

Il libro “in codice” della vita

Seguire il corso dell'evoluzione
attraverso l'analisi del DNA antico

CRISTIANO VERNESI

Centro di Ecologia Alpina - Centro Ricerca e Innovazione – FONDAZIONE EDMUND MACH
vernesei@cealp.it

Dai ciuffi di peli al genoma del *mammuth*

Nell'evoluzione per selezione naturale, quale delineata 150 anni or sono da Darwin nel suo lungamente e meritatamente citato “*L'origine delle specie*”, il termine stesso selezione ci indica un elemento fondamentale: perché si possa avere evoluzione è necessario poter scegliere. In estrema sintesi, la selezione naturale può assimilarsi ad un articolato processo mediante il quale vengono scelti gli individui che meglio si adattano a particolari condizioni ambientali e che in virtù di questo adattamento possono trasmettere il proprio patrimonio ereditario alle generazioni successive.

Proprio perché di scelta si tratta, l'elemento irrinunciabile di qualsiasi percorso evolutivo è l'esistenza di variazione, di diversità.

Questa diversità si manifesta e viene studiata a più livelli, da quelli più macroscopici, delle specie all'interno di un determinato ambiente (ecosistema), per arrivare a quelli su scala molecolare, ovvero di specifici frammenti degli acidi nucleici (geni).

Si definisce spesso, con una certa approssimazione ma nondimeno con molteplici ragioni scientifiche, il DNA come il libro della

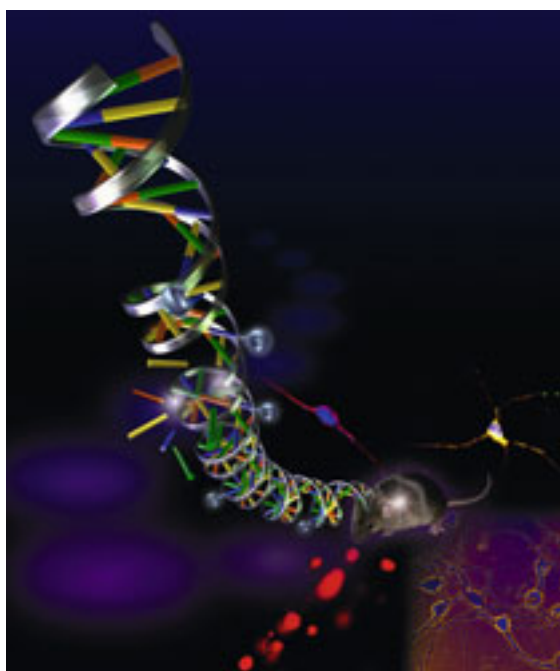


Fig.1 – La doppia elica è, per antonomasia, l'immagine del DNA, “memoria” genetica di cellule ed organismi.

vita. Proprio come un testo, anche il DNA è scritto in una lingua che, a ben vedere, può a tutti gli effetti dirsi universale, condivisa com'è dagli organismi più semplici come i virus fino a quelli più complessi quali, ad esempio, i mammiferi. Una lingua che conta solo quattro lettere, A, C, G e T (le quattro basi azotate: Adenina, Citosina, Guanidina e Timina).

Spingendoci oltre nella similitudine, potremmo pensare a ciascun organismo vivente come a un singolo libro, la cui lettura completa potrebbe farci capire non solo il suo funzionamento a livello di via metaboliche ma anche la sua storia, la sua evoluzione appunto.

Nel mondo ideale, la comprensione dell'evoluzione della vita sulla terra passerebbe, quindi, per l'allestimento di un'enorme biblioteca contenente tanti libri quante sono le specie attualmente presenti sul pianeta. Da lì poi si passerebbe alla lettura per intero dei singoli volumi: si dovrebbe, difatti, leggere il genoma di ogni organismo, allestendo quello che viene solitamente definito un progetto di ricerca di sequenziamento dell'intero genoma. Si tratta, come si può facilmente intuire, di ricerche complesse e costose, che si possono condurre solo su alcuni organismi chiave, primo fra tutto l'uomo, il cui genoma è stato, infatti, letto per intero già nel 2001. Sebbene il progresso tecnologico abbia fatto passi da gigante rendendo perseguibile un progetto di sequenziamento a costi inferiori di uno o anche più ordini di grandezza, rimane in ogni caso utopico sequenziare l'intero genoma di tutte le forme viventi.

Allora, proprio come faremmo per avere un'impressione parziale ma significativa di

un libro, possiamo affidarci alla lettura di alcuni capitoli. In modo semplicistico ma utile, possiamo pensare di suddividere l'intero spettro della variazione interna a ogni singolo genoma in due grandi categorie: la variazione neutrale e quella cosiddetta adattativa. La prima viene così definita perchè si ritiene che su di essa la selezione naturale abbia un'influenza molto marginale. Potremmo pensare ai capitoli di un libro che mostrano differenze sostanziali non solo fra specie diverse ma anche fra individui diversi della stessa specie per via dello schema più libero secondo cui sono costruiti. Per contro, la variabilità adattativa è sottoposta ai rigidi vincoli della selezione naturale come quelli, ad esempio, che agiscono su importanti processi metabolici come la respirazione. Per trasportare efficacemente l'ossigeno, indipendentemente che si tratti di un piccolo invertebrato o di un elefante, le molecole debbono possedere precisi requisiti. Ci possono essere variazioni ma su un tema sostanzialmente abbastanza rigido. In ultima analisi, l'analisi di questo tipo di variabilità ci svelerebbe una situazione di maggiore similitudine anche fra specie diverse, come se i capitoli dei diversi libri che mi trovassi a leggere presentassero significative analogie.



Fig.2 – Il sequenziamento di una porzione o dell'intero genoma si traduce, in estrema sintesi e semplificazione, nell'individuazione di un'infinita sequenza di basi azotate.



Fig.3 – Come l'usura del tempo può in varia misura pregiudicare la consultabilità e la decodifica di testi antichi, così la degradazione molecolare degli acidi nucleici ostacola il sequenziamento del DNA antico.

Continuando la nostra similitudine DNA-libro, si potrebbe concludere che a seconda che si leggano i capitoli neutri o quelli adattativi, si possono inferire risposte diverse sulla storia biologica dei singoli organismi. Con la variazione di tipo neutrale si studiano principalmente le relazioni filogenetiche e sistematiche fra i distinti *taxa*, l'effetto di importanti forze evolutive come la deriva genetica e la mutazione, nonché l'eventuale segno lasciato da fenomeni quali il flusso genico e l'espansione demografica. Attraverso alcune assunzioni (orologio molecolare) si può anche tentare di dare una profondità temporale agli eventi di divergenza fra le specie e/o le popolazioni.

L'analisi, invece, della variazione adattativa può farci capire l'azione della selezione nel determinare la risposta degli organismi alle sollecitazioni ambientali, offrendoci al tempo stesso importanti indicazioni circa le

capacità degli stessi di far fronte ad eventuali cambiamenti.

Come in una biblioteca molto fornita, si trovano accanto ai libri moderni anche più rari esemplari di libri antichi, siano esso incunaboli o addirittura manoscritti su pergamena, anche la nostra biblioteca biologica contiene esemplari moderni e antichi, ovvero vissuti in un passato più o meno lontano. Grazie all'avvento delle tecniche di biologia molecolare sono circa ormai 25 anni che è possibile studiare il DNA di questi individui antichi che si distingue per almeno tre aspetti molto critici: la degradazione, le piccole quantità e l'estrema sensibilità alla contaminazione. Pur senza entrare nei dettagli, si intuisce immediatamente che l'effetto finale è quello di un'analisi molto più complessa, proprio come potrebbe essere la lettura di un testo antico reso illeggibile dal tempo e con molti capitoli conservati solo in alcune parti.

A partire dalla pubblicazione del primo lavoro di un certo rilievo sul DNA cosiddetto antico (perchè estratto da reperti antichi) del 1984, si sono avute molte pubblicazioni, con anche roboanti annunci (e.g. estrazione e caratterizzazione del DNA di un dinosauro) che in non pochi casi si sono poi rivelati artefatti dovuti alla contaminazione da parte di DNA moderno.

Oggi sappiamo che è estremamente difficile recuperare DNA più antico di alcune decine di migliaia di anni, a meno che non provenga da organismi conservati nel *permafrost*; in questo caso, le basse temperature costanti permettono un significativo rallentamento di tutti i processi di degradazione degli acidi nucleici.

Il DNA antico e l'evoluzione umana

Uno dei campi in cui ha trovato maggiori applicazioni l'analisi del DNA antico è, senza

dubbio, quello della ricostruzione dell'evoluzione umana, con maggiore enfasi, anche per gli inevitabili limiti temporali della conservazione del DNA, sulla fase di transizione verso *Homo sapiens* e i rapporti fra quest'ultimo e Neandertal. Sebbene esistano anche forme intermedie, le due principali ipotesi circa la comparsa di *H. sapiens* prendono il nome di *Out of Africa* e ipotesi multiregionale. La prima, molto sinteticamente, prevede che il passaggio dalla forme ancestrali di *Homo erectus* alle prime morfologicamente ascrivibili a *H. sapiens* sia avvenuto una sola volta nel continente africano intorno a circa 180-200.000 anni fa. Da lì i primi *sapiens* avrebbero poi intrapreso, qualche decina di migliaia di anni più tardi, un viaggio che li avrebbe portati in Eurasia e America del nord, rimpiazzando le forme arcaiche lì eventualmente ancora presenti.

In particolare, relativamente all'Europa, questo modello prevede che non ci siano rapporti diretti di discendenza fra i Neandertal e i Cro-Magnons, come sono chiamati i primi *sapiens* europei.

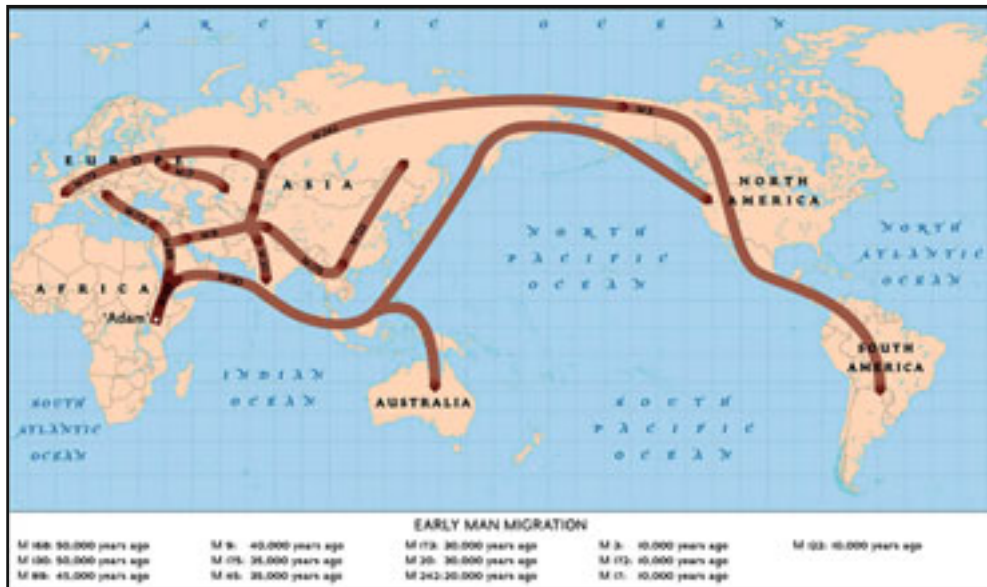


Fig.4 – L'ipotesi "Out of Africa" prevede un'origine africana e monofiletica di *Homo sapiens*, che dalla "culla" nel Continente Nero avrebbe poi colonizzato in tappe successive, il resto del globo.

L'ipotesi multiregionale prevede che non solo in Africa ma anche in Europa e Asia si sarebbe realizzato il passaggio dalle forme ancestrali di *erectus* a quelle derivate di *sapiens*. Laddove presenti, di fatto i Neandertal avrebbero potuto rappresentare l'elemento intermedio fra *erectus* e *sapiens*, ponendosi, perciò, in diretta connessione genealogica. In questo modello, si ipotizza che il mantenimento della coesione a livello di specie, si sarebbe determinato grazie ad un costante flusso genico fra i tre continenti che avrebbe impedito all'isolamento geografico di tramutarsi in un differenziamento genetico troppo marcato, il cui effetto finale avrebbe potuto anche condurre alla comparsa di nuove specie.

E' bene ricordare che entrambe le ipotesi sono state formulate a partire da dati paleontologici e archeologici; solo successivamente le indagini sulle attuali popolazioni hanno fatto entrare l'analisi del DNA nella disputa. Inferire un processo del passato dallo studio

dei suoi effetti sul presente non è, tuttavia, la stessa cosa che studiare direttamente gli eventi passati. L'analisi del DNA antico permette proprio l'indagine diretta del passato. Ritornando al discorso introduttivo, per indagare i rapporti genealogici fra forme differenti, non c'è dubbio che la variabilità neutrale sia più indicata; anche per questo motivo, le ricerche sul DNA antico si affidano spesso alla determinazione della sequenza nucleotidica di frammenti più o meno lunghi del DNA mitocondriale (mtDNA). Il mtDNA è una molecola circolare localizzata al di fuori del nucleo, nei mitocondri. Nella stragrande maggioranza dei vertebrati essa viene ereditata per la sola via materna e, non essendo sottoposta alla ricombinazione, viene trasmessa inalterata da una generazione all'altra salvo l'aggiunta di qualche mutazione, il cui tasso di accumulo, per organismi filogeneticamente simili, è, più o meno approssimativamente, una funzione lineare del tempo.

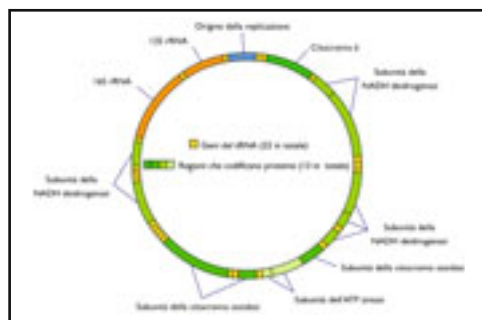
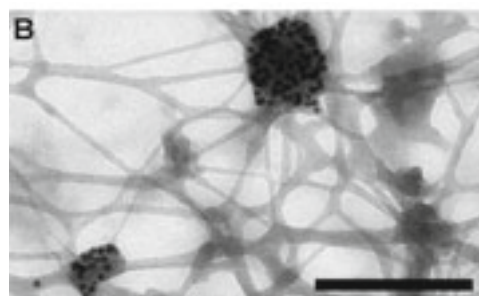
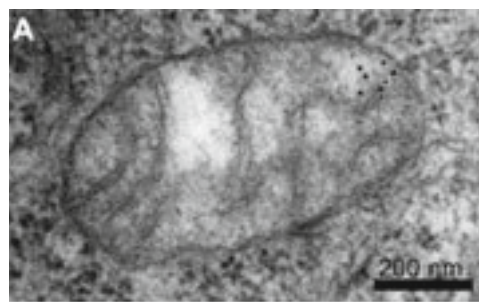


Fig.5 – Mappa del DNA mitocondriale

Fig.6a – Sezione di un mitocondrio con marcatura immunochimica ad oro colloidale tramite anti-DNA che individua ammassi discreti di mtDNA alla periferia dell'organello, vicino alla membrana mitocondriale.

Fig.6b – Particolare del citoplasma estratto dal mitocondrio: l'mtDNA marcato con le particelle d'oro resiste all'estrazione (immagini tratte da: IBORRA et al., BMC Biology 2004 2:9).



Inoltre, poiché ogni cellula contiene più mitocondri e in ogni mitocondrio vi sono più copie di mtDNA, esso è presente in una quantità significativamente maggiore del DNA genomico contenuto in sola duplice copia nel nucleo. In organismi vecchi anche migliaia di anni è facile intuire che i molteplici processi degradativi portano ad una riduzione qualitativa e quantitativa del DNA; è evidente, quindi, che se si vuol massimizzare la probabilità di recuperare del DNA da questi organismi antichi, ci si deve primariamente rivolgere al mtDNA.

Nel 1997 è stata determinata per la prima volta la sequenza di un frammento del mtDNA di un Neandertal vissuto circa 40.000 anni fa; il confronto con le sequenze al tempo disponibili in un ampio campione di individui moderni ha permesso di escludere sostanzialmente una diretta continuità genealogica fra Neandertal e *sapiens*. Almeno per quanto concerne le popolazioni attuali, nessuna di esse sarebbe geneticamente in diretta relazione con questo singolo individuo di Neandertal. Analisi su altri reperti di Neandertal hanno confermato il quadro emerso. Tuttavia, per meglio poter escludere un qualche contributo dei Neandertal alla costituzione del patrimonio ereditario del *sapiens* moderno, almeno in Europa, il confronto si sarebbe dovuto condurre fra i Cro-Magnons, i primi *sapiens* europei, e neandertaliani dello stesso continente, meglio se anche temporalmente coevi o quasi.

Proprio questa è stata la motivazione di un primo lavoro scientifico del 2003, cui ha partecipato anche chi scrive. Dall'analisi del mtDNA di due Cro-Magnons di circa 24.000 anni fa rinvenuti nella grotta di Paglicci, in Puglia, abbiamo potuto escludere un loro rapporto di maggior vicinanza con i Neandertal, nonostante siano ad essi più vicini temporalmente rispetto alle popolazioni moderne di *sapiens*.



Fig.7 – Una delle sepolture della grotta di Paglicci (immagine tratta dal sito: www.dst.unisi.it/)

Questo risultato ha trovato un'importante conferma in un recente lavoro del 2008 cui ha partecipato ancora il nostro gruppo di ricerca e che ha anche escluso che la contaminazione con DNA moderno possa aver pregiudicato i risultati dell'analisi originaria. Il mtDNA delinea, quindi, uno scenario di discontinuità fra i Neandertal e i primi *sapiens* europei, portando un forte sostegno all'ipotesi *Out of Africa*.

I sostenitori dell'ipotesi multiregionale hanno, in ogni caso, replicato che il quadro tracciato da un singolo marcatore genetico potrebbe, tuttavia, esser parziale non poten-

dosi così escludere un qualche contributo neandertaliano al patrimonio genetico di *sapiens*.

L'enorme avanzamento tecnologico permette oggi di affrontare l'indagine su porzioni sempre più rappresentative dell'intero genoma di organismi del passato. Sono del 2006 due importanti lavori scientifici in cui si arriva ad analizzare fino a un milione di paia di basi dell'intero genoma di un Neandertal, e non le sole poche centinaia di basi di un frammento del mtDNA. Anche questi studi evidenziano la chiara separazione fra Neandertal e *sapiens*, con una stima della divergenza fra le due forme intorno ai 500.000 anni fa, un tempo che mal si concilia con l'ipotesi multiregionale e che, ancora una volta, si pone in linea con le aspettative dell'*Out of Africa*.

Lo studio delle relazioni fra Neandertal e *sapiens* è stato affrontato anche esaminando la variabilità adattativa, focalizzandosi su una delle maggiori differenze fenotipiche osservabili fra le popolazioni moderne, il colore della pelle. Com'è noto, la pelle è pigmentata in modo diverso per rispondere alla necessità di maggiore o minore protezione dalla radiazione solare in funzione della latitudine. Si ha, perciò, che le popolazioni più settentrionali si caratterizzano per un colore più chiaro, mentre le popolazioni della fascia inter-tropicale hanno colorazioni più scure per consentire una maggiore protezione dai raggi ultravioletti. Nel genoma umano si è potuto verificare che è soprattutto un gene che determina la maggiore o minore pigmentazione; il suo nome è *mc1r* e codifica per il recettore della melanocortina. Si è anche visto che esistono determinate porzioni di questo gene in cui una singola base di differenza può condurre a diversa pigmentazione e colorazione dell'epi-dermide. Questa porzione è stata analizzata in una recente ricerca del 2007 in due campioni neandertaliani, uno spagnolo

e l'altro italiano. E' stata scoperta una mutazione mai riscontrata in ben 2.800 individui attuali di *sapiens*. Da prove funzionali su colture cellulari è emerso che tale mutazione determina una colorazione chiara della pelle e rossa nei capelli, come ad esempio, quella tipica di alcuni gruppi del nord Europa.

Utilizzando la terminologia darwiniana, siamo di fronte a una convergenza evolutiva: la necessità di rispondere allo stesso stimolo ambientale (scarso irraggiamento solare e freddo) porta alla stessa risposta fenotipica pur partendo da un substrato genetico diverso. Proprio la diversità del substrato genetico è, a ben vedere, un'ulteriore riprova della chiara distinzione fra Neandertal e *sapiens*, come già evidenziato dalla variabilità neutrale.

Sviluppi e implicazioni

Come già accennato, il tremendo progresso tecnologico degli ultimi anni, rende ormai possibile decifrare l'intero genoma di un organismo vissuto nel passato. Questo ha fatto nel 2008 un gruppo di ricerca americano sequenziando pressochè l'intero genoma di un *mammuth* rinvenuto nel permafrost. A partire da ciuffi di peli, i ricercatori hanno estratto il DNA che poi è stato sottoposto a una nuova tecnica di sequenziamento grazie alla quale in tempi molto ridotti si possono ottenere milioni di paia di basi. Circa l'80 % del genoma di questo *mammuth* è stato sequenziato, svelando così in modo molto preciso le relazioni filogenetiche con le attuali specie di elefanti. Si tratta, senza dubbio, di un risultato di estrema rilevanza: possiamo ora tentare di capire perchè questa specie si sia estinta e, applicando un approccio simile, estendere queste indagini a molte altre specie.



Fig.8 – Un campione musealizzato di peli di *mammuth*, come quello da cui è stato estratto il DNA da sequenziare.

Tuttavia, sono gli autori stessi di questo brillante lavoro a gettare qualche ombra sinistra sulle implicazioni di queste indagini. Essi, infatti, asseriscono che con l'intero genoma del *mammuth* a disposizione si potrebbe pensare di inserire le sequenze esclusive del *mammuth* nel genoma di un elefante attuale così da far nascere, per clonazione, un *mammuth*. Come affermano così si potrebbe “*to bring back an extinct species that modern humans have missed meeting by only a few thousand years.*” (riportare indietro una specie estinta il cui incontro gli uomini moderni hanno perso solo per poche migliaia di anni).

Questa propensione ad avvalersi dello strumento tecnologico per ritagliarsi un ruolo più o meno consapevole di demiurgo, appare in netto contrasto con una prospettiva evolutiva di stampo darwiniano. La nascita e l'estinzione delle specie sono il segno stesso del percorso evolutivo, frutto del continuo adattamento degli organismi all'insieme dei cambiamenti ambientali. Un complesso intreccio di ragioni ecologiche e climatiche è verosimilmente alla base dell'estinzione dei *mammuth* 8-10.000 anni fa. Nemmeno il più ambizioso e costoso esperimento mai realizzato da un essere umano potrebbe far tornare una parte, seppur molto esigua, del nostro pianeta alle condizioni antecedenti questa estinzione. Dobbiamo allora, molto onestamente, domandarci per quale finalità

dovremmo affrontare una ricerca comunque onerosa per riportare in vita un animale che, nella migliore delle ipotesi, potrebbe vivere soltanto in una sorta di grande camera climatica con lo scopo ultimo, non già di incamminarsi lungo la propria traiettoria evolutiva ma di intrattenere incuriositi spettatori (paganti).

Non sarebbe forse più utile destinare le medesime risorse per fronteggiare la drammatica perdita di biodiversità di cui siamo al tempo stesso spettatori e attori e che rischia di mettere in serio pericolo la continuazione della storia della vita sulla terra iniziata oltre tre miliardi e mezzo di anni fa?

Ringraziamenti

Vorrei sentitamente ringraziare David Caramelli (Università di Firenze), Matteo Girardi ed Elena Pecchioli (Fondazione EDMUND MACH).

Per approfondire

CARAMELLI *et al*, (2003) - *Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-years-old anatomically modern Europeans*. PNAS 100 (11): 6593-97.

CARAMELLI *et al*, (2008) *A 28,000 years old Cro-Magnon mtDNA sequence differs from all potentially contaminating modern sequences*. PLoS One 3 (7): e2700.

GREEN *et al*, (2006) *Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA*. Nature 444: 330-36

HIGUCHI *et al*, (1984) *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. Nature 312: 282-4.

KRINGS *et al*, (1997) *Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans*. Cell 90: 19-30.

LALUEZA-FOX *et al*, (2007) *A melanocortin receptor 1 allele suggests varying pigmentation among Neandertals*. Science 318: 1453-55.

MILLER *et al*, (2008) *Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth*. Nature 456: 387-90.

NOONAN *et al*, (2006) *Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA*. Science 5802: 1113-18.