



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
DIRETTORE: PROF. ANGELO CAU

DOTTORATO DI RICERCA

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente
Indirizzo Biologia dell'Uomo
Ciclo XXVI

TITOLO TESI

*Analisi di un isolato sardo tramite il cromosoma Y:
il caso Desulo*

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

Macrosettore: 05/B

SSD: BIO/08

Presentata da:	Dott.ssa Valeria Bachis
Coordinatore Dottorato	Prof. Emanuele Sanna
Tutor/Relatore	Dott.ssa Carla Maria Calò

Esame finale anno accademico 2012 – 2013



INDICE

Abstract.....	4
Introduzione.....	6
Isolati Genetici.....	6
Indici Biodemografici.....	7
Tasso di endogamia ed esogamia.....	8
Distanza matrimoniale.....	9
Consanguineità.....	10
La Sardegna.....	12
Desulo.....	13
La transumanza.....	16
Cromosoma Y.....	17
Gli alleli STRs del cromosoma Y.....	18
Gli Aplogruppi e Aplotipi del Cromosoma Y.....	21
Scopo del lavoro.....	28
Materiale e Metodi.....	29
Il campionamento.....	29
Estrazione del DNA.....	29
Quantificazione del DNA.....	31
Amplificazione mediante PCR.....	32
Digestione enzimatica.....	33
Elettroforesi su Gel di Agarosio e di Poliacrilamide.....	34
Amplificazione degli STRs del cromosoma Y.....	37
Elettroforesi capillare.....	38
Determinazione degli aplogruppi dubbi.....	40
Approfondimento della linea I2a.....	43
Digestione enzimatica.....	46
Sequenziamento M26.....	47
Elaborazione Statistica.....	47
Analisi degli aplotipi.....	48
Genepop.....	49
Elaborazioni grafiche.....	50
Albero filogenetico.....	50
MDS.....	51
PCA e sPCA.....	51
Surfer (v.9.11.947).....	52

Network (4.6.1.1).....	53
Risultati.....	54
Frequenze alleliche.....	54
Microdifferenziazione interna del Comune di Desulo.....	57
Network di desulo.....	58
PCA popolazioni Sarde.....	59
Confronto tra le popolazioni del Mediterraneo.....	60
MDS.....	60
PCA e sPCA.....	61
Analisi degli Aplogruppi.....	63
Aplogruppi rilevati a Desulo e nel Centro Sardegna.....	63
Surfer.....	65
Approfondimento della linea I2a.....	74
Discussione.....	79
Bibliografia.....	85
Ringraziamenti.....	90

ABSTRACT

The Sardinian population is often analyzed in human genetic investigation because it shows a genetic peculiarity when compared with other European populations (Calò et al. 2013, 2012; Calò e Vona 2005; Capocasa et al. 2014; Cappello et al. 1996; Francalacci et al. 2003, 2013; Robledo et al. 2009; Vona 1995).

Moreover, it was observed a high internal heterogeneity probably due to founders effects, isolation and bottleneck that occurred several times during Sardinia history.

In this work I have analyzed the population of Desulo: a small village, located in the archaic zone of Sardinia (Vona 1995), that showed high level of endogamy (91.36%) and consanguinity (26.27%) between 1800 and 1974 (Sanna et al., 2004). The village of Desulo was composed until the 1920 by three separated neighborhoods: Issiria, Asuai and Ovolaccio, that subsisted as three independent units.

Moreover, Desulo's shepherds practiced transhumance towards the Sulcis Sardinian area.

Hence, I wanted to test the level of population differentiation from different point of view: performing a comparison with other Sardinian populations, researching the presence of Desulo internal micro differentiation due to his subdivision in neighborhoods, and comparing it with other Mediterranean population.

To perform this study 17 Y-STRs were analyzed: DYS19, DYS385 a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, and YGATAH4. It was noteworthy the detection of the non consensus allele 18.2 in the locus DYS458. This frequencies is extremely low in the Caucasian and Italian populations (0.00317 and 0.014 respectively) but in Sardinian population it reaches the 0.1 % , furthermore all individuals carrying this allele belong to the haplogroup J1, confirming that the non consensus allele 18.2 can be used to discriminate the J1 haplogroup as suggested in previous studies (Alves et al. 2007b; Ghiani et al. 2009). Sardinia population, when compared with Mediterranean through Principal Component Analysis (PCA), resulted located in a separated cluster, also far from the Italian populations.

However, this work shows an elevated internal heterogeneity of Sardinians: in fact performing a PCA with only Sardinian population, the formation of two clusters can be seen: one including North Sardinia and Benetutti, and the other one Sulcis and Central Sardinia. Instead, Carloforte and Desulo appear

isolated. The latter is located very distant from Sulcis population, suggesting that despite the practice of transhumance, the two populations do not genetically interbreed. The most frequent observed haplogroup is I2a1a determined by the M26 mutation, which reached the frequencies of 48% in the population of Desulo while in European population is extremely rare (<5%) (Ghiani et al. 2009). This high frequency can be due to founder effect occurred during the Paleolithic colonization of the Sardinia island (Contu et al. 2008; Francalacci et al. 2013; Varesi et al. 2000). For this reason it was chosen to study in depth the I2a1a subclades. All individuals carrying the mutation M26 always have the L160 mutation (haplogroup I2a1a1). The frequency of analyzed mutations (PF4124, 18866539, PF4258, PF4461, 21841733 e M161), determining the different subclades, varies significantly in the Sardinian population. This suggests that the subclades variability of I2a1a haplogroup can be also due to genetic drift phenomena as founder effect and bottleneck and have remained in these areas through isolation. The isolation effect is also found at the micro geographic level in the village of Desulo. In fact, through the comparison with haplotypic data, the Issiria and Asuai districts appear differentiated, while Ovolaccio, the central district, seems to homogenate with the neighboring districts.

In conclusion, when Sardinia is compared with Mediterranean populations it appears homogeneous, but if we are going to observe in detail only Sardinian population notice a large internal heterogeneity, detectable even at micro geographic level as in the case of the village of Desulo.

For this reason it would be important to create, both for forensic and population genetics purposes, a database in which are recorded the different haplotypes detected in the Sardinian population.

Moreover, with this study it was possible to clarify some doubt on the genetic Sardinian heterogeneity, but unfortunately exclusively inherent in the male line; therefore, it would be desirable to continue this study analyzing the mitochondrial DNA to see if the results obtained on the male line are also overlapping on the female line.

INTRODUZIONE

ISOLATI GENETICI

È possibile definire isolato genetico una popolazione che, a causa dei limitati scambi con i paesi limitrofi si differenzia, talvolta anche notevolmente, da questi. La limitazione di questi scambi può derivare da numerosi fattori quali isolamento geografico, linguistico e/o culturale, che influenzano in maniera considerevole la possibilità di incontro tra le popolazioni e quindi la possibilità che tra queste si crei un flusso genico. Le differenze tra le popolazioni possono essere presenti già dalla fondazione della popolazione stessa a causa dell'effetto fondatore: infatti, quando un piccolo gruppo di persone si stacca dalla popolazione madre per andare a costituirne una nuova, non sempre porta con sé tutto il pool genico originario. Talvolta invece la differenziazione genica è dovuta ad eventi catastrofici e straordinari che portano ad una rapida diminuzione della popolazione (effetto collo di bottiglia) con una probabile perdita di alleli, (e quindi di variabilità genica all'interno della popolazione), mentre farà sì che, così come anche nel caso dell'effetto fondatore, venga amplificata la variabilità interpopolazioneistica. La continua comparsa di mutazioni casuali porta, inoltre, alla nascita di nuovi alleli che possono raggiungere anche frequenze molto elevate in popolazioni isolate. Gli isolati genetici sono spesso studiati poiché attraverso di essi è possibile analizzare malattie che nella popolazione generale sono considerate rare, ma che in queste popolazioni assumono frequenze rilevanti. Inoltre, studiare queste malattie in una popolazione molto ampia implica il tener conto di innumerevoli concause, invece studiarle in popolazioni di piccole dimensioni, con caratteristiche note e che condividono lo stesso ambiente rende il lavoro più rapido e agevole. Uno tra i primi isolati genetici analizzati sono gli Amish, una popolazione di anabattisti svizzeri che nel '700 emigrarono nella contea di Lancaster, Pennsylvania. Solo 8 cognomi rappresentano circa l'80% della comunità. Oggi questo gruppo è tra i più studiati per analizzare le cause di malattie multifattoriali come il diabete e l'osteoporosi. Numerose altre comunità isolate, tra le quali gli Utteriti del Nord America, gli

Indiani Rima in Arizona, gli Eschimesi, sono studiate con lo stesso scopo di riconoscere le cause che portano al manifestarsi di malattie genetiche complesse come alcune forme di asma, obesità, ipertensione e malattie cardiovascolari.

INDICI BIODEMOGRAFICI

Secondo la legge di Hardy-Weimberg si assume che in una popolazione estremamente grande, in cui non intervenga la selezione naturale, ci sia assenza di mutazione e movimenti migratori, e gli accoppiamenti avvengano in maniera casuale, e le frequenze alleliche non varieranno di generazione in generazione. Se in una popolazione una o più di queste condizioni non sono rispettate tale popolazione sarà soggetta ad evoluzione e quindi alla differenziazione genica rispetto alle altre popolazioni.

I principali fattori evolutivi che determinano la comparsa della variabilità all'interno delle popolazioni umane sono: la deriva genetica (effetto fondatore e effetto collo di bottiglia) che si osserva in maniera marcata nelle piccole popolazioni, e il limitato flusso genico che danno origine, entrambi, ad una fluttuazione casuale delle frequenze geniche, l'insorgenza di nuove mutazioni che porterà all'instaurarsi di nuovi alleli su cui poi agirà la selezione naturale, l'endogamia e la consanguineità, osservabile quando gli accoppiamenti non avvengono in maniera casuale ma all'interno di una ristretta cerchia matrimoniale con conseguente variazione delle frequenze genotipiche.

Infatti, nelle popolazioni umane la scelta del coniuge non è casuale, ma è influenzata da fattori sociali, religiosi, psicologici, socio-economici, etnici e geografici. Perciò, il differente peso con cui questi fattori agiscono all'interno della popolazione determina il livello di endogamia.

L'analisi della struttura matrimoniale è quindi fondamentale per comprendere la struttura biologica di una comunità e si basa sull'utilizzo di vari indici biodemografici:

- Tasso di endogamia ed esogamia
- Distanza matrimoniale
- Consanguineità

TASSO DI ENDOGAMIA ED ESOGAMIA

Vengono definiti endogamici tutti quei matrimoni che avvengono tra individui appartenenti ad un determinato gruppo (Comune, etnia, valle, casta, ecc.); mentre sono, invece, considerati esogamici quei matrimoni nei quali almeno uno dei coniugi non appartenga al gruppo in questione.

I tassi di endogamia (numero matrimoni endogamici/numero totale matrimoni) ed esogamia (numero matrimoni esogamici/numero totale matrimoni) sono le misure più semplici per rilevare la struttura biologica di una popolazione, e tuttavia vengono considerate tra le più informative (Relethford e Mielke 1994).

Infatti, l'analisi temporale dei tassi di endogamia consente di valutare il grado di isolamento di una popolazione; mentre, per quanto riguarda i tassi di esogamia, otteniamo informazioni sulla dispersione del patrimonio genetico nel territorio, data la relazione esistente tra movimento di coniugi e movimento di geni, in quanto i geni si "muovono" con gli spostamenti dei coniugi (Gueresi et al. 1993)

I tassi di endogamia ed esogamia non danno solo informazioni sul grado di isolamento riproduttivo, ma determinano anche il livello di affinità genetica all'interno e tra gruppi, dato che più elevata è l'endogamia maggiore è l'omogeneità interna del gruppo e minore è l'affinità con i gruppi circostanti (Pettener 1995)

Dagli inizi del Novecento si è potuta osservare una progressiva diminuzione dell'endogamia e un conseguente aumento dell'esogamia, dovuta principalmente all'aumento della mobilità individuale in seguito ai cambiamenti socio-culturali legati all'industrializzazione. Questo fenomeno è noto come "rottura degli isolati".

Fino agli inizi di questo secolo frequenze di matrimoni endogamici di circa 90% erano presenti in ambienti di tipo montano in Italia e in Europa (Pettener 1995).

Nei matrimoni esogamici possono essere individuate 3 componenti del movimento: la distanza, l'orientamento e la direzione.

DISTANZA MATRIMONIALE

La distanza matrimoniale viene misurata, generalmente, calcolando la distanza in linea d'aria tra i luoghi di nascita dei coniugi. Talvolta può essere anche calcolata lungo le principali direttrici di viabilità. Questo secondo approccio presenta, però, l'inconveniente che le vie impiegate per gli spostamenti possono variare nel tempo e che, in particolare per le comunità montane del passato, potevano essere utilizzati anche i sentieri di montagna.

I movimenti matrimoniali seguono direzioni e versi privilegiati in relazione ai fattori di tipo geografico, culturale, sociale ed economico e per poterne apprezzare le motivazioni risulta oltremodo utile la conoscenza delle vicende storiche ed economiche dei comuni esaminati.

Accade frequentemente che due comunità, pur geograficamente vicine, abbiano registrato in passato tassi di scambio matrimoniale molto bassi, a causa di conflitti di natura economica che le dividevano (ad esempio la contesa dei territori), altre, per contro, sebbene distanti venivano maggiormente a contatto, ad esempio a causa dello sfruttamento di una stessa risorsa. L'analisi dei movimenti maritali può essere effettuato utilizzando la distanza matrimoniale media o la distribuzione delle distanze in varie classi di ampiezza chilometrica.

La distanza matrimoniale media è considerata come una misura indicativa dell'area di scambio matrimoniale e quindi del grado di mobilità della popolazione; un'informazione simile viene fornita dall'incidenza delle distanze matrimoniali nelle varie classi di ampiezza chilometrica.

Lo studio dei movimenti matrimoniali può essere completato dall'analisi della distribuzione dei luoghi di provenienza dei coniugi, che permette di individuare asimmetrie nei movimenti

matrimoniali, con direzioni e versi di spostamenti privilegiati, dipendenti da fattori di ordine geografico, sociale ed economico.

CONSANGUINEITÀ

Nelle popolazioni, in presenza di una condizione di relativo isolamento e di endogamia si osservano in genere elevate frequenze di matrimoni consanguinei.

Sono detti consanguinei due individui che hanno almeno un progenitore relativamente prossimo in comune. L'effetto dell'inincrocio è un continuo decremento della frazione degli eterozigoti ed il corrispondente incremento di quella degli omozigoti, rispetto alle proporzioni attese secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg, e questo conduce a un'aumentata probabilità che vengano espressi alleli recessivi patologici o letali.

La consanguineità di un individuo può essere misurata mediante il coefficiente di consanguineità o di inincrocio (F) che rappresenta la probabilità che due alleli ad un locus preso a caso in un individuo, siano identici per discendenza, cioè copie di uno stesso allele presente in un antenato comune.

In una popolazione, invece, la consanguineità può essere stimata dall'incidenza percentuale di matrimoni consanguinei rispetto al numero totale di matrimoni verificatisi in un dato arco di tempo.

E' inoltre di particolare interesse la stima del livello medio di consanguineità nelle popolazioni partendo dalle dispense ecclesiastiche e calcolata secondo quanto proposto da Bernstein (1930) dalla formula:

$$\alpha = \sum p_i F_i$$

dove p_i è la frequenza relativa degli individui a consanguineità F_i .

La stima di α indica la probabilità che due alleli omologhi di un individuo scelto a caso nella popolazione siano identici.

Il livello medio di consanguineità di una popolazione dipende da diversi fattori come, ad esempio, la sua dimensione, il rapporto dei sessi, le frequenze dei vari tipi di matrimoni consanguinei, oltre al contesto geografico, socioeconomico, culturale e religioso.

È considerato un buon indicatore dell'isolamento riproduttivo; infatti, è risultato correlato in modo statisticamente significativo con il livello di endogamia e con l'altitudine (Floris e Sanna 2000).

Anche il tasso di incremento della popolazione e la migrazione differenziale per sesso possono condizionare la frequenza dei vari tipi di matrimonio e la consanguineità media di una popolazione (Leslie, 1985).

Il livello medio di consanguineità ha mostrato una tendenza storica peculiare: in genere nel '600 e nel '700 presentava valori costanti e generalmente bassi, nella seconda metà dell'800 si rileva un improvviso e rapido aumento della consanguineità, raggiungendo livelli massimi agli inizi del '900, a cui segue un repentino decremento a partire da un periodo generalmente compreso tra le due guerre mondiali (Moroni et al. 1992; Pettener 1995).

Da notare che la frequenza totale di matrimoni consanguinei sarebbe rimasta costante nel tempo fino agli inizi di questo secolo; l'aumentare e il successivo diminuire dei valori di α sarebbe conseguente alla variazione di frequenza di matrimoni tra consanguinei di grado più stretto, in particolare tra cugini primi (Pettener 1995)

Generalmente i coefficienti di consanguineità delle popolazioni umane presentano valori inferiori a 10^{-3} . In Sardegna il livello medio di consanguineità (α), dal 1765 al 1965, è risultato essere pari a $1,54 \times 10^{-3}$ (Moroni et al. 1992)

Limiti delle dispense di consanguineità sono conseguenti al fatto che possono essere presenti delle lacune nelle registrazioni; inoltre, le formule utilizzate possono variare da parroco a parroco sia in relazione alla scuola di formazione, sia in conseguenza di variazioni assunte nel tempo dal modo di codificare.

Dal 1917 non viene più richiesta la dispensa matrimoniale per la consanguineità di grado superiore a $F=1/64$, corrispondente ai secondi cugini, e dal 1983 l'obbligo di dispensa è stato ristretto ai soli matrimoni con $F=1/8$ e $F=1/16$, cioè rispettivamente ai matrimoni fra zio/a-nipote e cugini primi (Moroni et al., 1992). (<http://www.comune.villasor.ca.it>)

LA SARDEGNA

La popolazione sarda è stata spesso analizzata dal punto di vista genetico e si è potuto osservare che essa mostra una peculiarità biologica se osservata nel contesto delle popolazioni europee e mediterranee, ed una elevata eterogeneità interna dovuta probabilmente all'isolamento, agli scarsi flussi genici interni e agli effetti fondatore e collo di bottiglia, che con molta probabilità si verificarono numerose volte durante la storia della Sardegna a causa soprattutto di epidemie e carestie che falciarono la popolazione. Dall'analisi di alcuni reperti ossei ritrovati all'interno della Grotta Crobeddu e datati mediante il Carbonio 14 (Sondaar et al. 1995) si è potuto dedurre che l'isola fosse popolata già durante il periodo Paleolitico (15.590 ± 140 AC). Durante il successivo periodo Neolitico questi primi abitanti vennero in contatto con le altre popolazioni del Mediterraneo specialmente attraverso il commercio di ossidiana ricavata dai ricchi depositi presenti sull'isola (Lilliu 1988) ma si pensa che il contributo Neolitico al genoma dei sardi sia limitato (Passarino et al. 2001; Semino et al. 2000).

Dall'analisi della dinamica generale della popolazione sarda nel tempo si rileva che secondo le stime riportate da (Beloch 1880) e (Pais 1923) durante il periodo della dominazione romana, la consistenza numerica della popolazione sarda raggiunse livelli notevoli (150.000-200.000 individui) se paragonata con quella di altri periodi. Dalla prima metà del 1300 al 1796 tale consistenza subì dei drastici decrementi principalmente dovuti al grave stato di carenza alimentare in cui versava la popolazione:

- dal 1300 al 1400 (fenomeno principalmente attribuito agli effetti della spaventosa epidemia di peste del 1347-48);

- dal 1603 al 1655 (carestia e peste del 1652-56);
- dal 1678 e 1688 (carestia che ha causato 80000 morti);
- dal 1790 al 1796 (carestia del 1795);

Dal XVIII secolo, come in tutta l'Europa, (Bellettini 1987) è stato registrato uno sviluppo demografico continuo che porterà la popolazione Sarda a raggiungere nel 1838 i 500.000 individui. Oggigiorno la Sardegna è popolata da 1.599.511 residenti con una densità di soli 66.4 ab/kmq.

Questa densità, tra le più basse in Italia, unita ai frequenti decrementi demografici che possono aver determinato dei “colli di bottiglia”, hanno in particolar modo favorito l'isolamento geografico di alcuni paesi e perciò l'evoluzione e il mantenimento di alcune caratteristiche peculiari riscontrabili a livello genetico nella popolazione sarda che appare al suo interno alquanto eterogenea. Tale eterogeneità, inoltre, può essere stata in parte determinata dall'infezione malarica, che sino alla prima metà del 1900, imperversava con diversa intensità in diverse aree della Sardegna, inducendo quindi una pressione selettiva per alcuni geni quali della β -talassemia (Falchi and Piras 2006) e alcuni alleli STRs dei geni NOS (Bachis et al. 2014).

DESULO

La più antica attestazione del nome Desulo compare nel Condaghe di Bonarcado (CSMB 100C) nel quale figura un Eizu de Esule (Ezio di Desulo).

Nel XIV secolo, nei registri dei villaggi della diocesi di Arborea viene citato il nome Asnay, che sicuramente sta per Asuai, uno dei quartieri tutt'oggi esistenti di Desulo.

Successivamente il nome di Desulo compare anche nell'atto di pace del 1388 fra Eleonora D'arborea e il Re Giovanni d'Aragona, e nella *Corographia Sardiniae* si cita Desulis della curatoria del Mandrilisai.

Il villaggio di Desulo originariamente era composto da tre rioni: Issiria, Asuai e Ovolaccio (Fig.1).

Questi coesistevano come unità indipendenti, e ciò è dimostrato dal fatto che fossero presenti tre chiese e tre cimiteri, e le feste principali fossero proprio quelle di Sant'Antonio, San Basilio e San Sebastiano a cui erano intitolate le tre chiese.

Nel XIV secolo, Desulo, assistette a un enorme periodo di crisi, dovuto probabilmente all'estrema indigenza, la povertà delle terre e alla scoppio nel 1348 della peste nera ritenuta responsabile dello spopolamento di intere regioni. Quando un villaggio veniva colpito duramente dalla peste e al suo interno sopravvivevano pochi nuclei familiari, spesso questi confluivano negli altri villaggi limitrofi. È pensabile perciò che la popolazione dei villaggi montani di Bidustà, Notedia, Lapaè e Astè sia confluita nella vallata centrale dando corso al processo urbano e sociale di Desulo.

In questo periodo Desulo faceva parte dei feudi Regi, e solo successivamente entrerà a far parte del feudo del Mandrolisai.

Dopo un dominio di circa 400 anni in Sardegna da parte degli Aragonesi e degli Spagnoli, nel 1720 Desulo entra a far parte di quello che sarebbe diventato, nel 1848, il regno Sardo Piemontese sotto i Savoia.

Sotto questo regno, grazie a Carlo Alberto di Savoia, si ebbe l'introduzione del sistema metrico decimale dei pesi e delle misure e per la prima volta venne istituito il servizio di leva

obbligatoria. Purtroppo, a Desulo, come in tutta l'isola, persisteva ancora una grave condizione di povertà e analfabetismo.

Dopo i primi anni '20 il paese assistette alla fusione dei tre rioni in un unico complesso urbanistico.

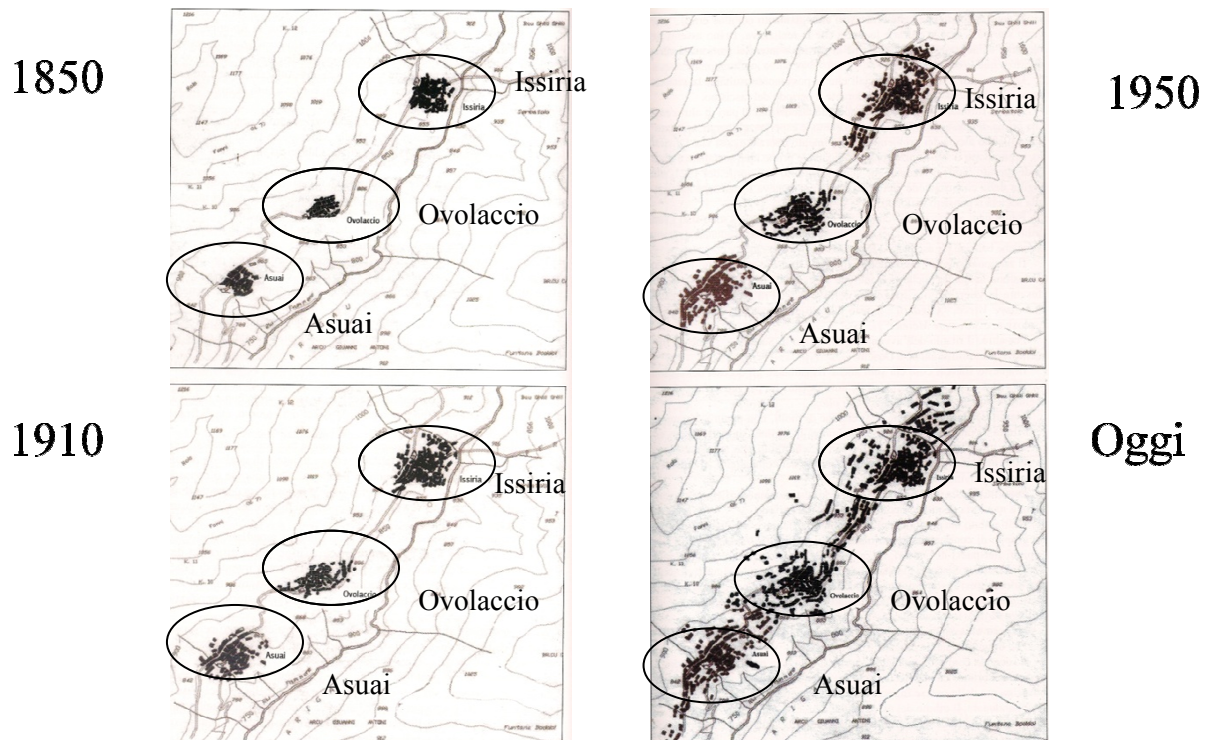


Fig.1 Urbanizzazione Desulo dal 1850 ad oggi.

Le due Grandi Guerre segnarono Desulo come il resto dell'Europa, e in particolar modo la seconda guerra mondiale comportò una massiccia partecipazione dei desulesi, e si concluse con la perdita di oltre 71 uomini.

Nel 1941 il paese ospitò per alcuni anni un gruppo di militanti nazionalisti croati, gli Ustascia.

Dalla seconda metà del '900 si osserva a una consistente emigrazione, soprattutto dei pastori, che trasferirono la loro residenza anagrafica in molti comuni del Cixerri e dell'Iglesiente in due momenti distinti: negli anni successivi al 1957 e dopo il 1967.

LA TRANSUMANZA

La transumanza era una pratica molto diffusa specialmente in tutta l'area del Mediterraneo.

Essa è dovuta principalmente a un rapporto deficitario tra l'estensione dei terreni pascolativi e il carico di bestiame che questi terreni devono sopportare.

Questo porta i pastori a una costante ricerca di terreni da pascolo.

Nell'area mediterranea la transumanza presenta almeno tre varietà di forme: transumanza diretta, che consiste nel trasferimento del bestiame in montagna durante il periodo estivo, da parte dei pastori della pianura, transumanza inversa, che consiste nello far svernare in pianura le greggi della montagna (praticata dai pastori barbaricini), e infine la transumanza mista, praticata dai pastori che risiedono a metà strada tra pianura e montagna. In Barbagia la transumanza, di solito, aveva inizio tra i mesi di ottobre e novembre e si concludeva a maggio con il rientro dei pastori in montagna.

Difficilmente i pastori barbaricini si integravano con le popolazioni della pianura, è questo è deducibile anche dal termine utilizzato da essi per indicare la transumanza: "*s'intrangiare*" (andare tra le genti straniere), che rende con efficacia il senso di estraneità del pastore all'ambiente fisico e sociale delle pianure.

Per questo motivo, benché non potesse evitarli del tutto, i rapporti con l'ambiente sociale, che il pastore percepiva come estraneo, erano ridotti al minimo.

Le transumanze più lunghe erano quelle compiute dai Fonnesi e dai Desulesi che avevano come mete tradizionali il Campidano di Cagliari e Oristano e la zona del Sulcis- Iglesiente.

Esse duravano diversi giorni e pertanto, per i pastori desulesi, prevedevano almeno 3 tappe intermedie :

La prima nei pressi di Laconi, la seconda a Gesturi e la terza a Villamar, da qua una volta giunti a Vallermosa , i pastori sceglievano se dirigersi a Sud verso Siliqua, Nuxis, Santadi o Teulada, oppure a Ovest verso Musei, Domusnovas, Villamassargia, Iglesias, Gonnese fino a Buggerru e Arbus.

CROMOSOMA Y

Il cromosoma Y è un cromosoma acrocentrico di circa 60 Mb, è infatti il più piccolo cromosoma umano ed è presente esclusivamente nel cariotipo maschile.

Concettualmente è suddiviso in due regioni: la prima coinvolta nella ricombinazione con il cromosoma X è denominata pseudoautosomica ed è costituita a sua volta da due zone PAR1 (localizzata all'estremità del braccio corto, 2.6 Mb) e PAR2 (localizzata all'estremità del braccio lungo, 0.3 Mb) e una seconda regione denominata male-specific (MSY) in cui non avviene alcun tipo di ricombinazione. (Skaletsky et al. 2003). All'interno del cromosoma Y sono stati identificati 52 geni differenti, 27 dei quali localizzati nelle zone PAR e i restanti nell' MSY. (Blaschke e Rappold 2006; Helena Mangs e Morris 2007).

Questi ultimi codificano principalmente per delle proteine che sono implicate nello sviluppo e nel mantenimento dei caratteri sessuali maschili e per questo motivo vengono generalmente espressi a livello dei testicoli. (Lahn and Page 1997). La porzione eucromatica dell' MSY è costituita da circa 23 Mb di cui 8 localizzati nel braccio corto del cromosoma (Yp) e 14.5 Mb sul braccio lungo (Yq), mentre la regione eterocromatica, costituita principalmente da sequenze ripetute, è localizzata in parte a livello centromerico (1 Mb) e in parte nella parte distale del braccio lungo (40 Mb). (Skaletsky et al. 2003) (Fig. 2).

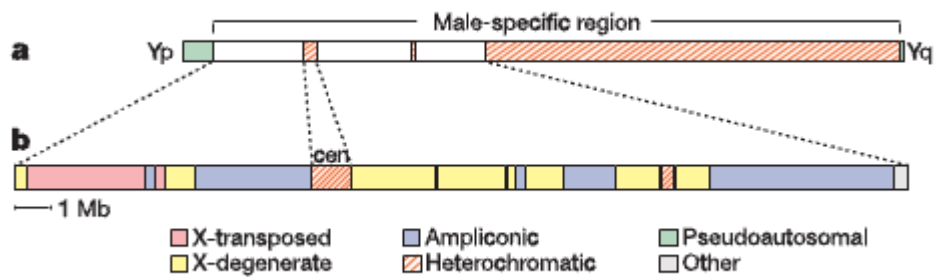


Fig.2 Regione MSY(Skaletsky et al. 2003)

Non avvenendo, in questa zona, la ricombinazione con il cromosoma X, essa viene trasmessa esclusivamente per via patrilineare, registrando perciò tutti gli eventi mutazionali che sono avvenuti durante l'evoluzione.

GLI ALLELI STRS DEL CROMOSOMA Y

Gli STRs e VNTRs (Short Tandem Repeats e Variable Number of Tandem Repeats) sono delle sequenze intersperse in tutto il genoma umano. Essi mostrano un elevato grado di variabilità interindividuale e per questo motivo sono stati spesso utilizzati negli studi di mappatura genetica, studi di linkage, e per l'identificazione personale. Vengono definiti VNTRs i polimorfismi di lunghezza le cui unità di ripetizione superano le 6 pb, mentre gli STRs sono composti da unità ripetute di 2-6 pb.

La variabilità degli alleli STRs e VNTRs è dovuta al numero di ripetizioni con le quale l'unità di base si ripete all'interno della sequenza in esame. In letteratura sono presenti centinaia di STRs analizzati all'interno di tutto il genoma umano. Si stima che il tasso di mutazione degli alleli STRs presenti sul cromosoma Y sia mediamente dello 0,21% per generazione (de Knijff et al. 1997), vengono per questo motivo considerati dei polimorfismi ad evoluzione veloce. Le mutazioni puntiformi (SNPs), per contro, vengono definite ad evoluzione lenta e si stima abbiamo un tasso di 3.0×10^{-8} mutazioni nucleotidiche per generazione (Xue et al. 2009).

Attraverso l'analisi di questi due tipi di marcatori è possibile determinare l'appartenenza di un individuo a un determinato aplogruppo.

Generalmente se il marcatore STRs è parte di un gene, il nome del gene stesso è usato per la designazione dell'STRs (TH01, localizzato all'interno del gene codificante per la tirosina idrossilasi), mentre se il marcatore si trova al di fuori di un gene, esso viene designato in base alla posizione cromosomica, es. D16S539, nel quale D significa DNA, 16 è il numero del cromosoma sul quale è localizzato l'STRs, mentre S seguito da un numero indica la regione cromosomica.

Nell'Ottobre 1993 la DNA Commission of the International Society of Forensic Haemogenetics (ISFH) stabilì che tutti gli alleli STRs debbano essere identificati in base al numero di ripetizioni da cui sono costituiti, se un allele non è costituito da un numero intero di ripetizioni questo dovrà essere identificato dal numero di ripetizioni complete seguito dal numero di paia di basi che determina la ripetizione parziale separati dal punto decimale (es. DYS643 allele 11.1)

Gli STRs del cromosoma Y maggiormente analizzati in particolar modo nelle analisi forensi e di genetica delle popolazioni sono illustrati in Tab.1:

Marker	Posizione (Mb)	Sequenza di basi ripetute	Range allelico
DYS393	3.19	AGAT	9-15
DYS456	4.33	AGAT	13-18
DYS458	7.93	GAAA	14-20
DYS19	10.13	TAGA	10-19
DYS391	12.61	TCTA	6-14
DYS635	12.89	TSTA	17-27
DYS437	12.98	TCTR	13-17
DYS439	13.03	AGAT	8-15

DYS389 I	13.12	TCTR	I: 9-17
DYS389 II			II:24-34
DYS438	13.38	TTTTTC	6-14
DYS390	15.78	TCTR	6-14
GATA-H4	17.25	TAGA	8-13
DYS385 a	19.26	GAAA	7-28
DYS385 b			
DYS392	21.04	TAT	6-20
DYS448	22.78	AGAGAT	17-24

Tab.1 17 STRs maggiormente analizzati sul cromosoma Y.

Essendo il cromosoma Y presente in singola copia all'interno del cariotipo maschile, l'analisi di questi STRs genererà, per ogni marcatore, un genotipo costituito da un singolo allele ad eccezione dei marcatori DYS385a/b e DYS389I i DYS389II. Nel primo caso il marcatore è presente in due regioni distinte del cromosoma, la cui amplificazione a partire da una singola coppia di primers produce due differenti amplificati (quindi due differenti alleli). L'allele di dimensione minore è chiamato "a", quello di dimensione maggiore "b", Mentre nel caso dei marcatori DYS389I i DYS389II i due alleli non identificano due regioni completamente distinte, bensì sono una parte dell'altro. In particolare, il primer forward è complementare a due distinte regioni localizzate vicine, mentre il primer reverse riconosce soltanto una regione. Da ciò consegue che sempre a partire da una singola coppia di primers verranno generati due alleli: uno, il maggiore, DYS389II comprende anche l'altro, il minore, DYS389I.

GLI APOLOGRUPPI E APLOTIPI DEL CROMOSOMA Y

Con il termine aplotipo si intende la combinazione di diversi stati allelici di un set di marcatori polimorfici che si trovano fisicamente associati sulla stessa molecola di DNA come per esempio un cromosoma o una regione cromosomica. L'aplogruppo rappresenta un insieme di aplotipi di cui si ipotizza un'origine comune, grazie alla condivisione di mutazioni caratteristiche (generalmente ad evoluzione lenta). Per quanto riguarda gli alleli localizzati nella MSY, essi sono sempre associati a formare l'aplotipo in quanto in questa zona, come descritto precedentemente, non avviene la ricombinazione genica. Per convenzione si indica perciò come aplotipo la somma della variabilità di tutti gli alleli STRs analizzati sul cromosoma Y. Mentre l'aplogruppo è determinato sulla base della condivisione di mutazioni specifiche per marcatori biallelici (SNPs) ad evoluzione lenta.

Viene considerato cromosoma Y ancestrale quello appartenuto ad un maschio teorico che rappresenta il più recente progenitore comune (MRCA Most Recent Common Ancestor) di tutti i maschi attuali lungo la linea patrilineare, e si ipotizza sia vissuto in Africa approssimativamente 70.000 anni fa. Partendo da questo presupposto è possibile datare la comparsa di tutte le successive mutazioni e di conseguenza degli aplogruppi che oggi caratterizzano la popolazione umana.

L'YCC (Y Chromosome Consortium) ha stabilito un sistema per definire gli aplogruppi del cromosoma Y basato sulle lettere da A a T, con ulteriori divisioni usando numeri e lettere in pedice.

L'aplogruppo più antico è l'aplogruppo A ed è localizzato prevalentemente nell'Africa sub-Sahariana, che si pensa possa essere stata la culla dell'uomo anatomicamente moderno. Da questo aplogruppo sono poi derivati tutti gli altri (Fig.3 e Fig.4), diffondendosi per il mondo attraverso le migrazioni avvenute durante tutto il corso della storia dell'uomo. L'analisi di questi

aplogruppi ci permette quindi di tracciare la provenienza dei diversi gruppi umani e di stabilirne la storia genetica.

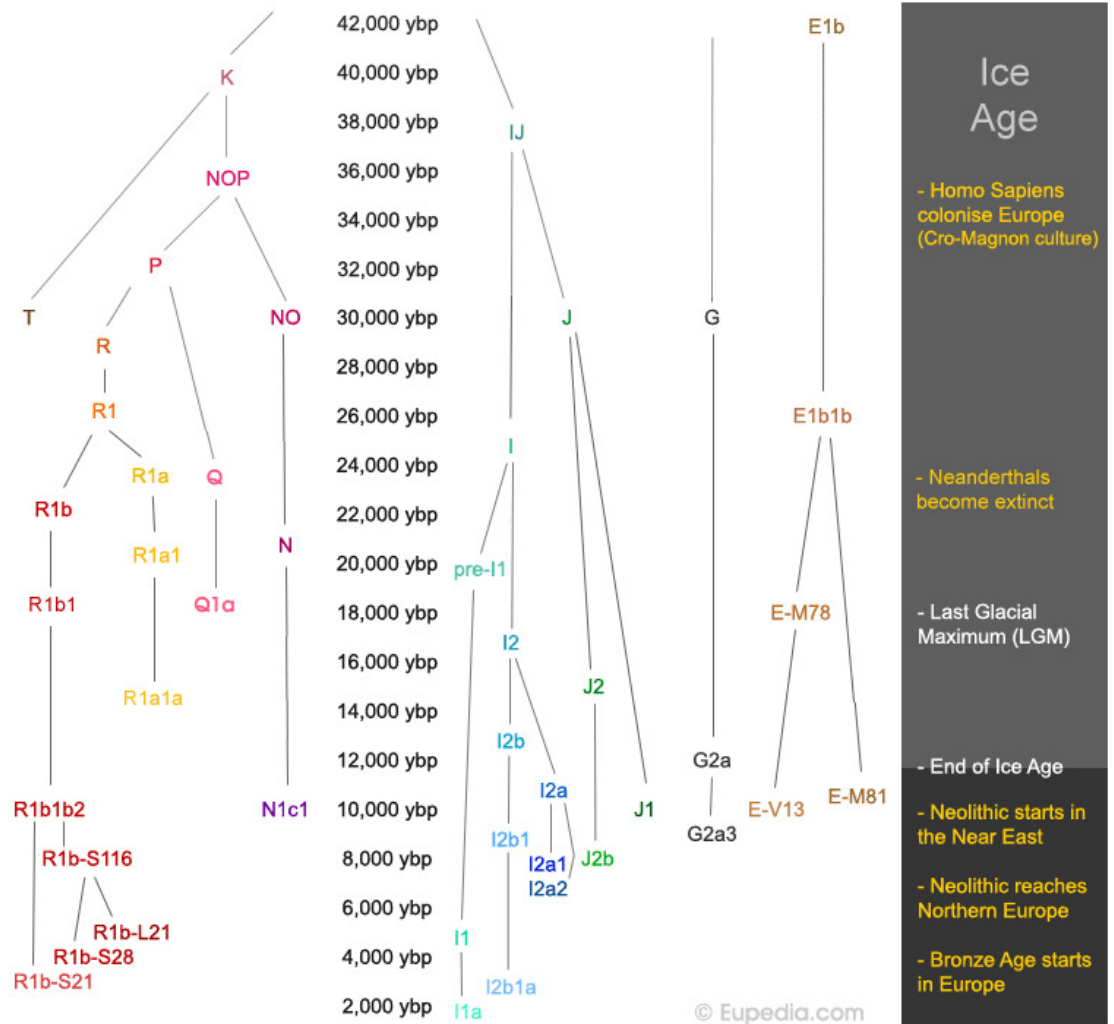


Fig.3 Principali aplogruppi Europei



Fig.4 Distribuzione dei principali aplogruppi Europei

Gli aplogruppi più frequenti in Europa sono:

Aplogruppo R1b

È l'aplogruppo più comune nell'Europa occidentale, raggiungendo in quest'area una frequenza dell'80 % in Irlanda, del 50 % in Germania e 43-45% in Danimarca e Norvegia (Wiik 2008). La sua frequenza invece decresce quando ci si sposta verso l'Est e il Sud Europa. L'aplogruppo R1b

sembra sovrapporsi ai territori in cui, durante il Paleolitico Superiore, predominava la cultura Aurignaziana (Pericić et al. 2005). In Italia l'hotspot è raggiunto nell'Italia settentrionale con una frequenza per l'aplogruppo R1b di circa il 62%, mentre in Sardegna si attesta a circa il 22% (Pericić et al. 2005). Sorprendentemente le forme più antiche sono state rilevate in Vicino Oriente e nel Caucaso, e probabilmente da qui si diffuse in tutta Europa durante il periodo Neolitico (Lacan et al. 2011).

Aplogruppo R1a

L'aplogruppo R1a è considerato l'aplogruppo dominante dell'Europa Orientale (Balanovsky et al. 2008). Nell'Eurasia esso mostra un chiaro cline Nord-Sud, raggiungendo la sua frequenza massima in Polonia (56.4%) e Ucraina (54%) (Pericić et al. 2005), e decrescendo in direzione dell'Europa Centrale e Settentrionale. Questa distribuzione è probabilmente associata ad antichi flussi migratori e potrebbe riflettere il ripopolamento dell'Europa dopo l'ultimo periodo glaciale da parte degli uomini che provenivano dai rifugi dell'Est. La diffusione di questo aplogruppo potrebbe essere stata inoltre amplificata dalle migrazioni Kurgan avvenute durante il V-IV secolo a.C. (Keyser et al. 2009). La frequenza di questo aplogruppo in Italia è del 3.4 %. (Di Giacomo et al. 2003).

Aplogruppo I

L'aplogruppo I identificato dalla mutazione M170 è una componente del pool genico Europeo che mostra una frequenza media del 18%. Probabilmente esso si è diffuso nel Nord Europa alla fine dell'ultimo periodo glaciale partendo dai rifugi della penisola Iberica, Sud della Francia e dell'Ucraina e dalle pianure della Russia centrale (Rootsi et al. 2004).

La più alta frequenza di questo aplogruppo è stata riscontrata, infatti, in Scandinavia e nel Sud Europa, nella zona circostante le Alpi Dinariche. Il subaplogruppo I1, inoltre, è particolarmente

frequente nel Nord Europa raggiungendo una frequenza dell'88-100% in Scandinavia, Norvegia, Svezia e tra i Sami.

Nei Balcani e nell'Est Europa, invece, è l'aplogruppo I2a1 ad essere maggiormente frequente (Croazia 31% e Bosnia 40%). Nell'Europa occidentale il suo subclade I2a1a (M26) assume una frequenza particolarmente elevata in Sardegna (41%), Castiglia (19%) Bèarn (8%) e tra i Baschi (6%), mentre è molto raro nel resto d'Europa (<5%) (Francalacci et al. 2003; Semino et al. 2000). La mutazione M26 ebbe origine probabilmente nei rifugi della penisola Iberica e potrebbe aver assunto una frequenza elevata in Sardegna a causa dell'effetto fondatore dovuto al popolamento dell'isola circa 9000 anni fa, ed essersi mantenuta grazie all'isolamento (Rootsi et al. 2004).

Aplogruppo G

Si pensa che l'aplogruppo G possa aver avuto origine nella regione del Caucaso durante il Paleolitico Superiore (Cinnioglu et al. 2004), e precisamente nell'Ossezia settentrionale, in cui esso è stato ritrovato con una frequenza pari al 74 %. Inoltre, circa 11% della popolazione dell'Anatolia e il 17% del Nord Sardegna, appartiene a questo aplogruppo. (Sims et al. 2009). L'aplogruppo G2a è il più frequente subclade nel campo dell'aplogruppo G in Turchia (9%), ed è presente con un frequenza di circa il 5 % in Italia e Grecia (Cinnioglu et al. 2004). A questo aplogruppo appartiene anche l'uomo di Similaun (mummia ritrovata nel 1991 sulle Alpi Venoste e risalente a un'epoca compresa tra il 3300 e il 3100 a.C.), i cui antenati comuni ai Sardi potrebbero essere arrivati nell'isola durante il Neolitico (Keller et al. 2012).

Aplogruppo J

L'aplogruppo J ebbe origine probabilmente nel Medio Oriente (Cinnioglu et al. 2004), e da qui si propagò verso l'Europa a seguito della diffusione della cultura agro-pastorale durante il periodo Neolitico. Era, inoltre, assai frequente tra i Fenici che lo diffusero nelle numerose colonie in cui essi si stabilirono lungo le coste del Mediterraneo (Kharkov et al. 2004).

L'aplogruppo J si biforca in due principali sub-clade: J1 e J2.

Recentemente è stata dimostrata una correlazione tra la frequenza degli aplogruppi J1-M267 e J2a-M410 e la media annuale delle precipitazioni nelle diverse aree del Medio Oriente.

Si è osservato, infatti, una frequenza maggiore dell'aplogruppo J1-M267 nelle zone prevalentemente aride mentre l'aplogruppo J2a-M410 è stato maggiormente rilevato nelle aree più piovose. Questo risultato è stato interpretato come dovuto ad un effetto fondatore associato a piccoli gruppi di pastori-cacciatori del neolitico che si stabilirono nell'arida penisola arabica adottando un'economia di tipo pastorale, mentre un'altra popolazione ancestrale caratterizzata prevalentemente dall'aplogruppo J2a-M410, si stabilì soprattutto nelle regioni della Mezzaluna fertile in cui grazie alle sufficienti precipitazioni, erano presenti i presupposti per sostenere l'economia agricola del Neolitico (Chiaroni et al. 2010). Attualmente l'aplogruppo J presenta la più alta frequenza nell'Est Europa (Siriani 49,5%, Palestinesi 39%, Israeliani 36%), e nella regione del Caucaso e in Anatolia (25-30%). In Italia si osserva una frequenza media di circa il 14%, che è principalmente presente nel meridione (Calabria 32%), mentre rappresenta circa il 10% degli aplogruppi sardi (Wiik 2008).

Aplogruppo E

L'aplogruppo E è caratterizzato dalla mutazione P29. Due delle 4 branche principali che lo caratterizzano, i sub-clade E1a e E2 sono presenti esclusivamente in Africa. La terza branca, il clade E1b1 è l'unico che sia stato osservato sia in Europa che in Asia. Le mutazioni M2/P1/M180 che definiscono il sub-clade E1b1a1a1 e le mutazioni M35/M215 che definiscono il sub-clade E1b1b suddividono il clade E1b1 in due gruppi monofiletici distinti. Entrambi sono molto frequenti nel continente Africano, ma solo il secondo è presente in Europa e Asia Occidentale. È stato recentemente proposto che il sub-clade E1b1b abbia avuto origine nell'Africa sub-Sahariana e si sia diffuso nel Nord Africa e nel Vicino Oriente durante il Pleistocene, successivamente da qui esso possa essere arrivato in Europa attraverso le migrazioni degli allevatori-agricoltori durante il periodo Neolitico (Cruciani et al. 2004). Attualmente la maggiore frequenza dell'aplogruppo E è possibile registrarla tra i Libanesi (25%), Albanesi e Greci (23%). In Italia mostra una frequenza media del 2.2 %, mentre in Sardegna è presente in circa il 10 % della popolazione (Wiik 2008). Il sub-aplogruppo più frequente in Europa è E1b1b1a1 identificato dalla mutazione M78, e in particolar modo nel Sud-Italia (16%) e nei Balcani (17-27%). La sua distribuzione mostra, inoltre, un cline discendente verso l'Europa occidentale (4-10% in Polonia, Russia, Croazia, Ungheria, Ucraina, Erzegovina e Bosnia, e 10% nell'Italia Centrale e Settentrionale) (Perić et al. 2005).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è quello di testare la differenziazione della popolazione Desulese a diversi livelli: a livello micro geografico analizzando la presenza di differenziazione interna del Comune di Desulo, possibilmente dovuta alla sua originaria suddivisione in rioni; a livello regionale effettuando il confronto tra la popolazione Desulese e altre 5 popolazioni Sarde tra le quali il Sulcis verificando in particolar modo se la transumanza possa aver influito sulla struttura genetica della popolazione Desulese; e inoltre, eseguendo un confronto tra la Sardegna e altre popolazioni che si affacciano sul bacino del Mediterraneo, verificare a livello interregionale e intercontinentale, se la peculiarità genetica osservata in precedenti studi venisse confermata anche da questo lavoro.

MATERIALE E METODI

IL CAMPIONAMENTO

Per effettuare il nostro studio è stata scelta la popolazione residente nel comune di Desulo in quanto in passato essa è stata caratterizzata da elevati livelli di consanguineità ed endogamia, eleggendola a possibile candidata quale comunità isolata. Il DNA è stato prelevato tramite tampone buccale da 50 individui maschi, apparentemente sani, non imparentati tra loro e residenti a Desulo da almeno tre generazioni. Inoltre a tutti partecipanti è stato fatto firmare un consenso informato per assicurare il corretto trattamento dei dati. È stato inoltre selezionato un campione di confronto, costituito da 44 individui maschi, non imparentati tra loro da almeno tre generazioni e provenienti dalla limitrofa area del Nuorese.

ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata mediante il metodo delle colonnine di silice con l'utilizzo del kit QIAamp® DNA mini kit fornito dalla QIAGEN. Questo procedimento permette di ottenere un prodotto altamente puro e con una buona resa. Il protocollo utilizzato è quello suggerito dall'azienda produttrice per l'estrazione del DNA da tampone buccale. Esso, come la maggior parte delle metodiche di estrazione, si articola in tre fasi principali: il primo passaggio determina la rottura della membrana cellulare e la precipitazione delle proteine mediante l'utilizzo del PBS, della proteinasi K e del Buffer AL. Il secondo passaggio consiste nella filtrazione del campione attraverso la colonnina di silice e la sua purificazione mediante l'utilizzo di due Buffer di lavaggio (AW1 e AW2) che fanno sì che sulla superficie della membrana di silice rimanga adeso esclusivamente il DNA. Il terzo ed ultimo passaggio consiste nell'eluizione del DNA e nel suo stoccaggio all'interno di un tubo sterile da 1,5 ml. L'eluizione mediante Buffer AE permetterà di conservarlo per lungo tempo a una temperatura di -20 °C.

Protocollo:

Prima di iniziare l'estrazione è necessario assicurarsi di aver a disposizione un termostato con dell'acqua alla temperatura di 56 °C, che il Buffer AE sia a temperatura ambiente, e di aver diluito con le giuste proporzioni di etanolo i Buffer AW1 e AW2.

1. Posizionare il tampone buccale in un tubo da micro centrifuga da 2 ml. Aggiungere 50 µl di PBS al campione.
2. Aggiungere 20 µl di QIAGEN Protease stock solution e 500 µl di Buffer AL. Vortexare per 15 sec.
3. Incubare a 56 °C per 10 min. Centrifugare brevemente per rimuovere eventuali gocce presenti nel tappo.
4. Aggiungere 500 µl di etanolo (96%-100%) al campione, miscelare mediante vortex e centrifugare brevemente per rimuovere eventuali gocce presenti nel tappo.
5. Trasferire 700 µl del preparato, ottenuto al punto 4, in una QIAmp Mini spin column inserita all'interno di un tubo da 2 ml. Tappare e centrifugare a una velocità di 8000 rpm per 1 min. Posizionare la QIAmp Mini spin column in un nuovo tubo da 2 ml e eliminare quello contenente il filtrato.
6. Ripetere il punto 5 trasferendo il rimanente preparato ottenuto nel punto 4 nella medesima QIAmp Mini spin column.
7. Aggiungere nella QIAmp Mini spin column 500µl di Buffer AW1. Chiudere il tappo e centrifugare a 8000 rpm per 1 min. Posizionare la QIAmp Mini spin column in un nuovo tubo da 2 ml e eliminare quello contenente il filtrato.
8. Aggiungere nella QIAmp Mini spin column 500µl di Buffer AW2. Chiudere il tappo e centrifugare a 14000 rpm per 3 min.
9. Posizionare la QIAmp Mini spin column in un nuovo tubo da 1.5 ml e eliminare quello contenente il filtrato. Aggiungere 150 µl di Buffer AE o acqua distillata. Incubare a temperatura ambiente per 1 min e centrifugare a 8000 rpm per un min.

QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Il DNA genomico estratto è stato quantificato mediante l'utilizzo del fluorimetro Qubit prodotto dall' Invitrogen. Il fluorimetro è uno strumento contenente una sorgente d'eccitazione, una cella per il campione e un rilevatore. Le molecole in soluzione sono normalmente eccitate da raggi UV e la sorgente d'eccitazione è una lampada di deuterio o xenon. La luce proveniente dalla lampada passa attraverso un monocromatore. La fluorescenza viene dispersa da un'altro monocromatore e rilevata da un tubo fotomoltiplicatore.

Il fluorimetro Qubit rileva i dati delle concentrazioni per ciascun campione confrontandoli con la curva generata dalla calibrazione effettuata con i due Standard (Fig. 5).

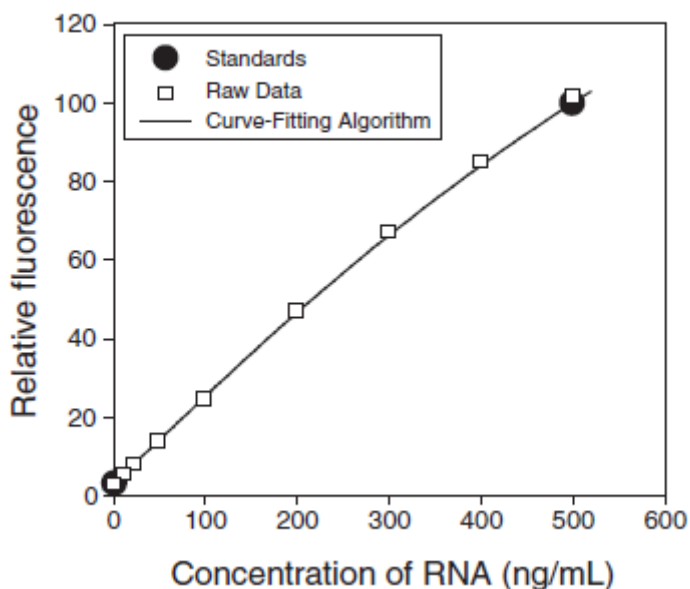


Fig.5 Curva di calibrazione Qubit

È molto importante effettuare l'analisi a temperatura ambiente in quanto le fluttuazioni di temperatura possono influire sull'accuratezza della lettura. Per ridurre al minimo questo tipo di errore è importante che tutti i reagenti utilizzati siano a temperatura ambiente e che il campione

venga inserito all'interno del fluorimetro Qubit solo per tempo necessario per effettuare la rilevazione.

L'utilizzo di questo strumento ha il vantaggio di essere molto rapido e di consentire l'utilizzo di una piccola quantità di DNA genomico per la quantificazione, ha purtroppo lo svantaggio del costo, in quanto prima dell'utilizzo il fluorimetro necessita della calibrazione mediante appositi Standard presenti nel Quant-iT ds DNA Hs Assay Kit. Inoltre, per ciascun campione, deve essere preparata una soluzione contenente 199 µl di Quant-iT Buffer a cui deve essere addizionato 1 µl di Quant-iT Reagent. Questa Mix sarà quindi dispensata in ciascun campione per un volume totale di 200 µl.

I campioni così preparati saranno quindi passati al vortex e incubati a temperatura ambiente per 2 min. La lettura espressa dallo strumento in ng/ml dovrà essere convertita mediante la seguente equazione:

$$\text{Concentrazione del campione} = \text{QF} \times \left(\frac{200}{x}\right)$$

dove: QF indica il valore indicato dal Qubit

x = numero di microlitri di campione utilizzati per la quantificazione.

AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

PCR è l'acronimo di Polymerase Chain Reaction. Questa metodica innovativa è stata inventata nel 1983 da Kary Mullins ed ha rivoluzionato le modalità delle ricerche genetiche.

Essa si basa sulla capacità della DNA Polimerasi di sintetizzare nuovi filamenti di DNA a partire da un filamento stampo. Necessita, però, di inneschi specifici che si appaiano al filamento stampo e forniscano all'enzima il gruppo 3'-OH su cui legare il primo dNTP e quindi iniziare la sintesi della catena nucleotidica. Questa tecnica permette di amplificare di molti ordini di grandezza (10^5 - 10^6) un frammento bersaglio. Perché la sintesi possa avvenire è necessario quindi, che all'interno della miscela di reazione siano presenti, oltre al DNA stampo, due inneschi di DNA a

singolo filamento che siano complementari alle estremità della sequenza bersaglio, i dNTP (deossinucleotidi trifosfato) A,T,C e G che saranno i mattoni utilizzati dalla DNA Polimerasi per sintetizzare i nuovi filamenti, la Taq Polimerasi (DNA polimerasi termo resistente estratta dal batterio *Thermus Aquaticus*), una piccola percentuale di MgCl₂ (cofattore della Taq Polimerasi) e un Buffer importante perché la reazione possa avvenire ad un pH stabile.

La PCR consiste in una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min seguita da 25-35 cicli di:

- Denaturazione: Avviene ad una temperatura di 94-96 °C per circa 30 sec -1 min . In questa fase si verifica la denaturazione del DNA stampo.
- Annealing: La temperatura di questa fase varia da 50 a 60 °C per circa 30 sec-1 min, in questo stadio si osserverà l'appaiamento degli inneschi con il DNA stampo.
- Elongation: Generalmente si realizza ad una temperatura di 72 °C per 30 sec-1 min. A questo punto la DNA polimerasi potrà sintetizzare i nuovi filamenti complementari utilizzando come punti di partenza gli inneschi appaiatisi nella fase precedente.

Successivamente si eseguirà un Elongation finale, in cui la temperatura sarà mantenuta a 72 °C per circa 10 min, il che darà la possibilità alla Taq polimerasi di terminare tutti i frammenti incompleti che potrebbero essersi generati durante i cicli precedenti.

DIGESTIONE ENZIMATICA

La digestione enzimatica è una tecnica che sfrutta la capacità delle endonucleasi batteriche di tipo II di riconoscere delle specifiche sequenze di DNA e di operare un taglio a doppio filamento all'interno o in prossimità della sequenza stessa.

Qualora la mutazione sotto indagine ricada all'interno di questa sequenza di riconoscimento potrà quindi introdurre o eliminare un nuovo sito di restrizione nel segmento di DNA che la contiene.

Sarà quindi necessario mettere a contatto l'enzima di restrizione specifico per la sequenza di interesse con il prodotto di PCR che la contiene facendo attenzione che la reazione avvenga alle condizioni di temperatura, pH e per una durata sufficiente perché l'enzima possa legarsi alle

molecole di DNA e operare il taglio in maniera specifica. I frammenti di DNA così ottenuti potranno essere visualizzati mediante elettroforesi che ci permetterà di visualizzare in maniera indiretta la presenza/assenza della mutazione SNPs

Gli enzimi di restrizione vengono indicati con una nomenclatura che si basa sul genere e sulla specie del batterio dal quale è stato isolato l'enzima stesso:

- Le prime tre lettere, scritte in corsivo, sono prese dalla nomenclatura del batterio di origine.
- Tipi differenti dello stesso organismo sono identificati da una quarta lettera minuscola (Es. Hind, Hinf).
- Segue una lettera maiuscola o un numero, che identificano un ceppo particolare di quel batterio, ove fosse necessario.
- Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi.

ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO E DI POLIACRILAMIDE

La tecnica dell'elettroforesi sfrutta la capacità delle molecole positivamente o negativamente cariche di muoversi in un campo elettrico. In un tampone alcalino o neutro, infatti, gli acidi nucleici si comporteranno come molecole cariche negativamente e migreranno così verso il polo positivo se sottoposte alla differenza di potenziale generata da un alimentatore di corrente. Il gel di agarosio viene utilizzato principalmente come supporto per separazioni rapide, a bassa risoluzione e quando i frammenti sono grandi e di dimensioni molto differenti tra loro. Per frammenti piccoli o che differiscono per poche paia di basi è invece più utilizzato il gel di poliacrilamide. L'agarosio è un polisaccaride ottenuto dalla purificazione dell'agar. Esso viene sciolto in concentrazione pari al 2-3 % in un tampone TAE e portato ad ebollizione. Prima che questa soluzione si solidifichi viene inoltre aggiunto il colorante Bromuro di Etidio (EtBr)

(concentrazione 1:10). La soluzione così ottenuta verrà quindi colata su un supporto in cui è stato inserito un pettine che servirà per la formazione dei pozzetti all'interno del gel. La molecola del EtBr è piatta e molto simile per struttura alle basi azotate del DNA tra le quale si insinua. Una volta ottenuta la polimerizzazione, il gel viene inserito all'interno della cella elettroforetica contenente il tampone TAE. I campioni di DNA vengono, quindi, introdotti all'interno dei pozzetti dopo essere stati miscelati con dei coloranti (blu di bromo fenolo, xilene cianolo) che permettono di seguire visivamente il caricamento del campione e la migrazione del DNA nel gel, inoltre, permette di appesantire il campione facendo di sì che vada a fondo nel pozzetto e non galleggi nel tampone. La corsa in genere viene effettuata ad un voltaggio costante (circa 120 V) e con un campo elettrico pari a 1.5 V/cm. Il tempo di applicazione del campo elettrico varierà in rapporto alla dimensioni delle bande da separare. Terminata la corsa il gel verrà posto su un transilluminatore a luce UV che permetterà di visualizzare le bande del DNA grazie alla presenza dell'EtBr che si è intercalato tra le basi durante la corsa elettroforetica. Infatti la molecola di EtBr se eccitata mediante luce ultravioletta con una lunghezza d'onda comprese tra 204 e 306 nm emette fluorescenza arancione permettendo quindi la visualizzazione delle bande di DNA.

Facendo variare la concentrazione di agarosio si ottengono delle maglie più o meno fitte che vengono usate in funzione della dimensione del frammento di DNA da osservare (Tab.2).

% agarosio	Frammenti visualizzabili
0,3	1,0-70 Kb
0,5	0,7-45 Kb
0,8	0,4-20 Kb
1,0	0,3-10 Kb
1,2	0,2-8 Kb
1,5	0,2-6 Kb
2,0	0,1-5 Kb

Tab. 2 Percentuale di agarosio in soluzione e frammenti visualizzabili

Quando è necessaria una più elevata risoluzione è consigliato adoperare i gel di poliacrilamide. Essi vengono prodotti facendo polimerizzare una sostanza chimica chiamata acrilamide. Essa è un monomero che mediante reazione con la N.N'-metilen-bis-acrilamide si converte in un

polimero. Questa reazione fa sì che una soluzione di acrilamide allo stato liquido gelifichi grazie anche alla catalizzazione effettuata dall'ammonio persolfato (APS). Questo sale ha la capacità di produrre radicali liberi dell'ossigeno in presenza di ammine terziarie come la N,N,N,'N'-tetrametilendiammina (TEMED). Questi radicali inducono la formazione di catene di poliacrilamide disposte a formare un gel. La dimensione dei pori è determinata sia dalla concentrazione totale dei monomeri che dalla percentuale di bis-acrilamide rispetto ai monomeri totali. Di solito il rapporto acrilamide/ bis-acrilamide è 19:1. Questi gel consentono di separare dei frammenti che differiscono tra loro anche di un solo nucleotide.

L'elettroforesi su gel di acrilamide è generalmente di tipo verticale.

Per la preparazione di una piastra si adoperano:

- Soluzione di Acrilamide-BisAcrilamide
- TBE 1X
- APS (20%)
- TEMED

La soluzione, una volta preparata, viene iniettata tra due piastre di vetro distanziate da un separatore

di plastica grazie al quale si crea un'intercapedine in cui si formerà un gel sottilissimo di circa 0.75 mm. Sulla parte alta, si dispone un pettinino per la formazione dei pozzetti. Dopo circa 50 minuti a temperatura ambiente il gel è polimerizzato.

A questo punto, si estrae il pettinino, si sistema la piastra nella cella elettroforetica verticale (riempita con TBE 1X) e si procede con la semina. In ciascun pozzetto verrà inserito il campione miscelato con il Bromo Fenolo Blu. Successivamente, si applicherà una differenza di potenziale di 200 Volt per un tempo medio di circa 50 min ma che potrà variare in relazione al peso dei frammenti di DNA da visualizzare. Terminata la corsa si dispone il gel in una soluzione di bromuro di etidio per 15 min. Poi, ponendo il sottile foglio di gel al transilluminatore a luce UV si effettuerà la lettura dei frammenti.

AMPLIFICAZIONE DEGLI STRS DEL CROMOSOMA Y

L'amplificazione degli alleli STRs del cromosoma Y è stata effettuata dal Reparto Investigazioni Scientifiche dei Carabinieri di Cagliari.

L'analisi è stata eseguita mediante una PCR multiplex con l'utilizzo del Kit AmpFISTR Yfiler (Applied Biosystems).

Mediante tale Kit è possibile analizzare contemporaneamente 17 STRs localizzati nel cromosoma Y.

Questi includono i marcatori necessari per garantire "l'aplotipo minimo" per la tipizzazione del cromosoma Y (Kayser et al. 1997) definito dai loci: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 e DYS385a/b; i marcatori DYS438 e DYS439 raccomandati nel 2003 dallo U.S. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) per definire in modo più preciso l'aplotipo minimo e 6 loci addizionali altamente polimorfici: DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 (YGATA C4) e Y GATA H4.

L'amplificazione è stata eseguita tramite il termociclatore Geneamp®PCR System 9700 (Applied Biosystems). Per ciascun pozzetto è stato dispensato 1 ng di DNA per un volume totale massimo di 10 µl. E' importante che il DNA non sia troppo concentrato in quanto una eccedenza di prodotti di PCR potrebbe generare un'elevata intensità della fluorescenza che andando oltre il range dinamico che lo strumento è in grado di determinare ("off scale" data) può originare diversi problemi:

- La quantificazione dei picchi "off scale" non sarà accurata.
- La separazione degli spettri sarà scarsa e quindi sarà problematica la lettura dei picchi.

Inoltre un eccesso di DNA potrà determinare un incompleto inserimento nelle catene neosintetizzate del nucleotide A.

Sarà inoltre necessario preparare una Mix che contenga 9.2 µl di AmpFISTR® PCR Reaction Mix, 5.0 µl di AmpFISTR® Yfiler® Primer Set e 0.8 µl di AmpliTaq Gold® DNA Polymerase per ciascun campione, e dopo averla adeguatamente miscelata dispensarne 15 µl per ciascun pozzetto contenente 10 µl di DNA. Successivamente chiudere i pozzetti mediante MicroAmp® Clear Adhesive Film o MicroAmp® Optical Adhesive Film e inserire all'interno del termociclatore che eseguirà i cicli mostrati in Tab. 3:

Initial incubation step	Denature	Anneal	Extend	Final extension	Final hold
HOLD	CYCLE (30)			HOLD	HOLD
95°C 11 min	94°C 1min	61°C 1min	72°C 1 min	60°C 80 min	4°C

Tab.3 Cicli PCR per amplificazione Y-STRs

ELETTROFORESI CAPILLARE

L'elettroforesi capillare è una tecnica analitica che separa gli ioni in base alla loro mobilità elettroforetica con l'uso di una tensione applicata. La mobilità elettroforetica dipende principalmente dalla carica della molecola, la viscosità, e il raggio dell'atomo. La velocità con cui si muoveranno le particelle sarà direttamente proporzionale al campo elettrico applicato. Se due ioni possiedono la stessa dimensione, quello che presenterà la maggiore carica elettrica si sposterà più velocemente. Per gli ioni della stessa carica, invece, sarà la particella più piccola, che avendo minor attrito registrerà il tasso di migrazione globale superiore. L'elettroforesi capillare è usata principalmente poiché è in grado di fornirci dei risultati rapidi e una separazione dei frammenti ad alta risoluzione. Nel nostro caso, per l'individuazione degli alleli STRs del cromosoma Y eseguita dal Reparto Investigazioni Scientifiche di Cagliari, è stato utilizzato il sequenziatore automatico ABI Prism 3100.

Sono stati inseriti, all'interno di ciascun pozzetto della MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, 9 µL of the formamide-size standard Mix (composta da 8.5 µL di Hi-Di™ Formamide e 0.5 µL GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0) e 1 µL di prodotto PCR o di ladder.

Dopo aver quindi, riscaldato il plate a 95 °C per 3 min, e averla immediatamente raffreddata in ghiaccio per ulteriori 3 min, è stato inserito all'interno del sequenziatore automatico ABI Prism.

La corsa di questi frammenti verrà rilevata mediante un laser che, eccitando le marcature fluorescenti presenti sui prodotti di PCR, farà sì che i segnali raccolti da un sistema ottico provvisto di fotomoltiplicatore possano essere inviati al software GeneMapper ID-X (v. 1.4) che ne eseguirà l'elaborazione. Il risultato sarà un elettroferogramma in cui ciascun picco corrisponde ad un preciso allele STR(Fig.6).



Fig. 6 Esempio di elettroferogramma per la determinazione degli alleli STRs

Mediante l'utilizzo del programma Haplogroup predictor (<http://www.hprg.com/hapest5/>), inserendo gli alleli STRs così individuati, è stato possibile determinare gli aplogruppi di appartenenza degli individui analizzati.

Quando il software ha prodotto un'attribuzione incerta dell'aplogruppo si è proceduto all'analisi degli SNPs.

DETERMINAZIONE DEGLI APLOGRUPPI DUBBI.

Per i campioni in cui la probabilità di assegnazione errata dell'aplogruppo fornita dall'haplogroup predictor superava il 2% è stata effettuata l'analisi dei polimorfismi SNPs che stanno alla base dei differenti aplogruppi.

I diversi marcatori sono stati amplificati utilizzando i primers elencati in Tab.4.

Aplog.	Marcatore	Mutazione	Primer For	Primer Rev	Dimensione frammento
G	M201	G>T	CTAATAATCCAGTACCAACTGAG	TGAATGTTCAAACGTCAAACAG	207 bp
R1	M173	A>C	AAGTTGATGCCACTTTTGAG	TTCTGAATATTAACAGATCACAA	199 bp
J2	M172	T>G	AAATTAGGAGCCAGATGACC	AATAATAATTGAAGACCTTTGAGT	176 bp
I2a	L460	A>C	CCAAGCCTGGAGAGTGACTT	GAGAGTGTAATTGCCAGCAC	478 bp

Tab.4 Primers utilizzati per la determinazione degli aplogruppi dubbi.

Seguendo i seguenti protocolli (Tab.5):

	Buffer (µl)	MgCl ₂ (µl)	DNTPs (µl)	P ₁ (µl)	P ₂ (µl)	H ₂ O (µl)	Taq (µl)	DNA (µl)	Tot (µl)
M201	2.5	0.75	1	0.75	0.75	18.05	0.2	1	25
M173	2.5	0.75	1	1	1	16.55	0.2	2	25
M172	2.5	0.75	1	0.75	0.75	18.05	0.2	1	25
L460	2.5	1	1	0.2	0.2	19	0.1	1	25

Tab.5 Protocollo amplificazione marcatori M201, M173, M172, L460

Per i marcatori M201, M173 e M172 è stato utilizzato un protocollo touchdown utile per aumentare la specificità del prodotto. Infatti, per i primi 14 cicli la temperatura di annealing

(T.a.) viene gradualmente fatta decrescere sino ad arrivare alla T.a. ottimale per il primer. La PCR continuerà utilizzando quindi questa temperatura per i successivi 35 cicli (Tab.6).

	Tempo	Temperatura	
Denaturazione	5'	94 °C	
Denaturazione	20''	94 °C	14 cicli*(-0.5°C ogni ciclo)
Annealing	1'	63 °C	
Estensione	1'	72 °C	
Denaturazione	20''	94 °C	35 cicli
Annealing	45''	56 °C	
Estensione	90''	72 °C	
Estensione	10'	72 °C	
Finale	∞	4 °C	

Tab.6 Settaggio PCR touchdown

Per il marcatore L460 è stato utilizzato, invece, il protocollo in Tab.7.

	Tempo	Temperatura	
Denaturazione	5'	94 °C	
Denaturazione	30''	94 °C	35 cicli
Annealing	30''	55 °C	
Estensione	30''	72 °C	
Estensione	10'	72 °C	
Finale	∞	4 °C	

Tab.7 Settaggio PCR per il marcatore L460

La presenza della mutazione SNP all'interno dei frammenti così ottenuti è stata rilevata mediante digestione enzimatica utilizzando gli enzimi in Tab.8 e seguendo il protocollo di digestione in Tab.9.

Marcatore	Mutazione	Enzima	Temperatura	lettura
M201	G>T	BseLI	55 °C	G=108bp+78 bp + 21 bp T=207 bp
M173	A>C	AdeI (DraIII)	37 °C	A=178 bp + 21 bp C=199 bp
M172	T>G	HinFI	37 °C	G=151 bp + 25 bp T=176 bp
L460	A>C	Hpy166II	37 °C	A= 346 bp + 132 bp C= 478 bp

Tab.8 Enzimi di restrizione e relative temperature e frammenti ottenuti dopo il taglio.

Reagenti	Quantità
Amplificato	10 µl
Buffer	2 µl
H₂O	7.8 µl
Enzima	0.2 µl

Tab.9 Protocollo digestione

APPROFONDIMENTO DELLA LINEA I2A

La linea I2a è stata indagata in maniera più approfondita studiando i seguenti SNPs (Tab.10):

Marcatore	Sottoaplog.	Mutazione	Primer For	Primer Rev	Dimensione frammento
P214	I2a2	G>C	TAAGCAGCCATCAAAGAAC	TGTTTTATTTGAATGTTTGA AGG	971 bp
M26	I2a1a	G>A	CCAGTGGTAAAGTTTTATTACAATTT	TTCACAGTAAGCAGGCAAT CC	321 bp
L160	I2a1a1	G>A	TCCAATGGTAGAATAAGCCCCA	ACTTGAATTCCTCAACTCAAAT GAAAA	250 bp
M161		C>A	TCACAGCAGCTCAGCAAA	CCTTTTTGGATCATGGTCT T	460 bp
PF4124		A>G	TGAGAGGCTTGAGAAAACCTGA	ACACAAAGTGGTTAAGTCC CCT	372 bp
18866539		G>A	TACCCAGAACCAGAGGACAT	GGATTTCCCAGGCACCTAGA	485 bp
PF4258		G>A	GCTCAGAGGTGCTCCAACAT	TCTTCTATTTCGGCCATCTT CT	883 bp
PF4461		A>G	ACCCAGTGAGTGTGTCTATATGC	GAGCTGAGGCCAACAGGTA G	706 bp
218417 33		G>A	GGGTGCCGGTACAAATTCCA	CTCGAGCCCTTCAAACCTTGC	285 bp

Tab.10 Primers per approfondimento aplogruppo I2a

Ciascun marcatore è stato amplificato con l'utilizzo di reagenti Euroclone secondo le proporzioni descritte nelle Tab.11. Tab.12, Tab.13.

Taq Q5	P214	M26	M161	PF4258
Buffer	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl
Buffer GC	0 µl	3.5 µl	3.5 µl	3.5 µl
dNTP	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
P1	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
P2	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
H₂O	18 µl	14.5 µl	15.5 µl	14.5 µl
Taq	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl
DNA	2 µl	2 µl	1 µl	2 µl
TOT	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Tab.11 Protocollo amplificazione per i marcatori P214,M26, M161 e PF4258.

Taq Phusion	L160 18866539 PF4461
Buffer	5 μ l
dNTP	0.8 μ l
P1	0.25 μ l
P2	0.25 μ l
H₂O	14.45 μ l
Taq	0.25 μ l
DNA	2 μ l
TOT	25 μ l

Tab.12 Protocollo amplificazione per i marcatori L160,18866539 e PF4461.

Euro Taq	PF4124 21841733
Buffer	2.5 μ l
MgCl₂	0.75 μ l
dNTP	1 μ l
P1	0.2 μ l
P2	0.2 μ l
H₂O	18.25 μ l
Taq	0.1 μ l
DNA	2 μ l
TOT	25 μ l

Tab.13 Protocollo amplificazione per i marcatori PF4124 e 21841733.

L'amplificazione è dei frammenti è stata ottenuta settando la PCR come descritto in Tab.14.

Marcatore	Denaturazione iniziale		Denaturazione		Annealing		Estensione		Estensione finale		Numero di cicli	Finale	
	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo		°C	Tempo
P214	94	5'	94	30''	52.5	30''	72	30''	72	10'	35	4	∞
M26	94	5'	94	30''	50	30''	72	50''	72	7'	35	4	∞
M161	94	5'	94	30''	52	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞
L160	94	5'	94	30''	58	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞
PF4124	94	5'	94	30''	61	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞
18866539	94	5'	94	30''	58	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞
PF4258	94	5'	94	30''	58	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞
PF4461	94	5'	94	30''	58	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞
21841733	94	5'	94	30''	58	30''	72	30''	72	7'	35	4	∞

Tab.14 Settaggio PCR per i marcatori P214, M26, M161, L160, PF4124,18866539, PF4258, PF4461 e 21841733

DIGESTIONE ENZIMATICA

La presenza delle mutazioni all'interno dei frammenti amplificati è stata rilevata mediante digestione enzimatica per i marcatori P214, M161, L160, PF4124, 18866539, PF4258, PF4461 e 21841733 utilizzando gli enzimi di restrizione e il protocollo elencati nelle Tab. 15 e Tab. 16.

Marcatore	Mutazione	Enzima	Temperatura	lettura
P214	G>C	EarI	37 °C	G=971 bp C=788 bp + 183 bp
M161	C>A	NlaIV	37 °C	C= 109 bp +85 bp +266 bp A=194 bp +266 bp
L160	G>A	HpyCH4IV	37 °C	A= 133 bp + 117 bp G=250 bp
PF4124	A>G	DdeI	37 °C	G=168 bp +69 bp +135 bp A=168 bp +204 bp
18866539	G>A	Acil	37 °C	G=116 bp +369 bp A=485 bp
PF4258	G>A	BmtI	37 °C	G=385 bp +498 bp A=883 bp
PF4461	A>G	BaeGI	37 °C	G=503 bp +206 bp A=706 bp
21841733	G>A	BmrI	37 °C	G=149 bp +107 bp +29 bp A=149 bp +136 bp

Tab.15 Enzimi di restrizione e relative temperature e frammenti ottenuti dopo il taglio.

Reagenti	Quantità
Amplificato	10 µl
Buffer	2 µl
H₂O	7.8 µl
Enzima	0.2 µl

Tab.16 Protocollo digestione

La presenza/assenza della mutazione M26 è stata invece visualizzata tramite sequenziamento del tratto amplificato.

SEQUENZIAMENTO M26

Per l'individuazione, della mutazione M26, il sequenziamento è stato eseguito dalla ditta Macrogen mediante sequenziatore automatico ABI3730XL. Il risultato ottenuto sarà un elettroferogramma, attraverso il quale è possibile visualizzare la sequenza di basi che compongono il frammento di interesse (Fig.7) Mediante il software MEGA sono state successivamente allineate le sequenze così ottenute con una sequenza di riferimento scaricata dal database NCBI. (Fig.8)

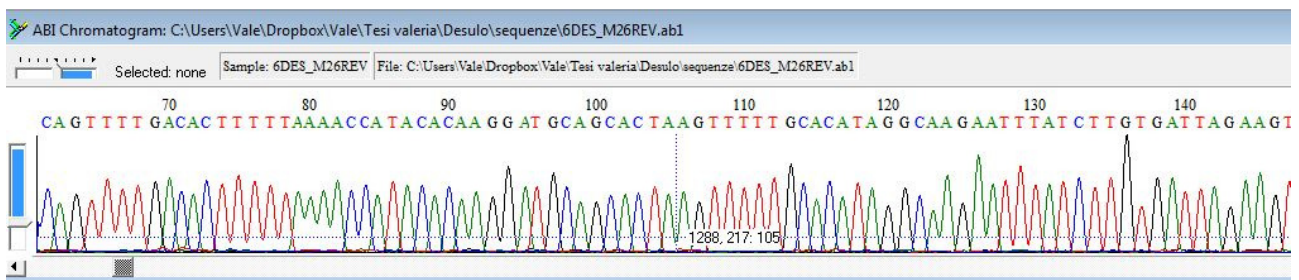


Fig.7 Elettroferogramma ottenuto dal sequenziamento di un campione di Desulo

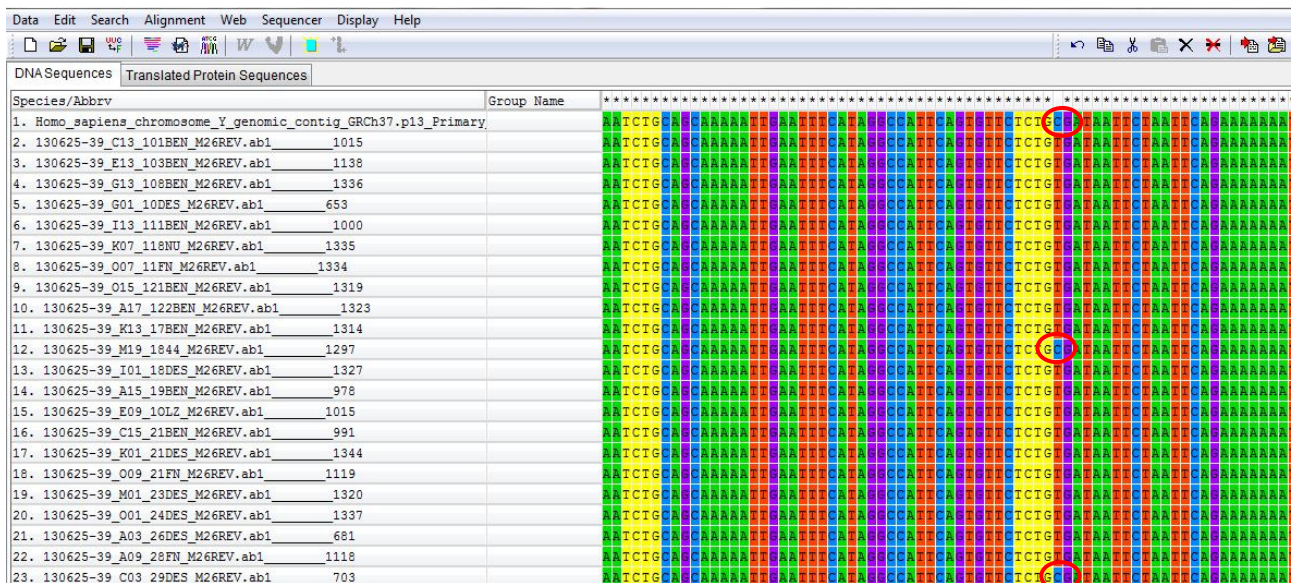


Fig.8 Allineamento sequenze campioni di Desulo con sequenza di riferimento.

ELABORAZIONE STATISTICA

Frequenze alleliche e aplotipiche

Le frequenze alleliche sono state elaborate tramite la macro MS tools. Questa toolkit calcola le frequenze alleliche percentuali di ciascuna ripetizione STRs partendo dai genotipi di ciascun

individuo a cui era stata assegnata in precedenza la popolazione di appartenenza. Le frequenze aplotiche sono state invece determinate mediante il software Arlequin (ver 3.5.1.2.). Ciascun aplotipo è determinato dalla somma degli stati allelici per ciascun STRs analizzato in ciascun campione. La frequenza aplotipica è stata calcolata secondo la formula:

$$\hat{p}_i = \frac{x_i}{n}$$

dove \hat{p}_i è la frequenza aplotipica stimata, x_i è l'aplotipo i osservato e n è il numero di volte che x_i è stato rilevato all'interno della popolazione.

ANALISI DEGLI APLOTIPI

Mediante il software Arlequin (ver 3.5.1.2) si è proceduto all'analisi degli aplotipi.

È stato calcolato il *numero di diversi aplotipi* osservato in ciascuna popolazione e il *gene diversity*: equivalente all'eterozigosità attesa per i dati diploidi: esso definisce la probabilità che due aplotipi, presi a caso in una popolazione, siano differenti. È stato calcolato, inoltre, il numero medio di differenze tra ciascuna coppia di aplotipi osservati all'interno di ogni popolazione (*mean number of pairwise differences*). È stato elaborato, quindi, l'indice di fissazione *FST*. Esso definito dalla riduzione della media dell'eterozigosità nelle sottopopolazioni (HS) quando confrontata con l'eterozigosità attesa nella popolazione complessiva (HT). Questa riduzione è principalmente dovuta a deriva genetica tra le sottopopolazioni. L'indice *FST* può assumere valori compresi tra 0 (sottopopolazioni non differenziate) e 1 (sottopopolazioni completamente differenziate).

$$FST = \frac{(HT - HS)}{HT}$$

Quando si analizzano loci aploidi, come nel caso dei polimorfismi del cromosoma Y, è più corretto pensare in termini, anziché di eterozigosità, di diversità aplotipica: questa è la misura del grado di variabilità aplotipica osservata all'interno di una popolazione. È stato inoltre elaborato l'indice *RST* che è specifico per l'analisi di ripetizioni di microsatelliti.

Infatti, sapendo che questi evolvono in accordo con il stepwise mutation model (SMM) gli individui che mostreranno un numero di ripetizioni simili saranno filogeneticamente più vicini rispetto a coloro che, invece, possiederanno una elevata variazione nel numero di ripetizioni.

$$RST = \frac{ST - SW}{ST}$$

Dove *ST* è la variazione della dimensione allelica nella popolazione totale, e *SW* è la variazione nella dimensione allelica tra le sottopopolazioni.

AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

Questo test ci permette di elaborare un indice di strutturazione genetica delle popolazioni utilizzando le informazioni degli alleli contenuti negli aplotipi, come per esempio la loro frequenza. I risultati ottenuti facendo il confronto delle differenze aplotipiche tra le sottopopolazioni verranno inserite all'interno di una matrice quadrata delle distanze di tipo Euclidea. La significatività dei componenti della covarianza associati ai possibili livelli di strutturazione genetica (tra gli individui, tra le popolazioni, tra i gruppi di popolazioni e all'interno dei gruppi) è stata testata utilizzando un tipo di analisi non parametrica.

GENEPOP

La micro differenziazione interna della popolazione Desulese è stata analizzata mediante il test di Fisher elaborato attraverso il software Genepop. Esso ci permette di testare l'ipotesi nulla e cioè che i genotipi osservati abbiano la stessa distribuzione in tutte le popolazioni da confrontare.

Sono considerate significative le differenze tra popolazioni che mostrano un p-value inferiore a 0,05.

ELABORAZIONI GRAFICHE

ALBERO FILOGENETICO

L'albero filogenetico è stato elaborato a partire dalle frequenze alleliche attraverso Phylip (ver. 3.68) Esso è un pacchetto costituito da una serie di programmi per la ricostruzione filogenetica.

L'homepage del progetto è raggiungibile all'indirizzo <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.

L'utilizzo di Phylip avviene, di solito, in flussi di lavoro in cui il file di output che viene generato da un programma sarà anche il file di input che potrà essere immediatamente utilizzato dal programma successivo. Una volta avviato, ciascun programma dà la possibilità all'utente di modificare le impostazioni di default mediante il menù presentato a schermo. Una volta ultimata la personalizzazione delle impostazioni sarà possibile lanciare il programma.

Per l'elaborazione dell'albero filogenetico sono stati utilizzati in ordine i seguenti programmi, tutti facenti parte del pacchetto Phylip (ver. 3.68) :

- Seqboot.exe: impiegato per validare la significatività dell'albero filogenetico, esso infatti permette la generazione di un set multiplo di alberi a partire da un unico set di frequenze alleliche di partenza .
- Gendist.exe: elabora una matrice delle distanze genetiche a partire dalle frequenze alleliche
- Neighbor.exe: costruisce un albero mediante successivi raggruppamenti dei lignaggi.
- Consense.exe: sceglie l'albero consenso che è costituito dai gruppi monofiletici che si sono verificati più spesso all'interno del set di alberi generati.

L'outree così generato sarà visualizzabile mediante il software Treeview (ver.1.6.6).

MDS

Il Multidimensional scaling ci permette di rappresentare graficamente una matrice delle distanze. Infatti, dopo aver creato la matrice delle distanze di Slatkin attraverso il software Arlequin (ver 3.5.1.2), è possibile creare un plot, mediante il software R (ver 2.15.1), nel quale le rispettive distanze nel set di punti che saranno visualizzati nel grafico, saranno proporzionali ai valori rilevati dalla funzione cmdscale di R (ver 2.15.1) nella matrice delle distanze genetiche che è stata usata come input.

PCA E SPCA

Tramite PCA (Principal Component Analysis) si può applicare una trasformazione lineare ad un data set composto da N dati e ottenere così M ($M < N$) variabili. È possibile, quindi, considerare solamente P delle M variabili basandosi sul fatto che nelle P variabili è contenuta una buona parte dell'informazione disponibile. In questo modo, ad esempio, si riesce ad eliminare componenti non desiderate nei dati o, al contrario, evidenziare componenti interessanti presenti nei dati. La PCA è quindi un algoritmo che ricerca iterativamente degli assi ortogonali lungo i quali gli oggetti proiettati mostrano la più alta varianza. La posizione relativa di questi oggetti (ad esempio individui) lungo le prime due Componenti fornisce una ragionevole approssimazione del modello di covarianza tra individui all'interno del set di dati.

In una delle più grandi applicazioni della PCA è stato il suo utilizzo per riassumere i dati delle frequenze alleliche di popolazioni umane provenienti da tutto il mondo. (Cavalli-Sforza et al. 1996).

La relazione tra le coordinate geografiche delle popolazioni analizzate e la loro frequenza allelica è stata inoltre studiata mediante la "spatial Principal Component Analysis" (sPCA) elaborata tramite il software R (ver. 2.15.1.) con l'utilizzo del package adegenet (Jombart 2008). Nella

PCA classica, infatti, gli eigenvalues vengono calcolati per massimizzare esclusivamente la varianza dei dati, mentre nella sPCA gli eigenvalues vengono calcolati per massimizzare sia il prodotto della varianza sia la loro autocorrelazione spaziale. L'analisi è stata effettuata usando la procedura pesata basata sulla triangolazione di Delunay. Successivamente è stata utilizzata funzione Mclust del package Mclust di R. Essa è un algoritmo di clusterizzazione che esamina sette differenti modelli e sceglie quello che meglio rappresenta i risultati ottenuti mediante la sPCA secondo il principio del Bayesian Information Criterion (BIC) più elevato. L'output contiene sia i valori del maximum-BIC model che l'appartenenza di ciascuna popolazione ai differenti cluster così ottenuti.

SURFER (V.9.11.947)

Per visualizzare la distribuzione degli aplogruppi osservati nelle nostre popolazioni Sarde, in confronto con altre popolazioni che si affacciano sul bacino del Mediterraneo sono state costruite delle mappe nelle quali le frequenze alleliche vengono rappresentate come curve di livello che assumono una colorazione tendente al rosso quando il loro valore è più elevato mentre una colorazione tendente al viola dove le frequenze assumono un valore minimo.

Per effettuare questa interpolazione grafica dei dati è stato utilizzato il software Surfer (ver. 9 .11.947). Esso è un programma di grafica grid-based che è in grado di interpolare i dati XYZ e di dare loro una veste grafica, che andrà a sovrapposta come layer ad una mappa georeferenziata di base.

Nel nostro caso è stata utilizzata una mappa di base georeferenziata che abbraccia tutto il bacino del Mediterraneo, ai valori X e Y sono state attribuite le coordinate geografiche relative alle popolazioni studiate, mentre al valore Z è stata attribuita la frequenza percentuale dell'aplogruppo analizzato.

NETWORK (4.6.1.1)

Network (ver.4.6.1.1.) è un software in grado di elaborare network e alberi filogenetici deducendo gli aplotipi ancestrali e i potenziali aplotipi intermedi. Il file di input è costituito dai dati genotipici (ripetizioni degli alleli STRs nel nostro caso) di ciascun individuo facente parte della popolazione sotto esame. Questi vengono confrontati fra di loro e viene costruita una matrice in cui sono indicati i passi mutazionali che separano ogni aplotipo dall'altro. Si uniscono prima i taxa che sono separati da un unico passo mutazionale, e poi si procede unendo i taxa separati da passi mutazionali via via sempre più grandi, fino a che tutti i taxa non sono uniti in un'unica struttura. Nel grafico che si viene a formare gli aplotipi sono rappresentati mediante cerchi la cui area è direttamente proporzionale alla frequenza dell'aplotipo nella popolazione. Le mutazioni sono rappresentate con delle linee.

Il network è stato elaborato mediante l'algoritmo Median-Joining che è adatto per studiare parametri non binari (come ad esempio i dati di ripetizioni STRs che possono presentare più di due alleli). Il parametro epsilon è stato impostato pari a 10, come consigliato dal User Guide del software. Tale valore ha consentito di ottenere un median network completo anche se ha incrementato notevolmente il tempo di elaborazione e ha prodotto un network di maggiore complessità. Per permettere la semplificazione del network è stato quindi utile utilizzare l'opzione MP che elimina i median vector e i links superflui.

RISULTATI

FREQUENZE ALLELICHE

I valori percentuali delle frequenze alleliche dei 17 STRs (DYS19, DYS385 a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 e Y GATA H4) sono riportate nelle Tab. 17 per quanto riguarda la popolazione di Desulo, mentre i rispettivi valori della popolazione di confronto (Centro Sardegna) sono riportati nella Tab. 18

Tutti i loci si sono mostrati polimorfici. I loci nei quali sono stati osservati un minor numero di alleli sono stati il DYS391 e DYS437 con soli tre alleli rilevati, mentre il locus maggiormente polimorfico è stato il DYS458 con 7 differenti alleli. Da notare la presenza, tra gli alleli di questo locus, dell'allele non consensus 18.2. La sua frequenza tra la popolazione Desulese raggiunge lo 0.1%, mentre nel centro Sardegna lo 0.05 %. Queste frequenze sono estremamente elevate se confrontate con quelle osservate in altre popolazioni caucasiche e italiane (0.00317 e 0.014 rispettivamente (Alves et al. 2007a; Ghiani et al. 2009; Myres et al. 2007)). Inoltre, gli individui portatori dell'allele 18.2 sono gli unici individui appartenenti all'aplogruppo J1.

L'andamento delle frequenze alleliche (Tab.17 e Tab.18) è prevalentemente unimodale in entrambe le popolazioni, ad esclusione dei locus DYS458, DYS19, DYS635 e DYS392 che sono invece bimodali. Il locus DYS385 è presente in due regioni distinte del cromosoma Y, la cui amplificazione a partire da una singola coppia di primers produce due differenti amplificati (quindi due differenti alleli), i quali non possono essere analizzati separatamente e per tale motivo vengono considerati come un genotipo, come raccomandato dalla DNA Commission of International Society of Forensic Genetics. Per quest'ultimo locus sono stati rilevati 18 aplotipi, e il più frequente è il 12-12 con una frequenza pari al 26 % nella popolazione di Desulo e del 27% nella popolazione di confronto.

	DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389II	DYS 458	DYS 19	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	GATA_H4	DYS 437	DYS 438	DYS 448	DYS385AB		
																	aplotipo	
8																	8-12	0
9							0,1	0						0,02			10-15	0
10								0,92	0,22		0	0,02		0,66			11-11	0,02
11		0,00						0,08	0,28		0,56	0,64		0,22			11-12	0,04
12	0,02	0,04					0,10		0,42		0,1	0,3		0,10			11-13	0,24
13	0,12	0,7				0,02	0,80		0,06		0,3	0,02					11-14	0,06
14	0,72	0,26			0,24	0,2	0		0,02		0,04	0,02	0,4				11-15	0,02
15	0				0,02	0,42					0		0,58				12-12	0,26
16	0,08				0,02	0,12							0,02				12-13	0,16
17	0,06				0,24	0,24											12-14	0
18					0,36										0,08		12-15	0
18,2					0,1												13-13	0,04
19					0,02										0,24		13-14	0,02
20										0,28					0,46		13-18	0
21			0							0,24					0,2		13-20	0,1
22			0,1							0,12					0,02		14-14	0,02
23			0,36							0,28							14-15	0
24			0,52							0,08							14-16	0
25			0,02							0							14-17	0
27				0,02													15-18	0
28				0,64													16-18	0,02
29				0,14														
30				0,1														

Tab.17 frequenze alleliche dei 17 Y-STRs nella popolazione di Desulo

	DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389II	DYS 458	DYS 19	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	GATA_H4	DYS 437	DYS 438	DYS 448	DYS385AB		
																	aplotipo	
8																	8-12	0,02
9							0,02	0,05						0,14			10-15	0,05
10								0,82	0,09		0,05	0,00		0,70			11-11	0,02
11		0,02						0,14	0,57		0,80	0,48		0,07			11-12	0,05
12	0,00	0,16					0,16		0,27		0,02	0,39		0,09	0,00		11-13	0,00
13	0,05	0,66				0,05	0,66		0,07		0,11	0,11			0,05		11-14	0,11
14	0,48	0,16			0,05	0,18	0,16		0,00		0,00	0,02	0,20		0,48		11-15	0,00
15	0,30				0,05	0,41					0,02		0,61		0,30		12-12	0,27
16	0,16				0,14	0,14							0,18		0,16		12-13	0,09
17	0,02				0,45	0,23									0,02		12-14	0,09
18					0,27												12-15	0,02
18,2					0,05												13-13	0,02
19																	13-14	0,07
20										0,07							13-18	0,05
21			0,02							0,34							13-20	0,00
22			0,09							0,16							14-14	0,00
23			0,61							0,30							14-15	0,05
24			0,25							0,11							14-16	0,02
25			0,02							0,02							14-17	0,05
27				0,05													15-18	0,02
28				0,45													16-18	0,00
29				0,23														
30				0,16														

Tab. 18 frequenze alleliche dei 17 Y-STRs nella popolazione di controllo (centro Sardegna)

All'interno delle popolazioni di Desulo 4 diversi aplotipi vengono condivisi da più campioni: il primo è condiviso da 5 individui, il secondo da 3, il terzo da 2 e il quarto da 5. Quest'ultimo aplotipo è condiviso anche da un individuo della popolazione di confronto (Centro Sardegna).

All'interno della popolazione di confronto solo due individui su un totale di 44 campioni condividono lo stesso aplotipo STRs. (Tab.19)

camp ioni	DYS 456	DYS 389I	DYS 390	DYS 389II	DYS 458	DYS 19	DYS 385a	DYS 385b	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	GATA_ H4	DYS 437	DYS 438	DYS 448
49d- 50d- 3d- 26d- 82d	14	13	23	28	18	17	12	13	9	10	11	21	11	12	15	10	20
54d 1d 19d	13	14	23	31	18	14	13	20	12	10	12	20	12	11	14	10	20
56d 8d 17d 11d 35d 1 cs	14	13	24	18	14	15	12	?	13	20	12	23	13	11	14	11	19
38d 42d	14	13	24	18	17	15	11	13	13	10	10	20	11	11	15	10	21
2 cs 17cs	15	12	23	29	17	16	12	14	13	11	11	24	11	11	16	10	20

Tab.19 degli aplotipi condivisi.

*d=campione di Desulo

*cs= campione Centro Sardegna

Attraverso il software Arlequin è stato possibile calcolare il *numero di diversi aplotipi* osservato in ciascuna popolazione, il *gene diversity* e il *mean number of pairwise differences*. Inoltre, è stata determinata la *Discrimination Capacity* ($DC = \text{Numero di differenti aplotipi} / \text{numero di individui}$) per entrambe le popolazioni analizzate (Tab.20).

Dall'osservazione di questi indici è possibile notare come la popolazione di confronto (Centro Sardegna) presenti sempre valori superiori rispetto a quelli calcolati per la popolazione Desulese.

Popolazione	n° di campioni	n° di differenti aplotipi	Gene diversity	Mean number of pairwise differences	Discrimination Capacity (DC)
Desulo	50	39	0.98	9.68	0.760
Centro Sardegna	44	43	0.99	10.30	0.954

Tab.20 Parametri rilevati nella popolazione di Desulo e Centro Sardegna

Mediante l'AMOVA, calcolata basandosi sul metodo RST, inoltre, le due popolazioni sono risultate altamente differenziate con un p-value pari a 0.00634.

MICRODIFFERENZIAZIONE INTERNA DEL COMUNE DI DESULO.

Mediante il test di Fisher elaborato mediante il software Genepop (ver.4.0) a partire dai dati aplotipici è stata testata la presenza di differenziazione genetica effettuando un confronto a coppie tra i rioni Issiria, Asuai e Ovolaccio che compongono il Comune di Desulo.

I risultati sono mostrati in Tab.21.

Popolazione	P-Value
Asuai & Issiria	0.004
Asuai & Ovolaccio	0.90
Issiria & Ovolaccio	0.98

Tab.21 p value ottenuti mediante il test di Fisher

I risultati mostrano chiaramente una differenziazione altamente significativa tra i rioni di Issiria e Asuai, mentre il rione di Ovolaccio sembra si sia completamente omogenato ai due rioni limitrofi.

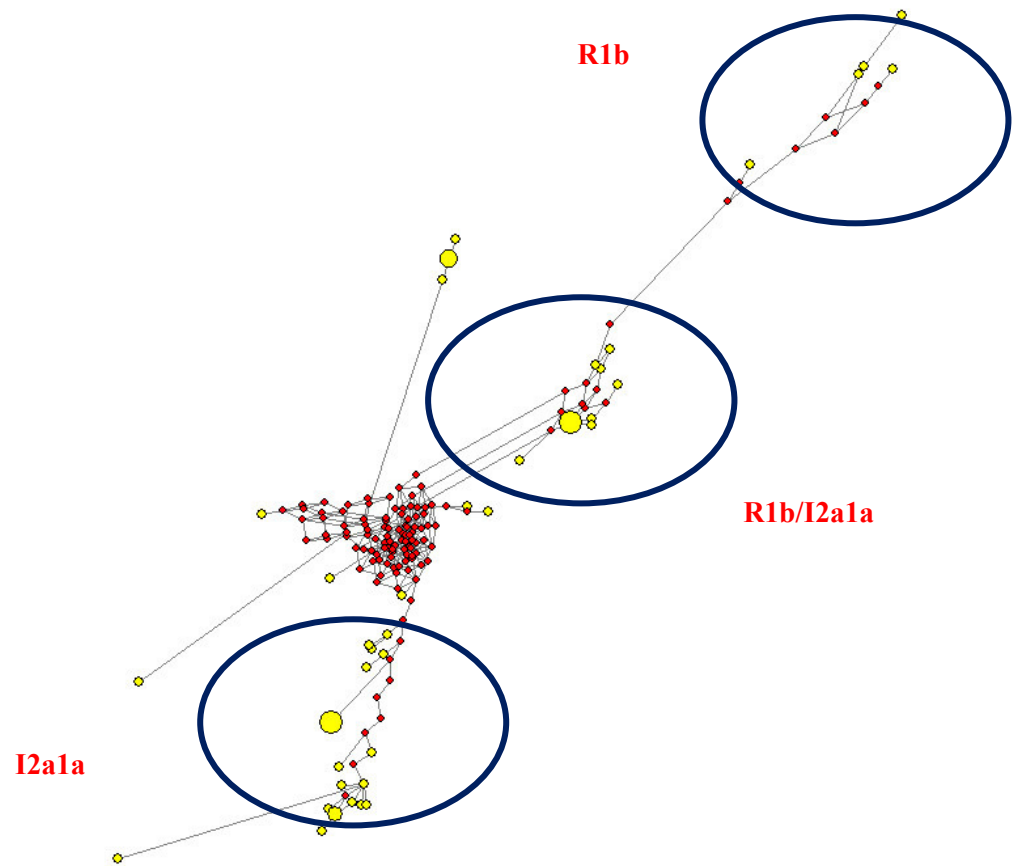


Fig.9 Network Desulo

La forma del network filogenetico della popolazione di Desulo (Fig.9) non mostra la classica forma starlike tipica dell'origine monofiletica. Il network è infatti costituito da più clusters aploipici, anche se non possiamo escludere la loro origine comune dal nucleo centrale costituito dagli aplogruppi R1b e I2a1 e una loro successiva differenziazione, già in epoca molto antica.

PCA POPOLAZIONI SARDE

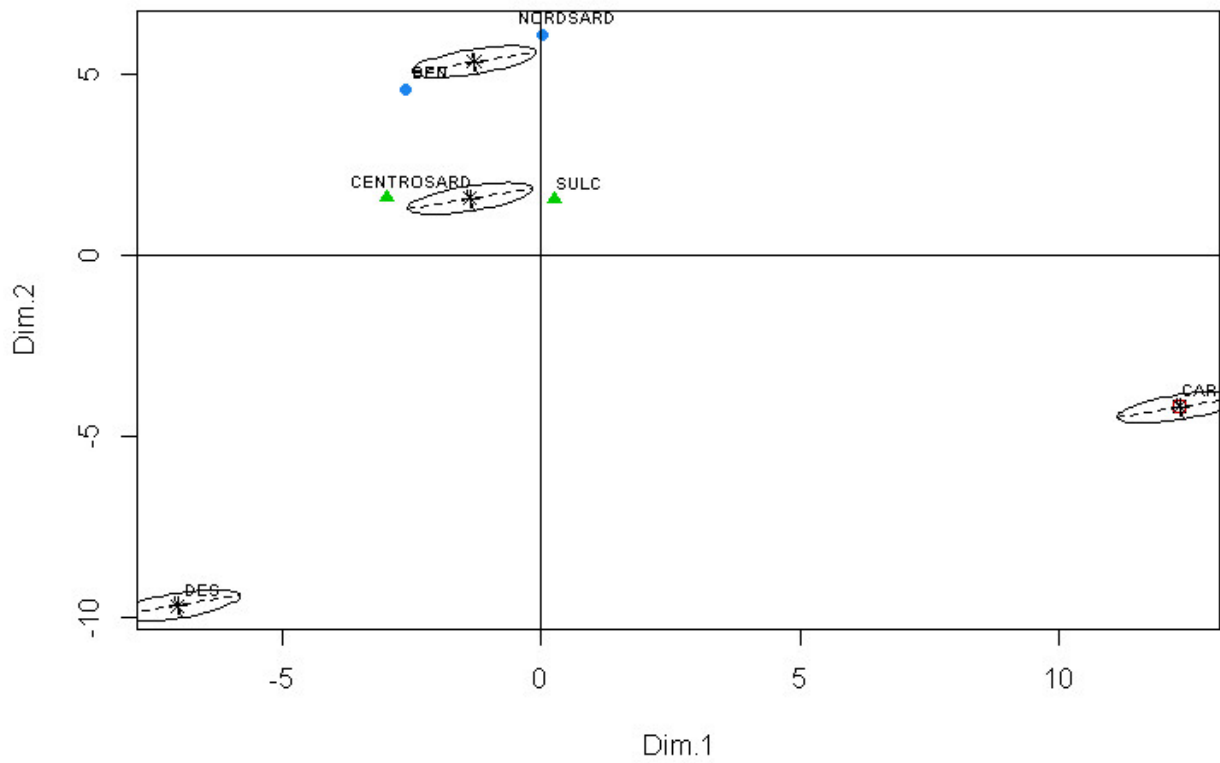


Fig.10 PCA tra le popolazioni Sarde

Si è quindi voluto effettuare il confronto tra la popolazione Desulese e altre 5 popolazioni sarde: 2 isolati (Carloforte, Benetutti) e 3 popolazioni aperte (Centro Sardegna, Nord Sardegna, Sulcis). Tale confronto è possibile visualizzarlo graficamente mediante PCA. (Fig.10). Tramite essa è possibile osservare la formazione di 4 cluster.

Desulo e Carloforte risultano separati dalle altre popolazioni sia dalla prima componente che dalla seconda componente che spiegano rispettivamente il 34.13% e il 27.57% della variabilità totale.

CONFRONTO TRA LE POPOLAZIONI DEL MEDITERRANEO

MDS

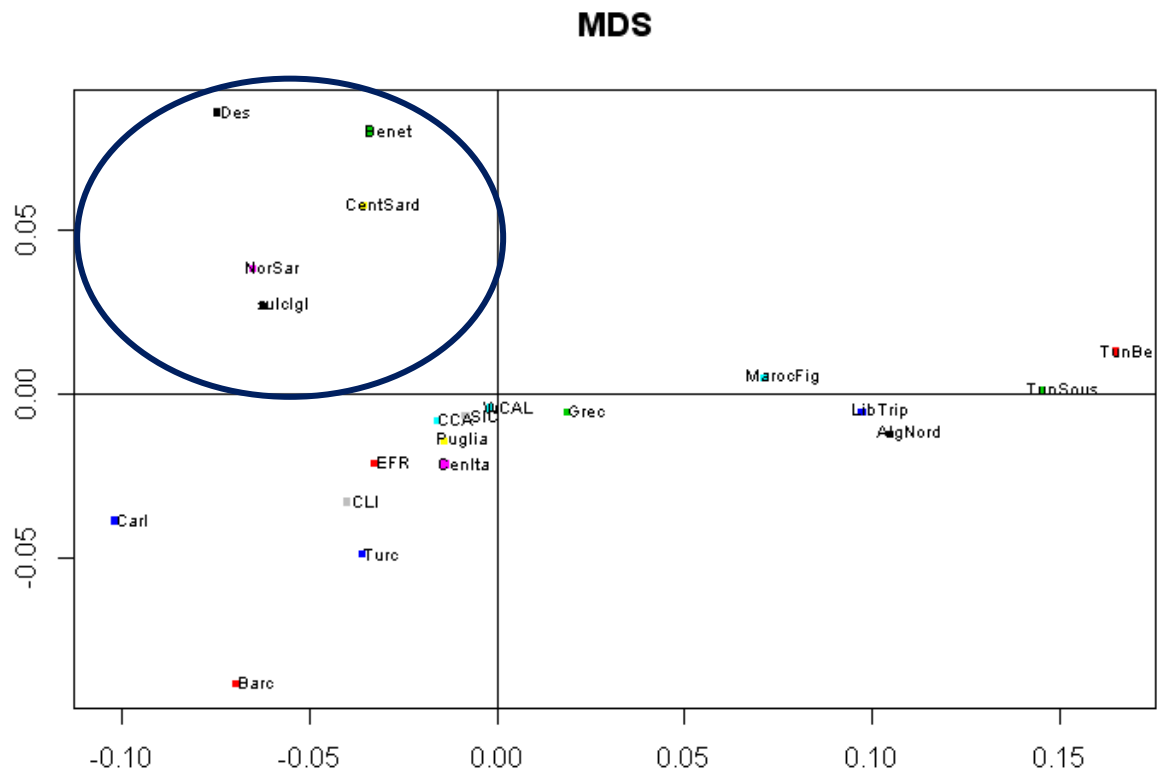


Fig.11 MDS confronto Sardegna e Mediterraneo

Des=Desulo, Benet=Benetutti, CentSard=Centro Sardegna, NorSar=Nord Sardegna, SulcIgl=Sulcis, Carl=Carloforte, Barc=Barcellona, Ture=Turchia, CLI=Liguria, EFR=Friuli, CenIta=Centro Italia, Puglia=Puglia, CCA=Campania, SIC=Sicilia, WCAL=Calabria, Grec=Grecia, MarocFig= Marocco, LibTrip= Libia, AlgNord=Algeria, TunSous= Tunisia Sousse, TunBe= Berberi della Tunisia

Abbiamo quindi voluto osservare come si posizionasse la popolazione Desulese rispetto ad altre 20 popolazioni che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (Alakoc et al. 2010; Brisighelli et al. 2012; Fadhlou-Zid et al. 2004; Ferri et al. 2009; Frigi et al. 2006; Kovatsi et al. 2009; Onofri et al. 2007; Palet et al. 2010; Piglionica et al. 2013; Robino et al. 2006; Sánchez et al. 2007; Triki-Fendri et al. 2013).

Mediante il MDS (Fig.11), costruito a partire dalla matrice delle distanze genetiche elaborata secondo il metodo di Slatkin, è possibile osservare la formazione di un cluster esclusivamente Sardo. Carloforte si colloca, invece, fuori da questo cluster e in prossimità delle popolazioni

italiane. La prima componente evidenzia, inoltre, una significativa differenziazione tra le popolazioni Africane da quelle del resto del Mediterraneo.

PCA E SPCA

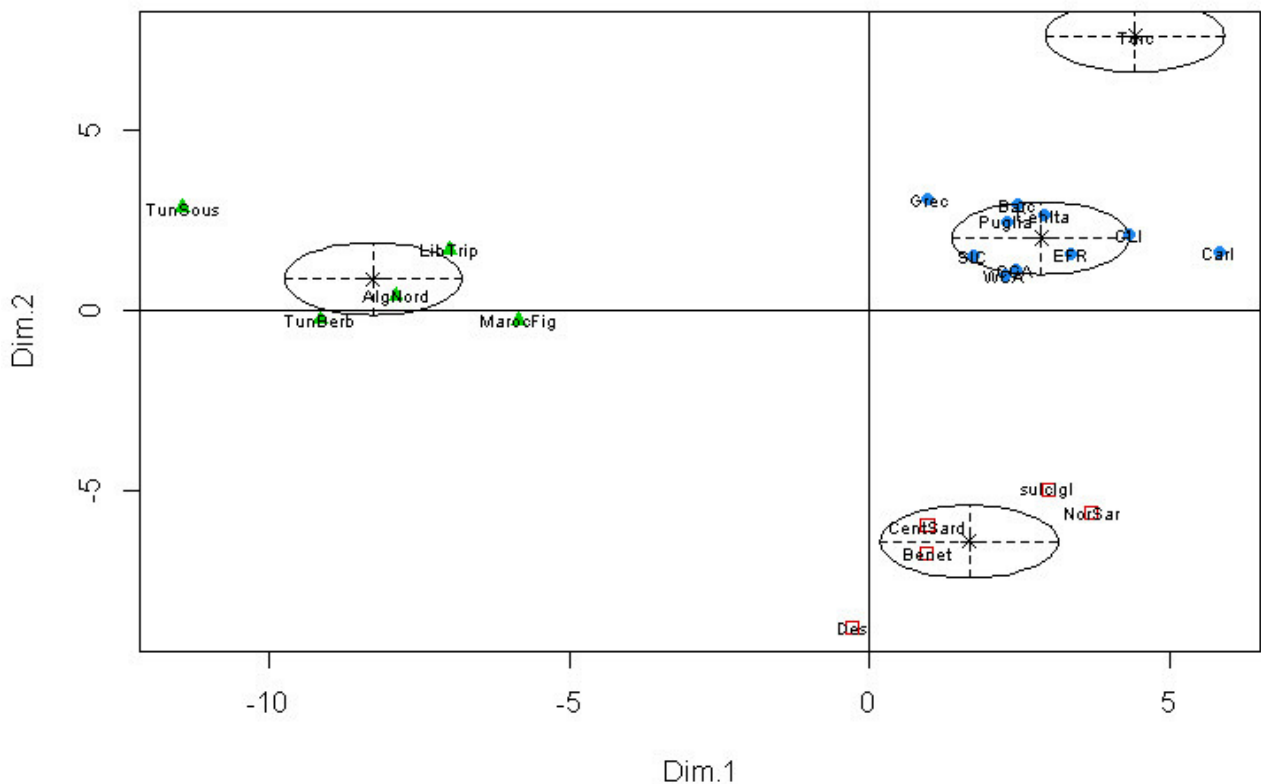


Fig.12 PCA confronto popolazioni Sarde con popolazioni che si affacciano sul Mediterraneo

Des=Desulo, Benet=Benetutti, CentSard=Centro Sardegna, NorSard=Nord Sardegna, SulcIgl=Sulcis, Carl=Carloforte, Barc=Barcellona, Ture=Turchia, CLI=Liguria, EFR=Friuli, CenIta=Centro Italia, Puglia=Puglia, CCA=Campania, SIC=Sicilia, WCAL=Calabria, Grec=Grecia, MarocFig= Marocco, LibTrip= Libia, AlgNord=Algeria, TunSous= Tunisia Sousse, TunBe= Berberi della Tunisia

Si è voluto quindi, analizzare, il grado di differenziazione esistente tra le popolazioni Sarde e le restanti popolazioni del Mediterraneo anche mediante l'osservazione delle componenti principali ottenute tramite PCA (Fig.12).

In questo caso la prima componente principale è in grado di spiegare esclusivamente il 19.34% della varianza totale, mentre la seconda componente il 12.62%, per un totale di circa 32% della variabilità spiegata mediante tale rappresentazione grafica.

È possibile rilevare il raggruppamento delle popolazioni in quattro cluster.

Desulo clusterizza accanto alle popolazioni sarde, separate del resto delle popolazioni mediterranee dalla seconda componente, mentre la prima componente permette di osservare la differenziazione esistente tra le popolazioni Nord Africane dalle altre popolazioni prese in esame. Un terzo cluster è determinato da popolazioni prevalentemente italiane, accanto alle quali si posiziona però anche la popolazione Greca e Spagnola (Barcellona) e la popolazione sarda di Carloforte. La Turchia appare invece isolata rispetto al resto delle popolazioni analizzate.

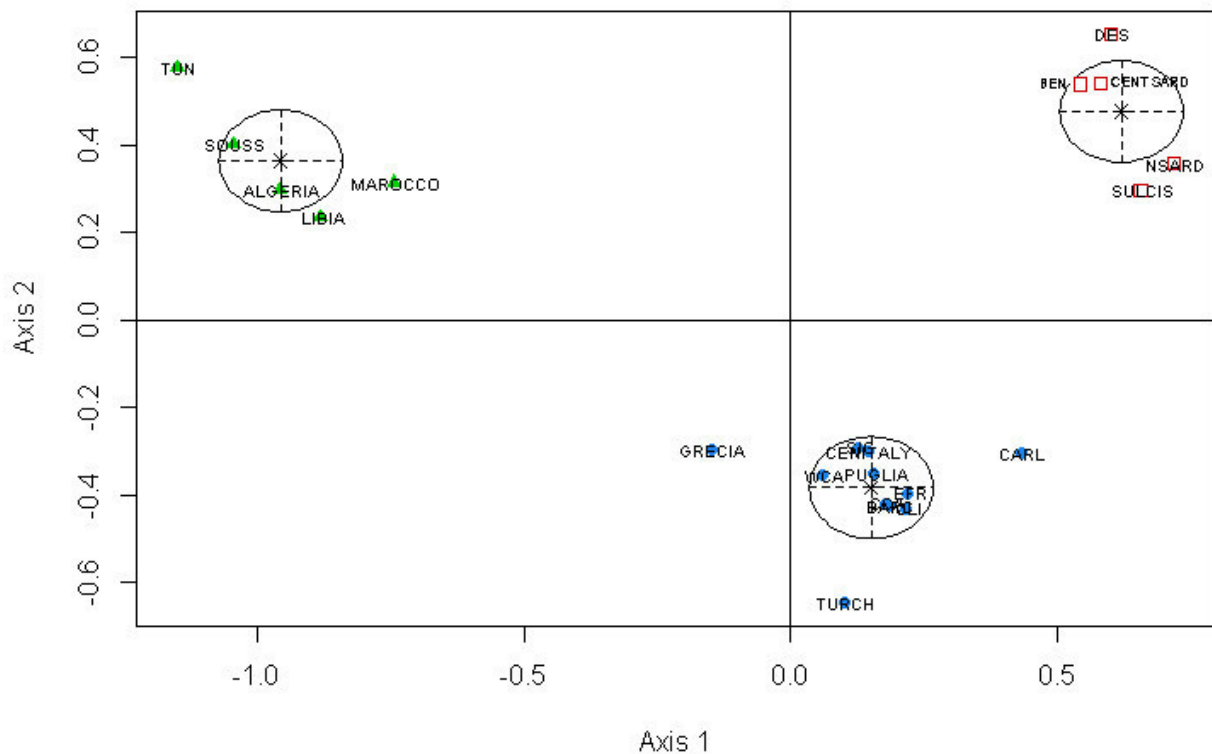


Fig.13 sPCA confronto tra popolazioni Sarde e popolazioni chi si affacciano nel Mediterraneo

Attraverso la PCA spaziale (Fig.13) elaborata tramite il software R con l'utilizzo del package Adegenet è stato possibile confrontare le popolazioni Sarde con altre popolazioni che si affacciano sul bacino del Mediterraneo non solo in base alla loro frequenza aplotipica, come nel caso della PCA classica, ma tenendo conto anche della localizzazione spaziale delle popolazioni prese in esame.

Anche in questo caso abbiamo la formazione di 3 cluster principali: uno prevalentemente sardo, uno prevalentemente italiano (con l'inclusione della Grecia, Spagna e Turchia), accanto al quale possiamo rilevare la popolazione di Carloforte, e un cluster di popolazioni Nord Africane.

La somma della varianza spiegata dalle due componenti principali supera il 50% della varianza totale. (33.6% la prima componente e 17,4% la seconda componente).

Mediante la sPCA è inoltre possibile indagare la presenza di pattern spaziali determinati dalla variabilità genetica delle popolazioni sotto indagine. L'esistenza di un pattern globale indica la presenza di differenziazione genetica tra popolazioni geograficamente distanti, mentre la presenza di un pattern locale indica una maggiore differenziazione osservabile tra popolazioni limitrofe piuttosto che tra popolazioni distanti geograficamente. In questo caso si è potuta osservare la presenza di un pattern globale (p-value= 0.01) e l'assenza di pattern locali (p-value=1).

ANALISI DEGLI APLOGRUPPI

APLOGRUPPI RILEVATI A DESULO E NEL CENTRO SARDEGNA

Mediante l'utilizzo del programma Haplogroup predictor (<http://www.hprg.com/hapest5/>), partendo dagli stati aplotipici dei campioni analizzati, è stato possibile determinare gli aplogruppi presenti nella popolazione di Desulo e nella popolazione di confronto (Centro Sardegna).

Quando il software ha prodotto un'attribuzione incerta dell'aplogruppo essi sono stati determinati mediante analisi degli SNPs.

I risultati sono mostrati nelle Fig 14 e Fig 15.

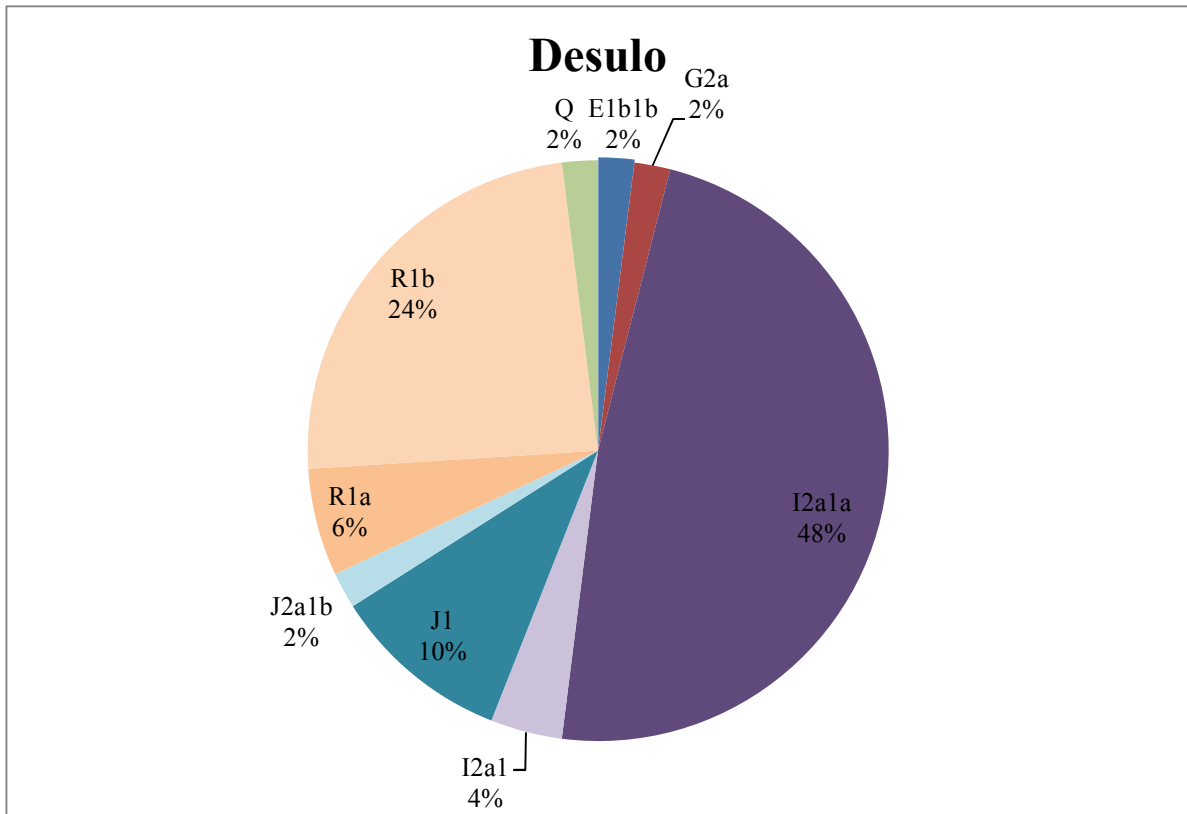


Fig.14 Grafico a torta delle frequenze degli aplogruppi rilevati Desulo.

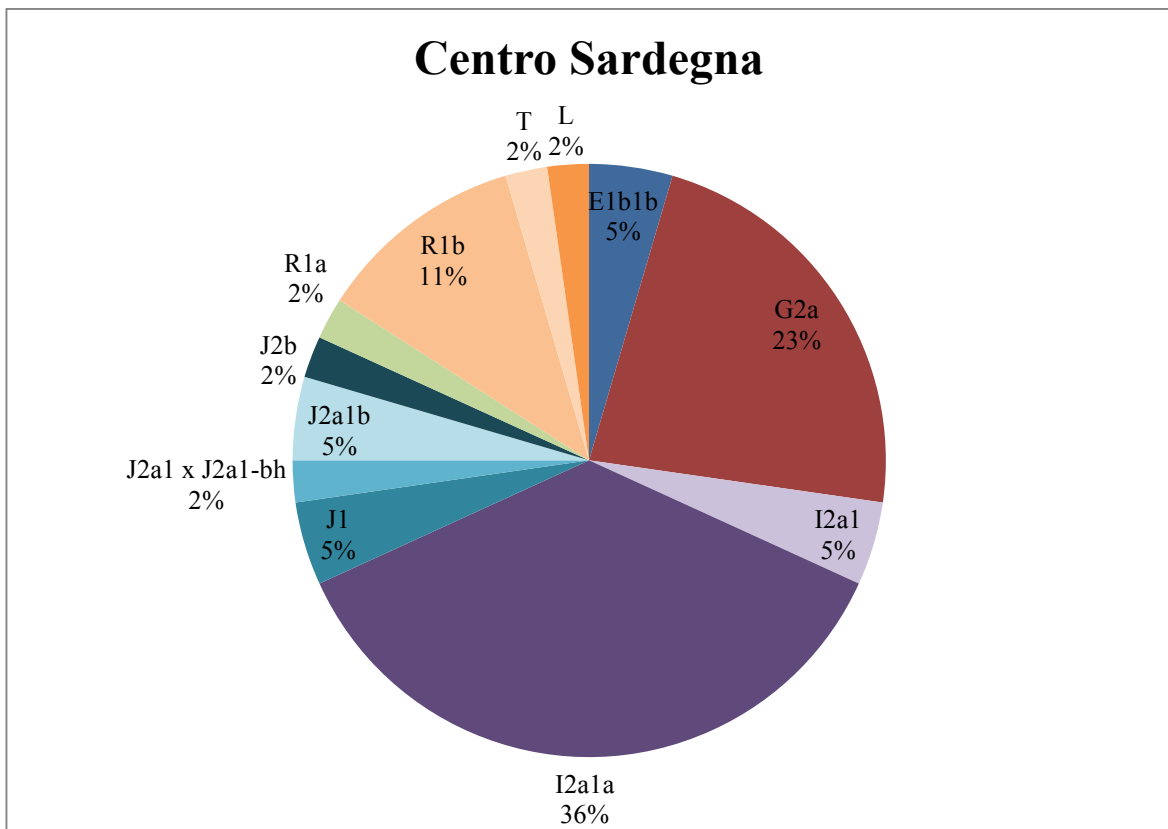


Fig.15 Grafico a torta delle frequenze degli aplogruppi rilevati nel Centro Sardegna.

Come si può notare il campione di controllo (Centro Sardegna) mostra una maggiore ricchezza di aplogruppi rispetto al campione di Desulo. È possibile osservare inoltre, che, per quanto riguarda gli aplogruppi condivisi esistono differenze sostanziali nelle frequenze rilevate (Tab.22).

Aplogruppi condivisi	Freq Desulo	Freq Centro Sard
R1b	24 %	11 %
R1a	6 %	2 %
E1b1b	2 %	5 %
G2a	2 %	23 %
I2a1a	48 %	36 %
I2a1	5 %	4 %
J1	10 %	5 %
J2a1b	2 %	5 %

Tab.22 Frequenze aplogruppi condivisi tra le popolazioni di Desulo e Centro Sardegna

L'aplogruppo più frequente in entrambi i campionamenti è sempre l'aplogruppo I2a1a (48 % nella popolazione Desulese e 36 % nel Centro Sardegna).

SURFER

Mediante il software Surfer è stato possibile costruire delle mappe in cui è visualizzabile il clino di distribuzione seguito dalle frequenze degli aplogruppi rilevati nelle diverse popolazioni che si affacciano sul bacino del Mediterraneo.

Tutti gli aplogruppi analizzati con le relative frequenze sono riportati in Tab.23

popolazione	_DE- M1	_JU- M429	A3- M32	B2a- M150	C3- M217	E1a*	e1b1b1*	EM40	F	G2a	H1a	I1	I2- M438	I2a	I2b	J1	J2	K	L1	N1	O*	P	Q1*	R1a1a*	R1b*	R2a*	T*
Calabria	3,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,70	0,00	7,41	0,00	3,70	0,00	3,70	0,00	0,00	29,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,70	7,41	14,81	3,70	3,70
Liguria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,33	0,00	4,44	4,44	2,22	0,00	2,22	6,67	0,00	2,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	42,22	0,00	4,44
Campania	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,68	0,00	3,23	3,23	3,23	0,00	6,45	19,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,45	29,03	0,00	3,23
Sicilia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,93	0,00	0,00	0,00	7,14	0,00	5,36	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,36	30,36	0,00	0,00
Friuli	2,13	2,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,26	0,00	8,51	0,00	10,64	0,00	0,00	10,64	0,00	2,13	0,00	0,00	0,00	0,00	12,77	40,43	0,00	0,00
Nord Italia	0,00	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	13,64	0,00	4,55	0,00	1,30	0,00	0,00	11,04	0,00	3,90	0,00	0,00	0,00	0,65	5,19	46,75	0,00	1,30
Centro Italia	0,62	1,85	0,00	0,00	0,00	0,62	19,14	0,00	1,23	11,73	0,00	2,47	1,85	0,62	0,00	3,09	14,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	0,62	36,42	0,00	2,47
Puglia	2,06	1,03	0,00	0,00	0,00	0,00	19,59	0,00	0,00	11,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,09	15,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,12	34,02	0,00	5,15
Benetutti	0,00	2,08	0,00	0,00	0,00	4,17	10,42	0,00	0,00	12,50	0,00	0,00	0,00	39,58	0,00	4,17	14,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,17	2,08	2,08
Carloforte	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,88	0,00	0,00	9,76	0,00	4,88	0,00	0,00	0,00	2,44	4,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	53,66	0,00	2,44
Nord Sardegna	2,70	5,41	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	0,00	2,70	13,51	0,00	8,11	0,00	24,32	0,00	0,00	18,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,92	2,70	0,00
Sulcis Iglesiente	4,17	4,17	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	0,00	0,00	14,58	0,00	0,00	0,00	31,25	0,00	0,00	10,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	0,00	0,00
Desulo	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	6,00	42,00	2,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	34,00	0,00	0,00
Centro Sardegna	0,00	2,27	0,00	0,00	0,00	4,55	4,55	0,00	0,00	15,91	0,00	0,00	6,82	34,09	0,00	4,55	9,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27	13,64	2,27	0,00
Bacellona	0,41	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	9,80	0,00	0,82	3,67	0,00	2,86	0,41	4,08	0,00	2,04	5,71	0,00	1,22	0,00	0,82	0,41	0,00	1,22	62,04	0,00	0,41
Berberi Tunisini	2,13	0,00	0,00	4,26	0,00	0,00	57,45	0,00	0,00	2,13	0,00	2,13	0,00	0,00	0,00	27,66	2,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,13
Tunisini Sousse	0,46	0,46	0,46	0,00	0,00	0,00	56,42	0,00	0,46	0,92	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	25,23	8,26	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	4,59	0,00	1,38
Marocco Figuig	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,77	44,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,85	15,38	0,00	0,00
Turchia	2,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,91	0,00	0,00	3,60	0,00	0,72	0,72	0,72	0,00	0,00	39,57	0,72	10,07	6,47	0,72	0,00	1,44	4,32	12,95	2,88	0,00
Libia	0,57	0,00	1,14	0,00	0,57	0,00	45,45	0,00	0,00	3,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,41	7,39	0,00	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	1,70	5,68	0,00	3,41
Algeria	0,00	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	57,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,55	4,90	0,00	0,00	0,00	0,98	0,98	0,98	10,78	0,00	0,00	
Grecia	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,52	29,84	0,00	1,57	6,81	0,52	0,52	0,00	10,47	0,00	7,33	15,71	0,00	3,14	0,52	0,00	0,52	0,00	8,90	9,95	0,00	1,57

Tab.23 Popolazioni e frequenze aplogruppi analizzati nel bacino del Mediterraneo

I principali risultati ottenuti mediante Surfer sono mostrati nelle Fig dalla 16 alla 27.

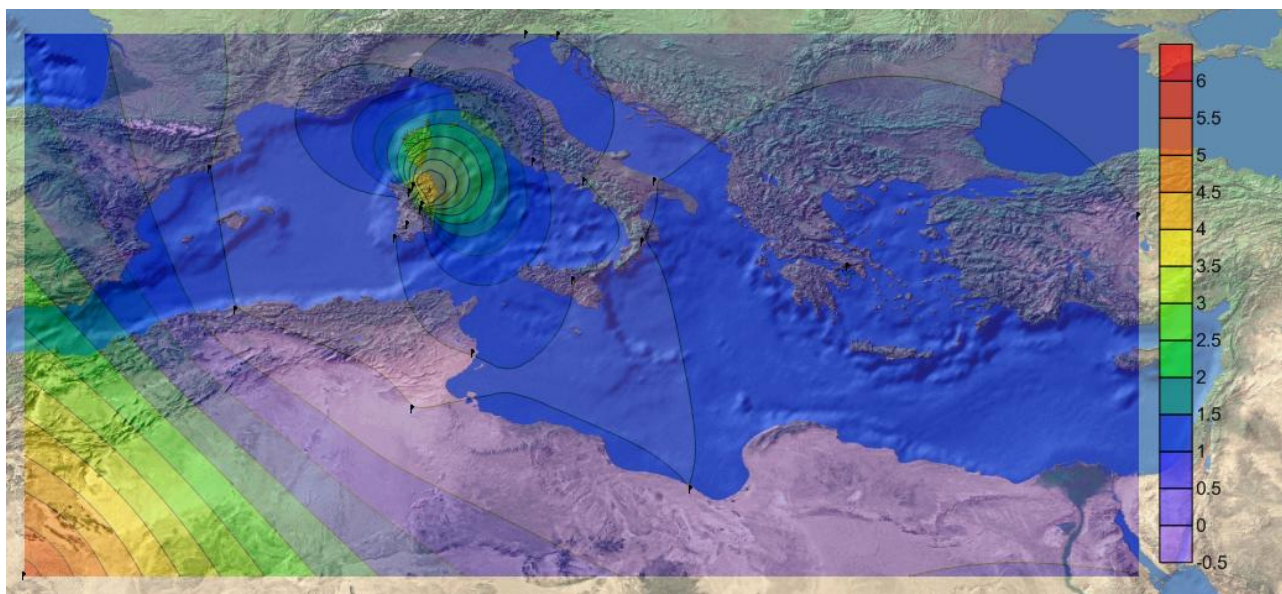


Fig.16 Distribuzione aplogruppo E1a

L'aplogruppo E1a appare presente con frequenze di circa il 5% nelle popolazioni del Marocco e di Benetutti .

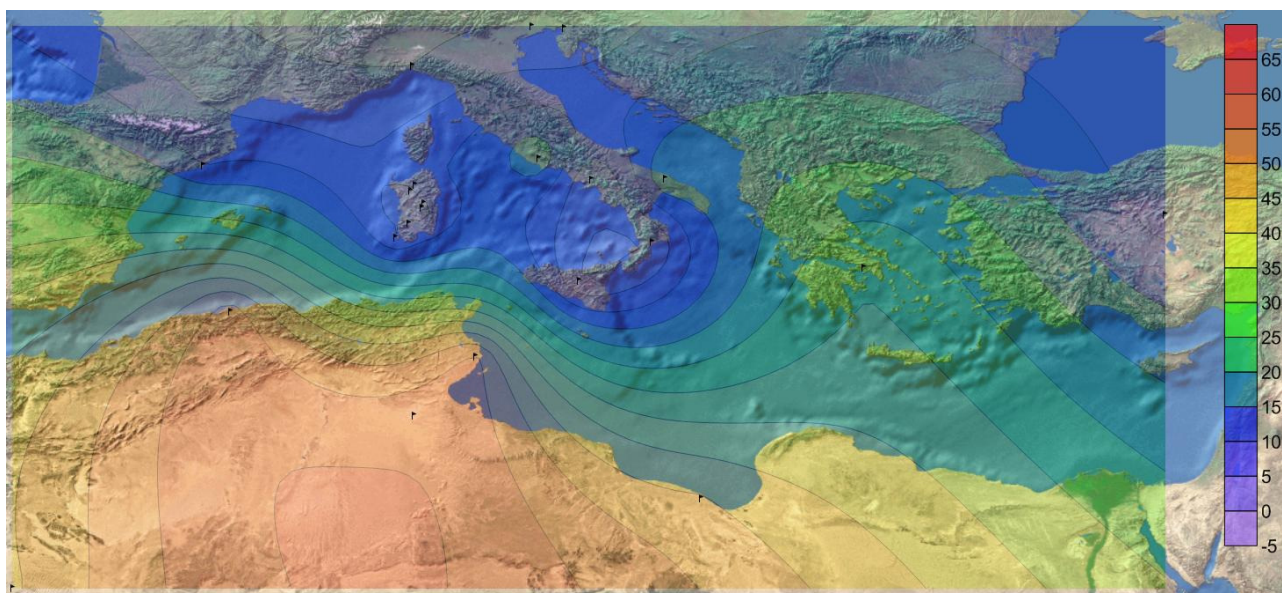


Fig.17 Distribuzione aplogruppo E1b1b

L'Aplogruppo E1b1b è stato osservato prevalentemente nel nelle popolazioni del Nord Africa (le frequenze maggiori sono state rilevate in Tunisia 57% e in Libia 47%) ma appare presente,

seppur con frequenze inferiori anche nel Sud Italia dove raggiunge il 19% in Puglia. In Sardegna il picco massimo è stato rilevato a Benetutti (10%).

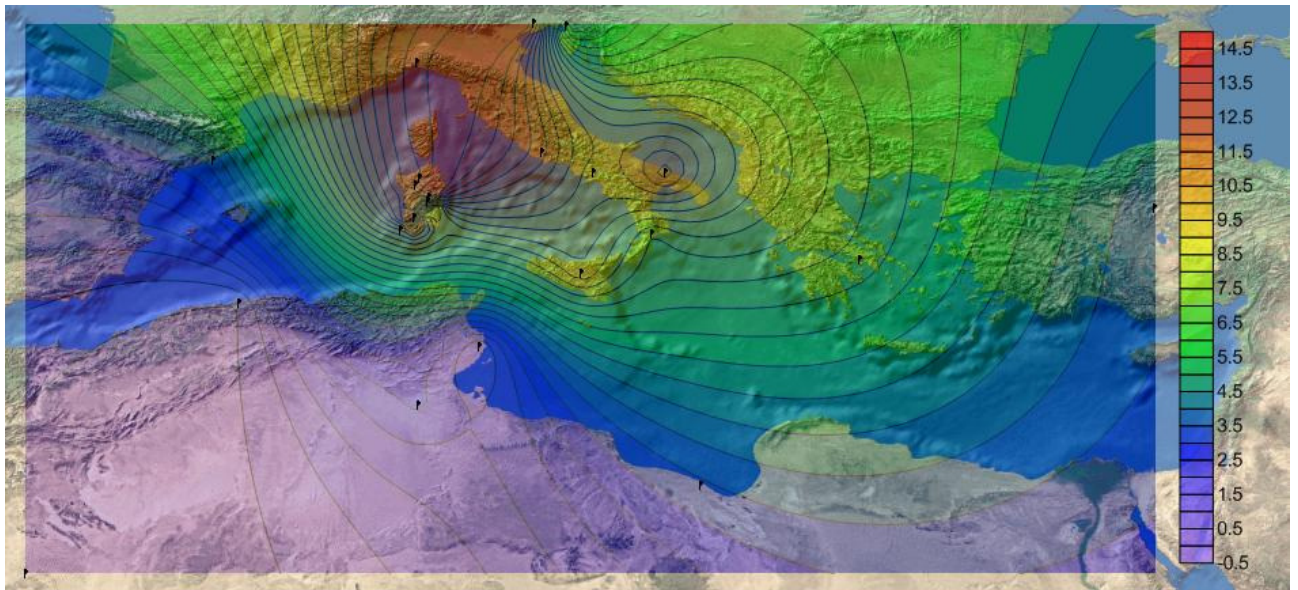


Fig.18 Distribuzione aplogruppo G2a

L'Aplogruppo G2a appare presente, con frequenze variabili, in tutte le popolazioni analizzate ad esclusione del Marocco e dell'Algeria del Nord .

La sua frequenza massima è stata rilevata nel Sulcis Iglesiente in Sardegna (16%). Esso sembra mostrare un cline che dell'Italia Centro-Settentrionale si irradia verso il resto d'Europa

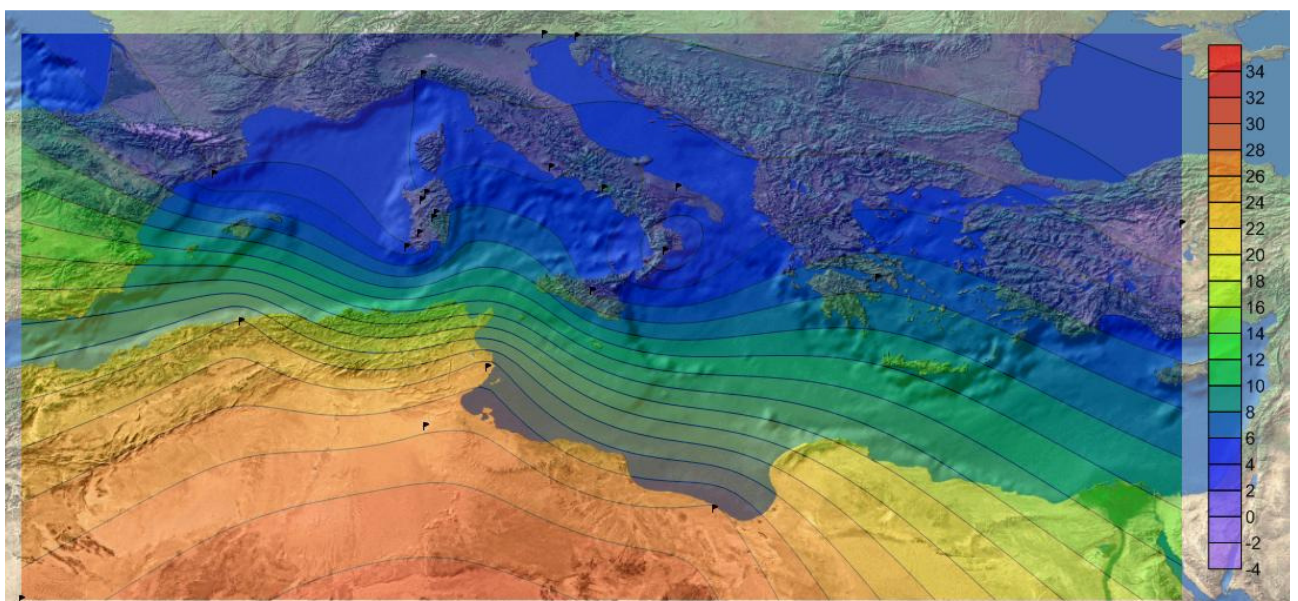


Fig.19 Distribuzione aplogruppo J1

L'aplogruppo J1 è presente in elevate frequenze tra le popolazioni del Nord Africa (circa il 27%) e mostra un cline discendente se ci spostiamo verso le popolazioni dell'Europa e verso la Grecia e il Medio Oriente, tra le quali la frequenza dell'aplogruppi J1 oscilla intorno al 2-3 %.

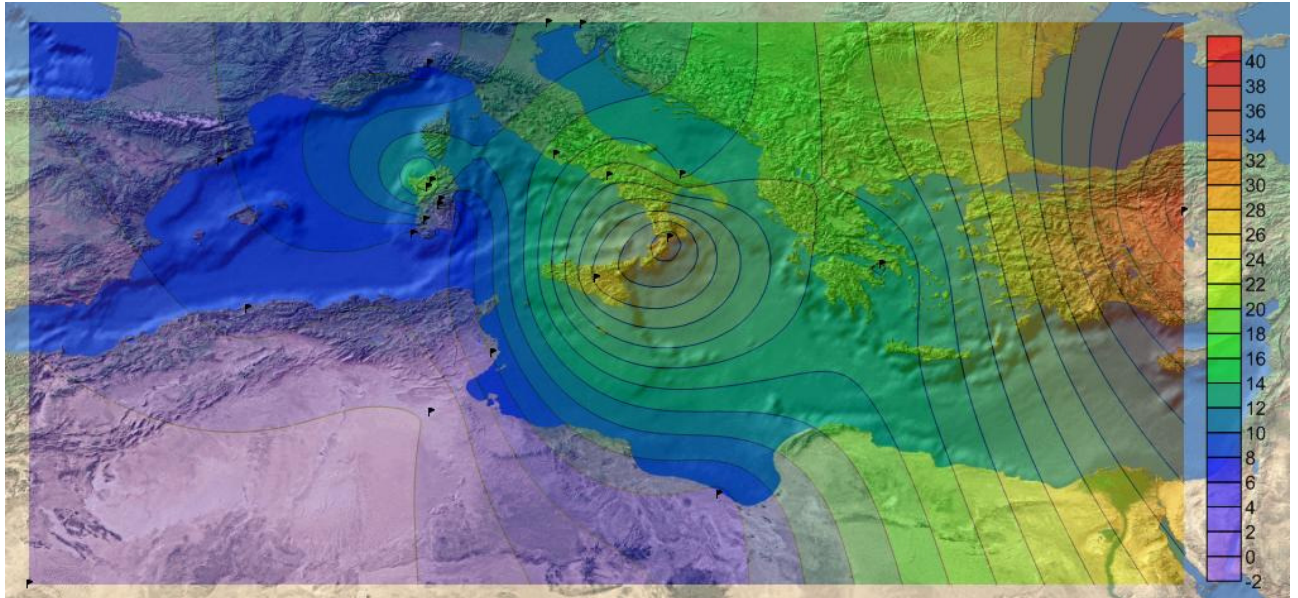


Fig.20 Distribuzione aplogruppo J2

L'aplogruppo J2 è stato rilevato in tutte le popolazioni analizzate ad esclusione che nella popolazione Desulese e Marocchina. La sua frequenza mostra una andamento Est-Ovest (con il valore massimo del 39 % raggiunto dalla popolazione Turca). In Italia le popolazioni in cui l'aplogruppo risulta essere maggiormente presente sono state quelle meridionali (circa 25%), mentre al Nord la sua frequenza oscilla intorno al 10 %.

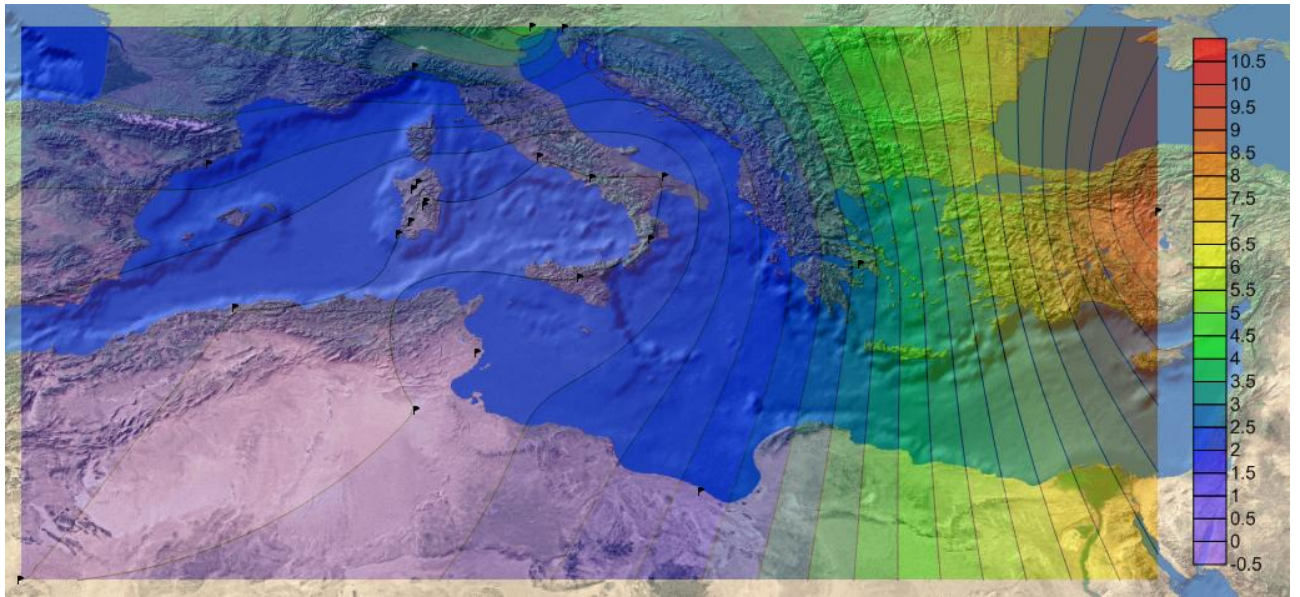


Fig.21 Distribuzione aplogruppo L1

L'aplogruppo L1 mostra frequenze estremamente basse in tutto il bacino del mediterraneo (0-2%). La sua frequenza massima è stata rilevata in Turchia (10%).

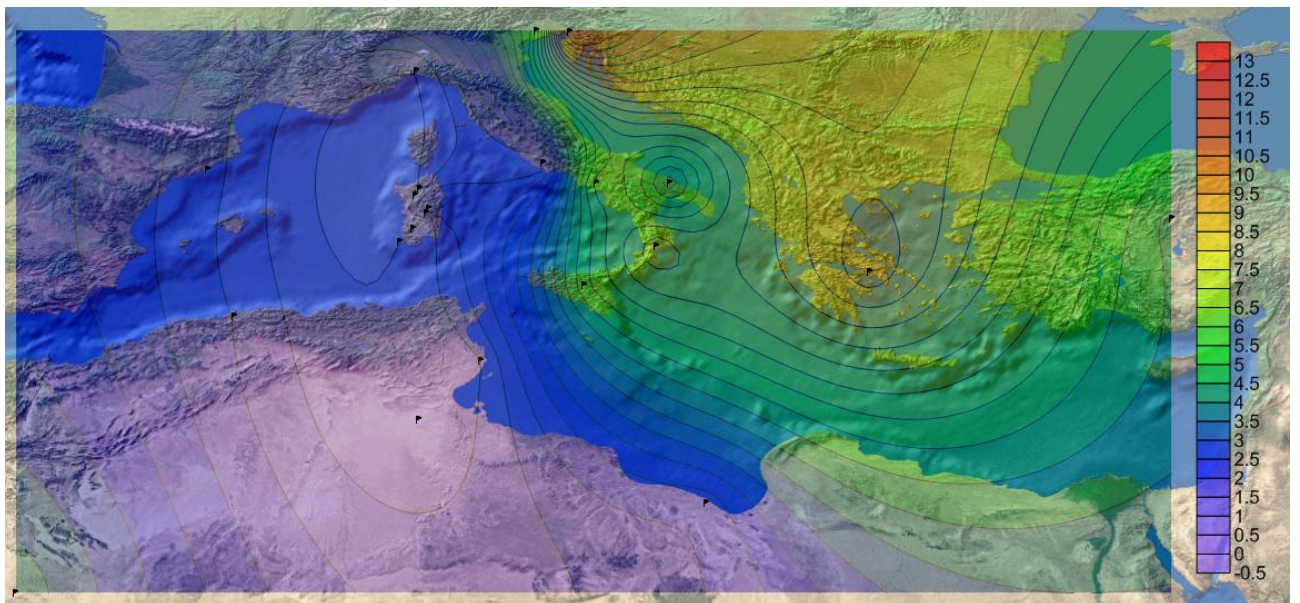


Fig.22 Distribuzione aplogruppo R1a1a

L'aplogruppo R1a1a mostra un cline che dalla Grecia (9%) e dal Friuli (12%) degrada verso l'Europa Occidentale. In Sardegna questo aplogruppo è assente in tutte le popolazioni analizzate ad esclusione del Centro Sardegna (2%).

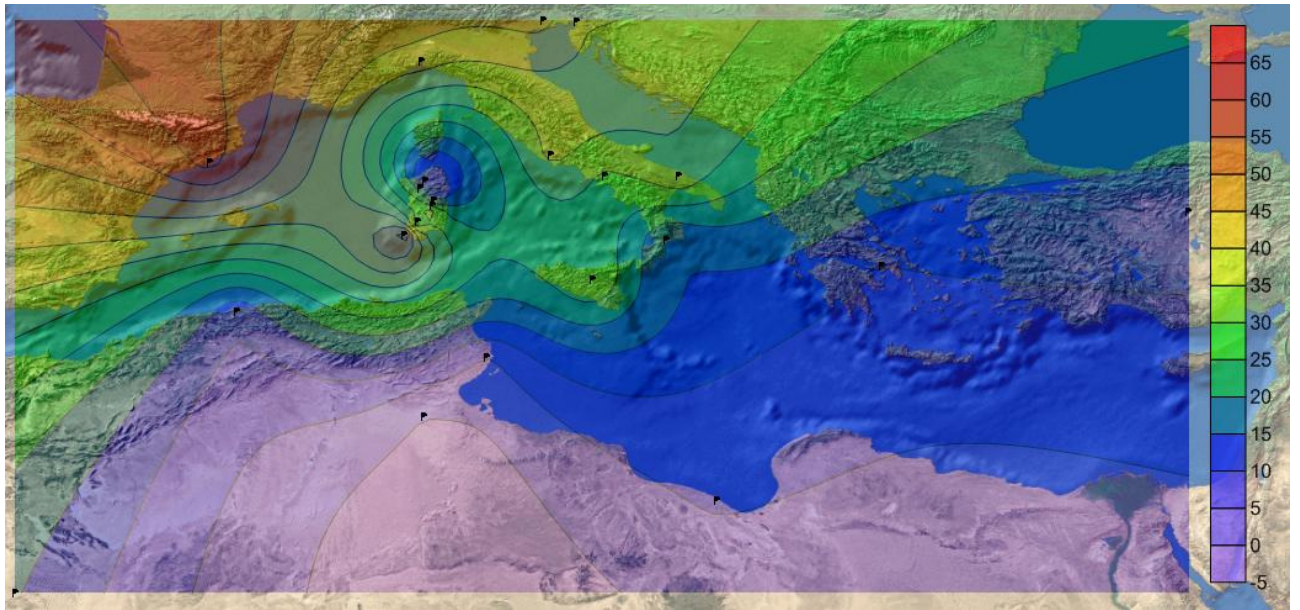


Fig.23 Distribuzione aplogruppo R1b

L'aplogruppo R1b è presente in tutte le popolazioni esaminate ad esclusione che tra i Berberi del Marocco. Mostra un andamento Ovest-Est, raggiungendo la sua frequenza massima tra la popolazione di Barcellona (62%) e Carloforte (53%). In Europa mostra una frequenza media del 35% mentre nel Nord Africa difficilmente supera il 10 %.

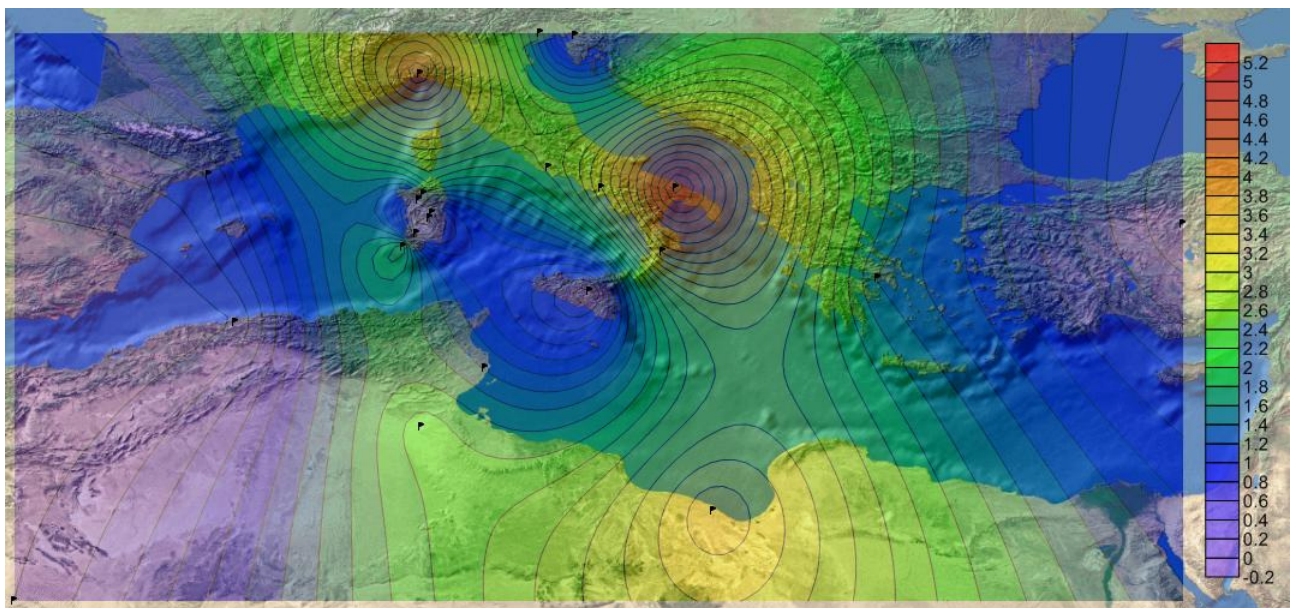


Fig.24 distribuzione aplogruppo T

L'aplogruppo T, è presente, seppur con basse frequenze, in tutto il bacino del Mediterraneo. Le sue frequenze maggiori sono state registrate in Liguria (4%) e Puglia (5%).

In Sardegna questo aplogruppo è stato rilevato solo a Carloforte e Benetutti con frequenze di circa il 2%, mentre a Desulo, Nord Sardegna, Centro Sardegna e Sulcis non è stato osservato.

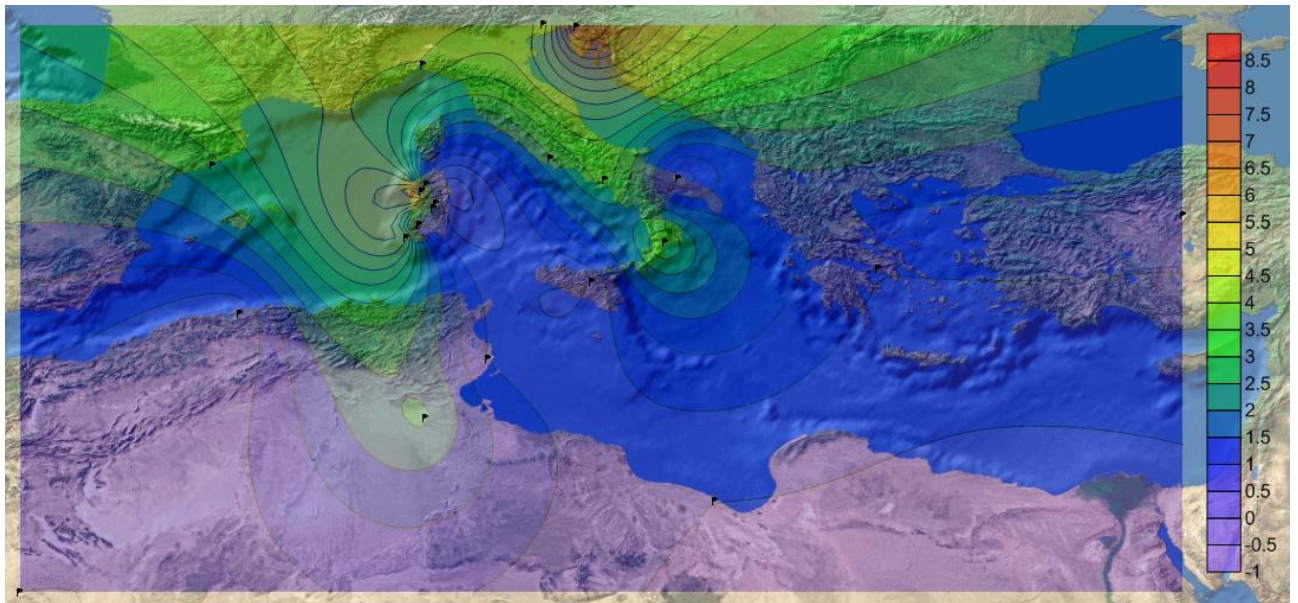


Fig.25 Distribuzione aplogruppo I1

L'aplogruppo I1 è stato rilevato principalmente in Friuli e nel Nord Sardegna con frequenze di circa 8 %. Nella penisola Italiana è stato rinvenuto in tutte le popolazioni analizzate anche se con frequenze inferiori (circa 4%), mentre è praticamente assente nel Nord Africa ad esclusione delle popolazioni Berberi della Tunisia, tra i quali è stata osservata una frequenza pari al 2 %.

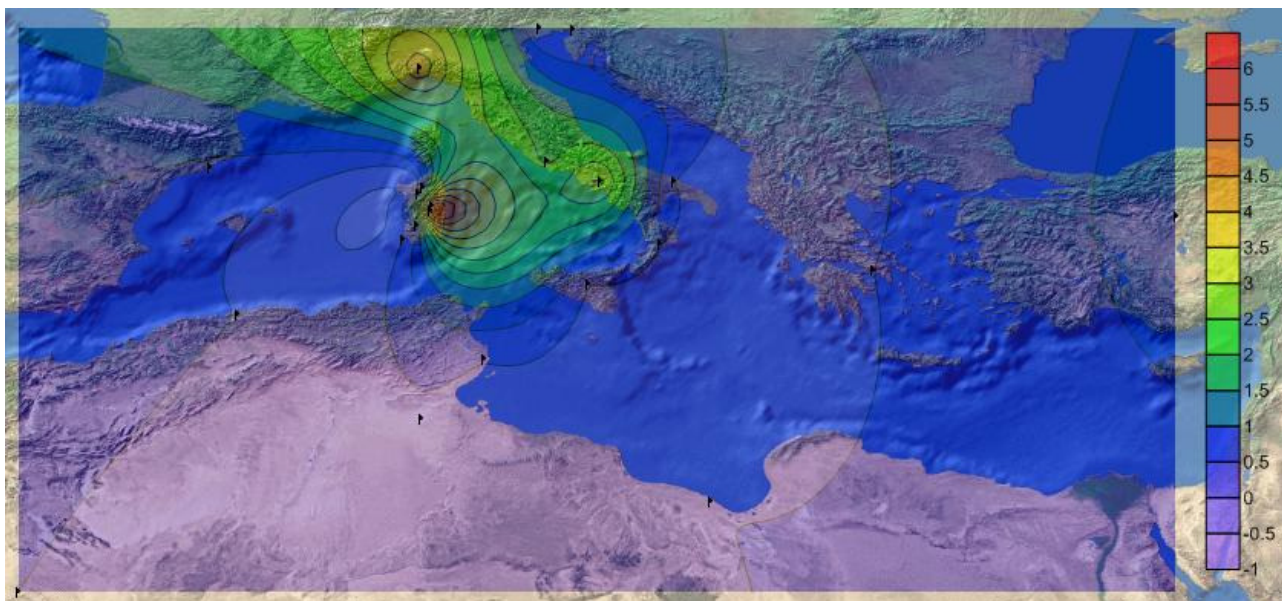


Fig.26 Distribuzione aplogruppo I2

L'aplogruppo I2 è particolarmente frequente a Desulo e nel Centro Sardegna (circa 6%). Tra la popolazione Italiana la sua frequenza si aggira intorno al 2 %, ad esclusione della Liguria nella quale l'aplogruppo I2 è stato rilevato con frequenze pari al 4,4%. È invece praticamente assente tra le popolazione del Nord Africa e del Medio Oriente.

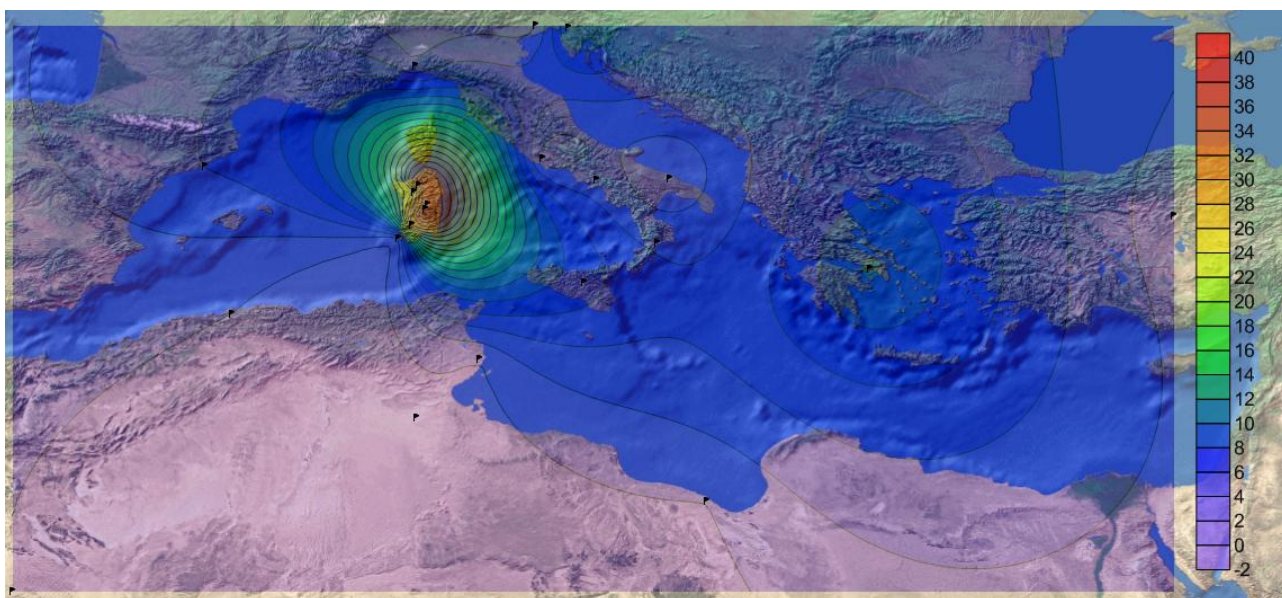


Fig.27 Distribuzione aplogruppo I2a

L'aplogruppo I2a è stato rilevato con frequenze pari al 42 % a Desulo, e sempre superiori al 35 % in tutte le popolazioni sarde analizzate, ad esclusione della popolazione di Carloforte in cui non è stato rilevato alcun campione portatore di tale aplogruppo. Nel resto del bacino del Mediterraneo questo aplogruppo è presente con frequenze inferiori al 10 %.

APPROFONDIMENTO DELLA LINEA I2A

Per quanto riguarda le popolazioni Sarde è stato possibile approfondire i sottoaplogruppi della linea I2a, mediante l'analisi di 9 SNPs (P214, M26, L160, PF4124, 18866539, PF4258, PF4461, 21841733 e M161) scelti opportunamente. (Fig.28)

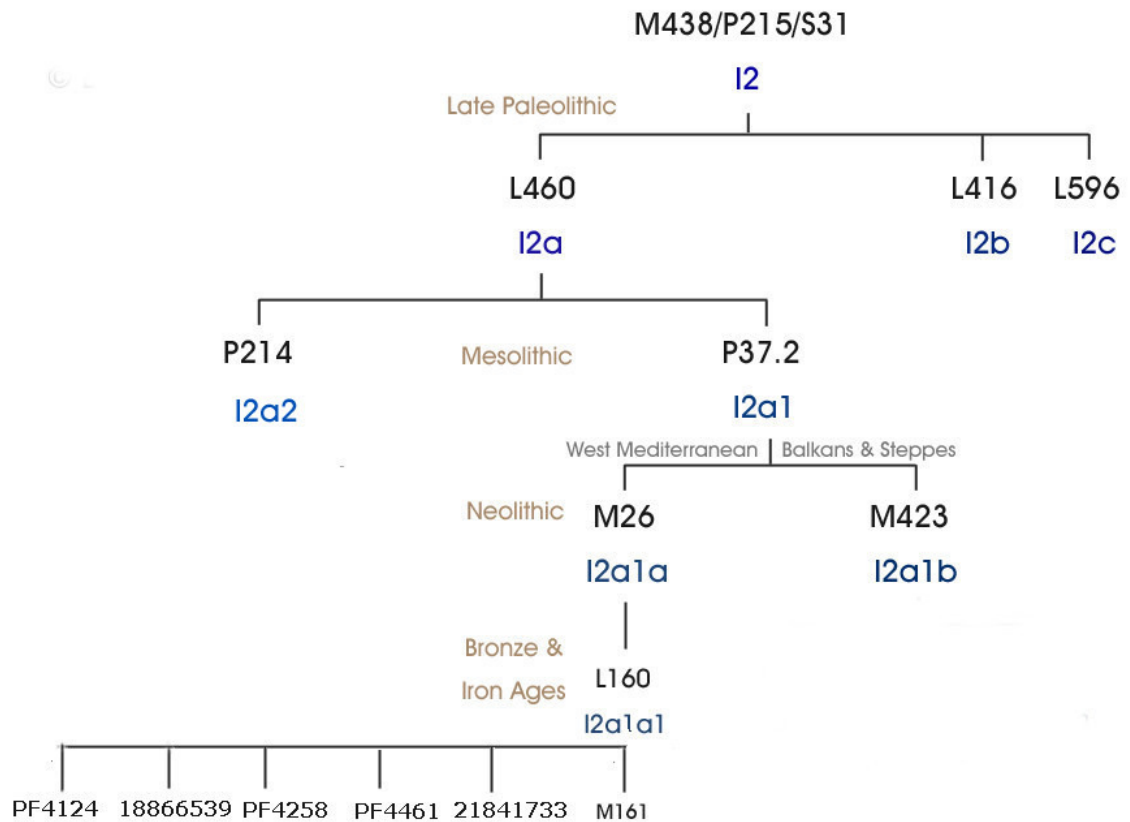


Fig.28 Schema SNPs analizzati per approfondimento linea I2a.

Tutti gli individui portatori della mutazione L460, che identifica l'aplogruppo I2a, appartengono al subclade I2a1 in quanto sono tutti risultati negativi per la mutazione P214 che identifica l'aplogruppo I2a2. È stato inoltre osservato che gli individui portatori della mutazione M26 possiedono sempre la mutazione L160.

Sono stati inoltre considerati appartenenti all'aplogruppo I2a1a1 (mutazione L160) gli individui i quali sono risultati negativi per le mutazioni PF4124, 18866539, PF4258, PF4461, 21841733 e M161.

La distribuzione delle frequenze delle mutazioni analizzate sono visualizzabili nelle Fig.29,30,31,32,33.

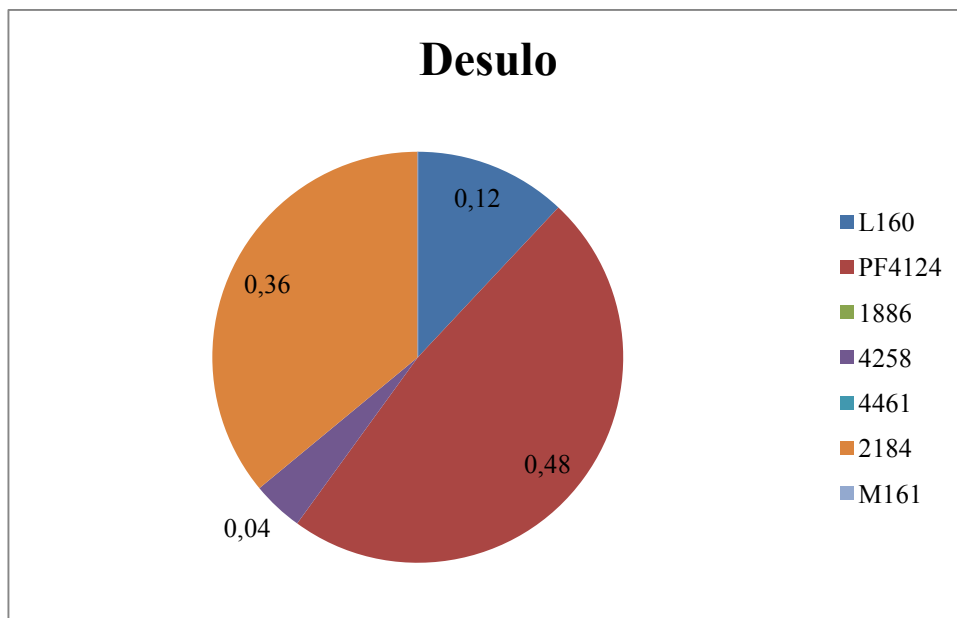


Fig.29 Frequenze degli SNPs che identificano i 6 subclade dell'aplogruppo I2a1a1 nella popolazione di Desulo

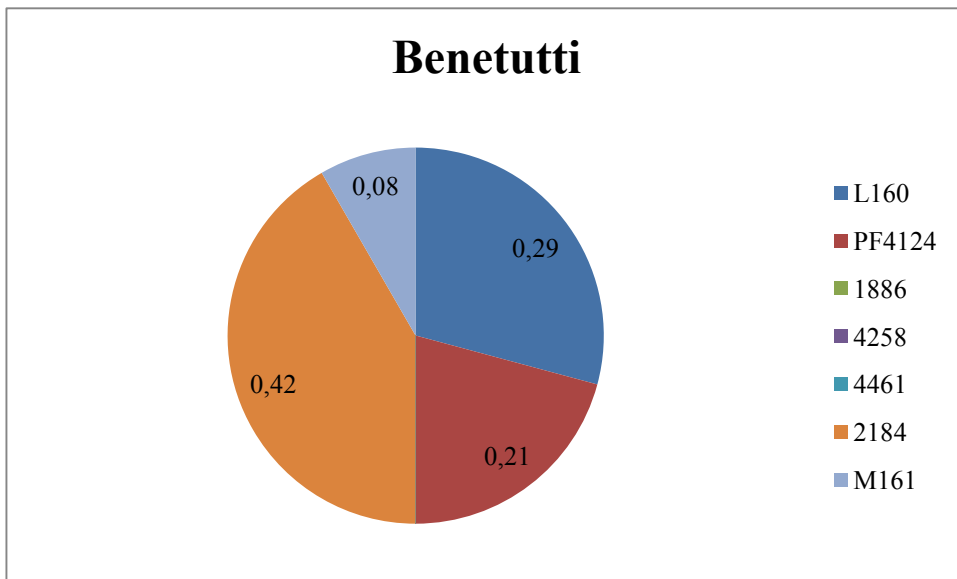


Fig.30 Frequenze degli SNPs che identificano i 6 subclade dell'aplogruppo I2a1a1 nella popolazione di Benetutti

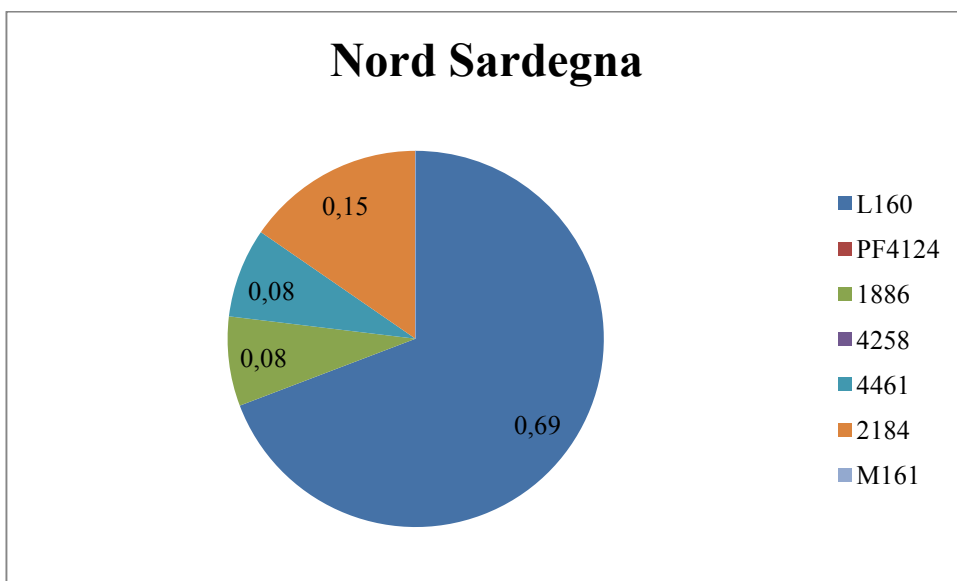


Fig.31 Frequenze degli SNPs che identificano i 6 subclade dell'aplogruppo I2a1a1 nella popolazione del Nord Sardegna

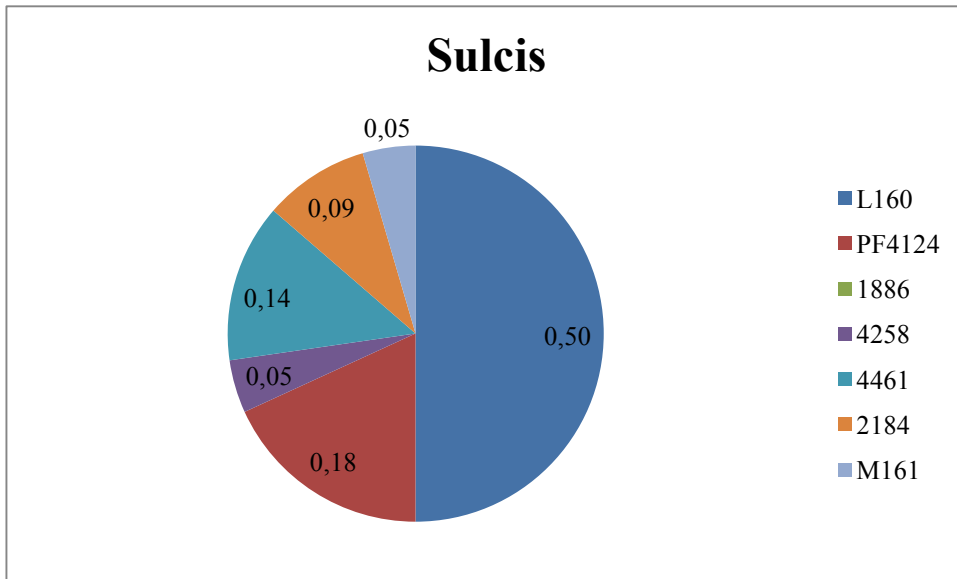


Fig.32 Frequenze degli SNPs che identificano i 6 subclade dell'aplogruppo I2a1a1 nella popolazione del Sulcis

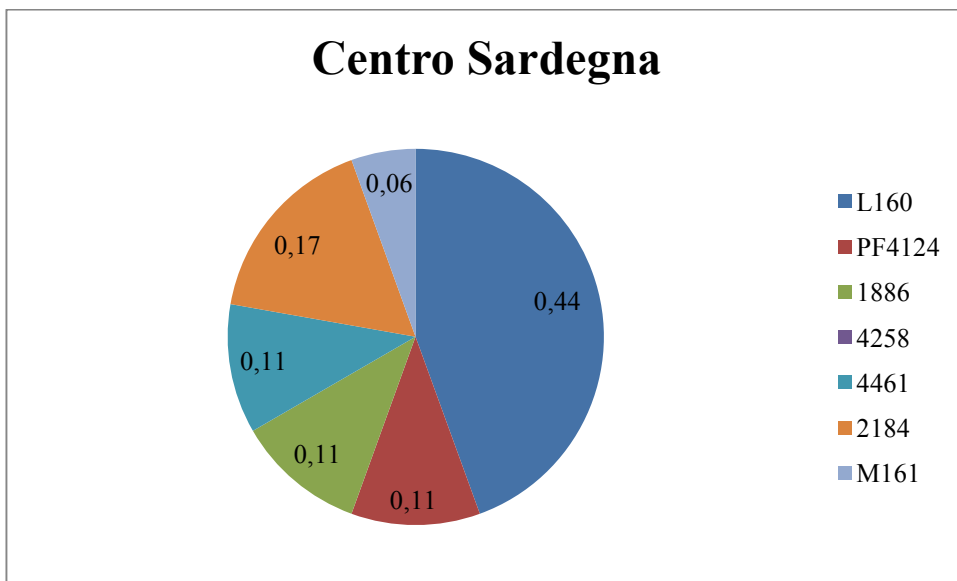


Fig.33 Frequenze degli SNPs che identificano i 6 subclade dell'aplogruppo I2a1a1 nella popolazione del Centro Sardegna.

È stato inoltre effettuato il test di differenziazione a coppie di popolazioni mediante il software Arlequin (ver. 3.5.1.2).

I risultati sono mostrati nella Tab.24.

	Desulo	Centro Sardegna	Benetutti	Nord Sardegna
Centro Sardegna	0.00264			
Benetutti	0.08369	0.11373		
Nord Sardegna	0.00014	0.84693	0.01351	
Sulcis	0.00127	0.78975	0.03515	0.48425

Tab.24. Confronto a coppie a partire dalle frequenze delle mutazioni che identificano i subclade dell'aplogruppo I2a1a1. I p-value significativi sono mostrati in grassetto.

Vediamo che Desulo si differenzia significativamente dalla popolazione di confronto (Centro Sardegna), dal Nord Sardegna e Sulcis, mentre Benetutti mostra delle differenze statisticamente significative solo quando confrontato con il Nord Sardegna e con il Sulcis.

DISCUSSIONE

La Sardegna è stata spesso utilizzata per indagini di tipo popolazionistico poiché è stato più volte osservato, in letteratura (Calò et al. 2013, 2012; Calò e Vona 2005; Capocasa et al. 2014; Cappello et al. 1996; Francalacci et al. 2003, 2013; Robledo et al. 2009; Vona 1995), che essa mostra una sua peculiarità genetica quando confrontata con altre popolazioni europee. È stata riscontrata, inoltre, un' elevata eterogeneità interna dovuta probabilmente all'isolamento, agli scarsi flussi genici e agli effetti fondatore e collo di bottiglia, che con molta probabilità si verificarono numerose volte durante la storia Sarda. Molto rilevante è stata sicuramente anche la presenza della malaria nell'isola. Infatti, avendo avuto una differente incidenza nelle diverse aree della Sardegna, contribuì probabilmente alla strutturazione genetica della popolazione Sarda inducendo dei cambiamenti nelle frequenze degli alleli che conferivano protezione nei confronti di questa infezione come nel caso della β -talassemia e alcuni alleli STRs dei geni localizzati sui geni NOS (Bachis et al. 2014; Falchi et al. 2006). In questo lavoro abbiamo voluto analizzare il villaggio di Desulo, localizzato nell'area arcaica della Sardegna (Vona 1995) e per il quale in passato sono stati registrati elevati livelli di endogamia tra 1800 e 1974 pari al 91.36 % e consanguineità 26.27% (Sanna et al. 2004). Il Comune di Desulo mostra, inoltre, altre due curiose peculiarità: esso era originariamente composto dai tre rioni Issiria, Asuai e Ovolaccio i quali coesistevano come tre unità indipendenti. Pare, infatti, che, sino agli anni '20, fossero presenti nel Comune tre chiese e tre cimiteri, e le feste principali fossero proprio quelle di Sant'Antonio, San Basilio e San Sebastiano a cui le tre chiese erano intitolate. La popolazione Desulese, inoltre, praticava la transumanza sino ai primi anni '60. Le mete raggiunte dai pastori erano principalmente il Campidano di Cagliari e Oristano e la zona del Sulcis- Iglesiente.

Partendo, quindi, da questi presupposti si è voluto analizzare la differenziazione della popolazione Desulese a diversi livelli: inizialmente è stato effettuato un confronto con 5 popolazioni Sarde: 2 isolati genetici (Carloforte, Benetutti) e 3 popolazioni aperte (Centro

Sardegna, Nord Sardegna, Sulcis), in particolar modo con lo scopo di verificare se la transumanza possa aver influito sulla struttura genetica della popolazione Desulese portando ad una sua omogeneizzazione genetica con le popolazioni del Sulcis; è stata inoltre analizzata la presenza di micro differenziazione interna del Comune di Desulo, dovuta appunto alla sua originaria suddivisione in rioni; successivamente è stato eseguito un confronto tra la Sardegna e altre popolazioni che si affacciano sul bacino del Mediterraneo per verificare se la peculiarità genetica osservata in precedenti studi venisse confermata anche da questo lavoro.

Per effettuare tali confronti si è proceduto, quindi, alla tipizzazione di 17 STRs (DYS19, DYS385 a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 e Y GATA H4) localizzati sul cromosoma Y.

Questo cromosoma, infatti, essendo presente in singola copia all'interno del cariotipo maschile e non essendo perciò soggetto a ricombinazione genica viene trasmesso per via esclusivamente patrilineare. I polimorfismi del cromosoma Y maggiormente analizzati sono gli alleli STRs, che avendo un tasso di mutazione medio del 0,21% per generazione (de Knijff et al. 1997) sono definiti a evoluzione veloce e permettono di determinare l'aplotipo mentre le mutazioni puntiformi (SNPs), che, per contro, vengono definite ad evoluzione lenta (tasso di mutazione di 3.0×10^{-8} mutazioni nucleotidiche per generazione (Xue et al. 2009)) stabiliscono l'appartenenza dell'individuo analizzato ad un determinato aplogruppo. Appunto grazie alla loro grande variabilità e al loro alto potere discriminante gli aplotipi del cromosoma Y vengono utilizzati sia nelle indagini di tipo forense (identificazione personale), sia in genetica delle popolazioni per stimare i flussi genici intercorrenti tra le popolazioni sotto esame.

L'analisi di questi STRs genererà, per ogni marcatore, un genotipo costituito da un singolo allele ad eccezione dei marcatori DYS385a/b e DYS389I e DYS389II. Particolare è stata la rilevazione, tra gli alleli del locus DYS458, dell'allele non consensus 18.2. La frequenza di tale allele è risultata estremamente elevata se confrontata con quella osservata in altre popolazioni caucasiche

e italiane (0.00317 e 0.014 rispettivamente (Alves et al. 2007b; Ghiani et al. 2009; Myres et al. 2007)), infatti, nella popolazione Desulese raggiunge lo 0.1%, mentre nel Centro Sardegna lo 0.05 %. Questo potrebbe suggerire che l'allele si sia diffuso nel Centro Sardegna per fenomeni di deriva genetica e poi si sia irradiato nel resto dell'isola con le migrazioni e aver raggiunto frequenze elevate in alcune aree a causa dell'effetto fondatore. Inoltre, gli individui portatori dell'allele 18.2 sono gli unici individui appartenenti all'aplogruppo J1. Questo sembra confermare che tale polimorfismo può essere usato efficacemente per discriminare l'aplogruppo, come precedenti ricerche avevano suggerito (Alves et al. 2007b; Ghiani et al. 2009). Sia mediante il MDS che tramite la PCA e sPCA è possibile osservare, oltre a ciò, che le popolazioni Sarde si collocano in un cluster esclusivamente Sardo. Ciò indica una profonda differenziazione tra queste e le altre popolazioni Mediterranee analizzate. Solamente Carloforte, pur essendo localizzata in Sardegna, si accosta alle popolazioni Italiane. Questo accade poiché gli abitanti di Carloforte sono in realtà di origine Ligure (Corrias 2010; Vallebona 1988). È inoltre caratteristica della popolazione Sarda, l'elevata frequenza dell'aplogruppo I2a1a determinato dalla mutazione M26. Nella popolazione Desulese questo aplogruppo raggiunge frequenze di circa il 48%, mentre è molto raro nel resto d'Europa (<5%). L'aplogruppo I, infatti, potrebbe aver giocato un importante ruolo nella ricolonizzazione dell'Europa dopo l'ultimo periodo Glaciale (Ghiani et al. 2009) e in particolar modo l'aplogruppo I2a1a aver raggiunto frequenze elevate in Sardegna a causa dell'evento fondatore avvenuto al momento della colonizzazione dell'isola in epoca pre-Neolitica (Contu et al. 2008; Francalacci et al. 2013; Varesi et al. 2000). Da ciò ci si attenderebbe quindi che questo aplogruppo mostrasse frequenze più elevate nei villaggi che ricadono nell'area arcaica rispetto al resto dell'isola, mentre effettivamente la sua frequenza appare omogenea in tutte le aree studiate (Corrias 2010). Ciò sembrerebbe, quindi, confermare la tesi esposta da Zei et al.,(2003). Infatti anche in questo lavoro era emersa una distribuzione sorprendentemente uniforme delle frequenze dell'M26 in tutte le parti dell'isola, ma che si annullava, rivelando un'elevata eterogeneità della popolazione Sarda e mostrando le

frequenze più elevate della mutazione M26 nell'area arcaica, quando i campioni venivano ridistribuiti secondo la loro provenienza ancestrale (mediante lo studio dei cognomi). Questo dipenderebbe dal fatto che dal 1861 al 1991 le aree montane persero circa il 20% della propria popolazione a favore delle aree pianeggianti, portando quindi a una omogeneizzazione delle frequenze della mutazione M26 (Zei et al. 2003)

Esaminando, inoltre, la differenziazione esistente a livello delle popolazioni Sarde mediante PCA attraverso l'analisi delle frequenze aplotipiche (Fig 10), si può notare la formazione di 2 cluster: uno costituito da Nord Sardegna e Benetutti e uno dal Sulcis e Centro Sardegna, mentre Desulo e Carloforte risultano isolati dalle altre popolazioni confermando l'elevato livello di eterogeneità genetica caratteristica della popolazione Sarda.

Desulo inoltre risulta separato dalla popolazione del Sulcis sia dalla prima componente che dalla seconda componente (che spiegano rispettivamente il 34.13% e il 27.57% della variabilità totale), facendo presupporre una assenza di flusso genico tra le due popolazioni, nonostante la pratica della transumanza. Risulta, invece, separato dalla popolazione di confronto (Centro Sardegna) dalla sola prima componente. L'aplogruppo più frequente per tutte le popolazioni Sarde è sempre l'I2a1a ad esclusione della popolazione di Carloforte, nella quale non è stato rilevato alcun campione portatore della mutazione M26. Si è quindi deciso di approfondire questa linea andando a ricercare le mutazioni SNPs che determinano i differenti subclade dell'aplogruppo I2a1a per testare se in Sardegna gli individui appartenenti a questo aplogruppo fossero tra loro omogenei o appartenessero a più subclade. È stato osservato che tutti gli individui portatori della mutazione M26 possiedono sempre la mutazione L160 (aplogruppo I2a1a1). La frequenza delle mutazioni analizzate (PF4124, 18866539, PF4258, PF4461, 21841733 e M161) che determinano i differenti subclade variano notevolmente nelle diverse popolazioni Sarde. Dai p-value ottenuti mediante il test di Fisher è possibile, infatti, osservare come la popolazione di Desulo si discosti significativamente dal Sulcis, Centro Sardegna, e Nord

Sardegna, mentre non mostra differenze significative con la popolazione di Benetutti. Questi risultati indicano chiaramente che gli individui portatori dell' aplogruppo I2a1a1 non sono tra loro omogenei, e anzi la variabilità dei subclade osservata tra le diverse aree analizzate non sembra dovuta al caso ma potrebbe essere anch'essa influenzata da fenomeni di isolamento e deriva genetica (quali l'effetto fondatore) che hanno fatto sì che gli individui appartenenti a un determinato subclade si concentrassero prevalentemente in un'area rispetto a un'altra come evidenziato anche da Francalacci et al (2013).

L'effetto dell'isolamento è inoltre riscontrabile anche a livello micro geografico. Infatti, partendo dai dati aplotipici della popolazione Desulese suddivisa per rioni è possibile osservare che Issiria e Asuai (i rioni più esterni) (Fig.1) mostrano una differenziazione statisticamente significativa (p -value 0.004) (Tab.21), mentre il rione centrale di Ovolaccio, forse proprio grazie alla sua posizione, pare si sia omogenato ai rioni limitrofi. Anche l'osservazione del network (Fig.9) suggerisce inoltre un'origine polifiletica della popolazione Desulese. Si può quindi concludere che le varie aree della Sardegna analizzate, quando confrontate con il pool genico del Mediterraneo, appaiono tra loro coese ma differenziate dalle popolazioni Mediterranee. Se invece si vanno ad analizzare le sole popolazioni Sarde, e in particolar modo gli isolati, queste si mostrano altamente eterogenee, ed è addirittura stata rilevata una micro differenziazione interna relativa ai rioni che compongono il Comune di Desulo. Questo lavoro sembra quindi confermare precedenti studi sui marcatori classici (Contu et al. 1992; Lampis et al. 2000) in cui era stato rilevato che l'eterogeneità genetica Sarda non appariva evidente quando si andavano a confrontare le macroaree costiere (maggiormente soggette a un più rilevante flusso genico) con i villaggi interni (più isolati). Infatti nonostante la differenziazione tra alcune macroaree (come l'Ogliastra) sia stata comunque osservata (Piras et al. 2012) essa risulta maggiormente evidente quando si vanno a confrontare tra loro i piccoli villaggi isolati (Elhaik et al. 2014).

Sicuramente gli STRs del cromosoma Y, mediante l'analisi aplotipica, si sono rivelati, quindi, altamente informativi e in grado di discriminare le differenze riscontrabili non solo tra i villaggi

ma anche all'interno di un unico Comune, così come è stato visto per Desulo. Ciò è dovuto principalmente all'elevato tasso di mutazione caratteristico di questi polimorfismi che li rende idonei allo studio di popolazioni che si sono differenziate in epoche recenti. Andando invece a operare un confronto tra popolazioni tra loro maggiormente distanti nel tempo e nello spazio, è stato sicuramente fondamentale andare a studiare le mutazioni SNPs che determinano gli aplogruppi, e che possiedono un tasso di mutazione inferiore.

Perciò, vista la grande differenziazione osservata tra le popolazione Sarda e le diverse popolazioni Italiane, e la grande eterogeneità interna all'isola, sarebbe importante creare, sia per fini popolazionistici che forensi, un database informatico in cui siano registrati i diversi aplotipi rilevati nella popolazione Sarda.

Inoltre, grazie a questo studio è stato possibile apportare maggior chiarezza sulla questione dell'eterogeneità genetica Sarda, inerente però purtroppo esclusivamente inerente alla linea maschile; sarebbe perciò auspicabile proseguire gli studi in modo tale da poter analizzare anche il DNA mitocondriale per verificare se i risultati ottenuti sulla linea maschile siano sovrapponibili anche sulla linea femminile.

BIBLIOGRAFIA

- Alakoc YD, Gokcumen O, Tug A, Gultekin T, Gulec E, Schurr TG. 2010. Y-chromosome and autosomal STR diversity in four proximate settlements in Central Anatolia. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:e135–137; doi:10.1016/j.fsigen.2010.01.016.
- Alves C, Gomes V, Prata MJ, Amorim A, Gusmão L. 2007a. Population data for Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs (AmpFISTR YFiler) in Portugal. *Forensic Sci. Int.* 171:250–255; doi:10.1016/j.forsciint.2006.10.022.
- Alves C, Gomes V, Prata MJ, Amorim A, Gusmão L. 2007b. Population data for Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs (AmpFISTR YFiler) in Portugal. *Forensic Sci. Int.* 171:250–255; doi:10.1016/j.forsciint.2006.10.022.
- Bachis V, Calò CM, Vona G, Corrias L, Carreras-Torres R, Moral P. 2014. Analysis of 16 STRs of NOS gene regions and around in six sardinian populations (Italy). *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.*; doi:10.1002/ajhb.22533.
- Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I, et al. 2008. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context. *Am. J. Hum. Genet.* 82:236–250; doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.019.
- Belletini A. 1987. *L'evoluzione demografica nel Settecento, in La popolazione italiana. Un profilo storico.* Einaudi, Torino.
- Beloch JK. 1880. *Der italische Bund unter Roms Hegemonie. Staatsrechtliche und statistische Forschungen.* B. G. Teubner, Lipsia.
- Blaschke RJ, Rappold G. 2006. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:233–239; doi:10.1016/j.gde.2006.04.004.
- Brisighelli F, Blanco-Verea A, Boschi I, Garagnani P, Pascali VL, Carracedo A, et al. 2012. Patterns of Y-STR variation in Italy. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6:834–839; doi:10.1016/j.fsigen.2012.03.003.
- Calò C, Vona G. 2005. Genetic and demographical analysis of San Pietro Island (Sardinia, Italy). *Hum. Evol.* 20:99–106; doi:10.1007/BF02438728.
- Calò CM, Corrias L, Bachis V, Vona G, Brandas A, Scudiero CM, et al. 2013. Analisi di due isolati della Sardegna (Italia) attraverso lo studio dei polimorfismi del cromosoma Y. *Antropo* 29.
- Calò CM, Corrias L, Vona G, Bachis V, Robledo R. 2012. Sampling strategies in a linguistic isolate: results from mtDNA analysis. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* 24:192–194; doi:10.1002/ajhb.22215.
- Capocasa M, Anagnostou P, Bachis V, Battaglia C, Bertoncini S, Biondi G, et al. 2014. Linguistic, geographic and genetic isolation: a collaborative study of Italian populations. *J Anthr. SCI* 1–32.
- Cappello N, Rendine S, Griffo R, Mameli GE, Succa V, Vona G, et al. 1996. Genetic analysis of Sardinia: I. data on 12 polymorphisms in 21 linguistic domains. *Ann. Hum. Genet.* 60: 125–141.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. 1996. *The history and geography of human genes.* Princeton University Press, Princeton, N.J.

- Chiaroni J, King RJ, Myres NM, Henn BM, Ducourneau A, Mitchell MJ, et al. 2010. The emergence of Y-chromosome haplogroup J1e among Arabic-speaking populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 18: 348–353.
- Cinnioglu C, King R, Kivisild T, Kalfoglu E, Atasoy S, Cavalleri GL, et al. 2004. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Hum. Genet.* 114:127–148; doi:10.1007/s00439-003-1031-4.
- Contu D, Morelli L, Santoni F, Foster JW, Francalacci P, Cucca F. 2008. Y-chromosome based evidence for pre-neolithic origin of the genetically homogeneous but diverse Sardinian population: inference for association scans. *PLoS One* 3:e1430; doi:10.1371/journal.pone.0001430.
- Contu L, Arras M, Carcassi C, La Nasa G, Mulargia M. 1992. HLA structure of the Sardinian population: a haplotype study of 551 families. *Tissue Antigens* 40: 165–174.
- Corrias L. 2010. L'isolamento degli isolati sardi: Carloforte e Benetutti. Dottorato di ricerca in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente XXIII ciclo, Università degli Studi di Cagliari.
- Cruciani F, La Fratta R, Santolamazza P, Sellitto D, Pascone R, Moral P, et al. 2004. Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) Y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1014–1022.
- De Knijff P, Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, et al. 1997. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int. J. Legal Med.* 110: 134–149.
- Di Giacomo F, Luca F, Anagnou N, Ciavarella G, Corbo RM, Cresta M, et al. 2003. Clinal patterns of human Y chromosomal diversity in continental Italy and Greece are dominated by drift and founder effects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 28:387–395; doi:10.1016/S1055-7903(03)00016-2.
- Elhaik E, Tatarinova T, Chebotarev D, Piras IS, Calo CM, Demontis A, et al. 2014. Nature Communication. Geographic Population Structure (GPS) of worldwide human populations infers biogeographical origin down to home village.
- Fadhlaoui-Zid K, Plaza S, Calafell F, Ben Amor M, Comas D, Bennamar El gaaied A. 2004. Mitochondrial DNA heterogeneity in Tunisian Berbers. *Ann. Hum. Genet.* 68:222–233; doi:10.1046/j.1529-8817.2004.00096.x.
- Falchi A, Giovannoni L, Calo CM, Piras IS, Moral P, Paoli G, et al. 2006. Genetic history of some western Mediterranean human isolates through mtDNA HVR1 polymorphisms. *J. Hum. Genet.* 51:9–14; doi:10.1007/s10038-005-0324-y.
- Falchi A, Piras IS. 2006. Genetics effects of malaria in Sardinia (Italy). In *Human Genetic Isolates*, Vol. 1 of, pp. 151–176, Carla Calò e Giuseppe Vona.
- Ferri G, Alù M, Corradini B, Radheshi E, Beduschi G. 2009. Slow and fast evolving markers typing in Modena males (North Italy). *Forensic Sci. Int. Genet.* 3:e31–33; doi:10.1016/j.fsigen.2008.05.004.
- Floris G, Sanna E. 2000. On the biological structure of the Sardinian people. 1: 85–106.
- Francalacci P, Morelli L, Angius A, Berutti R, Reinier F, Atzeni R, et al. 2013. Low-pass DNA sequencing of 1200 Sardinians reconstructs European Y-chromosome phylogeny. *Science* 341:565–569; doi:10.1126/science.1237947.

- Francalacci P, Morelli L, Underhill PA, Lillie AS, Passarino G, Useli A, et al. 2003. Peopling of three Mediterranean islands (Corsica, Sardinia, and Sicily) inferred by Y-chromosome biallelic variability. *Am. J. Phys. Anthropol.* 121:270–279; doi:10.1002/ajpa.10265.
- Frigi S, Pereira F, Pereira L, Yacoubi B, Gusmão L, Alves C, et al. 2006. Data for Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs (AmpFLSTR Yfiler) in two Tunisian Berber communities. *Forensic Sci. Int.* 160:80–83; doi:10.1016/j.forsciint.2005.05.007.
- Ghiani ME, Mameli A, Piras G, Berti A, Calo CM, Vona G. 2009. Population data for Y-chromosome haplotypes defined by AmpFISTR YFiler PCR amplification kit in North Sardinia (Italy). *Coll. Antropol.* 33: 643–651.
- Gueresi P, F MV, Pettener D. 1993. Problemi di metodi nelle indagini biodemografiche su popolazioni di ambiente montano. In: *Per una storia della popolazione italiana: problemi di metodo*, pp. 147–160, Dipartimento di Scienze Statistiche “P. Fortunati”, Università di Bologna.
- Helena Mangs A, Morris BJ. 2007. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr. Genomics* 8: 129–136.
- Jombart T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 24:1403–1405; doi:10.1093/bioinformatics/btn129.
- Keller A, Graefen A, Ball M, Matzas M, Boisguerin V, Maixner F, et al. 2012. New insights into the Tyrolean Iceman’s origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nat. Commun.* 3:698; doi:10.1038/ncomms1701.
- Keyser C, Bouakaze C, Crubézy E, Nikolaev VG, Montagnon D, Reis T, et al. 2009. Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. *Hum. Genet.* 126:395–410; doi:10.1007/s00439-009-0683-0.
- Kharkov VN, Stepanov VA, Borinskaya SA, Kozhekbaeva ZM, Gusar VA, Grechanina EY, et al. 2004. Gene pool structure of Eastern Ukrainians as inferred from the Y-chromosome haplogroups. *Russ. J. Genet.* 40: 326–331.
- Kovatsi L, Saunier JL, Irwin JA. 2009. Population genetics of Y-chromosome STRs in a population of Northern Greeks. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:e21–22; doi:10.1016/j.fsigen.2009.01.001.
- Lacan M, Keyser C, Ricaut F-X, Brucato N, Duranthon F, Guilaine J, et al. 2011. Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:9788–9791; doi:10.1073/pnas.1100723108.
- Lahn BT, Page DC. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675–680.
- Lampis R, Morelli L, Congia M, Macis MD, Mulargia A, Loddo M, et al. 2000. The inter-regional distribution of HLA class II haplotypes indicates the suitability of the Sardinian population for case-control association studies in complex diseases. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2959–2965.
- Lilliu G. 1988. Le *origini della storia sarda: il paleolitico e il neolitico. In *I: Dalle origini alla fine dell’età bizantina*, pp. 42–68, Jaca book, Milano.
- Moroni A, Anelli A, Anghinetti W, Siri E, Catelli M. 1992. Matrimoni tra consanguinei. In *Editoriale Comunicazioni Sociali*, Napoli.

- Myres NM, Ekins JE, Lin AA, Cavalli-Sforza LL, Woodward SR, Underhill PA. 2007. Y-chromosome short tandem repeat DYS458.2 non-consensus alleles occur independently in both binary haplogroups J1-M267 and R1b3-M405. *Croat. Med. J.* 48: 450–459.
- Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, Fraternali B, Buscemi L, Pesaresi M, et al. 2007. Y-chromosome genetic structure in sub-Apennine populations of Central Italy by SNP and STR analysis. *Int. J. Legal Med.* 121:234–237; doi:10.1007/s00414-007-0153-y.
- Pais E. 1923. *Storia della Sardegna e della Corsica durante il dominio romano*. Nardecchia editore, Roma.
- Palet L, Coudray C, Galey C, Keyser C, Melhaoui M, Gagnor C, et al. 2010. Y-STR genetic diversity in Moroccans from the Figuig oasis. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4:e139–141; doi:10.1016/j.fsigen.2010.02.006.
- Passarino G, Underhill PA, Cavalli-Sforza LL, Semino O, Pes GM, Carru C, et al. 2001. Y chromosome binary markers to study the high prevalence of males in Sardinian centenarians and the genetic structure of the Sardinian population. *Hum. Hered.* 52:136–139; doi:53368.
- Perić M, Lauc LB, Klarić IM, Rootsi S, Janićijević B, Rudan I, et al. 2005. High-resolution phylogenetic analysis of southeastern Europe traces major episodes of paternal gene flow among Slavic populations. *Mol. Biol. Evol.* 22:1964–1975; doi:10.1093/molbev/msi185.
- Pettener D. 1995. Cognomi e struttura biodemografica di comunità italo-albanesi della Basilicata (primi risultati: 1820-1984). In *Le Italie demografiche. Saggi di demografia storica*, pp. 251–270, Dipartimento di Scienze Statistiche, Università degli Studi di Udine, Udine.
- Piglionica M, Baldassarra SL, Giardina E, Stella A, D'Ovidio FD, Frati P, et al. 2013. Population data for 17 Y-chromosome STRs in a sample from Apulia (Southern Italy). *Forensic Sci. Int. Genet.* 7:e3–e4; doi:10.1016/j.fsigen.2012.08.003.
- Piras IS, De Montis A, Calò CM, Marini M, Atzori M, Corrias L, et al. 2012. Genome-wide scan with nearly 700,000 SNPs in two Sardinian sub-populations suggests some regions as candidate targets for positive selection. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 20:1155–1161; doi:10.1038/ejhg.2012.65.
- Relethford JH, Mielke JH. 1994. Marital exogamy in the Aland Islands, Finland, 1750-1949. *Ann. Hum. Biol.* 21: 13–21.
- Robino C, Inturri S, Gino S, Torre C, Di Gaetano C, Crobu F, et al. 2006. Y-chromosomal STR haplotypes in Sicily. *Forensic Sci. Int.* 159:235–240; doi:10.1016/j.forsciint.2005.05.015.
- Robledo R, Piras I, Beggs W, Calò C. 2009. Analysis of 31 STR loci in the genetic isolate of Carloforte (Sardinia, Italy). *Genet. Mol. Biol.* 32:462–465; doi:10.1590/S1415-47572009005000057.
- Rootsi S, Kivisild T, Benuzzi G, Help H, Bermisheva M, Kutuev I, et al. 2004. Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 75: 128–137.
- Sánchez C, Barrot C, Xifró A, Ortega M, de Aranda IG, Huguet E, et al. 2007. Haplotype frequencies of 16 Y-chromosome STR loci in the Barcelona metropolitan area population using Y-Filer kit. *Forensic Sci. Int.* 172:211–217; doi:10.1016/j.forsciint.2007.01.007.
- Sanna E, Iovine MC, Floris G. 2004. Evolution of marital structure in 20 Sardinian villages from 1800 to 1974. *Anthropol. Anz. Ber. Über Biol.-Anthropol. Lit.* 62: 169–184.

- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, et al. 2000. The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* 290: 1155–1159.
- Sims LM, Garvey D, Ballantyne J. 2009. Improved Resolution Haplogroup G Phylogeny in the Y Chromosome, Revealed by a Set of Newly Characterized SNPs. M.A. Batzered. *PLoS ONE* 4:e5792; doi:10.1371/journal.pone.0005792.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825–837; doi:10.1038/nature01722.
- Sondaar P, Elburg R, Hofmaijer GK, Martini F, Sanges M, Spaan A, et al. 1995. Human Paleontology. The human colonization of Sardinia, a Late-Pleistocene human fossil from Crobeddu cave.
- Triki-Fendri S, Sánchez-Diz P, Rey-González D, Ayadi I, Alfadhli S, Rebai A, et al. 2013. Population genetics of 17 Y-STR markers in West Libya (Tripoli region). *Forensic Sci. Int. Genet.* 7:e59–61; doi:10.1016/j.fsigen.2013.02.002.
- Vallebona G. 1988. *Carloforte. Storia di una colonizzazione*. Edizioni della Torre, Cagliari.
- Varesi L, Memmi M, Cristofari M-C, Mameli GE, Calò CM, Vona G. 2000. Mitochondrial control-region sequence variation in the Corsican population, France. *Am. J. Hum. Biol. Off. J. Hum. Biol. Counc.* 12:339–351; doi:10.1002/(SICI)1520-6300(200005/06)12:3<339::AID-AJHB4>3.0.CO;2-U.
- Vona G. 1995. Le caratteristiche genetiche dei Sardi. *Antropologia Contemporanea*.
- Wiik K. 2008. Where Did the European Men Come From. Scribd. Available: <http://www.scribd.com/doc/15048375/Where-Did-the-European-Men-Come-From> [accessed 10 March 2014].
- Xue Y, Wang Q, Long Q, Ng BL, Swerdlow H, Burton J, et al. 2009. Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree. *Curr. Biol.* CB 19:1453–1457; doi:10.1016/j.cub.2009.07.032.
- Zei G, Lisa A, Fiorani O, Magri C, Quintana-Murci L, Semino O, et al. 2003. From surnames to the history of Y chromosomes: the Sardinian population as a paradigm. *Eur. J. Hum. Genet.* 11:802–807; doi:10.1038/sj.ejhg.5201040.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare:

La Dott.ssa Carla Maria Calò per i suoi insegnamenti, il suo esempio e la sua costante disponibilità, dimostrata non solo in campo lavorativo ma anche umano, supportandomi enormemente durante questi anni e permettendo la stesura di questa tesi;

Il Prof. Giuseppe Vona per i suoi consigli indispensabili e le preziose indicazioni che mi hanno aiutato ad arricchire questo lavoro;

Il Prof. Emanuele Sanna per la suo aiuto e le sue utili consulenze in campo biodemografico;

Il Reparto Investigazioni Scientifiche dei Carabinieri di Cagliari nelle persone del Tenente Colonello Giovanni Delogu e del Maggiore Alessandro Mameli per l'aiuto nella genotipizzazione del cromosoma Y;

Il Sindaco del Comune di Desulo Gian Luigi Litarru che con grande coinvolgimento e passione mi ha assistito durante la fase di campionamento;

La comunità desulese per la grande ospitalità mostrata nei miei confronti, e tutti coloro che partecipando al campionamento hanno reso possibile questo lavoro;

La Dott.ssa Laura Corrias che con la sua infinita pazienza e amicizia mi è stata vicina durante tutto il percorso del dottorato;

Vorrei infine ringraziare la mia famiglia, il mio fidanzato e i miei amici per avermi sempre incoraggiato e sostenuto nelle mie scelte;

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2012/2013-XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".