitroso composti endogeni provenienti dalla dieta, urea e amine aromatiche, possono essere un rischio tanto quanto quelli preformati³⁶. Un aumentato apporto di carni rosse induce un aumento significativo dei livelli di composti azotati organici nelle feci, simile a quello indotto dai NOC tabacco-specifici presenti nel fumo di sigaretta³⁷. La formazione di NOC nel colon umano spiega perciò molto bene l'associazione fra le carni rosse ed il tumore del colon.

Quanto alla personalità fisiopatologica di re Ferrante i ritratti mostrano un'obesità crescente fin dalla giovinezza. L'esame della mummia conferma l'obesità e l'esame istologico delle carotidi rivela una grave aterosclerosi. Infine, l'altissimo tasso osseo di zinco rivelato dagli esami paleonutrizionali testimonia un massiccio consumo di proteine di origine animale e probabilmente di vino, tipico della gastronomia delle corti italiane del Rinascimento³⁸.

In conclusione l'ambiente alimentare della corte napoletana del XV secolo in generale, e le abitudini del sovrano in particolare, possono spiegare bene, con la loro abbondanza di agenti alchilanti endogeni, la mutazione del gene K-ras alla base del tumore che uccise il re aragonese oltre cinque secoli orsono.

Maria D'Aragona, marchesa del Vasto, era affetta da sifilide venerea, denunciata da alcune ulcere luetiche cutanee e docu-

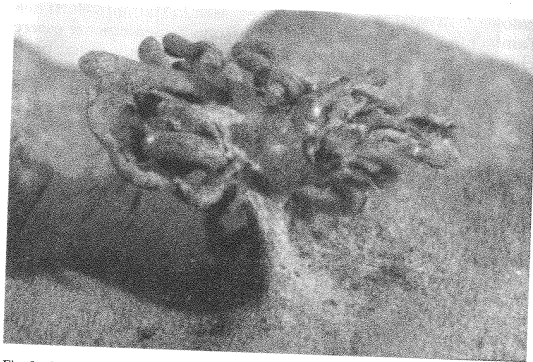


Fig. 8 - Condiloma di aspetto arboriforme nella regione inguinale della mummia di Maria d'Aragona.

mentata dalla presenza di treponemi, diagnosticati morfologicamente tramite immunostochimica ed esame ultrastrutturale³⁹. L'esame macroscopico della mummia aveva evidenziato la presenza, nella regione peri-inguinale destra, di una neoformazione pedunculata arborescente di 2x7 mm (Fig. 8) che, all'esame istologico, si presentava come una lesione cutanea papillare, con un tipico asse connettivale ed evidente paracheratosi. Le caratteristiche macroscopiche e microscopiche descritte apparivano peculiari del *condiloma acuminato*, una lesione squamosa sostenuta dal virus del papilloma umano o HPV⁴⁰. Per confermare la natura della lesione si è resa necessaria la ricerca dell'acido nucleico dell'HPV. Il DNA estratto da una sezione paraffinata dello spessore di 5 mm è stato amplificato con primers in grado di amplificare sequenze di 141-151 bp riferite a 25 tipi distinti di virus del papilloma genitale.

I frammenti di DNA amplificati sono stati utilizzati sia per clonare sia per tipizzare direttamente, tramite sonde, i virus

HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33. Il metodo di ibridazione ha rivelato la presenza del virus HPV 18, un virus che presenta un alto potenziale oncogeno. Un aspetto interessante è costituito dal fatto che il sequenziamento automatico di diversi cloni ha rivelato il 100% di sequenze omologhe sia nel DNA del virus HPV 18 sia in quello del virus JC9813, un nuovo virus HPV a basso potenziale oncogeno⁴¹.

Il virus del papilloma umano è molto antico e si è evoluto parallelamente al genere umano. Attualmente rappresenta uno dei più comuni virus trasmissibili sessualmente ed è responsabile di numerose lesioni dei genitali esterni e interni tra cui particolarmente importante è il carcinoma della cervice uterina.

*Gli studi descritti sono stati resi possibili da finanziamenti CNR, progetto finalizzato "Beni Culturali" e MIUR-COFIN.

BIBLIOGRAFIA E NOTE

1. HIGUCHI R., BOWMAN B., FREIBERGER M., RYDER O.A., WILSON A.C. *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. Nature, 1984; 312: 282-284.
2. ROLLO F. *Characterisation by molecular hybridization of RNA fragments isolated from ancient (1400 B.C.) seed*. Theor. Appl. Genet., 1985; 71: 330-333.
3. PÄÄBO S. *Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies*. J. Archaeol. Sci., 1985; 12: 411-417.
4. MULLIS K.B., FALOONA E.A., SCARF S.J., SAIKI R.K., HORN G.T., ERLICH H.A. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986; 51: 263-273.
5. PÄÄBO S., GIFFORD J.A., WILSON A.C. *Mitochondrial sequences from a 7,000-year-old brain*. Nucl. Ac. Res., 1988; 16: 9775-9787.
6. HAGELBERG E., CLEGG J.B. *Isolation and characterization of DNA from archaeological bone*. Proc. R. Soc. Lond. [series B], 1991; 244: 45-50.
7. HAGELBERG E., SIKES B. *Ancient bone amplified*. Nature, 1989; 342: 485.
8. PÄÄBO S. *Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989; 86: 1939-1943.
9. PÄÄBO S., HIGUCHI R., WILSON A.C. *Ancient DNA and the polymerase chain reaction*. J. Biol. Chem., 1989; 264: 9709-9712.
10. HOSS M., PÄÄBO S. *DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method*. Nucl. Ac. Res., 1993; 21: 3913-3914.
11. ANDERSON S., BANKIER A.T., BARRELL B.G., DE BRUIJN M.H.L., COULSON A.R., DROUIN J., EPERON I.C., NIERLICH D.P., ROE B.A., SANGER F., SCHREIER P.H., SMITH A.J.H., STADEN R., YOUNG I.G. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981; 290: 457-465.

12. HANDT O., KRINGS M., WARD R.H., PÄÄBO S., *The retrieval of ancient human DNA sequences*. Am. J. Hum. Genet., 1996; 59: 368-76.
13. CAPASSO L., VERGINELLI F., CARAMIELLO S., PALMIROTTA R., D'ANASTASIO R. & MARIANI-COSTANTINI R., *Identificazione e diagnosi molecolare di condizioni patologiche in reperti scheletrici umani antichi*. In "Il DNA nello studio dei resti umani antichi", a cura di F. Rollo, Medical Books, Palermo, 1999; 69-84.
14. GILES R.E., BLANC H., CANN H.M., WALLACE D.C., *Maternal inheritance of human mitochondrial DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980; 77: 6715-6719.
15. CANN R., *Mitochondrial DNA and human evolution: new directions, future challenges*. Rivista di Antropologia, 1993; 71: 305-314.
16. WALLACE D.C., YE J.H., NECKELMANN S.N., SINGH G., WEBSTER K.A., GREENBERG B.D., *Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations*. Curr. Genet., 1987; 12:81-90.
17. KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R.W., KRÄINITZKI H., STONEKING M., PÄÄBO S., *Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans*. Cell, 1997; 90:19-30.
18. KRINGS M., CAPELLI C., TSCHENTSCHER F., GEISERT H., MEYER S., VON HAESELER A., GROSSSCHMIDT K., POSSNERT G., PAUNOVIC M., PÄÄBO S., *A view of Neanderthal genetic diversity*. Nat. Genet., 2000; 26:144-146.
19. ROLLO F. (a cura di), *Il DNA nello studio dei resti umani antichi*. Medical Books, Palermo, 1999.
20. OLSEN S.J., *Origins of the domestic dog*. Tucson: University of Arizona Press, 1985.
21. NOBIS G., *Der älteste Haushund lebte vor 14.000 Jahren*. Umschau, 1989; 19:610.
22. VILÄ C., SAVOLAINEN P., MALDONADO J.E., AMORIM I.R., RICE J.E., HONEYCUTT R.L., CRANDALL K.A., LUNDEBERG J., WAYNE R.K., *Multiple and ancient origins of the domestic dog*. Science, 1997; 276: 1687-1689.
23. RANDI E., LUCCHINI V., CHRISTENSEN M.F., MUCCI N., FUNK S.M., DOLF G., LOESCHKE V., *Mitochondrial DNA variability in Italian and Eastern European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization*. Conservation Biology, 2000; 14: 464-473.
24. PARKMAN F., *The Oregon Trail*. Penguin, New York, 1978; 6:54.
25. POINAR H.N., HOSS M., BADA J.L., PÄÄBO S., *Aminoacid racemization and the preservation of ancient DNA*. Science, 1996; 272: 864-866.
26. PALMIROTTA R., VERGINELLI F., DI TOTA G., BATTISTA P., CAMA A., CARAMIELLO S., CAPASSO L., MARIANI-COSTANTINI R., *Use of a multiplex Polymerase Chain Reaction assay in the sex typing of DNA extracted from archaeological bone*. Int. J. Osteoarchaeol., 1997; 7:605-609.
27. ALMIND K., BJØRBAEK C., PEDERSEN O., KAHN C.R., *Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. The Lancet, 1993; 342: 828-832.
28. FORNACIARI G., *Indian mummies*. In: *Mummies, Disease & Ancient Cultures*. Cambridge: Cambridge University Press, 2nd ed., 1998; 266-281.
29. VOSKUIL D.W., KAMPMAN E., GRUBBEN M.J., GOLDBOHN R.A., BRANTS H.A., VASEN H.F., NAGENGAST F.M., VAN'T VEEB P., *Meat consumption and preparation, and genetic susceptibility in relation to colorectal adenomas*. Cancer, 1997; 114: 309-311.
30. GRYFE R., SWALLOW C., BAPAT B., REDSTON M., GALLINGER S., COUTURE J., *Molecular biology of colorectal cancer*. Current Problems in Cancer 1997; 21:233-300.
31. MARCHETTI A., PELLEGRINI S., BEVILACQUA G., FORNACIARI G., *K-ras mutation in the tumor of Ferrante I of Aragon, King of Naples (1431-1494)*. The Lancet, 1996; 347: 1272.
32. TOPAL M.D., *DNA repair, oncogenes and carcinogenesis*. Carcinogenesis 1988; 9:691-696.
33. GEORGIADIS P., XU Y.Z., SWANN P.F., *Nitrosamine-induced cancer: O4-alkylthymine produces sites of DNA hyperflexibility*. Biochemistry, 1991; 30: 11725-11732.
34. MIRVISH S.S., *Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC*. Cancer, 1995; 93:17-48.
35. LAUER K., *The history of nitrite in human nutrition: a contribution from German cookery books*. Journal of Clinical Epidemiology 1991; 44:261-264.
36. SHEPARD S.E., LUTZ W.K., *Nitrosation of dietary precursors*. Cancer Survey, 1989; 8:401-421.
37. BINGHAM S.A., PIGNATELLI B., POLLOCK J.R., ELLUL A., MALAVEILLE C., GROSS G., RUNSWICK S., CUMMINGS J.H., O'NEILL I.K., *Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? Carcinogenesis*, 1996; 17:515-523.
38. FORNACIARI G., CECCANTI B., CORCIONE N., BRUNO J., *Recherches paléonutritionnelles sur un échantillon d'une classe socialement élevée de la Renaissance italienne: la série de momies de S. Domenico Maggiore à Naples (XVe-XVIe siècles)*. In: *Advances in Paleopathology, Proceedings of the VII European Meeting of the Paleopathology Association*, 1989; 81-87.
39. FORNACIARI G., CASTAGNA M., TOGNETTI A., TORNABONI D., BRUNO J., *Syphilis in a Renaissance Italian Mummy*. The Lancet, 1989; 8663:614.
40. PRASAD C.J., *Pathobiology of human papillomavirus*. Clinical and Laboratory Medicine, 1995; 15:685-704.
41. FEOLI-FONSECA J.C., OLLIGNY L.L., FILION M., SIMARD P., RUSSO P.A., YOTOV W.V., *JC9813: A putative novel human papillomavirus identified by PCR-DS*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998; 250:63-67.

Correspondence should be addressed to:
Renato Mariani-Costantini, Sezione di Patologia Molecolare, Dipartimento di Oncologia e Neuroscienze, Università Gabriele D'Annunzio, Campus Madonna delle Piane, 66013 Chieti. E-mail: rmc@unich.it