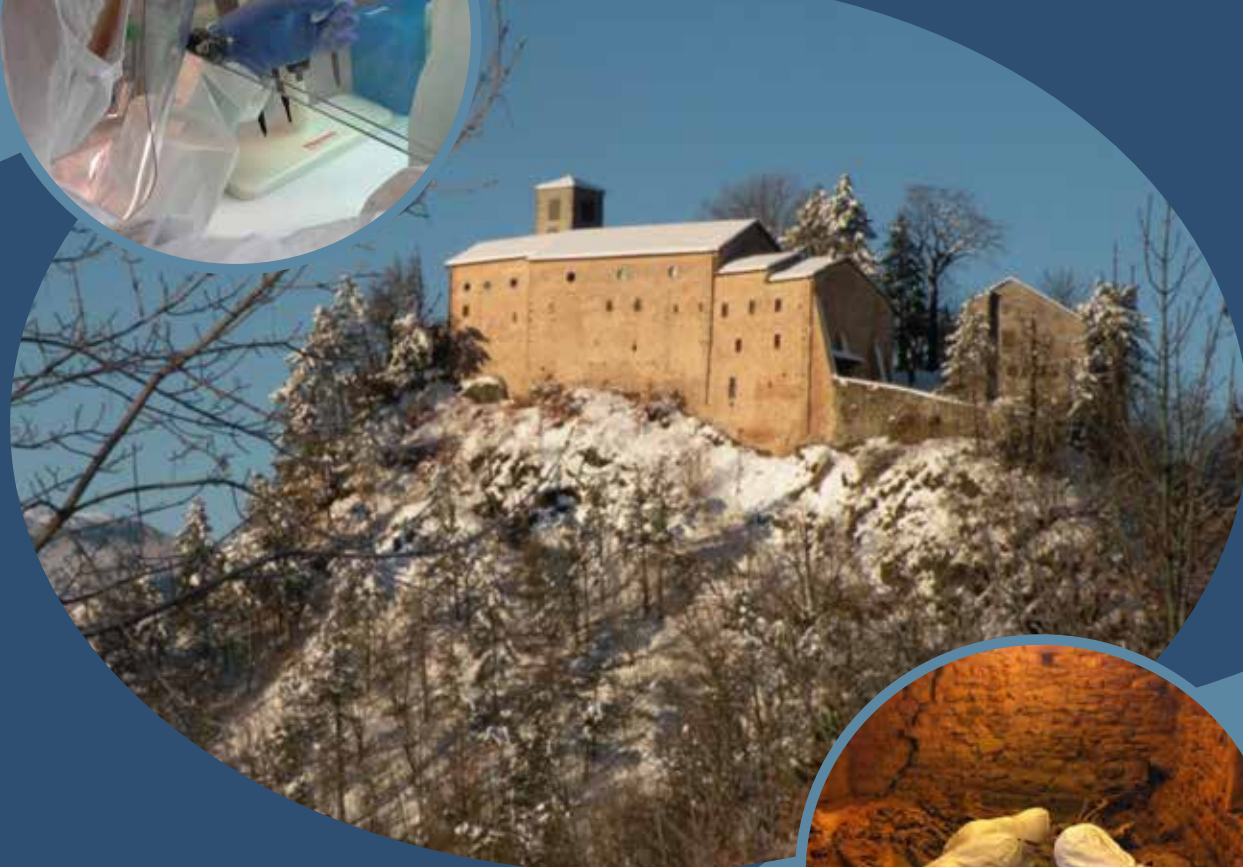
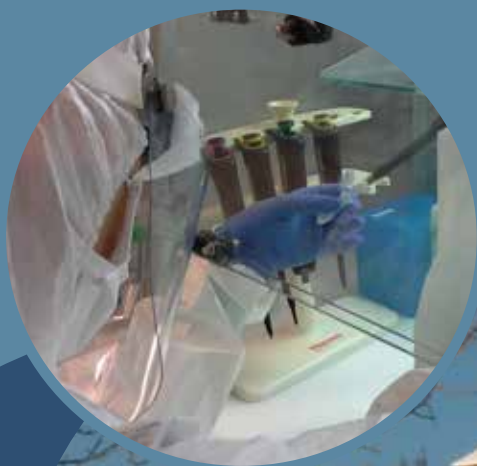


Le Mummie di Roccapelago

Un progetto pilota di ricerca interdisciplinare
tra archeologia, antropologia,
storia e scienze applicate



Le Mummie di Roccapelago

Un progetto pilota di ricerca interdisciplinare tra archeologia, antropologia, storia e scienze applicate

a cura di Elisabetta Cilli, Mirko Traversari

© 2020

Coordinamento editoriale

Fiamma Lenzi

Progetto grafico

Monica Chili

Stampato nel mese di maggio 2020

dal Centro Stampa Regione Emilia-Romagna (Bologna)

In copertina:

Veduta invernale della chiesa di Roccapelago edificata nel XVI secolo sui resti dell'antica rocca medievale; operazioni di campionamento all'interno della cripta sepolcrale della chiesa di Roccapelago; attività di analisi all'interno del Laboratorio del DNA antico nel Dipartimento di Beni Culturali dall'Università di Bologna (Campus di Ravenna).

IBC

Via Galliera, 21 40121 Bologna

Tel. 0039 051 527 6600

Fax 0039 051 232599

www.ibc.regione.emilia-romagna.it

Questo volume raccoglie le relazioni scientifiche di due convegni:

Le Mummie di Roccapelago: archeologia, antropologia e scienze applicate a confronto (Modena, 15 febbraio 2014) e *Le Mummie di Roccapelago 3.0: la rinascita degli antichi abitanti attraverso cinque anni di studi* (Ravenna, 24 marzo 2017).

ISBN 9788897281962

Elisabetta Cilli*, Alessio Zedde*, Patrizia Serventi*, Sara De Fanti**,
Andrea Quagliariello**, Stefania Sarno**, Giulia Graffi*, Monica Mosconi*,
Mirko Traversari*, Donata Luiselli**, Giorgio Gruppioni*

Il DNA delle mummie di Roccapelago: risultati preliminari

Introduzione

Il ritrovamento, nella cripta della chiesa della Conversione di San Paolo di Roccapelago (MO), di resti umani attribuibili a un elevato numero di individui, cronologicamente collocabili fra il XVI e il XVIII sec., ha dato la possibilità di sviluppare un ampio progetto multidisciplinare, che ha coinvolto diversi ambiti di ricerca: dall'archeologia all'antropologia, dalla paleopatologia all'entomologia, dall'archivistica allo studio dell'abbigliamento, ecc. Ciò anche grazie alle straordinarie condizioni di conservazione dei resti, in parte mummificati, e alla numerosità degli inumati, i quali rappresentano plausibilmente l'intera comunità montana di Roccapelago che si è susseguita nell'arco di circa duecento anni.

Nel contesto di simili ricerche, oggi un contributo significativo può derivare dall'analisi genetica dei reperti biologici attraverso l'esame del DNA che in essi si conserva, il cosiddetto DNA antico (aDNA). Ciò apre nuovi affascinanti orizzonti di ricerca rendendo possibile ricostruire la storia degli organismi che hanno lasciato qualche

traccia del loro passato. Questa testimonianza è racchiusa nel genoma di ogni essere vivente e, grazie ai continui progressi della biologia molecolare, è oggi possibile decifrarla, sia pure con i limiti derivanti dallo stato di conservazione della molecola di DNA che, dopo la morte dell'individuo, va incontro a processi più o meno intensi di frammentazione e degradazione, dovuti ai fattori chimico-fisici dell'ambiente di deposizione.¹ Il DNA recuperato da tessuti biologici antichi può contenere le risposte ad una serie di interrogativi sul passato della nostra specie o di altri organismi. Le applicazioni in questo settore di ricerca possono essere molteplici: studi evolutivi, identificazione di patologie infettive o genetiche, identificazione personale, definizione di rapporti di parentela tra individui, ricostruzione della dieta e caratterizzazione genetica di gruppi umani del passato. Attraverso l'analisi del DNA, notevoli risultati, ad esempio, sono stati raggiunti, oltre che nella caratterizzazione dell'umanità fossile, nella ricostruzione della storia bioculturale delle popolazioni etrusca² e nuragica,³ di gruppi asiatici,⁴ nonché dell'antico popolamento della Polonia.⁵

* Dipartimento di Beni Culturali, Laboratorio di Antropologia fisica e del DNA antico, Università di Bologna, Campus di Ravenna.

** Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Laboratorio di Antropologia Molecolare e Centre for Genome Biology, Università di Bologna.

¹ CARAMELLI 2009.

² VERNESI *et al.* 2004; GHIROTTO *et al.* 2013.

³ CARAMELLI *et al.* 2007.

⁴ KEYSER-TRACQUI *et al.* 2003; KEYSER-TRACQUI *et al.* 2006.

⁵ JURAS *et al.* 2014.

In questo contesto di ricerche rientra anche il progetto di studio del DNA nell'antica popolazione di Roccapelago. Esso è nato con l'intento di caratterizzare geneticamente questa interessante comunità montana che nella cripta della sua chiesa ci ha lasciato una preziosa testimonianza del suo passato e di ricollegarla con gli attuali abitanti del borgo.

Nella prospettiva di porre le basi per un ampio progetto integrato di archeologia, antropologia, biologia e genetica umana, ci si è proposti i seguenti obiettivi:

1. creare una biobanca del DNA dei membri della comunità del passato e dei viventi, secondo una scansione cronologica dal XVI secolo ad oggi. La peculiarità di detta biobanca risiede nel fatto che essa verrebbe a contenere il DNA di individui della medesima comunità che si sono succeduti nell'arco di oltre 400 anni, offrendo la possibilità di svolgere studi longitudinali di genetica e genomica umana;
2. individuare, fra i campioni di DNA costituenti la biobanca, le linee parentali maschili e femminili, mediante l'incrocio dei dati anagrafici dedotti dai registri parrocchiali e civili con quelli emersi dall'esame genetico;
3. creare un database in cui archiviare i dati (da trattarsi in forma anonima) di carattere antropologico, patologico, nutrizionale di ciascuno dei membri della biobanca che in un secondo momento verranno integrati con i dati genetici.

Il progetto, tuttora in corso, di cui vengono qui presentati i primi risultati, prevede innanzitutto l'analisi molecolare del DNA estratto da campioni di tessuti biologici antichi, come ossa e denti, prelevati dai resti rinvenuti nella cripta della chiesa. I marcatori genetici scelti per questo studio sono definiti 'uniparentali', in quanto vengono trasmessi da uno solo dei due genitori. Nello specifico sono stati analizzati il DNA mitocondriale ed il cromosoma Y. Il DNA mitocondriale,⁶ a differenza di quello nucleare, si trasmette solo per via materna, mentre il cromosoma Y solo per via paterna.⁷

La ricerca ha previsto l'applicazione delle più recenti ed innovative tecniche nel campo del DNA antico, comprese le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*).

Le analisi sono state svolte tenendo sempre conto delle principali linee guida previste nel settore di ricerca del DNA antico. In particolare, queste rigorose procedure (*Golden criteria*)⁸ prevedono l'obbligo di utilizzare un laboratorio esclusivamente dedicato all'estrazione del DNA antico (*clean lab*) ed un accurato monitoraggio delle possibili contaminazioni dei campioni, in tutte le fasi della ricerca, dal campionamento alle analisi in laboratorio. E' stato infatti chiaramente dimostrato come la possibilità di contaminazione da DNA esogeno moderno sia molto elevata qualora non siano state prese le adeguate precauzioni.⁹ In aggiunta a tutte le rigorose procedure volte a limitare le contaminazioni, sono

⁶ Del DNA mitocondriale (mtDNA) è stata presa in esame la prima regione ipervariabile (HVRI).

⁷ Per il cromosoma Y sono stati analizzati alcuni marcatori denominati microsatelliti (*Short Tandem Repeats* o STRs) costituiti da un tratto del DNA formato da una sequenza breve ripetuta molte volte del DNA: la ripetizione è comunemente tra 2 e 5 paia di basi.

⁸ COOPER, POINAR 2000.

⁹ PILLI *et al.* 2013.



Fig. 1 Preparazione di un campione dentale per l'estrazione del DNA.

stati genotipizzati tutti i ricercatori venuti in contatto con i reperti analizzati.¹⁰

Materiali e metodi

Il campionamento dei reperti destinati all'analisi del DNA antico ha riguardato un numero cospicuo di individui, che coprono l'arco temporale tra il XVI e il XVIII secolo¹¹ coincidente con la fase di utilizzo della cripta della chiesa della Conversione di S. Paolo a Roccapelago come luogo di sepoltura. Tutte le fasi di analisi dell'aDNA (campionamento, trattamento dei campioni, estrazione ed amplificazione) sono state condotte con apposite tute integrali dotate di cappuccio, guanti e maschere di prote-

zione, onde evitare la contaminazione da DNA esogeno. I campioni che consentono di ottenere risultati migliori nell'analisi del DNA antico sono rappresentati dai denti (Fig. 1) che, grazie alla loro peculiare struttura compatta e al rivestimento di smalto, offrono una più efficace protezione contro la degradazione e la contaminazione del DNA.¹² Per ogni individuo è stato campionato anche un frammento di femore al fine di incrociare i dati emersi dai differenti distretti e monitorare la presenza di DNA contaminante. In totale sono stati effettuati prelievi su circa 100 individui recuperati dalla cripta.

Allo scopo di effettuare uno studio genetico sulla popolazione di Roccapelago secondo una prospettiva diacronica, dalla fine del '500 ad oggi,

¹⁰ GILBERT *et al.* 2005.

¹¹ GRUPPIONI *et al.* 2010.

¹² ADLER *et al.* 2011; HIGGINS, AUSTIN 2013; HIGGINS *et al.* 2013; PILLI *et al.* 2013.

sono stati campionati, mediante prelievo buccale, numerosi individui attualmente residenti nel territorio, portatori di cognomi che, in base ai dati rilevati nei registri della parrocchia di Roccapelago, risultano essere quelli più ricorrenti fin dalle origini del paese.¹³

Presso il Laboratorio di Antropologia e DNA antico del Dipartimento di Beni Culturali sono state effettuate le fasi più critiche della procedura di analisi del DNA antico, tra cui l'estrazione, mentre presso il Laboratorio di Antropologia Molecolare e Centre for Genome Biology del Dipartimento BiGeA sono state eseguite le successive operazioni di sequenziamento massivo e genotipizzazione.

I campioni antichi sono stati estratti tramite membrane silicee,¹⁴ secondo un protocollo ottimizzato dai ricercatori coinvolti nel presente progetto. Il DNA è stato quantificato attraverso saggio fluorimetrico tramite Qubit (Invitrogen). Successivamente si è proceduto alla amplificazione sia del DNA mitocondriale che del cromosoma Y.

Per quanto riguarda il DNA mitocondriale è stato amplificato il frammento HVR1 (hypervariable region 1) tramite l'utilizzo di tre coppie di primers. I frammenti amplificati sono stati analizzati sia tramite clonaggio e successivo sequenziamento in Sanger,¹⁵ sia tramite sequenziamento massivo su piattaforma Ion Torrent PGM (Life Technologies). Per lo studio del cromosoma Y, in un primo momento, è stato impiegato il kit AmpFLSTR® Yfiler® PCR Amplification (Life Technologies). In seguito tuttavia il kit PowerPlex® Y23 System (Promega) si è dimostrato più

sensibile e maggiormente adatto ad essere utilizzato sul DNA antico, permettendo di analizzare simultaneamente 23 microsatelliti del cromosoma Y.

Primi risultati e prospettive future

I campioni prelevati dai resti umani hanno mostrato alte concentrazioni di DNA endogeno, grazie alle ottime condizioni di conservazione dei corpi. La presenza di due finestre nella parete orientale della cripta ha permesso, infatti, un'intensa ventilazione del locale che, unitamente al clima fresco e asciutto, ha favorito una rapida disidratazione dei tessuti e la loro conservazione nel tempo.

Al momento, della popolazione antica recuperata dalla cripta, sono stati analizzati 32 individui per il DNA mitocondriale e 9 individui per il cromosoma Y mentre, per quanto riguarda la popolazione vivente, sono stati analizzati 15 individui.

I dati preliminari emersi dallo studio del cromosoma Y hanno fornito interessanti risultati che hanno permesso di condurre un'indagine su doppia scala, sul piano popolazionistico e su quello identificativo delle linee parentali.

A livello locale, dal confronto degli aplotipi del cromosoma Y riscontrati negli inumati della cripta e nella popolazione attuale di Roccapelago è emerso un significativo *match* tra un individuo antico campionato fra gli inumati, attualmente musealizzato, insieme ad alcuni altri, nella cripta della Chiesa di S. Paolo, ed uno degli individui viventi campionati (Fig. 2) rendendo

¹³ L'attento vaglio della documentazione dell'archivio parrocchiale rientra nell'ambito della tesi di dottorato di Mirko Traversari, nella cornice del PhD programme in Cultural Heritage Studies.

¹⁴ ROHLAND *et al.* 2010; DABNEY *et al.* 2013.

¹⁵ Il principio della tecnica sviluppata da Fred Sanger si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati (dideossitriofosfato, ddNTPs) per interrompere la reazione di sintesi in posizioni specifiche.

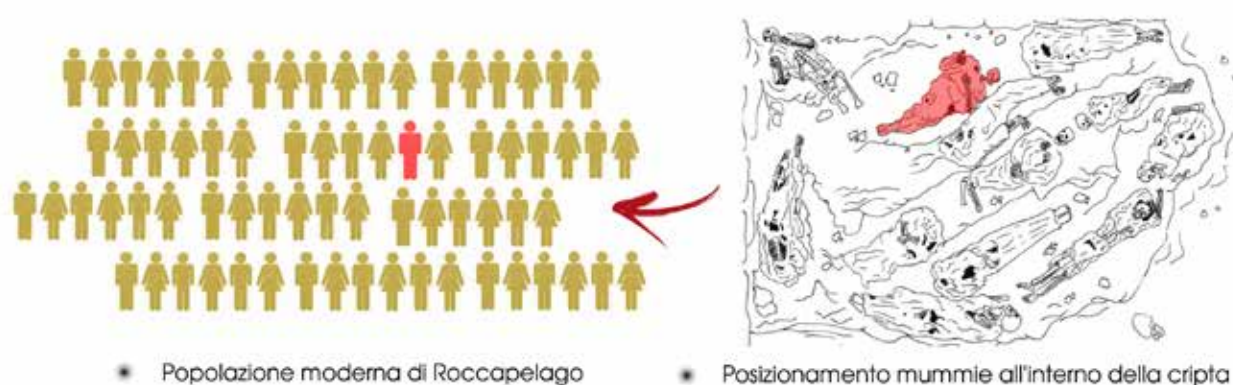


Fig. 2 Individuazione di una linea del cromosoma Y che collega un abitante di Roccapelago con un suo antenato, attualmente musealizzato nella cripta della chiesa.

possibile, anche grazie all'incrocio con i dati dell'archivio parrocchiale, la identificazione di una delle linee parentali maschili che congiungono la comunità del passato con quella attuale. Ciò conferma la possibilità che, attraverso l'ampliamento della ricerca, si possa giungere alla identificazione di linee parentali che dal passato si saldano con quelle viventi, con la possibilità di analizzare la segregazione genetica, nell'arco di quattro secoli, di caratteri fenotipici o patologici. Su una scala più ampia, gli aplotipi del cromosoma Y, sia del campione antico che del campione moderno, sono stati comparati con quelli di altre popolazioni, inseriti in un database appositamente creato. Tale operazione risponde all'obiettivo di individuare gli aplotipi più simili e calcolare le distanze genetiche rispetto alle popolazioni di confronto, consentendo di inquadrare meglio la popolazione di Roccapelago nell'ambito della variabilità genetica dell'Italia nord-occidentale e in particolare delle popolazioni dell'area tosco-emiliana.

Gli indici di distanza genetica hanno rivelato che la popolazione di Roccapelago diverge rispetto alle altre popolazioni di confronto e sembra qualificarsi come un possibile caso di isolato genetico, come ad esempio una piccola comunità

originatasi da pochi individui fondatori e rimasta successivamente a lungo isolata. È interessante inoltre sottolineare come la popolazione di Roccapelago mostri maggiori affinità genetiche con le popolazioni della Piana di Lucca e di Grosseto/Siena, e in generale con le popolazioni toscane, rispetto a quelle emiliane (Bologna e Modena). Grazie all'integrazione del dato genetico con i dati storici, la situazione riscontrata potrebbe essere ricondotta ai movimenti dei pastori che spostavano le greggi lungo le linee di transumanza, le quali collegavano Roccapelago con le zone di Lucca e Grosseto.

L'ampliamento del numero di campioni esaminati ed il completamento delle analisi genetiche consentiranno una migliore comprensione della struttura genetica della comunità di Roccapelago e della sua storia.

Parallelamente a questa ricerca di genetica di popolazione, presso gli stessi laboratori, è in corso l'analisi del microbiota intestinale delle mummie rinvenute a Roccapelago, cioè dell'insieme di microrganismi simbiotici ospiti del tubo digerente umano che residuano nel record archeologico. Un tale studio su campioni antichi permetterebbe di definire uno stato ancestrale delle comunità microbiche e la loro conseguente

co-evoluzione con l'uomo. Inoltre, l'analisi della composizione batterica intestinale può rappresentare un approccio innovativo rispetto ai metodi classici etno-antropologici, permettendo di dedurre informazioni sulle abitudini alimentari, sullo stile di vita e sulle condizioni di salute di antiche popolazioni.

Inoltre la popolazione di Roccapelago, per le sue caratteristiche genetiche, che sembrano ricondurla ad un potenziale isolato genetico, potrebbe essere candidata come popolazione ideale anche in progetti di ricerca sulla longevità o di genetica medica. Difatti lo studio di alcune malattie ereditarie multifattoriali, come ad esempio le malattie cardiovascolari, risulterebbe semplificato, data la compresenza di alcune peculiarità quali il piccolo numero di fondatori della popolazione, l'omogeneità ambientale e fenotipica e la limitata distribuzione geografica.¹⁶

I dati preliminari finora ottenuti preannunciano risultati di notevole interesse, la cui lettura integrata consentirà la ricostruzione e la miglior comprensione delle dinamiche sociali e bioculturali che hanno caratterizzato la storia della piccola comunità di Roccapelago.

Bibliografia

ADLER C., HAAK W., DONLON D., COOPER A. 2011, *Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones*, «Journal of Archaeological Science», XXXVIII, pp. 956-964.

ARCOS-BURGOS M., VÉLEZ-JUARBE J., SOLOMON B., MUENKE M. 2012, *A common genetic network underlies disruptive or externalizing disorders*, «Human Genetics», CCXXXI, pp. 917-929.

CARAMELLI D. 2009, *Antropologia Molecolare, Manuale di base*, Firenze, Firenze University Press.

CARAMELLI D., VERNESI C., SANNA S., SAMPIETRO L., LARI M., CASTRÌ L., VONA G., FLORIS R., FRANCALACCI P., TYKO R., CASOLI A., BERTRANPETIT J., LALUEZA-FOX C., BERTORELLE G., BARBUJANI G. 2007, *Genetic variation in prehistoric Sardinia*, «Human Genetics», CXXII, pp. 327-336.

COOPER A., POINAR H. 2000, *Ancient DNA: Do It Right or Not at All*, «Science», CCLXXXIX, p. 1139.

DABNEY J., KNAPP M., GLOCKE I., GANSAUGE M.-T., WEIHMANN A., NICKEL B., VALDIOSERA C., GARCÍA N., PÄÄBO S., ARSUAGA J.-L., MEYER M. 2013, *Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments*, «Pnas», CX, pp. 15758-15763.

GHIROTTI S., TASSI F., FUMAGALLI E., COLONNA V., SANDIONIGI A., LARI L., VAI S., PETITI E., CORTI G., RIZZI E., DE DELLIS G., CARAMELLI D., BARBUJANI G. 2013, *Origins and Evolution of the Etruscans' mtDNA*, «Plos One», VIII, pp. 1-11.

GILBERT T. P., RUDBECK L., WILLERSLEV E., HANSEN A., SMITHE C., PENKMANE K. E.H., PRANGENBERGE K., NIELSEN-MARSHE C.M., JANSG M.E., ARTHURH P., LYNNERUPI N., TURNER-WALKERJ G., BIDDLEK M., KJØLBYE-BIDDLEK B., COLLINS M.J. 2005, *Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy*, «Journal of Archaeological Science», XXXII, pp. 785-793.

GRUPPIONI G., LABATE D., MERCURI L., MILANI V., TRAVERSARI M., VERNIA B. 2010, *Gli scavi della Chiesa di San Paolo di Roccapelago nell'Appennino modenese. La cripta con i corpi mummificati naturalmente*, «Pagani e Cristiani. Forme e attestazioni di religiosità del mondo antico in Emilia», X, pp. 219-245.

HIGGINS D., AUSTIN J. 2013, *Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains*, «Science & Justice», LIII, pp. 433-441.

HIGGINS D., KAIDONIS J., TOWNSEND G., HUGHES T., AUSTIN J. 2013, *Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures*, «Investigate Genetics», IV, pp. 1-8.

¹⁶ ARCOS-BURGOS *et al.* 2012; JORDE *et al.* 2000.

JORDE L., WATKINS S., BAMSHAD M., DIXON E., RICKER E., SEIELSTAD M. 2000, *The distribution of human genetic diversity: A comparison of mitochondrial, autosomal, and Y chromosome data*, «American Journal of Human Genetics», LXVI, pp. 979-988.

JURAS A., DABERT M., KUSHNIAREVICH A., MALMSTROM H., RAGHAVAN M., KOSICKI J.Z., METSPALU E., WILLERSLEV E., PIONTEK J. 2014, *Ancient DNA Reveals Matrilineal continuity in present-day Poland over the last Two Millennia*, «Plos One», IX, pp. 1-9.

KEYSER-TRACQUI C., CRUBÉZY E., LUDE B. 2003, *Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egiin Gol Valley of Mongolia*, «American Journal of Human Genetics», LXXIII, pp. 247-260.

KEYSER-TRACQUI C., CRUBÉZY E., PAMZSAV H., VARGA T., LUDES B. 2006, *Population origins in Mongolia: genetic structure analysis of ancient and modern DNA*, «American Journal of Physical Anthropology», CXXXI, pp. 272-281.

PILLI E., MODI A., SERPICO C., ACHILLI A., LANCIONI H., LIPPI B., BERTOLDI F., GELICHI S., LARI M., CARAMELLI D. 2013, *Monitoring DNA Contamination in Handled vs. Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains*, «Plos One», VIII, pp. 1-6.

ROHLAND N., SIEDEL H., HOFREITER M. 2010, *A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput*, «Molecular Ecology Resources», X, pp. 677-683.

VERNESI C., CARAMELLI D., DUPANLOUP I., BERTORELLE G., LARI M., CAPPELLINI E., MOGGI-CECCHI J., CHIARELLI B., CASTRÌ L., CASOLI A., MALLEGNI F., LALUEZA-FOX C., BARBUJANI G. 2004, *The Etruscans: A Population-Genetic Study*, «American Journal of Human Genetics», LXXIV, pp. 694-704.