

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
corso di laurea in
SCIENZE NATURALI

TESI DI LAUREA

“Eredità mitocondriale medio orientale all’Isola
d’Elba.”

Relatori:

Prof. Giorgio Paoli

Dr. Sergio Tofanelli

CANDIDATO:

GUIDUCCI ANDREA

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

INDICE

Riassunto.....	I
CAPITOLO 1 Introduzione.....	1
ISOLA D'ELBA.....	2
Aspetti Geomorfologici	2
Insediamenti preistorici.....	6
Insediamenti storici.....	9
CAPITOLO 2 La variabilità genetica	13
2.1 La variabilità genetica.....	14
2.1.1 Il DNA mitocondriale.....	15
2.1.2 Variabilità del DNA mitocondriale nelle popolazioni umane ..	17
2.2 Obiettivi della ricerca.....	21
CAPITOLO 3 Materiali e metodi	22
3.1 Il campionamento	23
3.2 Estrazione di DNA da bulbo pilifero.....	23
3.3 Analisi del DNA mitocondriale.....	24
3.3.1 Amplificazione in PCR	24
3.3.2 Visualizzazione amplificati su gel	26
3.3.3 Analisi della HVSI: regione non codificante del mtDNA	28
3.3.4 Reazione di sequenza	30
3.3.5 Analisi al sequenziatore	31
CAPITOLO 4 Metodi statistici.....	33
4.1 Indice di diversità genetica.....	34
4.2 Distanze genetiche	35
4.3 Multidimensional Scaling (MDS).....	36
4.4 Analisi Network.....	37
CAPITOLO 5 Risultati e Discussione	40

5.1 Risultati	41
5.2 Discussione.....	50
5.2.1 Linee mitocondriali di origine medio-orientale.....	50
5.2.1.1 Aplogruppo U7	50
5.2.1.2 Aplogruppo U7 nell'Isola d'Elba	52
5.2.1.3 Aplogruppo H5 e H7	52
5.3 Conclusioni.....	54
Ringraziamenti	55
Riferimenti bibliografici	56
Pagine web consultate	62

Riassunto

Il sequenziamento della regione non codificante del DNA mitocondriale (regione HVS1) consente, sulla base di mutazioni puntiformi ad alto tasso di mutazione, la costruzione di aplotipi composti che rappresentano, ciascuno, una linea diretta a trasmissione esclusivamente femminile. Attraverso la loro analisi risulta semplificata la ricostruzione filo-geografica delle popolazioni.

Nella presente tesi si è studiata la variabilità HVS1 nella popolazione dell'Isola d'Elba. Quest'ultima, per evidenze storico-culturali, geografiche, e demografiche, può essere considerata come un'area parzialmente isolata che ben si presta alla verifica di modelli di popolamento basati su marcatori uni-parentali di linea.

Un totale di 53 sequenze HVS1 sono state ottenute da altrettanti individui residenti nell'isola (area occidentale), non imparentati fra loro da almeno tre generazioni, aventi entrambi i genitori e tutti e quattro i nonni nativi dell'Elba.

Dal confronto con un archivio di sequenze HVS1 italiane (in particolare toscane) e medio-orientali, si è stimata la composizione del campione elbano e la possibile origine di ciascun aplotipo nel contesto del popolamento dell'area mediterranea.

I risultati suggeriscono una significativa differenziazione del repertorio mitocondriale elbano rispetto a quello italiano. La divergenza è causata da una alta frequenza di aplotipi caratteristici di linee (H5,H7,U7) per le quali si ipotizza una chiara origine medio-orientale. La presenza di tali linee è compatibile con flussi migratori avvenuti in epoca storica (etruschi, fenici, coloni romani), le cui tracce si sarebbero conservate grazie al forte isolamento della popolazione.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

ISOLA D'ELBA

Aspetti Geomorfologici

Con i suoi 223,5 kmq ed uno sviluppo costiero di 118 km, l'Elba è la maggiore isola dell'Arcipelago toscano (Fig. 1), che comprende a nord, le isole Gorgona e Capraia, a sud, Pianosa, Montecristo, Giglio e Giannutri. Situata tra il promontorio di Piombino e la Corsica, da cui dista, rispettivamente, 9 km e 50 km circa, presenta una caratteristica forma allungata, irregolarmente triangolare (28 km tra Punta delle Pietre Albe e Capo Ortano) con base sul canale di Piombino e punta rivolta verso la Corsica. La costa irregolare è caratterizzata da quattro profonde insenature opposte due a due, la rada di Portoferraio e il Golfo di Procchio geograficamente disposte a nord dell'isola, il Golfo Stella con l'annesso Golfo di Lacona e il Golfo di Marina di Campo a sud formano due strozzature nel corpo centrale dell'isola con larghezza minima di 3,5 km tra il Golfo Stella e la rada di Portoferraio che la dividono virtualmente in tre parti : una occidentale caratterizzata dal Monte Capanne (m 1019), una centrale con due allineamenti collinosi che si annodano al complesso Monte San Martino/Monte Orello (m 337) e una orientale caratterizzata al centro con la Cima del Monte (m 516).



Fig. 1 Arcipelago toscano

Per quanto riguarda l'aspetto morfologico (Fig. 2), l'Isola d'Elba presenta una grande varietà di forme con rilievi di diversa altezza. Il più alto è il Monte Capanne, che con i suoi 1019 m di altezza domina la parte occidentale dell'Isola; i rilievi più importanti del versante nord-orientale sono : Monte Serra 422 m, Monte Strega 427m, Monte Castello 396 m, il Volterraio 403 m e Cima del Monte, che con i suoi 516 m, è la vetta più alta di questo versante, mentre quello sud-orientale culmina con il Monte Calamita, 412m. Sono presenti pianure alluvionali in prossimità del mare: la più grande è quella di Marina di Campo, con una superficie di circa 4 kmq, che separa il Monte Capanne dai rilievi più bassi del Monte Tambone e Monte S. Martino; segue la piana di Portoferraio di circa 3 kmq e quella di Schiopparello, 2 kmq sulla costa settentrionale; infine la piana di Lacona 2

kmq e la piana di Mola 1.2 kmq e le più piccole piane di Porto Azzurro, 0.5 kmq e Barbarossa, 0.35 kmq nel versante sud-orientale.

L'Isola è il maggior residuo toscano di una vasta Tirrenide miocenica ed ha costituzione geologica e struttura assai complessa. In essa si concentrano i principali problemi geologici di carattere regionale connessi con l'evoluzione sedimentaria, strutturale e metamorfica dell'Appennino settentrionale. La natura dei terreni presenta rocce magmatiche, rocce metamorfiche e rocce sedimentarie, delle quali si trova la serie quasi completa dal Carbonifero all'attuale con la sola lacuna nel Neogene. Un accurato studio delle rocce affioranti sull'Isola ha permesso al geologo L. Trevisan nel 1950 (Lodi 1909 – Pisa 1996), di effettuare una ricostruzione geologica ritenuta ancora oggi, a mezzo secolo di distanza, ancora valida. L'Elba è costituita da cinque unità geologiche denominate "Complessi": i primi tre sembrano avere analogie con le formazioni rocciose della Toscana (Dominio Toscano), mentre gli altri due con quelle Liguri (Dominio Ligure).

Complesso I°: Complesso Calamita ,omonimo della penisola, che affiora tra Mola e Terranera. E' costituito da rocce metamorfiche di medio-basso grado (Gneiss del Calamita) e quarziti del Paleozoico; quarziti, scisti, dolomie e calcari dolomitici a cellette con scisti filladici alla base, del Trias e marmi del Lias inferiore.

Complesso II°: Caratteristiche le formazioni rocciose di questo complesso che affiorano lungo la fascia costiera tra Terranera e Rio Marina e nella zona della Valdana. Le rocce sono state interessate da metamorfismo regionale e termometamorfismo. E' possibile osservare lungo la strada che sale dalla spiaggia di Ortano una sezione delle varie formazioni rocciose. Alla base sono presenti Cisti arenacei e argilloscisti carboniosi,;

successivamente Porfidi massicci mentre la copertura è costituita da Calcari dolomitici, Marmi massicci del Lias inferiore e Filladi calcifere.

Complesso III° : Tra Terranera e Rio Marina sino a Cavo, dove affiora anche lungo la costa. Di questo complesso fanno parte un basamento metamorfico con Scisti di Rio Marina, mentre la copertura è costituita da una successione di sedimenti attribuibili alla Falda Toscana.

Complesso IV°: Le formazioni rocciose di questo complesso appartengono al Complesso ofiolitifero delle Liguridi, affiorando nella parte centro orientale e nord orientale dell'isola. La serie delle così dette Rocce Verdi (ofiolitica) del Giurassico superiore è rappresentata dalla successione di Serpentiniti Iherzolitiche e harzburgitiche. La copertura invece è costituita da rocce sedimentarie, Radiolariti, Calcari e Argilliti.

Complesso V°: Affiorante nella parte centrale dell'isola tale complesso è costituito da due unità liguri distinte. L'unità inferiore che affiora presso Colle Reciso, è costituita da Flysch del paleocene con argille e marne; quella superiore è invece rappresentata dal Flysch cretaceo, chiamato anche Flysch dell'Elba. Si tratta dell'imponente Complesso granodioritico del Monte Capanne formatosi a seguito di un processo di gonfiamento per ascesa forzata. E' dimostrato che in corrispondenza della volta, durante tale gonfiamento, si siano formate pieghe gravitative con simmetria centrifuga e faglie dirette, mentre in corrispondenza della fascia con massima sezione circolare orizzontale si siano formate pieghe in compressione ed accavallamenti (Pertusati et al. 1993).

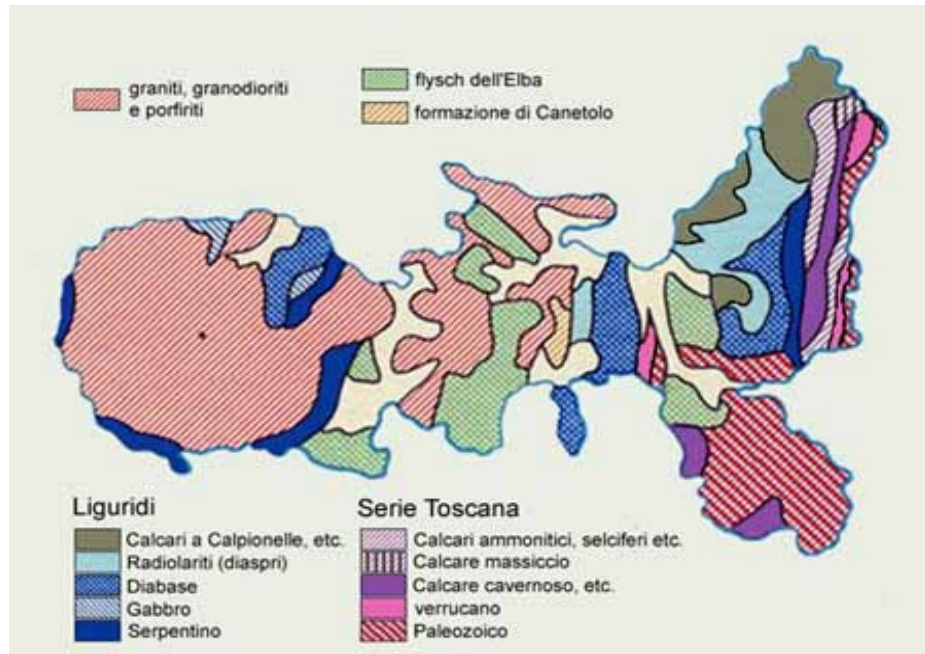


Fig. 2 Carta geologica

Insedimenti preistorici

Fin dal paleolitico l'Isola d'Elba venne abitata da popolazioni dell'età della pietra antica (Radmilli A. M. 1960). Della facies musteriana restano infatti numerose tracce, rappresentate da strumenti adoperati per la caccia come punte, dischi di selce, raschiatoi, rinvenuti in varie località dell'isola. Gli insediamenti abitativi di queste prime popolazioni di *Homo sapiens* si trovavano prevalentemente nella parte centrale dell'isola e nei pressi della costa settentrionale, dove condizioni idrografiche favorevoli di questa zona dovevano evidentemente soddisfare le esigenze di quelle genti che erano dedite, oltre che alla caccia, anche alla pesca e alla raccolta.

Il popolamento dell'Elba va comunque visto in rapporto alle altre isole dell'Arcipelago Toscano, che, fin dal Neolitico (II °III° sec. a C), erano approdo per le rotte navali che si dirigevano verso la costa toscana e le

isole maggiori per un circuito di circolazione dell'ossidiana e altre materie prime (Grifoni Cremonesi 2000; Tozzi et al. 2000).

Scarsi sono i ritrovamenti di resti risalenti al Neolitico, mentre di particolare interesse quelli dell'eneolitico (2500 a C). Questa facies dell'eneolitico italiano è conosciuta quasi esclusivamente attraverso manifestazioni funerarie. Caratteristiche sono le cosiddette tombe "a forno", grotticelle artificiali scavate nella roccia con sepolture singole o plurime o le deposizioni collettive in grotte naturali. Ne è testimonianza la Grotta calcarea di San Giuseppe, risalente a tale datazione, situata nelle vicinanze di Rio Marina, scoperta casualmente nel 1966, ed oggetto di scavi da parte dell'università di Pisa, negli anni successivi, con la direzione di Giuliano Cremonesi. Al suo interno è stato ritrovato materiale archeologico rappresentato da resti scheletrici riferibili ad almeno 90 individui fra uomini, donne, bambini ed ossa di animali; inoltre ceramica (Fig. 3), industria litica, costituita quasi esclusivamente da cuspidi di freccia in selce e diaspro locale di varie dimensioni, con corpo triangolare con peduncolo e alette e punte di osso levigato, interpretabili come armi da getto. Gli oggetti di metallo in rame con elevato contenuto di arsenico, sono abbastanza numerosi: fra di essi pugnali a lama piatta e oggetti di uso incerto come asticcioline con sezione triangolare o circolare.

Gli indizi cui si è fatto cenno fanno pensare che l'imponente materiale bellico dei corredi maschili, riportato in luce nella grotta, sia da mettere in relazione alla necessità di controllo del territorio a difesa delle risorse preziose quali potevano essere i giacimenti minerari. Una conferma è offerta dallo studio paleopatologico dei resti degli inumati della grotta di S. Giuseppe: ben tre crani sufficientemente integri presentano episodi traumatici causati da pesanti corpi contundenti inferti forse da un'asciamartello o da una mazza (Cremonesi 1966).

Tutto ciò a testimonianza di lotte di gruppi rivali per il controllo del territorio e delle sue risorse.

La grotta infatti, si trova in una zona ricca di minerali cupriferi e deve essere stata utilizzata da un gruppo umano piuttosto consistente, che si dedicava probabilmente alle attività estrattive (Grifoni Cremonesi R. 1989-99). Dell'antica età del Bronzo l'Elba è particolarmente ricca di testimonianze. Frequente è il ritrovamento di macine e macinelli per la sfarinatura dei cereali, di fornelli e bollitoi per la lavorazione del latte; è un fatto incontestabile che fra la fine dell'età del Bronzo e gli inizi dell'età del Ferro (1.100-700 sec. a.C.), l'economia elbana conosce una forte accelerazione. Cresce la domanda di manufatti metallici: strumenti per il lavoro dei campi, utensili vari, armi e oggetti di ornamento. Fra quest'ultimi diffusissime le fibule, accessorio dell'abbigliamento maschile e femminile. Il decisivo orientamento dell'economia in senso pastorale impone nuove strategie di insediamento. Nella parte occidentale dell'isola è possibile individuare resti di domoliti pastorali e insediamenti caratterizzati da aie. Queste strutture hanno pianta circolare o ellittica con dimensioni variabili tra i sette e i tredici metri di diametro, con lo scopo di offrire riparo ai pastori e alle loro greggi. Significativa è l'assenza di queste costruzioni nella parte centrale dell'isola, a conferma della sua natura pianeggiante. Una divisione così netta tra i due poli dell'isola ci fornisce informazioni non solo sull'economia degli elbani ma anche sui loro possibili contatti. Ciò fa supporre un possibile isolamento sociale e genetico caratteristico di popolazioni antiche.

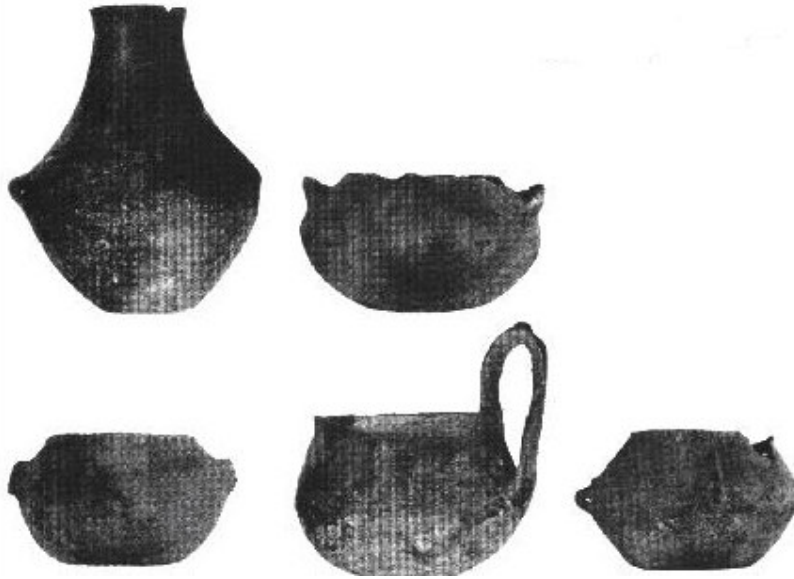


Fig. 3 Vasi ritrovati nella grotta di S. Giuseppe

Insedimenti storici

A partire dall'età del ferro (IX° sec. A.C.) si stanziarono sull'isola i Liguri, i quali, dopo aver fondato sulla costa tirrenica la città di Populonia, si insediarono all'Elba per poi raggiungere più tardi la Corsica nel III° sec a C. Queste prime popolazioni del periodo erano dedite all'escavazione e alla metallurgia del ferro nella regione orientale dell'isola. Verso il secolo VII° a.C, un altro popolo si impadronì delle miniere elbane, assoggettando le orami residenti genti liguri: gli Etruschi: per molti secoli la storia dell'Elba sarà legata alla loro storia.

Quattro grandi potenze, con alterne vicende, si spartirono lo spazio commerciale della parte del Mediterraneo attraversata dalle rotte mercantili che toccano l'Elba: sono ovviamente gli Etruschi, i fenicio-punici, i focei di Marsiglia ed i siracusani. Non tutti sono stati alla ribalta nello stesso tempo né hanno avuto la stessa capacità di modificare il quadro dell'economia tirrenica. Per un lungo periodo gli etruschi ed i fenicio-punici ebbero ottimi

rapporti e la loro attività è estremamente florida fino a tutto il VI secolo a.C. Alla base economica il ferro che è uno degli elementi primari.

Dell'Elba, in questa fase, finora sappiamo archeologicamente ben poco, ma quel poco ci conferma che culturalmente è ben collegata all'Etruria, e che ne è parte vitale.

Già durante il VI secolo a.C. si affaccia una terza potenza: gli abitanti di Focea, città greca, che dopo aver fondato Massalia (Marsiglia), nel 600 a.C. si spostano in Corsica e d arrivano ad uno scontro diretto con gli Etruschi. La battaglia di Aleria del 540 a.C. ha esito incerto. Solo lo scontro con i siracusani a Cuma nel 474 a.C. segnano una battuta di arresto che dà origine ad una lenta recessione della potenza etrusca sul mare: si chiudono i porti dell'Etruria meridionale.

Intanto Siracusa tenta l'espansione nel Tirreno settentrionale organizzando due spedizioni, nel 453 a.C., una in Corsica e l'altra all'Elba.

Con l'occupazione romana le attività minerarie e metallurgiche si svilupparono sensibilmente; sorsero centri importanti sull'isola fra cui Fabricia, situata nei pressi dell'attuale Portoferraio, Capoliveri, Marciana, Rio (Ninci G. 1815).

Caratteristici del periodo primi decenni del III secolo a.C. sono i ritrovamenti sull'isola meridionale di anfore vinarie etrusche, greco-orientali e massaliote e di varia ceramica da mensa e di uso vario, che rivela contatti con il meridione e l'Italia centrale. L'abbondanza di anfore è impressionante, l'alimentazione, ricostruibile attraverso lo studio dei resti di pasto, è ricca e variata: suini, ovicaprini con connessi prodotti lattato-caseari, bovini e in minor misura equini, con una integrazione se pur piccola di caccia e pesca.

Le uniche tracce note degli insediamenti sul territorio elbano sono i ritrovamenti di sepolture come in località Le Trane, Casa del Duca e Monte Orello a Portoferraio e a Grassera in Rio nell'Elba.

Nel XII° sec fu a lungo contesa fra Genovesi e Pisani e solo un secolo più tardi quest'ultimi vi si insediarono in modo definitivo. A metà del 1300 la popolazione elbana fu decimata dalla pestilenza che portò gli abitanti dell'isola da 6000 persone, prima del contagio, a complessivamente 2000 soltanto (Pintor F. 1898-99). Il numero si riavvicinò nuovamente a 6000 individui agli inizi del 1500.

Durante il periodo del governo pisano molte persone migrarono da Pisa e dall'Italia settentrionale per cercare guadagno nelle miniere. Il territorio più popoloso era certamente Rio e Grassera, villaggio scomparso nel XVI° sec. Grazie in seguito al dominio dei Medici, le miniere di Rio passarono dalla fase di sola escavazione a quella più moderna di produzione modificando la vita dei cavaatori rendendoli semplici operai salariati e non più piccoli imprenditori che erano prima, con conseguente accrescimento della popolazione nella zona mineraria e un miglioramento delle condizioni socio-economiche dell'isola (Cardarelli R. 1938). Si ha un incremento di abitanti anche nel territorio di Portoferraio, con l'arrivo di genti dal Granducato di Toscana; primo fra tutti Cosimo de' Medici che contribuì alla costruzione della nuova città di Cosmopoli, costruita sui resti di Fabricia e Ferraia, divenuta poi Portoferraio (Ninci G. 1815).

Dal '500 l'Elba fu governata, tranne il territorio di Portoferraio rimasto ai Medici, dalla signoria degli Appiano che successe nello stato di Piombino, di cui l'isola faceva parte, famiglia che, già un secolo prima, non riuscì a valorizzare i giacimenti ferrosi di Rio, ma comunque la vendita del minerale costituiva il maggior introito di tale famiglia. Portoferraio e Portolongone costituivano i centri con più alta densità di famiglie quasi esclusivamente elbane e militari di origine spagnola e napoletana sposatisi con donne dell'isola.

A causa di lotte fra Francesi e Spagnoli, le condizioni dell'isola peggiorarono. Solo grazie ai progressi dell'industria e del commercio e per la riduzione della mortalità, dalla metà del '700 terminò il lungo periodo di

stazionarietà della popolazione elbana. Si passò da 6500 abitanti nel 1745 a 12000 nei primi anni dell'800 (Mellini V. 1890). Il numero degli abitanti raddoppiò in soli 50 anni passando a 21.446 nel 1853.

Dal 1861, con l'annessione al Regno d'Italia, il numero della popolazione elbana aumentò nuovamente soprattutto nel comune di Portoferraio. Attualmente, dopo l'ultimo censimento ISTAT del 2001, la popolazione elbana consta di 27846 individui distribuiti in otto comuni: Portoferraio, Porto Azzurro, Campo nell'Elba, Marciana, Marciana Marina, Capoliveri, Rio Marina e Rio nell'Elba.

CAPITOLO 2

LA VARIABILITÀ GENETICA

2.1 La variabilità genetica

Lo studio della variabilità genetica delle popolazioni umane, che ha avuto un notevole sviluppo nel campo dell'antropologia, ha dimostrato di essere uno strumento utile nello studio dei fenomeni macroevolutivi e microevolutivi che hanno interessato la specie umana. Grazie a tali informazioni, ottenute con questi tipo di approccio, si è dato un ulteriore apporto alle conoscenze sull'origine dell'Uomo e sulle popolazioni attuali, evidenziando che nell'analisi delle piccole differenze contenute nel genoma umano si raccoglie un numero di informazioni potenzialmente enorme. Il DNA, fonte di tali differenze, essendo trasmesso attraverso le generazioni rappresenta nelle popolazioni attuali un archivio vivente del nostro passato. La variabilità genetica è determinata dal verificarsi delle mutazioni che sono di vario tipo e possono essere indagate con diverse metodologie. I cambiamenti nelle frequenze alleliche di una popolazione dipendono marcatamente da due fattori evolutivi: la selezione naturale, che è il risultato della variabilità genotipica individuale in una popolazione in funzione della probabilità di sopravvivenza e riproduzione degli individui e la deriva genetica, che dipende dal numero di individui che generano la generazione successiva. Anche la migrazione rappresenta un altro fattore molto importante per la variabilità di una popolazione. Per un tempo molto lungo della loro storia evolutiva la maggior parte delle popolazioni sono rimaste relativamente isolate; la media di un immigrato per generazione in una popolazione può essere sufficiente per mantenere la deriva parzialmente sotto controllo e per evitare la completa fissazione di alleli (Cavalli Sforza e Feldman 2003).

La deriva genetica è quel fattore evolutivo che rappresenta l'azione del caso: alcune variazioni si verificano per caso e, per lo stesso motivo, possono essere fissate, oppure perse nel pool genico di una popolazione. La

deriva conduce verso l'uniformità genetica ed i suoi effetti sono particolarmente intensi nelle popolazioni piccole e isolate.

2.1.1 Il DNA mitocondriale

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è una piccola molecola circolare (16569bp) a doppio filamento (Fig. 4), non complessata con istoni, che si trova in centinaia di migliaia di copie per cellula, all'interno dei mitocondri, gli organuli deputati alla respirazione cellulare. Le caratteristiche di questa molecola la rendono particolarmente adatta per gli studi di tipo evolutivo (Johnson et al. 1983; Cann et al. 1987); infatti a partire dagli anni '80 ovvero da quando è stata interamente sequenziata (Anderson et al. 1981), si sono accumulate numerose informazioni sulla variabilità di questo sistema genetico nelle popolazioni umane, che hanno condotto ad importanti risultati nella comprensione dell'evoluzione dell'Uomo e della storia delle popolazioni.

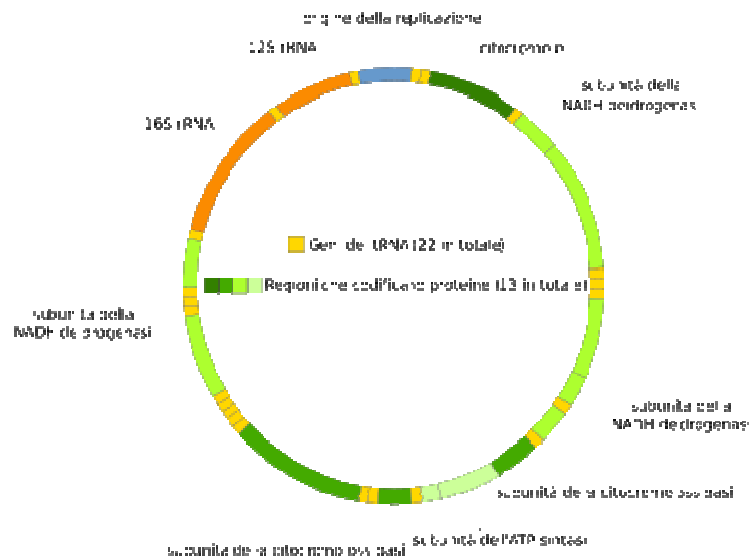


Fig. 4 Organizzazione DNA mitocondriale umano

Il DNA mitocondriale è costituito da una regione codificante che presenta trentasette geni e codifica per tredici sub-unità proteiche del sistema di fosforilazione ossidativi, due RNA ribosomali (rRNAs) e ventidue RNA

transfer (tRNAs), e da una regione non codificante, con funzioni di regolazione, chiamata regione di controllo (D-loop) in cui sono comprese tre regioni ipervariabili (HVS I, HVS II ed HVS III).

Ereditato esclusivamente per via materna, il mtDNA è esente da ricombinazione. Se non si verificano mutazioni casuali, la madre lo trasmette alla progenie inalterato. Le linee materne mostrano perciò la massima somiglianza tra individui imparentati per via materna.

Le mutazioni che si verificano nel mtDNA sono per la maggior parte sostituzioni di base e delezioni, le prime sembrano essere sostanzialmente neutrali e sono quelle maggiormente considerate negli studi evolutivi, tuttavia sono considerate neutrali anche la variazione di lunghezza di un tratto poly (C) nella regione di controllo e la delezione-9 bp” nella regione codificante, che deriva da un cambiamento nel numero di coppie di un motivo di 9 bp ripetuto in tandem (Jobling e Tyler-Smith, 2004). C'è la possibilità che questi marcatori non siano del tutto neutrali, poiché interessano regioni che codificano geni della catena respiratoria e che quindi possano essere suscettibili alla selezione (Excoffier e al. 1992; Mishmar et al. 2003; Pyle et al. 2005).

A causa di diversi fattori che comprendono l'alta concentrazione di radicali liberi nell'ambiente mitocondriale, l'assenza di istoni e le modalità di replicazione, il tasso di mutazione del mtDNA è molto più elevato di quello del DNA nucleare: un alto tasso di mutazione permette di datare eventi evolutivi relativamente recenti e rappresenta quindi una caratteristica utile per lo studio dell'evoluzione umana. Le prime stime, ottenute confrontando il DNA umano con quello di altri primati, hanno messo in evidenza che il tasso di sostituzione nucleotidica del mtDNA è circa dieci volte superiore a quello del DNA nucleare (Brown et al. 1979).

Il tasso di mutazione lungo la molecola non è uniforme. È stato stimato che, esclusa la regione di controllo, il numero di sostituzioni per sito per anno è pari a 0.017×10^{-6} (Ingman et al. 2000). È stato dimostrato che

l'evoluzione delle regioni del DNA mitocondriale umano che codificano proteine, è condizionata da processi non casuali (Kivisild et al. 2006). Il ruolo della selezione si riflette nella probabilità di fissazione delle mutazioni nei differenti siti, evidenziando l'inadeguatezza dell'applicazione, per questa molecola, di un orologio molecolare tarato considerando un tasso di evoluzione medio.

Un fenomeno che si può riscontrare, ancora in virtù dell'elevato tasso di mutazione di questa molecola, è quello dell'eteroplasmia cioè della presenza nella stessa cellula o nello stesso individuo di più di un tipo di mtDNA, in opposizione ad una situazione di omoplasmia. L'eteroplasmia può essere rilevata solo nel caso in cui una certa proporzione di molecole mutanti si siano accumulate, solitamente maggiore all'1%, e diventi così evidenziabile con le diverse tecniche di indagine (Jobling e Tyler-Smith, 2004).

Riassumendo, la trasmissione patrilineare, l'assenza di ricombinazione alla meiosi e l'elevato tasso di mutazione fanno di questo sistema, con i polimorfismi che ospita, una molecola ideale per lo studio dell'evoluzione umana.

2.1.2 Variabilità del DNA mitocondriale nelle popolazioni umane

Con l'analisi dei frammenti di restrizione della regione codificante (RFLPs – Restriction Fragment Length Polymorphism) è stato possibile individuare alcuni gruppi di mutazioni neutrali più frequenti, condivise da linee mitocondriali che distinguono diversi aplotipi (combinazione di varianti alleliche lungo un cromosoma o un segmento cromosomico contenente loci strettamente associati fra loro; <http://it.wikipedia.org>) ed altre, meno frequenti, che rappresentano le mutazioni diagnostiche per la definizione di aplogruppi di linee mitocondriali, in cui gli aplotipi sono compresi (Johnson et al. 1983; Cann et al. 1987; Torroni et al. 1996).

Attualmente sono disponibili numerose tecniche che permettono la tipizzazione dei siti polimorfici della regione codificante come ad esempio l'applicazione di Multiplex-PCR e Single Base Extension (Quintans et al. 2004) e si assiste inoltre ad una tendenza al sequenziamento dell'intero genoma (Ingman et al. 2000; Macaulay et al. 2005; Behar et al. 2006).

Gli aplogruppi presentano una distribuzione geografica non casuale, continente-specifica, che fornisce un quadro dei movimenti di popolazione che hanno portato alla colonizzazione delle aree continentali e riportano inoltre tutte le popolazioni umane ad una comune origine africana recente, in accordo con l'ipotesi "Out of Africa 2" (Stringer e Andrews, 1988). Infatti, studiando le linee materne nelle popolazioni attuali, è stato possibile ricostruire a ritroso un albero genealogico che comprende tutta l'umanità e che giunge ad una antenata comune denominata "Eva mitocondriale" (Most recent Common Ancestor), che visse probabilmente in Africa tra 100.000 e 200.000 anni fa (Wilson e Cann 1992).

Molti sono i consensi sull'ipotesi Out of Africa 2 per l'origine dell'uomo moderno, resta tuttavia dibattuta la questione riguardante le rotte di migrazione. L'ipotesi per così dire tradizionale contempla la dispersione dell'uomo, dall'Africa sub-sahariana al continente eurasiatico, attraverso il così detto "corridoio levantino" (45.000 anni fa) (Stringer e Andrews, 1988), ma alcuni autori hanno ipotizzato che una prima via di dispersione dal corno d'Africa, (60 – 75.000 anni fa), sia stata quella lungo la costa meridionale dell'Oceano indiano verso l'Asia sud-orientale e l'Australia (Metspalu et al. 2004; Macaulay et al. 2005).

Dal macro-aplogruppo L del DNA mitocondriale si originano i sub-aplogruppi L1 ed L2, esclusivamente africani e l'aplogruppo L3 dà origine ai macro-aplogruppi M ed N, originatesi probabilmente in africa orientale da cui poi si sono diffusi fuori dal continente africano, in Eurasia e nelle Americhe (Quintana Murci et al. 1999; Salas et al. 2002). Gli Aplogruppi H, I, J, N1b, T, U, V e W sono caratteristici europei, gli aplogruppi A, B, C

e D si trovano in Asia e nelle Americhe e gli aplogruppi G, Y e Z predominano in Siberia. L'aplogruppo X è stato riscontrato a basse frequenze in Africa settentrionale, in Europa, in Asia centrale e occidentale e in America, mentre non è presente in Siberia o in Asia orientale (Reidla et al. 2003).

L'origine africana dell'aplogruppo M non è stata completamente accettata, infatti considerando l'elevata frequenza e diversità che presenta in India e in altre parti dell'Asia alcuni autori hanno suggerito che M si sarebbe originato in Asia sud-occidentale (Quintana-Murci et al. 1999; Roychoudhury et al. 2001; Richards et al. 2003).

Il ritrovamento di M1 o di una linea ancestrale ad M1 in India potrebbe aiutare a spiegare la presenza di M1 in Africa come risultato di una retromigrazione dall'India, ma non essendosi verificato, non si può rimpiazzare lo scenario che vede l'insorgenza dell'M in Africa (secondo Metspalu et al. 2004); anche l'assenza di linee L3, a parte L3M ed L3N, in India è compatibile con un'origine di M in Africa orientale. Inoltre, la presenza di M1 non accompagnato da linee L nel Caucaso (Tambets et al. 2000), lasciano la questione sulle origini dell'aplogruppo M ancora aperta.

Per spiegare la filogeografia di questi aplogruppi del DNA mitocondriale, è opportuno considerare diversi scenari possibili di migrazione che presuppongono più eventi dell'Out of Africa (Fig. 5). Tuttavia può essere indicato un solo primo evento di migrazione che avrebbe portato le linee ancestrali M ed N (con quest'ultima che aveva già dato origine ad R), in Asia meridionale e che potrebbe rendere conto dell'attuale filogeografia del DNA mitocondriale in Eurasia.

Gli aplogruppi riflettono un'origine mitocondriale comune e lo studio dei loro rapporti filogenetici e della loro distribuzione può essere utile per stimare fenomeni di mescolamento conoscendo la direzione di migrazione delle popolazioni in determinate aree oppure per individuare "colli di bottiglia" dovuti alla colonizzazione di nuove regioni geografiche. Occorre

tuttavia tenere presente che la storia degli aplogruppi non coincide con la storia delle singole popolazioni in cui sono presenti e l'età di un aplogruppo non corrisponde all'età di una popolazione, perciò alla diffusione di ciascun aplogruppo non corrisponde necessariamente un singolo evento di migrazione. Quando una popolazione migra, porta con sé gli aplogruppi in essa presenti, non uno soltanto e l'età di un certo aplogruppo nella stessa popolazione indica quando è avvenuta la mutazione che lo ha originato, non quando è avvenuta la migrazione (Pakendorf e Stoneking, 2005).

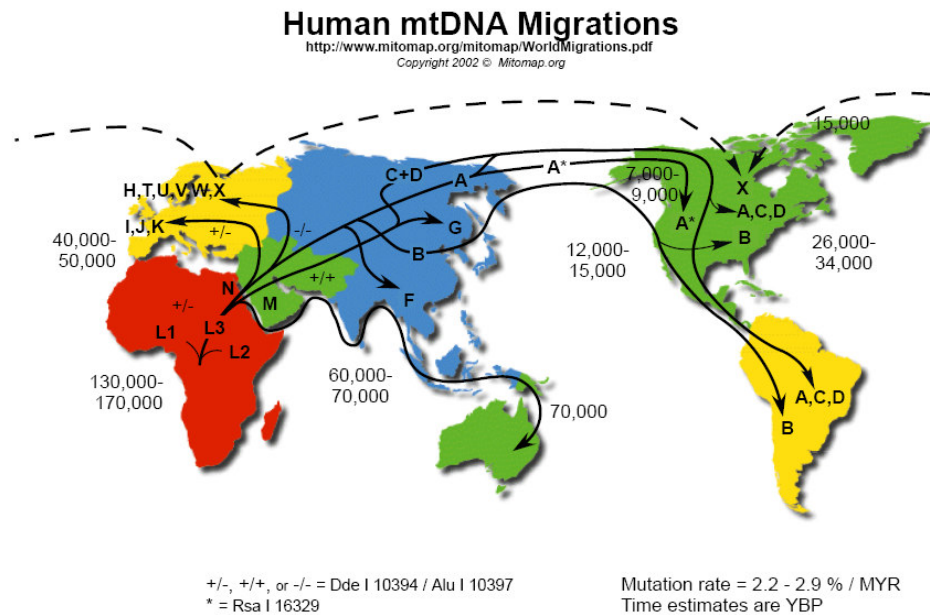


Fig. 5: Diffusione delle linee mitocondriali nel mondo.

2.2 Obiettivi della ricerca

I due principali scopi di questa tesi sono:

1. Stimare la composizione genetica della popolazione elbana attraverso l'analisi della variabilità mitocondriale della regione HVSI.
2. Dal confronto con un archivio di sequenze HVS1 di origine italiana e medio-orientali, stimare la possibile origine di ciascun aplotipo nel contesto della storia del popolamento del mediterraneo e dell'Isola d'Elba in particolare.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Il campionamento

Il materiale oggetto di questa tesi è rappresentato da follicoli piliferi sopracciliari (5-8 per individuo), appartenenti a 53 individui elbani residenti nell'isola da almeno due generazioni e tra loro non imparentati.

Per ciascun individuo sono state raccolte, mediante intervista, informazioni riguardanti data e luogo di nascita, residenza nell'isola, genitori e nonni nati all'Elba. Per ciascun individuo è stata redatta una scheda in cui sono riportati i dati anagrafici e demografici della persona; ogni volta è stata richiesta l'autorizzazione al trattamento anonimo dei dati secondo quanto previsto dalla legge 675/96.

La raccolta del campione è stata eseguita utilizzando guanti e strumenti in condizioni di sterilità, pulendo la parte dove si pratica il prelievo e gli strumenti per tale operazione con alcool (etanolo al 100%). Per ogni individuo sono stati prelevati da 5 a 8 bulbi piliferi dalle sopracciglia, una regione pilifera che consente il recupero di una quantità molto alta di cellule, circa 300, rispetto ad altre parti del corpo. I bulbi sono stati successivamente posti in provette da 0.5 ml e conservate in frigo alla temperatura di 4°C fino al momento dell'analisi.

3.2 Estrazione di DNA da bulbo pilifero

Il DNA genomico è stato isolato da peli sopracciliari provvisti di bulbo utilizzando una variante del protocollo di estrazione descritto da Higuchi et al. (1988). Le modifiche consistono nell'utilizzo di detergenti tensioattivi non ionici quali Nonidet P40 e Tween 20, per prevenire una eventuale perdita di DNA provocata dall'impiego dei detergenti ionici indicati nel protocollo originale.

Inoltre non è stata eseguita la purificazione in fenolo-cloroformio.

A ciascun campione biologico sono stati aggiunti 400 μ l di Tampone di Estrazione composto da:

- Tris-HCL pH 8 10mM;
- KCL 50 mM;
- Nonidet-P40 0.45% (v/v);
- Tween 20 0.45% (v/v);
- Proteinasi K 60ug/ml;

La lisi parziale si è ottenuta incubando i campioni per due ore in un termostato a 56°C. Successivamente il lisato grezzo è stato posto per 10 minuti alla temperatura di 95°C per consentire la denaturazione dell'enzima proteolitico. La soluzione di DNA genomico così ottenuta è stata conservata ad una temperatura di -20°C fino al momento dell'amplificazione.

3.3 Analisi del DNA mitocondriale

Una aliquota del DNA genomico estratto dai 53 individui elbani è stato inviato presso l'Università di Santiago de Compostela, dove è stato tipizzato per 24 polimorfismi SNPs utilizzando la tecnica del minisequencing riassunta nel lavoro di Alvarez-Iglesias e collaboratori del 2007. Tale analisi ha permesso l'assegnazione di ciascun individuo ad una delle principali linee mitocondriali (aplogruppi).

Una altra aliquota di DNA è servita in questa tesi per approfondire l'analisi della variabilità interna alle linee individuate. E' stato sequenziato il primo segmento ipervariabile (HVSI) della regione non codificante (D-loop).

3.3.1 Amplificazione in PCR

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è un metodo rapido e versatile che permette l'amplificazione selettiva di una determinata regione di DNA

sfruttando il principio della moltiplicazione enzimatica ad opera di una polimerasi termoresistente.

Per ottenere questo tipo di amplificazione selettiva sono necessarie alcune informazioni a priori sulla sequenza del DNA bersaglio, che rendano possibile la costruzione di due sequenze oligonucleotidiche da utilizzare come inneschi o primers.

Una volta aggiunti al DNA genomico denaturato, fungono da iniziatori e si legano in senso opposto a sequenze di DNA complementari immediatamente fiancheggiando la regione da amplificare.

I primers vengono sintetizzati chimicamente in modo da avere una sequenza complementare alle due regioni che fiancheggiano il segmento, uno in direzione 5'-3' di un filamento (primer forward) e uno in direzione 5'-3' del filamento opposto (primers reverse).

La reazione avviene all'interno del termociclatore che svolge ripetuti cicli termici sequenziali, alle diverse temperature necessarie per le tre fasi principali del processo: denaturazione, appaiamento, estensione.

- **Denaturazione:** consiste nella separazione dei due filamenti di DNA che avviene solitamente a 93-95°C per il DNA genomico umano

- **Appaiamento o Annealing:** consiste nella fase in cui i primers presenti in eccesso rispetto al DNA si uniscono stabilmente e rapidamente al DNA stampo. La temperatura di questa fase va dai 50° ai 70°C a seconda della temperatura di fusione (T_m) della propria elica in corrispondenza delle sequenze complementari alle sequenze dei primers ed aumenta proporzionalmente al contenuto in basi G e C.

- **Estensione:** consiste nella fase in cui l'enzima DNA polimerasi sintetizza nuovi filamenti in direzione 5'-3' nel tratto compreso fra i due primers, utilizzando la sequenza target come stampo. Il tutto avviene ad una

temperatura di circa 70-75°C e al termine di questi cicli, dopo un'ultima estensione prolungata, i prodotti amplificati vengono raffreddati per impedire la rinaturazione delle eliche.

3.3.2 Visualizzazione amplificati su gel

I prodotti amplificati e purificati sono stati visualizzati, al fine di valutarne resa e specificità, mediante elettroforesi su gel d'agarosio. La tecnica prevede l'utilizzo di un gel con due file di pozzetti dove vengono caricati i campioni amplificati, alloggiato in una vaschetta elettroforetica su un supporto rigido e completamente immerso in una soluzione tampone di TAE 1x (Tris acetato 0.04 M; EDTA pH 8, 0.001 M). Due elettrodi posti ai lati del supporto, collegati ad una sorgente di corrente continua, pescano direttamente nella soluzione tampone. Quando tra i due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale si genera un gradiente di potenziale elettrico, in presenza del quale qualsiasi sostanza dotata di carica elettrica migrerà lungo il gel con una direzione ed una velocità dipendenti dalla tensione applicata, dal segno e dalla grandezza della carica, dalle dimensioni dello ione e dal pH del tampone utilizzato:

La velocità di migrazione è data dalla formula:

$$V = E_q / f$$

Dove f rappresenta la forza di attrito nel gel che si oppone al movimento delle molecole rallentandole, mentre E_q è la tensione applicata ai due capi del dispositivo. Tale velocità è direttamente proporzionale alla carica elettrica ed inversamente proporzionale alla massa dello ione.

Per esperimenti di questo studio è stata applicata la tensione di 80V (400mA) per una durata di 30 minuti.

Il DNA amplificato viene appesantito con una soluzione glicerata contenente blu di bromofenolo e xilene cianolo, coloranti che fungono da

tracciante del fronte di migrazione, consentendo di seguire la regolarità della corsa. In un pozzetto, per ogni fila, viene caricato anche un marker di lunghezza (AmpliSize Molecular Ruler 50-2000bp Ladder, BioRad), contenente 10 tipi di frammenti di peso molecolare definito e lunghezza nota, da 50 fino a 2000 bp, concentrati 10 ng/banda/ul.

Una volta caricati, il DNA, sottoposto all'azione del campo elettrico, inizia a migrare verso il polo positivo in virtù della sua carica negativa.

La concentrazione di agarosio è scelta in funzione delle dimensioni delle molecole da separare. In questo caso il gel è stato preparato con agarosio a basso punto di fusione Nu-Sieve (FMC), in modo da poter raggiungere una concentrazione del 2% per la visualizzazione dei prodotti amplificati e purificati.

Il gel viene preparato sospendendo l'agarosio in polvere in un tampone acquoso di TAE 50X, bollendo la miscela fino ad ottenere una soluzione limpida e lasciandola raffreddare a temperatura ambiente su un supporto rigido. Due pettini di plastica vengono posizionati nella soluzione, così da formare i pozzetti per il caricamento dei campioni, e tolti a raffreddamento ultimato. A questo punto può avvenire il caricamento.

Durante la corsa elettroforetica il gel funziona come un setaccio, rimanendo indietro i frammenti più grandi e pesanti mentre quelli più piccoli e meno ingombranti migrano più velocemente verso il polo opposto. Lo scopo è infatti quello di separare i frammenti in base alla loro grandezza e constatare con apposito marker di confronto che rientrino nel range previsto.

I prodotti amplificati sono evidenziati con bromuro di etidio, sostanza intercalante il DNA che assorbe nell'ultravioletto (312 nm) ed emette nel visibile (giallo-verde). I frammenti di DNA legati al colorante, dopo essere stati esposti ai raggi UV di un transilluminatore, appaiono come una serie di bande luminose la cui intensità è proporzionale alla concentrazione dell'amplificato (Fig. 8). Le bande vengono confrontate con quelle

parallele al marker standard che funziona come un righello graduato consentendoci di stimare il peso molecolare e la lunghezza dei nostri frammenti.

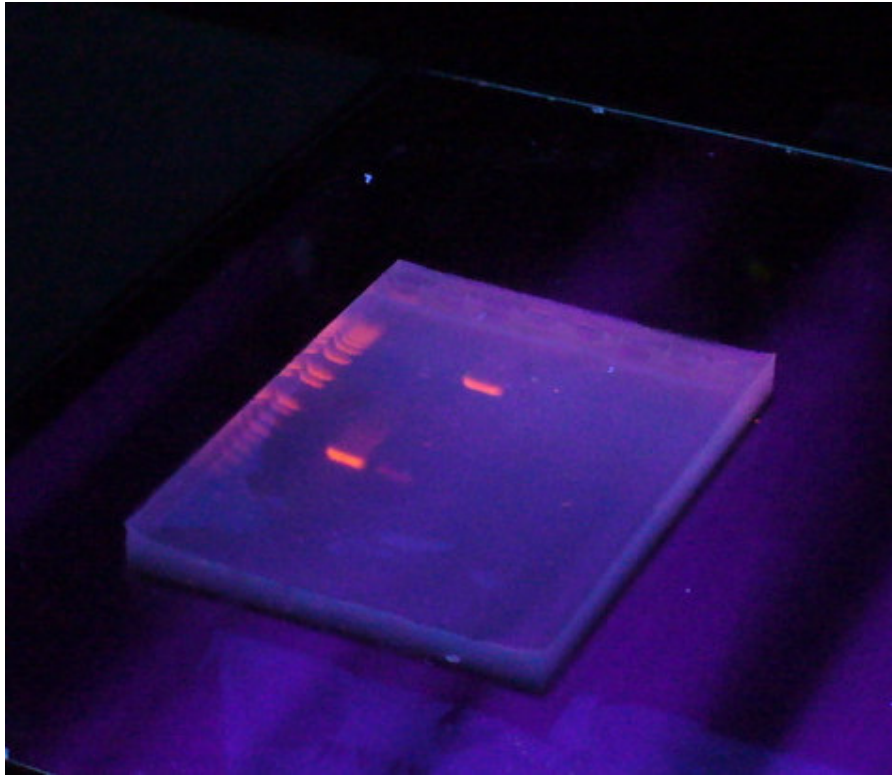


Fig. 8 Elettroforesi su gel di agarosio al 2%. (it.wikipedia.org/wiki/Elettroforesi.)

3.3.3 Analisi della HVSI: regione non codificante del mtDNA

IL DNA di tutti i campioni analizzati è stato utilizzato per l'amplificazione di un frammento di 405 bp del primo segmento ipervariabile (HVSI).

Ciascuna amplificazione è stata eseguita in una miscela di reazione contenente i seguenti componenti, nelle proporzioni indicate in tabella 1.1.

Miscela di reazione	Concentrazione finale μ l
H2O sterile	28.3
Polimerasi	0.3
Buffer 10x	0.3
Deossinucleotidi	6
Primer L15996	0.7
Primer H16401	0.7
MgCl ₂	4
DNA	5
Vol	50

Tab. 1.1. Esempi di concentrazioni per la miscela di reazione

La miscela di reazione così ottenuta è sottoposta in PCR a 30 cicli di temperatura per tempi variabili:

- 95° per 12'
- 94° per 50''
- 52° per 1'
- 72° per 1'20''
- 72° per 10'
- 4° inf.

Successivamente l'amplificato è stato purificato su colonnine Microcon YM-50. Queste colonnine sono caratterizzate da un particolare filtro che concentra e purifica soluzioni di macromolecole mediante l'utilizzo di centrifughe ad angolo fisso. Il campione è stato caricato su colonnina ed è stata eseguita una prima centrifugazione della durata di 2' circa. La membrana trattiene il prodotto purificato rilasciando nella provetta il materiale in eccesso sottoforma di filtrato. In seguito, il filtro viene capovolto in una nuova provetta e sottoposto a una seconda centrifugazione

a 2000 x g per 3'. La resa finale è di circa 5ul di purificato. Per verificare l'avvenuta amplificazione e quantificare il prodotto purificato, il preparato viene sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio al 2% (Vedi paragrafo 3.3.3).

3.3.4 Reazione di sequenza

La reazione di sequenza è stata condotta con il Kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing (versione 3.1, Applied Biosystem).

La miscela di reazione preparata in un volume finale di 22 µl contiene:

- circa 50 ng di amplificato
- Big Dye Terminator Mix (Taq polimerasi e i quattro dideossinucleotidi marcati con diversi fluorocromi)
- Buffer 5x

Primer reverse o forward

Il protocollo di amplificazione prevede 1' a 96°C e 30 cicli a 96°C per 20'', 52°C per 5'' e 60°C per 4'.

Successivamente è stata eseguita una seconda purificazione utilizzando le colonnine Micro Bio Spin 30 (Biorad); tali colonnine sono caratterizzate da una matrice di gel in poliacrilammide sospesa in un Tris buffer a pH 7.4 che necessitano di un periodo iniziale di sedimentazione a temperatura ambiente e di successivi capovolgimenti prima del loro utilizzo.

Dopo aver rimosso il tappo, le colonnine sono state inserite in dei tubi specifici per microcentrifuga forniti dal kit; sono state centrifugate a 2000 x g per 2' ed è stato raccolto il gel filtrato. Successivamente l'amplificato, caricato sulle colonne, è stato centrifugato a 2000 x g per 4', utilizzando nuove eppendorf da 1.5 ml.

Circa 10 µl di purificato finale viene aggiunto a 10 ul di formammide e sottoposto a denaturazione mediante PCR (programma "Hot" 94° C per 3').

3.3.5 Analisi al sequenziatore

Il sequenziamento automatico è stato eseguito mediante ABI PRISM 310 Genetic Analyser composto da un'unità di elettroforesi e di lettura, un computer Power Macintosh G3, una stampante a colori e il software GeneScan Analysis.

Questi strumenti collegati assieme offrono un'analisi completamente automatizzata del DNA molecolare, consentendo in questo caso la lettura della sequenza. Il sequenziatore ABI PRISM 310 è costituito da un'elettroforesi capillare al termine della quale i campioni vengono raggiunti da un raggio laser che incide perpendicolarmente ad essi.

I coloranti fluorescenti con i quali sono stati marcati i campioni, eccitati dal laser, emettono segnali fluorescenti che sono rilevati da una camera digitale in grado di trasmetterli ad un computer collegato.

Durante la corsa elettroforetica il software GeneScan controlla la strumentazione e l'impostazione dei parametri elettroforetici come il pH, l'intensità della corrente, la temperatura.

Nell'analisi vengono utilizzati dei coloranti fluorescenti che hanno loro massima emissione fluorescente in un preciso range di lunghezza d'onda, ad esempio il dR110 emette fluorescenza alla lunghezza d'onda più corta, seguito da dR6G, dTAMRA ed infine dROX.

I frammenti, che hanno carica negativa, sono quindi sottoposti al campo elettrico dell'elettroforesi, che li separa facendoli scorrere attraverso dei capillari in direzione di un polo positivo. Poiché i frammenti più corti sono anche quelli più veloci, il loro ordine finale riflette le dimensioni individuali e i frammenti interi, grazie alla presenza dei nucleotidi terminatori, i ddNTP, marcati, possono così essere letti come la sequenza originaria alla rovescia. La luce laser attiva i marcatori fluorescenti mano a mano che i frammenti scorrono attraverso uno strumento rilevatore,

producendo un tracciato finale colorato che è tradotto in una sequenza. (Fig. 9).

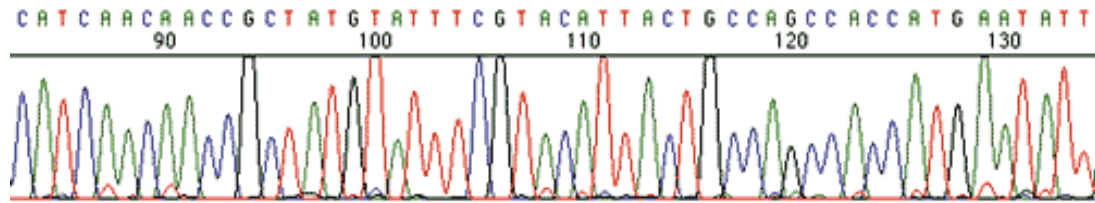


Fig. 9 Sequenza DNA vista al computer.

La sequenza nucleotidica elaborata dal sequenziatore è stata allineata e confrontata con la CRS (Cambridge Sequence Reference, Anderson, 1981; Andrews 1999) dalla posizione nucleotidica 16024 alla 16383, utilizzando il software DNA Alignment, (www.flexus-engineering.com) per assegnare lo stato allelico ai siti polimorfici e quindi verificare la presenza o meno di mutazioni lungo la sequenza studiata.

CAPITOLO 4

METODI STATISTICI

4.1 Indice di diversità genetica

Una delle misure più efficaci utilizzate per stimare il grado di polimorfismo di un locus entro una popolazione è l'eterozigosità che viene calcolata dalla somma dei quadrati delle sequenze di tutti i suoi alleli, sottratta rispetto all'unità.

Per un sistema diploide ed in una popolazione in equilibrio tale formulazione concettualmente corrisponde alla proporzione attesa di individui eterozigoti per il locus considerato.

In un sistema aploide com'è nel caso del DNA mitocondriale, tale formula esprime semplicemente una misura della variabilità genetica, ovvero la probabilità che due aplotipi o due alleli ad uno stesso locus, presi a caso nella popolazione, siano diversi. Viene denominata diversità genetica o Gene Diversity ed è calcolata mediante la formula:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Dove n è il numero dei cromosomi (individui) nel campione, k è il numero di alleli e p è la frequenza del i -esimo allele.

L'indice di H assume il valore zero in assenza di polimorfismo, mentre si avvicina ad uno tanto maggiore è il grado di variabilità osservabile nel campione per un determinato marcatore.

Quando più loci sono tipizzati per lo stesso campione, il grado di polimorfismo medio esistente della popolazione può essere convenientemente espresso dalla Diversità Genetica media che è data dalla media aritmetica dei valori calcolati per singoli loci (Nei 1987), secondo la formula:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^l \frac{h_i}{l}$$

In cui l è il numero di loci e j indica il generico locus.

La varianza per h e H associata al processo di campionamento è stata calcolata come indicato da Nei (1987).

4.2 Distanze genetiche

Una misura naturale della divergenza genetica tra due popolazioni è data dal parametro F_{st} tra coppie di popolazioni, stimato nel nostro caso con il metodo dell'analisi della varianza, introdotta da Cockerham (1973) per il trattamento delle frequenze geniche, ed estese da Excoffier (1992) al trattamento dei dati molecolari.

Il parametro F_{st} viene calcolato mediante la formula:

$$F_{st} = \frac{V_p}{p(1-p)}$$

Dove V_p corrisponde alla varianza delle frequenze geniche o aplotipiche e p è la loro media.

Tale valore rappresenta generalmente il grado di differenziazione genetica di più popolazioni. Quando si applica a due sole popolazioni, la stessa formula stima la loro distanza genetica.

Nel caso in cui si disponga di aplotipi si tiene conto non solo del dato di frequenza, ma anche delle differenze molecolari tra i vari alleli dei diversi loci. Il numero di loci ai quali gli alleli differiscono (metodo della conta del numero di differenti alleli o “pairwise number of different alleles”) viene registrato utilizzando la seguente formula:

$$d_{xy} = \sum_{i=1}^l d_{xy}(i)$$

dove i è la funzione di Kronecker, pari ad uno se gli alleli del i -esimo locus sono diversi tra i due campioni presi in esame e zero in caso contrario; l è il numero di loci.

Per la realizzazione di questo tipo di analisi è stato utilizzato il programma Arlequin, versione 2.000.

4.3 Multidimensional Scaling (MDS)

Il Multidimensional Scaling (Kruskal, 1964) è una procedura matematica che consente di rappresentare gli oggetti in uno spazio euclideo, definito da un numero qualsivoglia ridotto di dimensioni, in modo tale che le distanze riprodotte riflettano con la maggior fedeltà possibile i valori osservati sperimentalmente. Il criterio è quello di collocare gli oggetti rispettando l'ordine reciproco tra tutte le misure a coppie date. Gli elementi della matrice analizzata possono essere costituiti da valutazioni che esprimono il grado di similarità o di differenziazione; nel nostro caso si tratta delle distanze genetiche osservate tra coppie di popolazioni.

Sappiamo che dati n oggetti, definiti dalle distanze reciproche osservate sperimentalmente essi, naturalmente, sono sempre esattamente posizionabili in uno spazio euclideo a n -dimensioni. L'obiettivo del metodo MDS è quello di costringere questa rappresentazione, difficilmente visualizzabile ed interpretabile, all'interno di uno spazio euclideo da un numero inferiore di dimensioni, in ultima analisi, abitualmente, un sistema cartesiano, nel nostro caso bidimensionale, in modo però da introdurre la minore distorsione possibile rispetto ai rapporti originali.

La procedura di riduzione, a partire da una prima proiezione dei dati nel sistema spaziale definito, passa attraverso una serie iterazioni (Guttman

1968), nel corso delle quali gli oggetti vengono di volta in volta disposti in nuove configurazioni. La fedeltà con cui ogni determinata configurazione riflette la matrice reale o, in altri termini, il grado di adattamento tra le distanze a coppie riprodotte e le distanze osservate vengono valutati attraverso la misura di stress (Φ) che è così definita:

$$\Phi = \sum (d_{ij} - \delta_{ij})^2$$

In questa formula d_{ij} rappresenta la distanza osservata sperimentalmente tra due oggetti i e j (nel nostro caso le popolazioni) e δ_{ij} è la distanza corrispondente alla rappresentazione spaziale ottenuta. Maggiore è l'adattamento delle due matrici, quella osservata e quella derivata, minore è il valore di questo parametro. La sequenza di iterazione è governata da questo principio e viene interrotta nel momento in cui diventa relativamente improbabile passare ad una distribuzione spaziale con un livello di Stress inferiore rispetto alla precedente. L'algoritmo opera confrontando continuamente la matrice relativa alle proiezioni ottenute con quella reale e misura la rapidità con cui diminuisce lo Stress. Quando tale velocità rimane costante al di sotto di una singola minima prefissata la procedura ha termine (Guttman 1968).

Per tale tipo di analisi è stato utilizzato il programma "Statistica" per Windows versione 5.1.

4.4 Analisi Network

Le relazioni genealogiche tra gli aplogruppi, nel campione di popolazione esaminato, sono state analizzate mediante l'utilizzo del programma Network, proposto da Bandelt nel 1994 (Bandelt e al. 1995).

Il software suddetto realizza un reticolo tridimensionale nel quale gli aplogruppi vengono rappresentati da una sfera corrispondente alla loro

frequenza relativa e separati da segmenti proporzionali al numero di mutazioni che li differenziano.

Per l'analisi dell'HVSI il programma Network propone due algoritmi alternativi: il "Reduced Median network" (RM) ed il "Median Joining" (MJ). La scelta di utilizzare il MJ è stata dettata dalla tipologia dei nostri dati e dall'esigenza di ottenere una rappresentazione dei rapporti tra gli aplotipi che fosse la più semplice possibile.

L'algoritmo MJ offre la possibilità di pesare in modo differente i vari caratteri e di introdurre un parametro, epsilon, il quale varia il grado di tolleranza nell'analogia tra aplotipi.

La fase successiva è la creazione di alberi "minimun spanning" tra loro collegati, cioè di network nei quali i diversi aplotipi sono disposti in modo tale che non si creino cicli o nodi addizionali, così che la lunghezza totale del reticolo sia la minima possibile.

Mediante l'applicazione di un metodo euristico di massima parsimonia vengono aggiunti al network i "median vectors", ovvero dei vertici intermedi tra due o più aplotipi ed interpretabili, dal punto di vista biologico, come possibili aplotipi non campionati o aplotipi ancestrali estinti.

Il network è stato pesato sulla base della frequenza delle mutazioni considerando come peso iniziale 50 attribuito alle frequenze minori. L'algoritmo termina quando tutti gli aplotipi sono stati aggiunti al reticolo in costruzione.

L'età di un aplotipo ancestrale definito da una elaborazione network è stata stimata con la statistica Rho e si riferisce al tempo di origine minimo per la mutazione che precede l'oplotipo (Morral et al.1994). Tale parametro restituisce un'età in unità mutazionali da convertire in anni moltiplicando per un certo tasso di mutazioni.

Noi abbiamo utilizzato come tasso mutazionale 0.00001 (mutazione x sito x generazione), che riflette un valore medio ricavato attraverso diversi studi

genealogici, 25 anni come tempo intergenerazionale e 495 come numero di siti complessivo.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Risultati

Alla luce della tipizzazione (Alvarez-Inglesias et al. 2007) svolta sul campione elbano per le mutazioni binarie della regione codificante, sono stati individuati 10 diversi aplogruppi su un totale di 53 individui esaminati: H* (30,2%), J/T (20,7%), U7 (17,0%), J1 (17,0%), K1 (11,3%), H5 (5,7%), H7 (5,7%), U* (5,7%), N* (1,9%), H1 (1,9%). Allo scopo di verificare la posizione dell'Isola d'Elba all'interno del paesaggio genetico mediterraneo, la variabilità binaria (frequenza degli aplogruppi) del campione elbano è stata confrontata con quella di popolazioni tosco-laziali (Brisighelli F, comunicazione personale), italiane e orientali (Achilli et al. 2007 e riferimenti ivi inclusi).

Sono state calcolate le distanze genetiche tra coppie di popolazioni (F_{st} pairwise) e alla matrice corrispondente è stato applicato il metodo MDS (Multidimensional Scaling).

Population	Sample ID	T	G	G	A	C	T	T	A	G	A	A	T	C	C	A	C	T	G	A	C	C	T	C	HG	HVS-I	
		72	3010	3915	3348	3992	4216	4336	4529	4580	4769	4793	6776	7028	10142	10398	10400	10873	11719	12308	12705	13188	14766	15454	15904		
Isola d'Elba	G1	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.	
Isola d'Elba	G6	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G9	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G10	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G11	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G12	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G14	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G15	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G20	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G24	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G27	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G28	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G32	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G46	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G51	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G53	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H*	n.d.
Isola d'Elba	G31	-	A	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H1	n.d.
Isola d'Elba	G38	-	-	-	-	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H5	086 270 304
Isola d'Elba	G7	-	-	-	-	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H5	270 304
Isola d'Elba	G37	-	-	-	-	-	-	C	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H5	270 304
Isola d'Elba	G26	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H7	093 265 271 362C/T 519
Isola d'Elba	G21	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H7	093 265 271 519
Isola d'Elba	G33	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H7	093 265 519
Isola d'Elba	G16	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	J/T	n.d.
Isola d'Elba	G29	-	-	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	J/T	n.d.
Isola d'Elba	G3	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	J1	n.d.
Isola d'Elba	G4	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	J1	n.d.

Population	Sample ID	T	G	G	A	C	T	T	A	G	A	A	T	C	C	A	C	T	G	A	C	C	C	T	C	HG	HVS-I
Isola d'Elba	G13	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G42	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G44	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G45	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G47	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G48	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G50	-	a	-	-	-	C	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	-	-	-	-	T	-	-	J1	n.d.	
Isola d'Elba	G2	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	-	T	-	-	K1	n.d.	
Isola d'Elba	G8	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	-	T	-	-	K1	n.d.	
Isola d'Elba	G18	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	-	T	-	-	K1	n.d.	
Isola d'Elba	G34	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	-	T	-	-	K1	n.d.	
Isola d'Elba	G35	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	-	T	-	-	K1	n.d.	
Isola d'Elba	G41	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	-	T	-	-	K1	n.d.	
Isola d'Elba	G36	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	A	-	T	-	T	-	-	N*	183T 189 223 278 519	
Isola d'Elba	G22	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U*	n.d.	
Isola d'Elba	G23	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U*	n.d.	
Isola d'Elba	G25	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	-	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U*	n.d.	
Isola d'Elba	G17	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 362 519	
Isola d'Elba	G40	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 362 519	
Isola d'Elba	G5	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	
Isola d'Elba	G19	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	
Isola d'Elba	G30	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	
Isola d'Elba	G39	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	
Isola d'Elba	G43	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	
Isola d'Elba	G49	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	
Isola d'Elba	G52	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	T	T	-	-	-	A	G	-	-	T	-	-	U7	271 318T 519	

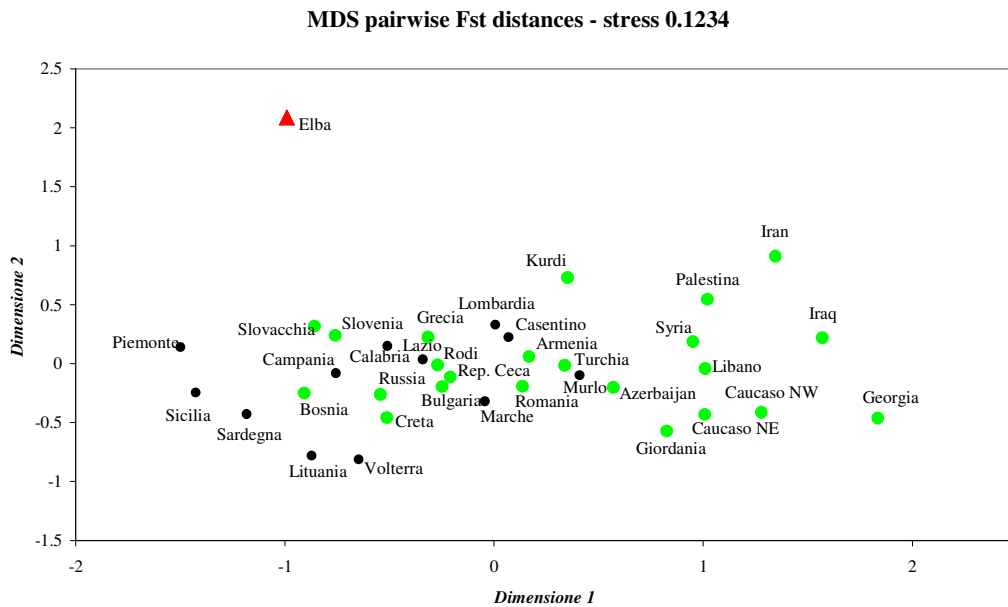


Fig. 10: Rappresentazione del Multidimensional Scaling ottenuto dalla matrice di distanze genetiche F_{st} basate sulle frequenze degli aplogruppi di popolazioni dell'Europa orientale, italiana e medio-orientali. In verde sono riportate le popolazioni orientali in generale e in nero quelle italiane; in rosso il campione elbano.

I rapporti reciproci tra popolazioni sono stati rappresentati su un grafico bidimensionale nelle Fig. 10 e 11. Si nota come il campione elbano si separi nettamente dalle popolazioni italiane, da quelle medio-orientali e da quelle toscane. L'indice di stress è molto significativo ($P \ll 0,001$, Sturrock & Rocha 2000) di conseguenza entrambi i grafici bidimensionali rappresentano bene la reale distanza tra le singole popolazioni. La posizione marginale della popolazione elbana nel grafico di Fig.10 sembra determinata da aplogruppi tipici della componente orientale sulla dimensione 2, da aplogruppi tipici della componente italo-balcanica sulla dimensione 1.

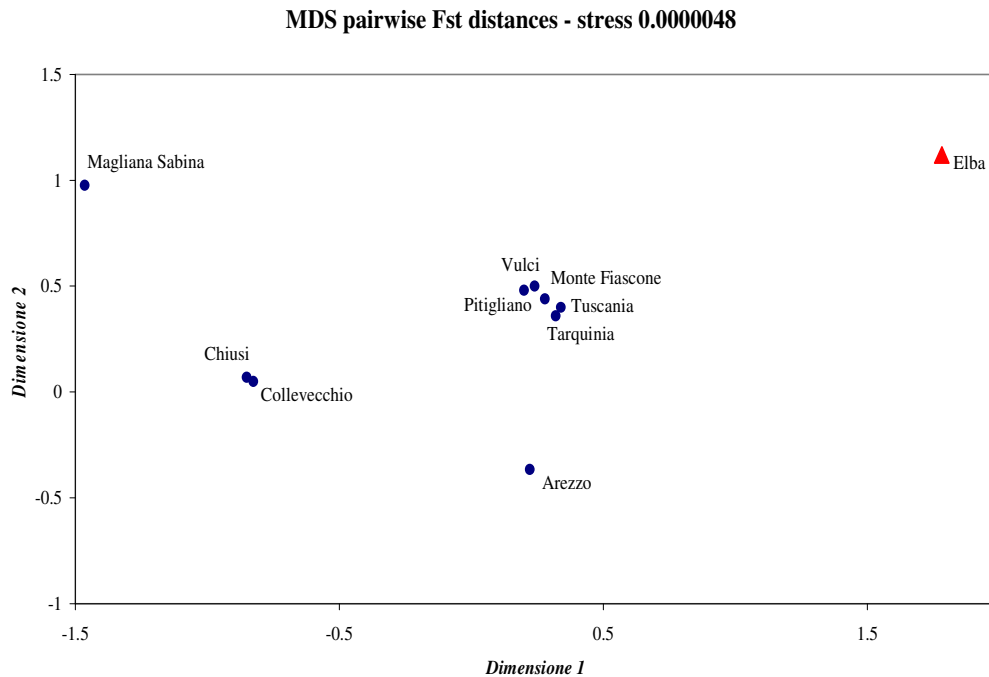


Fig. 11: Rappresentazione del Multidimensional Scaling ottenuto dalla matrice di distanze genetiche Fst basate sulle frequenze degli aplogruppi all'interno della regione tosco-laziale.

Unendo in un unico aplotipo i dati binari e i dati HVSI dei mitocondri per i quali precedenti studi hanno suggerito un'origine mediorientale (aplogruppi H5, H7, U7), è stato costruito un albero di massima parsimonia (Fig. 12).

In rosso sono evidenziati i cluster in cui ritroviamo insieme sia individui toscani che elbani. Tutti i mitocondri elbani (identificabili dalla iniziale G) tranne uno sono raggruppati in 3 cluster insieme a campioni provenienti da Collevechio (U7) e da Tuscania (H5 e H7).

In particolare, una ricerca sulle banche dati (NCBI Genebank) ha rivelato che una mutazione (16271) tipica dei mitocondri U7 del campione elbano è stata ritrovata anche in due individui residenti nella piana di Lucca.

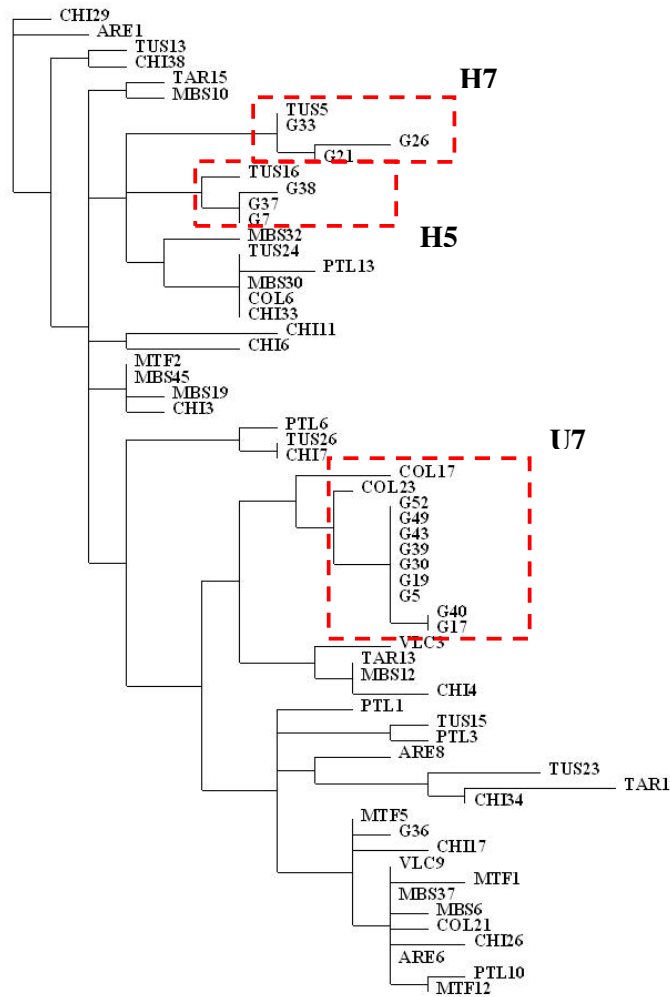


Fig. 12: Albero di massima parsimonia basato sulla frequenza di mutazioni puntiformi della regione codificante e non codificante (software “Philip” ver. 3.6).

Per questo motivo è stata fatta un’ulteriore analisi per approfondire le possibili origini della linea U7 ritrovata nel nostro campione. La frequenza nel campione in esame è stata confrontata con quella media di popolazioni italiane (Achilli et al. 2007, Turchi et al. 2008) e alcune popolazioni orientali (Roostalu et al. 2007, Abu-Amero et al. 2008) (Fig13).

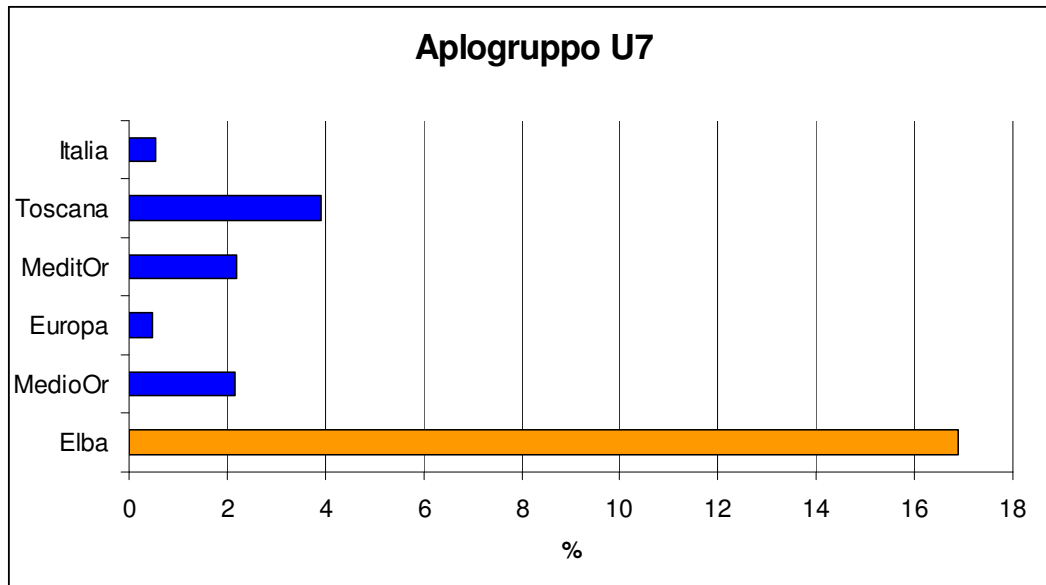


Fig. 13 Frequenza aplogruppo U7 nell'Isola d'Elba e popolazioni di confronto.

I valori suggeriscono l'area toscano/tirrenica come una zona dove tale linea raggiunge i massimi assoluti. Questa eredità può essere ricondotta ad un evento migratorio che ha interessato un'ampia area, successivamente rinforzato da fattori casuali dovuti all'isolamento. L'analisi Network (Fig. 14) evidenzia due cluster principali rappresentati ciascuno da un possibile aplotipo ancestrale, entrambi di origine medio orientale (in verde). Da qui si diramano tutti gli altri aplotipi sempre meno frequenti (sfere più piccole). In particolare, gli aplotipi elbani (in rosso) si ritrovano in un ramo terminale alla cui base ci sono i due aplotipi provenienti dalla Piana di Lucca. Tale ramo è caratterizzato dalla mutazione 16271 che lo allontana dagli aplotipi delle altre popolazioni tosco-laziali, mantenendo tuttavia un legame con gli aplotipi ancestrali di origine medio orientale. L'origine della mutazione 16271 viene stimata intorno ai 4040 ± 3386 anni fa, e la sua successiva introduzione all'Isola d'Elba (aplotipi con mutazione 16309) intorno a 897 ± 890 anni fa.

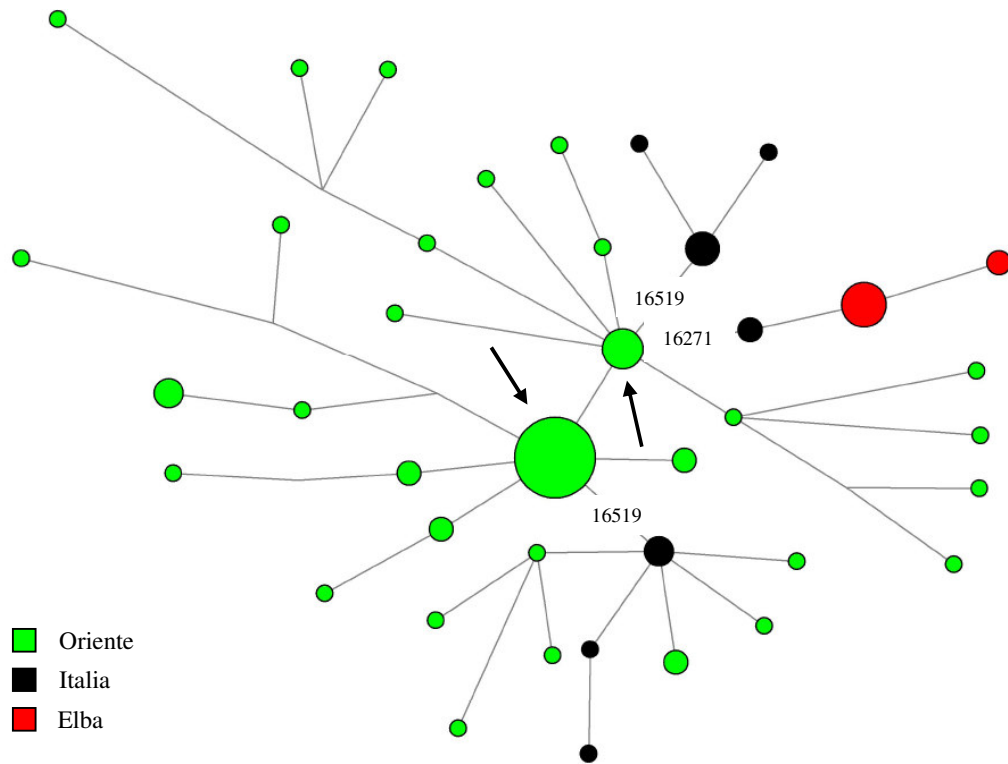


Fig. 14: Albero di massima parsimonia costruito mediante l'algoritmo MJ sulla base degli aplotipi HVSI relativi all'aplogruppo U7. Le frecce indicano i due principali aplotipi ancestrali medio-orientali; la 16519 e la 16271 sono le mutazioni alla base delle tre ramificazioni di maggior interesse.

In seguito è stata approfondita l'analisi sulle possibili origini anche per gli aplogruppi H5 e H7 (Fig. 15 e 16). Anche in queste due rappresentazioni grafiche si riscontra un collegamento tra le popolazioni medio orientali e la popolazione elbana i cui aplotipi si collocano ancora in posizione terminale. Per quanto riguarda il legame di quest'ultima con le popolazioni italiane in generale, si nota come all'interno della rappresentazione grafica relativa all'aplogruppo H5 non ci siano aplotipi condivisi, mentre è presente un'unica condivisione (Tuscania) all'interno dell'aplogruppo H7.

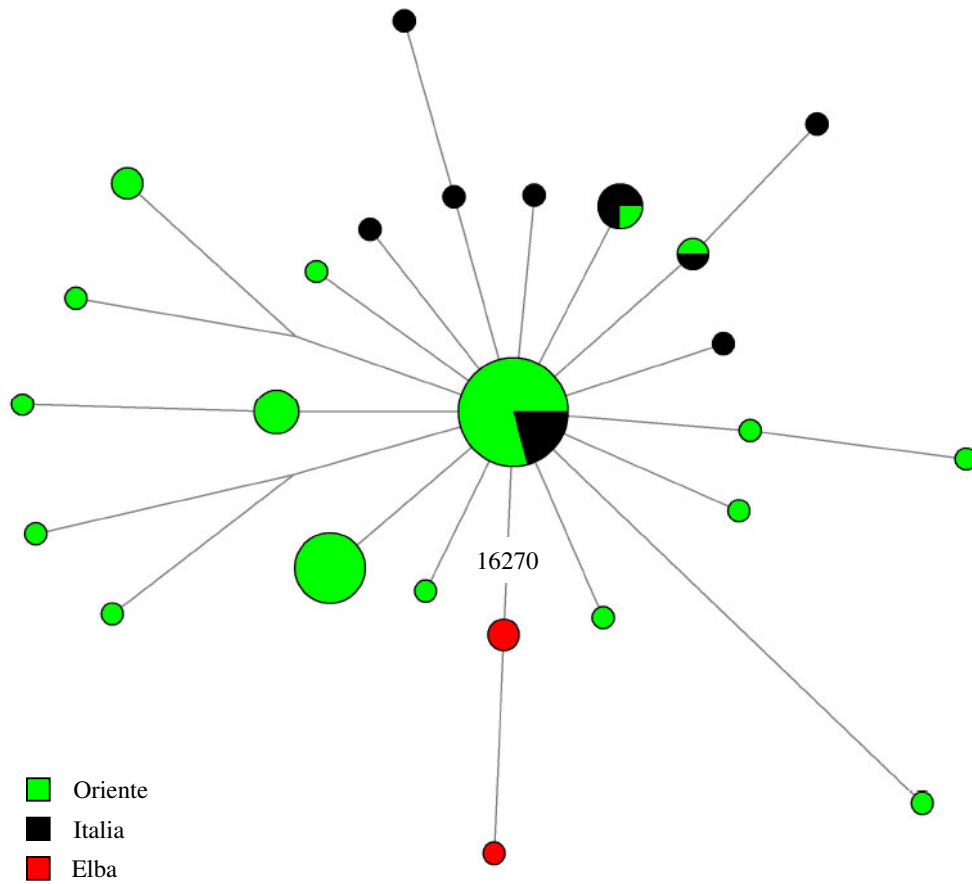


Fig. 15: Albero di massima parsimonia costruito mediante l’algoritmo MJ sulla base degli aplotipi HVSI relativi all’aplogruppo H5. La 16270 rappresenta la mutazione alla base della ramificazione elbana.

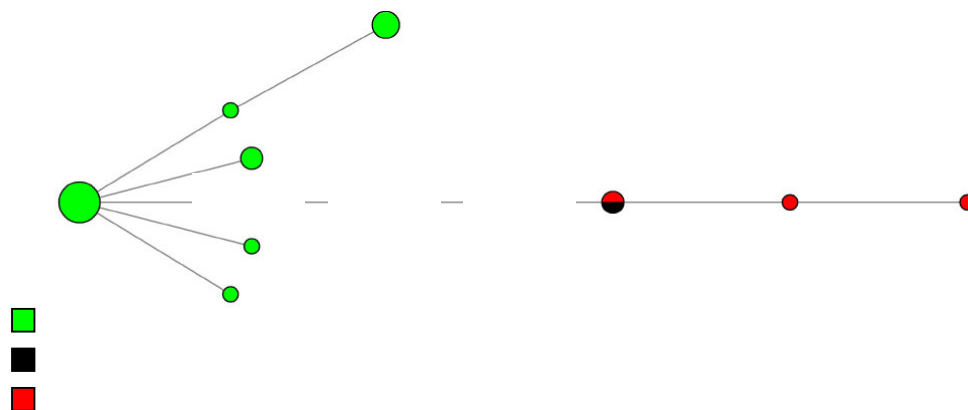


Fig. 16: Albero di massima parsimonia costruito mediante l’algoritmo MJ sulla base degli aplotipi HVSI relativi all’aplogruppo H7. La 16093, 16265 e la 16519 sono le mutazioni alla base della ramificazione elbana.

5.2 Discussione

In questo studio è stata analizzata la variabilità mitocondriale di un campione di 53 individui residenti all'Isola d'Elba, non imparentati fra loro, aventi entrambi i genitori e tutti e quattro i nonni nativi dell'Elba.

L'Isola d'Elba, per evidenze storico-culturali, biologiche, demografiche e posizione geografica, può essere considerata come un'area parzialmente isolata e ben si presta alla verifica di modelli di coalescenza basati su marcatori a trasmissione uni-parentale.

Inizialmente, con la tecnica del minisequencing eseguita da alcuni ricercatori dell'Università di Santiago de Compostela (Alvarez-Inglesias et al. 2007) e successivamente con il sequenziamento della regione non codificante HVSI del mtDNA per gli aplogruppi di supposta origine mediorientale, si è cercato di ricostruire l'origine degli aplotipi che rappresentano, ciascuno, una linea diretta a trasmissione esclusivamente femminile.

Nel complesso, il campione elbano si separa nettamente sia dalle popolazioni italiane che da quelle toscane, a conferma del suo isolamento dal punto di vista geografico.

5.2.1 Linee mitocondriali di origine medio-orientale

In particolare, è stata presa in considerazione la variabilità HVSI di 3 cluster (H5, H7, U7) per i quali si ipotizza una origine medio orientale

5.2.1.1 Aplogruppo U7

L'aplogruppo U, appartenente al super-aplogruppo R, rappresenta un insieme di individui che discendono da un stesso antenato comune di sesso femminile che si ipotizza abbia avuto origine circa 55.000 anni fa in Asia occidentale (Tab. 2.1). All'interno di questa linea sono presenti diversi sottoaplogruppi, (U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8 e K) che ritroviamo con

vasta distribuzione nel nord Africa, India, Caucaso settentrionale e Vicino Oriente.

Successivamente dall'Asia occidentale, attraverso la Russia e i monti del Caucaso passando per le steppe del Mar Nero verso le regioni degli attuali stati baltici, una prima linea dell'aplogruppo U si pensa possa essere migrata, in un primo momento verso la Scandinavia e in un secondo momento verso il resto dell'Europa e zone del mediterraneo attestandosi con una frequenza vicina al 7% nelle popolazioni attuali (Fig. 5).

In particolare, l'aplogruppo U7 non è presente in molte popolazioni europee, ma lo ritroviamo nel vicino Oriente, in Pakistan e soprattutto in Iran, con una frequenza che varia dal 4 al 10%. In India, nella parte più occidentale, nello stato di Gujarat, l'aplogruppo U7 ha una frequenza pari al 12%, mentre nel resto della penisola indiana la frequenza scende a circa il 2%. L'eventuale patria di questo aplogruppo abbraccia quindi l'Iran e l'India occidentale visto che la sua frequenza diminuisce rapidamente spostandosi sia ad est che ad ovest; conseguentemente si ipotizza che l'aplogruppo U7 sia stato introdotto in Asia attraverso la fascia costiera occidentale.

<i>Aplogruppo U</i>	
Data di origine	55.000 anni
Luogo di origine	Asia occidentale
Antenato	R
Discendenti	U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8, K
Definizione di mutazioni	73, 7028, 11719, 12308, 14766

Tab. 2.1 Schema riassuntivo aplogruppo U

5.2.1.2 Aplogruppo U7 nell'Isola d'Elba

E' emerso come la filogeografia dell'aplogruppo U, individuato in Iran e India occidentale, presenti delle varianti particolari come la 16271 (sub aplogruppo U7) ritrovate nell'area di Lucca e nell'Isola d'Elba. Per questo motivo, si ipotizza che un sottogruppo di individui dalla Piana di Lucca o da zone limitrofe toscane possa essere migrato nell'Isola d'Elba introducendo la variante 16271. Dalle relative datazioni citate nei risultati si suppone una diffusione dell' U7 avvenuta in almeno due fasi: una prima introduzione in Toscana durante la transizione Neolitico/Eneolitico; una successiva migrazione nell'Isola d'Elba in tempi più recenti compatibili con il periodo della dominazione della Repubblica pisana.

La conservazione di questa variante fino ai giorni nostri probabilmente è dovuta al fatto che si sono create delle barriere al flusso genico o si sono instaurati nuclei endogamici relativamente isolati. In particolare, la parte occidentale dell'Elba può aver conservato maggiormente caratteri di insediamento umano antico e più stabile poiché le comunicazioni sono state ostacolate dalla mancanza di un sistema viario interno e dall'asprezza dell'orografia. Oltre all'effetto drift, anche una colonizzazione di alcuni centri da parte di pochi individui (effetto fondatore) o la drastica riduzione del numero degli abitanti in seguito a eventi casuali (la pestilenza che colpì la zona di Marciana nel 1350 circa), possono aver favorito la conservazione di varianti specifiche.

5.2.1.3 Aplogruppo H5 e H7

L'aplogruppo H è il più comune aplogruppo mitocondriale presente in Europa. Ha avuto probabilmente origine circa 30.000 anni fa nella parte ovest dall'Asia, ed e' arrivato in Europa intorno ai 20-25.000 anni fa, diffondendosi rapidamente a sud-ovest del continente. Il suo arrivo in Europa coinciderebbe più o meno con lo sviluppo della cultura Gravettiana. Circa metà della popolazione europea possiede l'aplogruppo H; questo è

altresì presente in nord Africa e in Medio Oriente. La maggior parte delle popolazioni europee presenta una frequenza generale dell'aplogruppo H di circa 40%–50%, frequenza che decresce nella zona sud orientale del continente asiatico raggiungendo il 20% nel Vicino Oriente e Caucaso e <10% nel Golfo Persico, India del nord e Asia centrale (Tab. 2.1).

<i>Aplogruppo H</i>	
Data di origine	30.000 anni
Luogo di origine	Ovest Asia
Antenato	HV
Definizione di mutazioni	263

Tab. 2.2 Schema riassuntivo aplogruppo H

I sottoaplogruppi H5 e H7 si ritrovano in Europa e in Asia occidentale dove in quest'ultima si pensa abbiano avuto origine.

L'analisi network sulle possibili origini degli aplogruppi H5 e H7 ritrovati nel nostro campione (Fig. 15 e 16), mette in risalto anche in questo caso un possibile collegamento tra le popolazioni medio orientali e la popolazione elbana mediato da popolazioni toscane.

5.3 Conclusioni

Riassumendo, i risultati suggeriscono una significativa differenziazione del repertorio mitocondriale elbano rispetto a quello italiano e sostengono l'ipotesi di una chiara origine medio-orientale per alcuni aplotipi caratteristici delle linee H5,H7,U7 che rappresentano il 28,3% della variabilità totale elbana. La presenza di tali linee all'Elba è compatibile con flussi migratori in epoca storica. Popolazioni candidate ad aver svolto il ruolo di vettore di tali linee sono le grandi potenze, che, con alterne vicende, si spartirono lo spazio commerciale della parte del Mediterraneo attraversata dalle rotte mercantili che toccarono l'Elba a partire dall'età del ferro (IX° sec. A.C.): Etruschi, Fenicio-Punici, Focei (Greci) e Siracusani. In epoca più recente, Pisani e Genovesi, che si alternarono nella dominazione dell'Alto Tirreno dal XI al XVII secolo. La stima media dell'origine di alcune mutazioni tipiche del repertorio mitocondriale elbano e i relativi limiti di confidenza rendono quest'ultima finestra temporale lo scenario storico più probabile per la introduzione e la diffusione delle linee "orientali". Queste tracce genetiche si sarebbero conservate sino ai giorni nostri e si siano espanse in frequenza grazie al forte isolamento della popolazione in esame.

L'analisi network suggerisce invece una introduzione precedente delle stesse linee "orientali" nell'area tosco-laziale. I tempi stimati sono compatibili con diversi scenari da collocarsi in epoca preistorica (tardo Neolitico) o protostorica (età dei metalli). Dai nostri dati non si può escludere l'ipotesi che la linea U7 sia stata introdotta dagli Etruschi, come suggerito da studi precedenti (Achilli et al. 2007, Roostalu et al. 2007, Abu-Amero et al. 2008) .

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Professor Giorgio Paoli del Dipartimento di Etologia, Ecologia ed Evoluzione, per la disponibilità e la gentilezza dimostratemi durante lo svolgimento della presente tesi; il Dottor Sergio Tofanelli che mi ha dedicato il suo tempo e le sue conoscenze; la Dottoressa Stefania Bertoncini che mi ha seguito passo dopo passo nell'apprendimento delle tecniche di laboratorio e nello svolgimento testuale della tesi; Luca Taglioli per la risoluzione di problemi informatici, che questo lavoro ha richiesto.

Un grazie alla mia famiglia: babbo, mamma, mio fratello Riccardo e alla mia Patrizia.

Riferimenti bibliografici

- Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V., Moral P., Dugoujon J., Roostalu U., Loogvali E., Kivisild T., Bandelt H., Martin R., Villems R., Santachiara-Benerecetti S., Semino O., and Torroni A., (2007). Mitochondrial DNA Variation of Modern Tuscans Supports the Near Eastern Origin of Etruscans.
- Alvarez-Iglesias V, Jaime JC, Carracedo A, Salas A. Coding region mitochondrial DNA SNPs: Targeting East Asian and Native American haplogroups. *For. Sci. Int: Genet* 1: 44–55.
- 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., Staden, R., and Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
- Bandelt, H.J., Forster, P., and Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol* 16, 37–48.
- Behar, D.M., Metspalu, E., Kivisild, T., Achilli, A., Hadid, Y., Tzur, S., Pereira, L., Amorim, A., Quintana-Murci, L., Majamaa, K., Herrstadt, C., Howell, N., Balanovsky, O., Kutuev, I., Pshenichnov, A., Gurwitz, D., Bonne-Tamir, B., Torroni, A., Villems, R., and Skorecki K. (2006). The matrilineal ancestry of Ashkenazi Jewry: portrait of a recent founder event. *Am. J. Hum. Genet* 78, 487–497.
- Brown, W.M., George, M.Jr., and Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 1967-1971.

- Cann, R.L., Stoneking, M., and Wilson, A.C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325, 31–36.
- Cardarelli R. (1938). *Comunanza Etnica degli elbani e dei Corsi*. Arch. Stor di Corsica. P.484.
- Cavalli Sforza L.L. e Feldman (2003). The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet.* (2003) 33 Suppl:266-75. Review.
- Cockerham, C.C. (1973). Analysis of gene frequencies. *Genetics* 74, 679-700.
- Excoffier, L. (2005). Arlequin: software for population genetics data analysis. cmpg.unibe.ch/software/arlequin3
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Grifoni Cremonesi R. con contributi di Mallegni F. e Sorrentino C., (2001). *La grotta sepolcrale di San Giuseppe all'Isola d'Elba* (in memoria di Giuliano Cremonesi). Istituto italiano di preistoria e protostoria Firenze.
- Guttman, L.A. (1968). A general non metric technique for finding the smallest coordinate space for a configuration of points. *Psychometrika* 33, 469-506.
- Higuchi R., Von Beroldingen CH, Sesanbaugh GF, Erlich HA. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543-546.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Paabo, S., and Gyllensten, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408, 708–713.

- Jobling, M.A., Hurles, M.E., and Tyler-Smith, C. (2004). *Human evolutionary genetics: origins, peoples and disease*. Garland Science, New York.
- Johnson, M.J., Fallace, D.C., Ferris, S.D., Rattizzi, M.C., and Cavalli-Sforza, L.L. (1983). Radiation of human mitochondria DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J. Mol. Evol* 19, 255-271.
- Khaled K., Abu-Amero, José M Larruga, Vicente M Cabrera, Ana M González . (2008). Mitochondrial DNA structure in the Arabian Peninsula.
- Kivisild, T., Shen, P., Wall, D.P., Do, B., Sung, R., Davis, K., Passarino, G., Underhill, P.A., Scharfe, C., Torroni, A., Scozzari, R., Modiano, D., Coppa, A., de Knijff, P., Feldman, M., Cavalli-Sforza L.L., and Oefner, P.J. (2006). The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics* 172, 373–387.
- Kruskal, J.B. (1964). Non metric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 29, 115-129.
- Macaulay, V., Hill, C., Achilli, A., Rengo, C., Clarke, D., Meehan, W., Blackburn, J., Semino, O., Scozzari, R., Cruciani, F., Taha, A., Shaari, N.K., Raja, J.M., Ismail, P., Zainuddin, Z., Goodwin, W., Bulbeck, D., Bandelt, H.J., Oppenheimer, S., Torroni, A., and Richards, M. (2005). Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science* 308, 1034–1036.
- Mellini V. (1890) *I Francesi all'Elba*. Livorno p.6.
- Mellini V. (1890). *Memorie storiche dell'Isola d'Elba*. Leo S.Olschki, Firenze Editore.
- Metspalu Mait, Kivisild Toomas, Metspalu Ene, Parik Jüri, Hudjashov Georgi, Kaldma Katrin, Serk Piia, Karmin Monika, M Behar Doron,

- Thomas M. Gilbert, Endicott Phillip, Mastana Sarabjit, Torroni Antonio and VILLEMS Richard, Papiha Surinders, Skorecki Karl, (2004). Most of the extant mtDNA boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A., and Wallace, D.C. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100, 171–176.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. (New York: Columbia University Press).
- Ninci G., (1815). *Storia dell'Isola d'Elba*. Tipografia Broglia Portoferraio.
- Pakendorf, B., and Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 6, 165-83. Review.
- Pertusati P.C., Raggi G., Ricci C.A., Duranti S., Calmieri R. (1993). *Evoluzione post-collisionale dell'Elba centro-orientale*. *Mem. Soc Geolo.It* 49:297-312 9ff. 1 tav.(Scritti in onore do L. Trevisan).
- Pintor F. (1898-99) *Dominio pisano nell'Isola d'Elba durante il sec.XIV*. *Studi storici di Crivellucci e PAis*, vol.VII Pisa p.387 e segg.
- Pyle, A., Foltynie, T., Tiangyou, W., Lambert, C., Keers, S.M., Allcock, L.M., Davison, J., Lewis, S.J., Perry, R.H., Barker, R., Burn, D.J., and Chinnery, P.F. (2005). Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann. Neurol* 57, 564-7.
- Quintana-Murci, L., Semino, O., Bandelt, H.J., Passarone, G., McElreavey, K., and Santachiara-Benerecetti, A.S. (1999). Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nat. Genet* 23, 437–441.

- Quintáns, B., Alvarez-Iglesias, V., Salas, A., Phillips, C., Lareu, M.V., and Carracedo, A. (2004). Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci. Int* 140, 251-7.
- Radmilli A. M. (1960). *La preistoria della Toscana e dell'Umbria*. "L'universo" XL, n.4 Firenze p.814-832.
- Reidla, M., Kivisild, T., Metspalu, E., Kaldma, K., Tambets, K., Tolk, H.V., Parik, J., Loogväli, E.L., Derenko, M., Malyarchuk, B., Bermisheva, M., Zhadanov, S., Pennarun, E., Gubina, M., Golubenko, M., Damba, L., Fedorova, S., Gusar, V., Grechanina, E., Mikerezi, I., Moisan, J.P., Chaventré, A., Khusnutdinova, E., Osipova, L., Stepanov, V., Voevoda, M., Achilli, A., Rengo, C., Rickards, O., De Stefano, G.F., Papiha, S., Beckman, L., Janicijevic, B., Rudan, P., Anagnou, N., Michalodimitrakis, E., Koziel, S., Usanga, E., Geberhiwot, T., Herrnstadt, C., Howell, N., Torroni, A., and Villems, R. (2003). Origin and diffusion of mtDNA haplogroup X. *Am. J. Hum. Genet* 73, 1178–1190.
- Richards, M., Macaulay, V. and Bandelt, H.J. (2003). Analyzing genetic data in a model-based framework: inferences about European prehistory. In "Examining the farming/language dispersal hypothesis" (P. Bellwood and C. Renfrew eds.), pp. 459–466. McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge.
- Roostalu U, Kutuev I, Loogväli EL, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, Khusnutdinova EK, Usanga E, Kivisild T, Villems R. 2007. Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol Biol Evol* 24:436-48.

- Roychoudhury, S., Roy, S., Basu, A., Banerjee, R., Vishwanathan, H., Usha Rani, M.V., Sil, S.K., Mitra, M., and Majumder, P.P. (2001). Genomic structures and population histories of linguistically distinct tribal groups of India. *Hum. Genet* 109, 339-350.
- Salas, A., Richards, M., De la Fé, T., Lareu, M.V., Sobrino, B., Sánchez-Diz, P., Macaulay, V., and Carracedo, A. (2002). The making of the African mtDNA landscape. *Am. J. Hum. Genet* 71, 1082–1111.
- Stringer, C.B., and Andrews, P. (1988). Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science* 239, 1263-68.
- Tambets, K., Kivisild, T., Metspalu, E., Parik, J., Kaldma, K., Laos, S., Tolk, H.V., Golge, M., Demirtas, H., Geberhiwot, T., Papiha, S.S., De Stefano, G.F., and Villems, R. (2000). The topology of the maternal lineages of the Anatolian and Trans-Caucasus populations and the peopling of the Europe: some preliminary considerations. In Renfrew & Boyle (eds.), 219-35.
- Torrioni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M.L., and Fallace, D.C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144, 1835–1850.
- Tozzi C., Weiss M.C., (1997/2000). *Il primo popolamento olocenico dell'area corso-toscana*. II Toscana Corsica (1997/1999). Asse 4.2-Cultura Uomo Società. Edizioni ETS.
- Turchi Chiara , Loredana Buscemi , Carlo Previderè , Pierangela Grignani, Anita Brandstätter, Alessandro Achilli, Walther Parson , Adriano Tagliabracci & Ge.F.I. Group, (2008)., Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing.
- Wilson AC, Cann RL. The recent African genesis of humans. *Sci Am.* 1992 266(4):68-73.

Pagine web consultate

Arlequin 3.1. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>

Fluxus Technology. <http://www.fluxus-engineering.com> (for Network 4.0.1.2)

The Genographic Project www.nationalgeographic.com/genographic/

Wikipedia, l'Enciclopedia libera. www.wikipedia.com

Software DNA Alignment, (www.flexus-engineering.com)