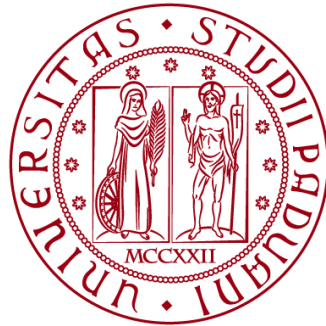


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

EPIGENETICA PER L'ECOLOGIA MOLECOLARE DEGLI ORGANISMI MARINI

**Tutor: Prof.ssa Chiara Papetti
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Federica Pizzolato

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Introduzione	2
Capitolo I: Metodologie epigenetiche per l'ecologia molecolare	3
1.1 Utilità delle tecnologie epigenetiche per l'ecologia.....	3
1.2 Metodologie per lo studio della metilazione del DNA	5
Capitolo II: Three-spined stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>): esempi di metodologie epigenetiche	9
2.1 Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS): studio di Metzger e Schulte (2018).....	10
2.2 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS): studio di Artemov et al. (2017).....	12
2.3 Alcune considerazioni sui casi di studio analizzati.....	15
Capitolo III: Proposta progettuale sull'applicazione di tecniche epigenetiche per studi ecologici	16
Capitolo IV: Limiti e possibili sviluppi futuri delle metodologie epigenetiche per l'ecologia molecolare	18
Bibliografia	20
Sitografia	21

Introduzione: l'epigenetica

L'epigenetica è una disciplina che studia i processi molecolari che modulano l'espressione del DNA, senza andare a modificare la sua sequenza nucleotidica.

Le mutazioni epigenetiche (o *epimutations*) sono quindi quelle che contribuiscono a determinare il fenotipo senza alterare il genotipo. Sono modificazioni reversibili della struttura chimica del DNA e della cromatina e hanno la capacità, per mezzo dei gameti, di essere trasmesse alle generazioni seguenti anche se possono essere cancellate e riscritte durante la vita di un organismo.

È di fondamentale importanza in biologia tener conto dell'epigenoma perché le sue modifiche possono giustificare una porzione di varianza fenotipica che è dovuta ad alterazioni nell'espressione genica piuttosto che nella sequenza nucleotidica.

Infatti, quando l'epigenoma subisce delle alterazioni viene alterata anche l'espressione genica e ciò può portare a cambiamenti fenotipici duraturi.

Alla base dei meccanismi epigenetici vi sono processi molecolari come la metilazione (e demetilazione) del DNA, la modifica degli istoni e l'attività degli RNA non codificanti (come siRNA e miRNA). Questi ultimi modulano l'espressione genica legandosi a molecole di mRNA a cui sono complementari, portandoli alla degradazione.

Gli istoni agiscono in maniera differente: possono subire modifiche post-traduzionali (come l'acetilazione, la metilazione e la fosforilazione delle loro code N-terminali) che cambiano il livello di compattazione della cromatina, andando così a modulare positivamente o negativamente la trascrizione.

Negli studi più recenti il focus dell'epigenetica, specialmente per quanto riguarda l'ecologia e la biologia evolutiva, è concentrato sulla metilazione del DNA (Lamka et al., 2022), reazione catalizzata dalle DNA metiltrasferasi (DNMT) che prevede l'aggiunta di un gruppo metile in posizione C-5 ad una citosina, che diventa 5-metilcitosina (5mC).

I siti CpG, dinucleotidi in cui una citosina è seguita da una guanina, sono il target principale della metilazione del DNA ma si possono trovare citosine metilate anche in contesti diversi.

La metilazione dei siti CpG riduce l'espressione genica inibendo il legame tra il DNA ed i fattori di trascrizione o favorendo il mantenimento dello stato non trascrizionalmente competente della cromatina.

I dinucleotidi CpG si trovano raggruppati nella regione regolatoria dei geni, nei *repeats* e nei *gene bodies* (Vogt, 2021) (ovvero nelle porzioni di sequenza che vengono trascritte).

L'epigenetica suscita particolare entusiasmo quando si parla della sua relazione con l'ambiente.

Come è stato già accennato, le differenze fenotipiche non riflettono necessariamente differenze genotipiche: oggi, l'insieme degli studi supporta l'idea che i tratti fenotipici siano determinati sia da effetti genetici che ambientali, con l'epigenetica che, tramite la regolazione della *phenotypic plasticity* e l'ereditarietà intergenerazionale,

funge da mediatore per gli effetti a breve termine che l'ambiente ha sul fenotipo (Lamka et al., 2022).

La *phenotypic plasticity* è l'abilità degli individui di alterare la loro fisiologia, morfologia e/o comportamento in risposta a cambiamenti delle condizioni ambientali; si intuisce che parte della varianza fenotipica è dovuta a questo fenomeno.

Capitolo I: Metodologie epigenetiche per l'ecologia molecolare

1.1 Utilità delle metodologie epigenetiche per l'ecologia

L'ecologia è un settore della biologia che studia l'interazione degli organismi con l'ambiente in cui vivono.

Storicamente queste interazioni sono state studiate tramite osservazioni in campo e manipolazioni sperimentali. Ciò ha fornito molti dati fenotipici, basati su uno o più aspetti riguardanti l'organismo, come la sua morfologia, fisiologia, biochimica e comportamento.

Gli studi di ecologia tradizionale hanno contribuito notevolmente a migliorare le conoscenze che abbiamo su moltissime specie e sui processi che mantengono gli ecosistemi. È tuttavia complicato ottenere dati genetici dalle popolazioni selvatiche, ed i biologi spesso dovevano affidarsi unicamente ai polimorfismi visibili.

I dati fenotipici si rivelano tutt'ora utili in ecologia, allo stesso tempo se utilizzati da soli presentano alcune limitazioni, basti pensare al mimetismo, a come alcuni tratti cambino stagionalmente o in base all'età dell'individuo, o al fatto che la *phenotypic plasticity* può portare alla sovrastima della variabilità genetica (Freeland, 2005).

È stato quindi indispensabile per gli ecologi, in sincronia con lo sviluppo di metodologie molecolari sempre più avanzate, includere metodologie e dati molecolari ai loro studi. Si è così affermato progressivamente un nuovo ramo dell'ecologia, la *molecular ecology* (o ecologia molecolare).

I campi dell'ecologia molecolare sono i più svariati ma sono accumulati dal fatto che utilizzano dati molecolari per comprendere l'ecologia e l'evoluzione degli organismi in natura.

Per gli ecologi è oggi fondamentale studiare soprattutto i processi epigenetici ed incorporare domande epigenetiche alle loro ricerche, dal momento che questi potrebbero significativamente migliorare la loro comprensione dei meccanismi che determinano la variabilità fenotipica naturale e delle risposte degli individui e delle popolazioni alle variabili biotiche e abiotiche.

La varianza epigenetica può infatti influenzare importanti fattori ecologici. Questo include sia le relazioni tra gli organismi e i fattori ambientali abiotici (la *phenotypic plasticity* e la tolleranza allo stress in mancanza di risorse come luce, acqua o nutrienti per esempio) che le interazioni biotiche tra organismi diversi, come il grado in cui la varianza epigenetica influenza l'abilità di competizione, la resistenza a predatori o a patogeni (Bossdorf et al., 2008).

Ad oggi nelle banche dati sono presenti molteplici pubblicazioni sull'emergente campo dell'epigenetica per l'ecologia molecolare. Molti studi parlano di come gli organismi con differenti profili epigenetici possano avere un maggiore o minore potenziale nel rispondere a stress abiotico e ad altre sfide dell'ambiente. In molti casi si parla di componenti della dieta, variazioni di temperatura o salinità, sostanze chimiche inquinanti ed altri stress esterni che possono avere effetti a lungo termine sullo sviluppo, sul metabolismo e sulla salute, alcune volte anche nelle generazioni successive.

Spesso invece si mira a studiare la variabilità epigenetica per predire le traiettorie evuzionistiche che sono importanti nella conservazione, infatti processi come la metilazione del DNA e la modifica degli istoni possono rappresentare un secondo sistema di variabilità ereditabile attraverso il quale la selezione naturale può agire più velocemente e indipendentemente dall'ambiente.

Sono sempre più numerose le prove del fatto che i processi epigenetici sono una componente importante di ibridazione e di poliploidia e possono quindi giocare un ruolo chiave nella speciazione e nella biologia di diverse specie invasive (Bossdorf et al., 2008).

Non mancano ricerche epigenetiche sull'uomo: studi epidemiologici sulla pelle e su altri tessuti hanno identificato variazioni dei profili di metilazione del DNA associati con vari fattori ambientali che includono l'esposizione cronica alla luce del sole, alla polvere di amianto ed al fumo di tabacco, il consumo di alcol e l'uso di tinte per capelli.

Come già accennato, uno dei problemi più grandi dell'ecologia è ottenere dati su cui lavorare, specialmente quando si studiano popolazioni selvatiche.

Uno studio interessante in cui le tecniche epigenetiche vengono usate come strumento per ottenere dati fenotipici rilevanti in ecologia tratta delle balene *humpback* (*Megaptera novaeangliae*), cetacei per i quali non sono disponibili markers morfologici o molecolari per una chiara determinazione dell'età dopo lo svezzamento.

Al tempo esistevano pochi metodi per determinare l'età di queste balene e molti di questi erano letali. Ciò portava ad una carenza di dati e limitava gli ecologi nella comprensione di questa specie marina, in quanto l'età in ecologia è di fondamentale importanza per determinare molte caratteristiche individuali e della popolazione: essa consente di calcolare il loro potenziale evolutivo, di studiare i processi di sviluppo ed i fattori che influenzano il successo riproduttivo.

È molto importante anche per costruire le *life tables* che forniscono un quadro generale della sopravvivenza e della mortalità specifiche per classi di età, strumento indispensabile per gli ecologi che si occupano di salvaguardia delle specie a rischio di estinzione e biologia di conservazione.

A.M. Polanowski, J. Robbins, D. Chandler & S. N. Jarman nel 2014 hanno sviluppato l'HEAA (*Humpback Epigenetic Age Assay*), una metodologia epigenetica non letale che coinvolge il pirosequenziamento per stimare l'età delle balene *M. novaeangliae*, identificando nel loro genoma tre siti CpG con livelli di metilazione delle citosine fortemente correlati all'età (Polanowski et al., 2014).

Quest'ultimo esempio permette di comprendere quanto siano necessarie nuove metodologie come l'HEAA per il futuro dell'ecologia.

Infine, le tecniche molecolari valorizzano gli studi ecologici perché si rivelano utili anche in molte altre aree di ricerca e, di conseguenza, collaborazioni interdisciplinari stanno diventando sempre più comuni tra l'ecologia e un range di campi accademici e sperimentali che includono epidemiologia, agricoltura, genetica, e allevamento ittico.

Pertanto, la biologia molecolare affina gli studi ecologici, estendendo anche il loro campo di pertinenza. Risulta evidente l'importanza per l'ecologo di comprendere i meccanismi epigenetici e saperne utilizzare le metodologie.

1.2 Metodologie per lo studio della metilazione del DNA

Le tecnologie epigenetiche si evolvono rapidamente, a pari passo del progredire delle metodologie molecolari che si sono evolute particolarmente nelle ultime due decadi.

Esistono varie metodologie epigenetiche diverse tra loro in base al tipo di epimutazione che si vuole analizzare; nei prossimi paragrafi si parlerà delle tecnologie mirate alla metilazione del DNA che, come accennato nel capitolo precedente, è una delle modificazioni epigenetiche del DNA più studiate in ambito ecologico.

Se si dà un'occhiata al 'percorso storico' dei progressi epigenetici, bisogna considerare che le prime analisi sul metiloma (ovvero le analisi della distribuzione delle 5mC presenti nel genoma) arrivarono tardi non solo per l'assenza delle più affidabili tecnologie moderne (una delle prime tecniche è stata la cromatografia su carta già ampiamente utilizzata per altri scopi negli anni quaranta) ma anche perché i biologi non conoscevano ancora l'importante ruolo della metilazione e non era nei loro interessi analizzarla. Basti pensare che si dovettero attendere gli esperimenti di Griffith (1928) e di Avery (1944) per comprendere che le catene polimeriche di acidi nucleici contengono informazioni genetiche e per conoscere l'importanza della metilazione del DNA si dovette attendere ancora di più: si ipotizzò solo negli anni 60' da studi sui batteri che la 5mC potesse avere una funzione biologica precisa (Oda et al., 1966) e la conferma di ciò arrivò nel 1975 quando Riggs pubblicò uno studio sulla correlazione tra la 5mC e l'inattivazione del cromosoma X (Harrison, Parle-Mcdermott, 2011). Questo diede il via agli studi che cercavano di dimostrare che la metilazione del DNA ha delle importanti conseguenze sulla regolazione dei geni.

Oggi esistono diversi metodi per rilevare la metilazione del DNA, tutti basati sulla distinzione tra le citosine metilate (5mC) e le citosine non metilate.

Due dei principi più comunemente utilizzati in queste tecniche (ed in quelle meno recenti) sono la digestione del DNA con enzimi di restrizione sensibili alla metilazione ed il BS-seq (*Sodium Bisulfite sequencing*), il sequenziamento di DNA convertito con bisolfito (Laine et al., 2022).

Gli enzimi di restrizione sensibili alla metilazione sono delle endonucleasi che legano e tagliano il DNA tramite il riconoscimento di sequenze nucleotidiche specifiche. Tra la varietà di differenti tipi di enzimi di restrizione che esistono solo alcuni sono sensibili alla metilazione del DNA. Queste proprietà furono sfruttate nel 1979 da Cedar et al. che per le loro analisi del metiloma utilizzarono gli enzimi *HpaII* e *MspI*,

entrambi specifici per la sequenza CCGG ma in presenza di gruppo metile alla seconda citosina del *motif* la digestione da parte di *MspI* continua ad avere successo, quella di *HpaII* no. Questa differenza è cruciale: rilevando i frammenti di DNA digerito dai due diversi enzimi si poteva capire quali di questi erano metilati e quali no; se una determinata regione è metilata viene tagliata in due da *MspI* e non da *HpaII*, se viene tagliata da entrambi la regione non è metilata.

I frammenti, in base alla presenza o all'assenza della metilazione, avranno dimensioni diverse. La rilevazione dei frammenti di DNA digerito avveniva inizialmente tramite marcatura radioattiva e due TLC (*Thin Layer Chromatography*) dimensionali. Più tardi si iniziò ad utilizzare il Southern Blotting. (Harrison, Parle-Mcdermott, 2011).

Uno dei primi metodi epigenetici applicati a domande ecologiche, il *methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism* (l'amplificazione di polimorfismi sensibili alla metilazione) (Lamka et al., 2022) si avvale proprio di questi enzimi. È conveniente dal punto di vista economico, di metodologia semplice e facilmente applicabile ad organismi non modello non esigenti dal punto di vista computazionale. Utilizza enzimi di restrizione sensibili alla metilazione sui campioni di DNA, i frammenti ottenuti vengono successivamente amplificati tramite PCR e visualizzati su gel. Tuttavia, questo metodo ha diverse carenze, la più importante delle quali è che conduce lo *screening* di loci anonimi che non possono poi essere *genome-referenced* o comparati nei vari studi (Crotti et al., 2020).

Per questo motivo oggi il campo delle metodologie epigenetiche per l'ecologia (*eco-epi methodologies*) sfrutta di più il secondo principio di cui è stato accennato nelle pagine precedenti: il trattamento con bisolfito abbinato al *next generation sequencing* (NGS). Nel 1970 Hayatsu et al. dimostrarono che il bisolfito di sodio (NaHSO_3) provoca la solfonazione del carbonio 6 delle citosine. Questa reazione avviene anche nella 5-metilcitosina ma molto più lentamente.

Hayatsu et al. (1970) scrivono: '*These studies may be of importance because sodium bisulfite is being used as food additives and sulfur dioxide is the main cause of the air pollution*'. Si comprende che gli autori non avevano ancora intuito quale impatto enorme la loro scoperta avrebbe prodotto.

Nel 1992 Frommer et al. ebbero l'intuizione: la diversa cinetica di solfonazione tra C e 5mC poteva essere utilizzata per studiare la metilazione del DNA. In ambiente acido la citosina viene solfonata e deamminata dal bisolfito di sodio e viene quindi convertita in un uracile solfonato. Il successivo trattamento alcalino desolfona il prodotto ottenuto nella reazione precedente e si ottiene un uracile. Al contrario le citosine metilate sottoposte allo stesso trattamento e in opportune condizioni di temperatura e acidità non sono reattive alla conversione e restano inalterate.

Sequenziando poi il DNA precedentemente sottoposto a questo trattamento le citosine non metilate possono essere identificate paragonando tramite analisi bioinformatiche la sequenza non trattata a quella convertita con bisolfito e trovando i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs).

La tecnica ideata da Frommer et al., nonostante abbia subito migliorie nel tempo, ha rivoluzionato il campo dell'epigenetica. La loro intuizione è stata successivamente applicata alle nuove metodologie ed i metodi basati sulla conversione con bisolfito sono ancora tra i più utilizzati oggi.

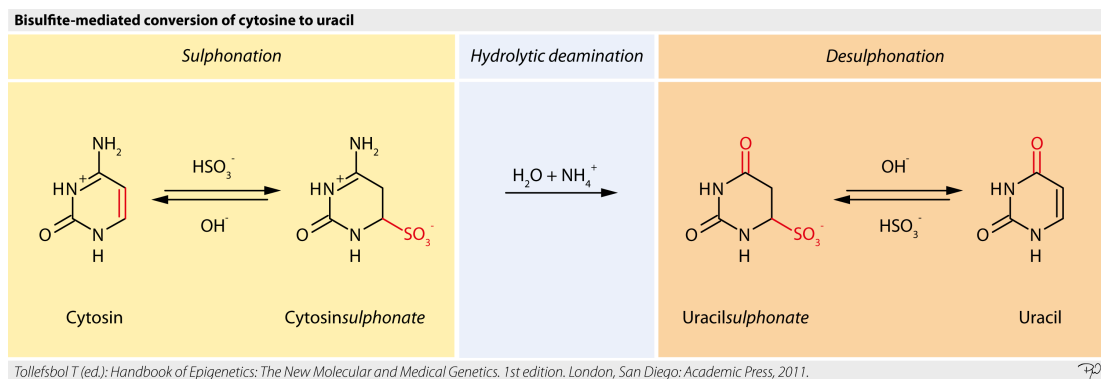


Figura 1.1 Reazione chimica della conversione delle citosine in uracile mediata dal bisolfito di sodio. Foto tratta da Wikipedia dalla pagina dedicata al *Whole Genome Bisulfite Sequencing*, autore: Crenim.

Sebbene la reazione con bisolfito sia stata adattata e applicata in passato anche a tecniche che non coinvolgevano il sequenziamento, grazie allo sviluppo esponenziale di quest'ultimo (decine di nuove piattaforme di sequenziamento sono state ideate in seguito all'entusiasmo prodotto dal Progetto Genoma Umano) le tecniche di BS-seq hanno preso il sopravvento.

Le metodologie più comuni per sequenziare il DNA convertito con bisolfito hanno come target l'intero genoma (WGBS: *Whole Genome Bisulfite Sequencing*) o una ridotta e specifica porzione del genoma utilizzando gli enzimi di restrizione (RRBS: *Reduced Representation Bisulfite Sequencing*).

La maggior parte degli studi odierni su domande ecologiche o evolucionistiche richiedono alte quantità di campioni che superano di molto quelle effettivamente studiate, evidenziando la necessità dello sviluppo di approcci che hanno come bersaglio una rappresentazione del genoma specifica e più corta. L'RRBS è una possibile soluzione a questo problema dato che utilizza enzimi di restrizione che tagliano il DNA in maniera non randomica su (o vicino) sequenze specifiche (Laine et al., 2022).

Ciò rende l'RRBS economicamente vantaggiosa rispetto alla WGBS ed evita di condurre analisi su centinaia di migliaia di siti CpG che ci si aspetta non avere significato funzionale. Tuttavia, certi studi possono richiedere una rappresentazione imparziale della metilazione del DNA a livello dell'intero genoma o di parti cospicue di esso, in questi casi si rivela più utile la WGBS (Laine et al., 2022). Metzger e Schulte nel 2018 si sono serviti di questa tecnica per paragonare i livelli di metilazione di maschi e femmine del pesce *Gasterosteus aculeatus* (three-spined stickleback), ottenendo come risultato un'ipermetilazione del cromosoma X delle femmine che suggerisce un potenziale ruolo della metilazione del DNA nell'evoluzione dei cromosomi sessuali eterogametici.

Entrambi gli approcci sono quindi validi ma i loro diversi protocolli si rivelano utili per rispondere a domande ecologiche diverse.

Il trattamento con bisolfito ha però qualche svantaggio: i) presenta bias di conversione incompleta delle citosine; ii) crea un ambiente inadatto al DNA, portandolo spesso ad un'eccessiva degradazione che influenza la qualità del sequenziamento. Questa degradazione colpisce principalmente le regioni genomiche ricche di citosine non metilate, il che può risultare in una sovrastima dei livelli di metilazione globali (Laine

et al., 2022); iii) richiede un genoma di riferimento per la specie d'interesse, dato ancora non presente per molte specie (Crotti et al., 2020).

Nel corso degli anni sono stati testati diversi protocolli di conversione con bisolfito per cercare di ridurre i bias che questo metodo presenta.

Un'alternativa per evitare questi problemi nello studio della variazione della metilazione del DNA negli individui è sviluppare tecniche che non coinvolgono il trattamento con bisolfito. Una di queste è l'epiRADseq, una metodologia *reduced representation* sviluppata nel 2016 da Schield et al. in cui i campioni di DNA vengono digeriti con due diversi enzimi di restrizione, uno dei quali sensibile alla metilazione. Di conseguenza un locus che contiene basi 5mC non sarà tagliato dall'enzima sensibile alla metilazione, non sarà amplificato dalla PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e non verrà sequenziato, diversamente da un locus non metilato. Si possono quindi determinare differenze quantitative nella frequenza della metilazione in loci specifici osservando le frequenze delle *reads* ottenute per ogni locus.

Se un locus presenta diverse 5mC non saranno ottenute *reads*, mentre se un locus non è metilato si otterrà un numero di *reads* proporzionale alla frequenza di C non metilate del locus.

La presenza/assenza e la relativa frequenza delle *reads* per locus possono essere paragonate tra individui diversi, quindi negli studi di eco-epi si possono per esempio osservare le differenze tra campioni che hanno vissuto in areali caratterizzati da fattori ecologici diversi.

Nel loro studio del 2020 Crotti et al. hanno condotto un'analisi sulla validità di questa tecnica nell'ambito della genetica delle popolazioni ed hanno ottenuto dati positivi, sottolineando che uno dei suoi vantaggi principali è il fatto che per applicarla non serve necessariamente avvalersi di un genoma di riferimento.

Questa tecnica è già stata utilizzata per studi di ecologia molecolare su *Coregonus lavaretus*, un salmonide vulnerabile in termini di estinzione. Come misura di conservazione della specie, negli ultimi 30 anni sono state introdotte 6 nuove *refuge populations* in areali diversi e dei ricercatori (Crotti et al., 2021) si sono serviti dell'epiRADseq per trovare possibili risposte a domande ecologiche ed evolucionistiche sulla loro traslocazione. Hanno identificato differenti frequenze di metilazione in loci in cui si trovavano geni coinvolti nelle funzioni epatiche, nel sistema immunitario ed in quello nervoso.

Altre tecniche promettenti che risolvono i bias presentati dalla conversione con bisolfito sono quelle che coinvolgono il *third generation sequencing*. Esso offre al sequenziamento l'opportunità di rilevare la metilazione del DNA dagli stessi *dataset* senza alcun trattamento aggiuntivo (Laine et al., 2022). Un esempio di applicazione di queste tecnologie agli studi ecologici è lo studio di Drown et al. che nel 2022 hanno utilizzato l'ONT (*Oxford Nanopore Technology*) per analizzare la struttura e connettività di 5 popolazioni di *Atherinomorus stipes* provenienti dal sud della Florida.

Tuttavia, anche questa metodologia presenta i suoi inconvenienti in quanto anche essa necessita di un genoma di riferimento (Drown et al., 2022), inoltre il *third generation sequencing* non è ancora privo di errori di sequenziamento (Laine et al., 2022).

Delle tecniche sono state soppiantate, altre si sono rivoluzionate e migliorate nel corso del tempo. Ad oggi non esistono metodi perfetti e sprovvisti di problematiche, è perciò importante valutare attentamente di che strumenti servirsi in base alla tipologia di analisi che si vuole condurre.

Le ultime novità descritte e la velocità con cui sono state sviluppate nel corso degli anni sono promettenti per gli studi futuri di ecologia molecolare.

Capitolo II: Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): esempi di metodologie epigenetiche.

Spesso i siti in cui gli ecologi molecolari prelevano i loro campioni sono mari e oceani, ciò non sorprende se si pensa che l'habitat marino è il più vasto del pianeta e ricopre la maggior parte della superficie del globo: se ci esprimiamo in termini di volume totale costituisce oltre il 99% dello spazio terrestre colonizzato da forme viventi.

Una recente review che parla di epigenetica in ambito ecologico ed evolutivo (Lamka et al., 2022) afferma che solo 4 specie sono soggetti di 5 o più studi di ecologia molecolare, una di queste è *Gasterosteus aculeatus*, ciò suggerisce che stia diventando un organismo modello in questa disciplina emergente.

Perciò gli articoli trattati nelle prossime pagine, dato che esaminano le variazioni dei profili di metilazione di popolazioni di *three-spined stickleback* in diverse condizioni di salinità (uno dei fattori ecologici abiotici da cui dipende la distribuzione di questa specie), si dimostrano utili per intraprendere lo studio dell'ecologia molecolare.

Gasterosteus aculeatus è una specie che fa parte dei pesci osteitti e che abita le acque artiche, subartiche e temperate sia marine che dolci dell'emisfero boreale (IUCN Red List). È spesso soggetto di studi che indagano le basi genetiche dell'adattamento evolutivo, specialmente grazie all'elevata plasticità delle sue placche ossee che costituiscono la sua corazza difensiva, capaci di aumentare in numero e di ricoprire parti più o meno cospicue del loro corpo in poche generazioni.

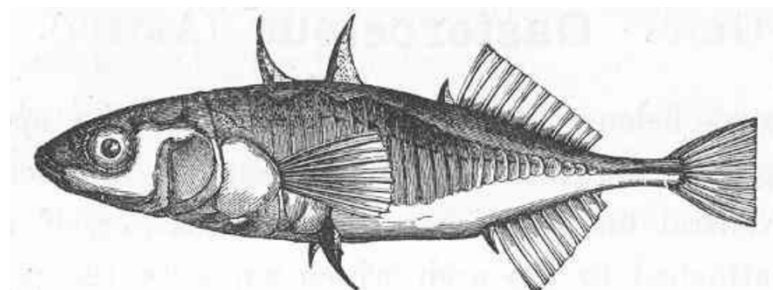


Fig. 28.—GASTEROSTEUS ACULEATUS (LINNÆUS).

Figura 2.1 Raffigurazione di *Gasterosteus aculeatus* in cui sono ben evidenti le tre spine dorsali acuminate tipiche della specie. Immagine tratta da Wikimedia Commons, disegno di Harry Govier Seeley.

Dopo l'ultima glaciazione, popolazioni marine ancestrali di *three-spined stickleback* hanno colonizzato e si sono adattate a nuovi ambienti disponibili d'acqua dolce. L'adattamento a questi nuovi ambienti portò a rapide e parallele evoluzioni divergenti che coinvolgono la forma corporea, il numero di placche ossee, i livelli di espressione genica e la *phenotypic plasticity* (Metzger and Schulte, 2018).

L'osmoregolazione rappresenta una sfida complicata per gli organismi viventi: i pesci d'acqua dolce sono iperosmotici rispetto all'ambiente esterno e devono fronteggiare la perdita di sali verso l'esterno e l'ingresso di acqua nel loro corpo; invece i pesci marini sono iposmotici rispetto all'esterno e devono far fronte a problemi opposti. È quindi molto importante per lo studio della distribuzione delle popolazioni indagare sui meccanismi che permettono agli organismi acquatici di adattarsi a differenti condizioni osmotiche.

Come verrà spiegato nei casi di studio che saranno analizzati, molti *G. aculeatus* possono trasferirsi da ambienti marini ad ambienti dolci e viceversa in una generazione. Ciò suggerisce che debbano essere coinvolti dei meccanismi epigenetici, più semplici da 'cancellare' e 'riscrivere' (Artemov et al., 2017).

2.1 Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS): studio di Metzger e Schulte (2018)

Nel loro studio del 2018 Metzger e Schulte hanno dimostrato che l'aumento di salinità dell'ambiente in cui vivono popolazioni di *G. aculeatus* ha effetti *genome wide* sulla metilazione del loro DNA, portando all'accumulo di variazione epigenetica tra le popolazioni naturali che vivono in diversi areali.

Gli autori hanno prelevato i campioni dall'*Oyster Lagoon*, in Columbia Britannica, li hanno separati in 6 acquari da 110 L e acclimatati a 21 ppt (*parts per thousand*) di salinità ed a 18°C. Queste condizioni mimano quelle presenti nel loro luogo di origine.

Gli autori hanno poi raccolto le uova da femmine di *three-spined stickleback* gravide e immediatamente divise in 6 diverse piastre petri contenenti 5ml di acqua marina a 2, 7, 14, 21, 28, or 35 ppt; la fecondazione è avvenuta con spermatozoi provenienti dalla stessa vasca. Una volta assorbito il tuorlo, gli embrioni sono stati spostati in vasche da 110 L con salinità appropriata. Operando in questo modo i campioni allevati in condizioni di salinità diverse sono cresciuti separatamente e sono stati controllati dal momento della fecondazione.

Gli autori hanno identificato le DMCs (*differentially methylated cytosines*) nei pesci, ad un mese di vita, cresciuti a 2 diverse salinità di allevamento, ovvero a 2 ppt ed a 21 ppt che corrispondono al range più ampio che permette una buona fecondazione e un buon successo di schiusa.

Per analizzarne il metiloma è stata applicata la metodologia WGBS: una volta ultimata la preparazione della libreria è stato applicato il trattamento con bisolfito ed il sequenziamento è stato condotto tramite piattaforma Illumina HiSeqX.

Sono stati identificati 1,259 CpG metilati differenzialmente nelle due condizioni di salinità prese in esame. La maggior parte delle DMCs (1,051) erano ipometilate in individui vissuti ad alta salinità rispetto ad individui con bassa salinità.

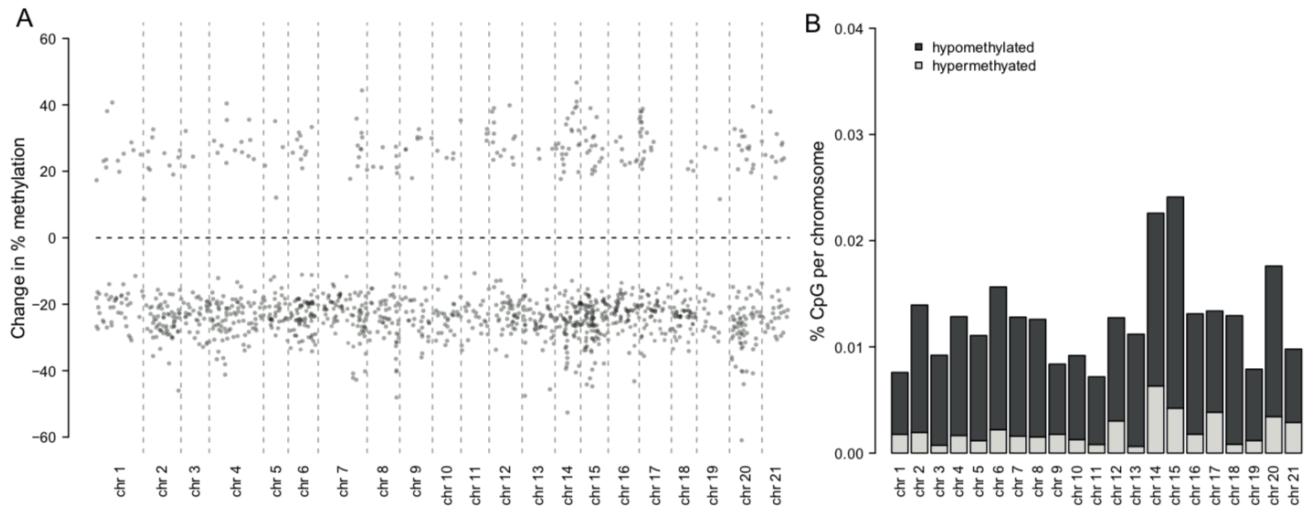


Figura 2.2 Loci CpG metilati differenzialmente in pesci allevati a bassa (2 ppt) e ad alta salinità (21 ppt). (A) Ogni punto rappresenta un DMC tra i due gruppi presi in esame. L'asse delle ordinate indica la percentuale di CpG metilate differenzialmente, un valore positivo corrisponde ad un DMC ipermetilato nei pesci allevati a 21 ppt rispetto a quelli allevati a 2 ppt, mentre un valore negativo rappresenta un DMC ipometilato nei pesci a 21 ppt rispetto a quelli allevati a 2 ppt. L'asse delle ascisse indica la posizione del DMC nel genoma di *G. aculeatus*. Sono rappresentati solo i DMC per i quali il range di metilazione supera il 10%. (B) Percentuale delle DMC in un dato cromosoma. Il colore più chiaro rappresenta le DMC ipermetilate e quello scuro rappresenta le DMC ipometilate nei pesci allevati a 21 ppt rispetto a quelli allevati a 2 ppt. Figura tratta da Metzger e Schulte, 2018.

Ciò va a sostenere l'idea che in seguito all'ultima glaciazione, nel passaggio da ambienti marini ad ambienti d'acqua dolce, *G. aculeatus* abbia subito un aumento dei livelli di metilazione e di conseguenza alcuni dei suoi geni vengono *down-regolati*. Questa è una chiara risposta epigenetica alle variazioni dei fattori ambientali.

Analisi dei geni collocati vicino a queste DMCs hanno rivelato che di molti di questi si conosceva già il coinvolgimento nella risposta alle variazioni di salinità (studi condotti tramite RNA-seq da Gibbons et al., 2017 e da Wang et al., 2014).

Nello studio di Metzger e Schulte (2018) sono stati identificati 126 geni che rispondono (aumentando o diminuendo il loro livello di metilazione) al grado di salinità. Tra questi sono presenti molti geni di canali ionici che sono importanti per regolare le concentrazioni cellulari degli ioni in condizioni iper ed iposmotiche, come la pompa del calcio *atp2b4*, il cotrasportatore Na/Cl *slc12a3* e il cotrasportatore Na/K *slc12a1*.

Questi dati suggeriscono che le variazioni di metilazione del DNA riflettono una risposta alla salinità dell'ambiente che può facilitare l'accumulo di variazione epigenetica tra le popolazioni naturali e possono avere un ruolo nel facilitare la transizione da ambienti marini ad ambienti d'acqua dolce.

In questo studio è stata utilizzata la metodologia del WGBS (più costosa della RRBS come detto precedentemente) in quanto gli autori hanno condotto analisi anche su dimorfismo sessuale nella metilazione del cromosoma 19. Per far ciò era necessario verificare che la metilazione dimorfica fosse effettivamente presente in maniera più elevata nei cromosomi sessuali (19) che negli altri cromosomi. È stato quindi necessario l'utilizzo di un approccio che fornisse una rappresentazione del genoma completo.

Da questa analisi, è risultato che il 65% dei CpG metilati in maniera diversa tra maschi e femmine è contenuto nel cromosoma 19, più precisamente si ha un'ipermetilazione nel DNA delle femmine rispetto a quello dei maschi. Questo dimorfismo è presente in molti taxa, a causa dei sistemi di compensazione del dosaggio.

La metilazione differenziale dei cromosomi sessuali, propongono gli autori, può interpretare un importante ruolo nella soppressione della ricombinazione tra i due cromosomi omologhi e provocare così delle conseguenze nell'evoluzione dei cromosomi sessuali eterogametici.

2.2 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS): studio di Artemov et al., 2017

Studi condotti precedentemente a quello di Artemov et al. (2017), come gli articoli di Jones et al. (2012) e di Terekhanova et al. (2014), hanno riscontrato una variazione nelle frequenze alleliche di alcuni geni tra le popolazioni d'acqua marina e dolce. Tuttavia, si conosceva ancora poco sulla risposta dell'epigenoma di *G. aculeatus* all'alterazione della salinità.

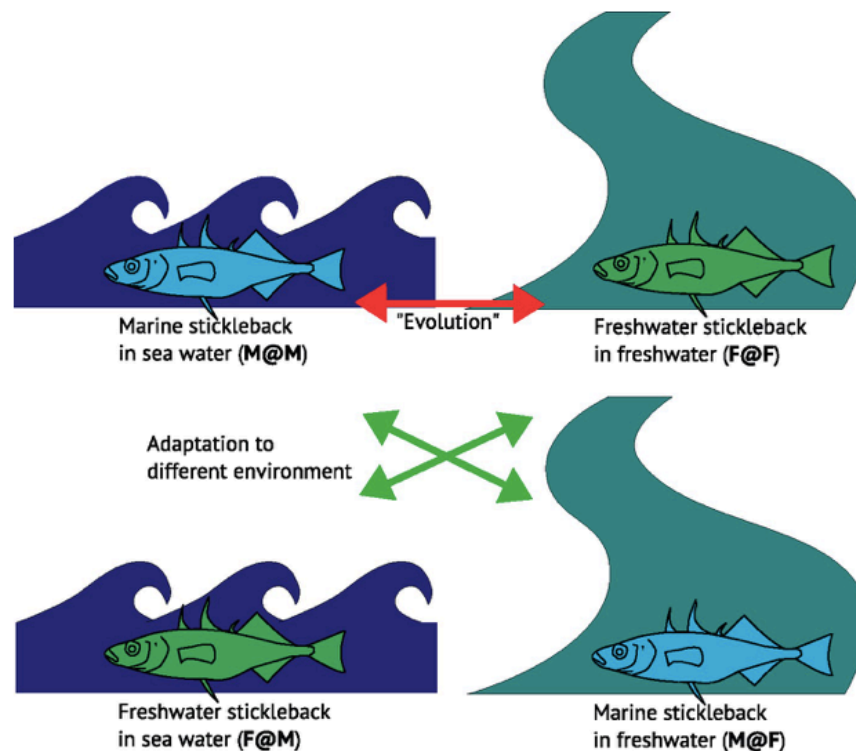


Figura 2.3 Progetto sperimentale dello studio di Artemov et al. Figura tratta da Artemov et al., 2017.

In questo studio gli autori hanno eseguito l'analisi di metilazione dei genomi di *G. aculeatus* marini (nell'articolo siglati come M@M), d'acqua dolce (F@F), d'acqua dolce ma trasferiti per 4 giorni in acque marine (F@M) e viceversa (M@F). I campioni sono stati prelevati dal lago Mashinnoye (in Carelia, Russia) e dalla costa del Golfo di Kandalakša, situato oltre il confine nord della Carelia (Figura 2.3).

Il lago si è separato dal mare 700 anni fa, momento nel quale la concentrazione salina delle sue acque ha iniziato a calare drasticamente fino a raggiungere una salinità tipica delle acque dolci.

Tramite tecnica RRBS (con sequenziatore Illumina 2500 ed enzima di restrizione *MspI*) gli autori hanno identificato i DMGs (*differentially methylated genes*), definiti tali se contenenti almeno una DMC. Questo tipo di analisi ha permesso agli autori dello studio di studiare l'adattamento delle popolazioni campione nel breve lasso temporale (gruppi di *three-spined stickleback* rimasti nel loro ambiente d'origine confrontati con quelli che si sono acclimatati ad un ambiente diverso) e a più ampia scala temporale (differenze tra pesci marini e d'acqua dolce, 'Evolution' nell'immagine 2.3).

Al tempo era già stato dimostrato da Dmitrieva et al. nel 2011 che ad una linea cellulare servono almeno 24 ore di esposizione a concentrazioni saline diverse da quelle del luogo d'origine per risentire dei primi cambiamenti epigenetici. Gli autori hanno quindi scelto 4 giorni come tempo di acclimatazione a breve termine.

Bisogna precisare che i campioni di DNA sono stati prelevati dalle branchie in quanto esse vengono a contatto diretto con l'acqua circostante e per questo motivo è più probabile che risentano dello stress osmotico.

I risultati sono stati chiari ed hanno permesso di dimostrare (come nello studio di Metzger e Schulte del 2018) che le variazioni della salinità hanno un impatto sulla metilazione del DNA di *G. aculeatus*: tra M@M ed F@F gli autori hanno identificato 40 DMGs, tra M@M ed M@F 151 e tra F@F ed F@M 16.

Per far chiarezza sull'adattamento a più lunga scala temporale, gli autori hanno analizzato la natura dei 40 DMGs risultati tra M@M ed F@F: sono quasi tutti geni codificanti proteine di canali ionici (come CACNA1FB canale del calcio voltaggio-dipendente, ATP4A pompa Na/K ATP-dipendente) e proteine transmembrana (come GJA3 proteina gap-junction).

Concentrandosi su CACNA1FB hanno registrato una diminuzione dei livelli di metilazione dei CpG nella DMR in cui si trova il gene di questo canale ionico nella popolazione d'acqua dolce (F@F) rispetto alla popolazione marina (M@M). Successivamente, sono stati studiati i livelli di espressione di CACNA1FB in entrambi i gruppi, tramite analisi trascrittomiche (RNA-seq). Ciò ha permesso agli autori di confermare che l'espressione di CACNA1FB è più elevata negli F@F che negli M@M. Questi risultati sono in linea con il concetto comune che la metilazione del DNA nelle prossimità dei geni è correlata negativamente con l'espressione genica.

Considerazioni simili sono state fatte per gli altri geni appartenenti alle categorie sopracitate.

Altre analisi sono state condotte invece sui cambiamenti avvenuti nei 4 giorni di acclimatazione al nuovo ambiente: analizzando le differenze nella metilazione del DNA tra le popolazioni marine e d'acqua dolce hanno notato che alcune di queste somigliavano alle differenze indotte in breve tempo dalla traslocazione degli M@F.

Hanno ipotizzato che i geni che sono differenzialmente metilati sia tra F@F e M@M che tra M@F e M@M rappresentino la risposta iniziale alla variazione delle condizioni saline dell'ambiente circostante, un adattamento a breve termine che non può essere sostituito da altri cambiamenti evolutivisti e che può permanere nel tempo. Molti di questi geni sono associati alle risposte allo stress osmotico, come quelli coinvolti nell'ubiquitinazione e nell'autofagia.

Gli autori hanno inoltre ipotizzato che per le popolazioni di *three-spined stickleback* d'acqua dolce, che sono stati sottoposti ad un fenomeno chiamato 'collo di bottiglia' (*population bottleneck*) e che perciò hanno una variabilità genica limitata, sarebbe benefico compensare la carenza di eterozigotità (indice importante di variabilità genica) con una varianza epigenetica aumentata, così da avere a modo loro una varianza fenotipica che possa fare da substrato su cui la selezione può lavorare, portando la popolazione ad adattarsi.

Per dimostrare ciò hanno calcolato la varianza della metilazione del DNA in 5kb a cui appartengono i loci di alcuni geni consecutivi e correlati alle risposte alla variazione della salinità, sia tra gli individui M@M che tra gli F@F. La varianza maggiore appartiene al gruppo d'acqua dolce, dimostrando che la metilazione del DNA può contribuire all'adattamento dei pesci d'acqua dolce aumentando la varianza fenotipica (Fig. 2A).

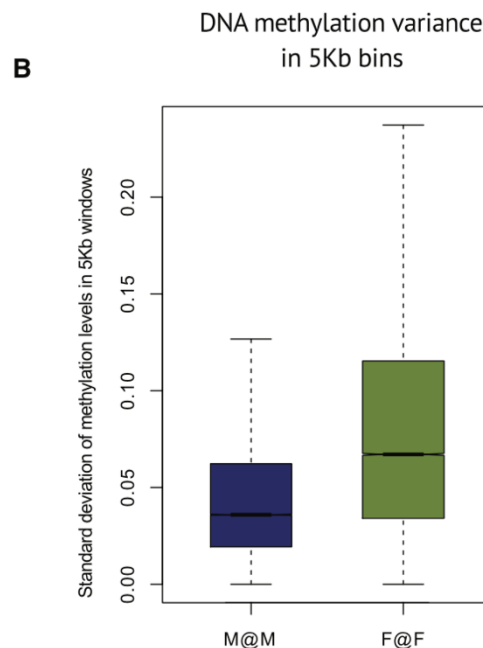


Figura 2.4 Confronto tra le varianze dei livelli di metilazione di 5kb del DNA di pesci M@M ed F@F. Grafico tratto da Artemov et al., 2017.

Gli autori hanno anche dimostrato che i set di geni che presentano differenze genetiche (sempre legate a condizioni saline diverse) ed epigenetiche non coincidono: ciò supporta l'idea che gli adattamenti genetici ed epigenetici stiano alla base di meccanismi evolutivi indipendenti. La metilazione del DNA rappresenta una risposta iniziale all'adattamento che non può essere sostituita da mutazioni genetiche di altra natura.

2.3 Alcune considerazioni sui casi di studio analizzati

Gli articoli presentati nel capitolo precedente portano risultati simili ed entrambi sottolineano l'importanza degli effetti ambientali sull'epigenoma, indispensabili per l'adattamento a nuovi areali caratterizzati da fattori ecologici diversi.

Ambedue sono esempi di come gli studi molecolari affinino quelli ecologici, come detto nel primo capitolo, in quanto estendono il loro campo di pertinenza.

Infatti, queste analisi sulle differenze di metilazione del DNA a salinità di sviluppo diverse possono risultare interessanti per gli ecologi in cerca di dati sulla distribuzione delle popolazioni, ma anche per i ricercatori di biologia evoluzionistica e di genetica delle popolazioni che studiano l'evoluzione adattativa.

A tal proposito, l'articolo di Artemov et al. risulta particolarmente interessante in quanto non solo porta prove a sostegno del coinvolgimento dei meccanismi epigenetici nell'evoluzione adattativa, ma nelle sue considerazioni differenzia anche l'adattamento a breve e lunga scala temporale.

È anche importante sottolineare le differenze tra questi casi di studio. Nel lavoro di Metzger e Schulte i campioni sono stati allevati alle salinità scelte dagli autori, che hanno manipolato sperimentalmente l'ambiente in cui i pesci hanno completato il loro sviluppo per verificare che altri fattori ecologici non potessero interferire. Invece nel lavoro di Artemov et al. i *three-spined sticklebacks* sono stati prelevati direttamente da due luoghi diversi, caratterizzati da differenti concentrazioni di salinità.

Sebbene i due siti di campionamento non fossero molto distanti, sarebbe stato preferibile condurre delle manipolazioni sperimentali in laboratorio per osservare lo sviluppo totale dei pesci, verificando che la presenza di fattori esterni diversi dai livelli di salinità non potessero interferire con i risultati.

Come accennato nella sezione 2.1, nonostante la tecnica RRBS sia più vantaggiosa in termini economici, nell'articolo di Metzger e Schulte è stata utilizzata la metodologia WGBS, in quanto uno degli obiettivi dello studio era studiare le differenze di metilazione tra il cromosoma 19 ed il resto del genoma.

Dal momento che ad oggi non esiste una tecnologia perfetta e priva di errori, prima di condurre degli studi di ecologia molecolare è molto importante valutare quale metodologia sia più adatta a rispondere alle proprie domande, tenendo conto dei diversi svantaggi che hanno, del *budget* e dell'organismo soggetto delle analisi.

Capitolo III: Proposta progettuale sull'applicazione di tecniche epigenetiche per studi ecologici.

Molti studi di ecotossicologia hanno come soggetto *G. aculeatus*, grazie al fatto che questa specie (della quale sono ben conosciuti percorsi migratori, fisiologia, genoma e ciclo vitale) si rivela un ottimo bioindicatore dell'inquinamento delle acque.

In questi articoli sono analizzati gli effetti dell'esposizione di *three-spined stickleback* a molti inquinanti di varia natura, come i PCBs (Adams et al., 2019), le microplastiche (O'Connor et al., 2022), il rame (Mottola et al., 2022) ed il BPA (bisfenolo A) (De Kermoyan et al., 2013).

I vantaggi *G. aculeatus* nell'ambito dell'ecotossicologia sono molteplici: è un piccolo pesce che può vivere in acquari di dimensioni ridotte ed ha un ciclo vitale breve, perciò i costi di allevamento non sono eccessivi. È facilmente catturabile, vive in habitat caratterizzati da temperature e salinità diverse in molte aree dell'emisfero boreale, inoltre, quando l'ambiente in cui si trova è soggetto a perturbazioni, reagisce attraverso risposte fisiologiche non letali, permettendo agli studiosi di misurare gli effetti causati dalle variazioni ambientali senza riscontrare grosse difficoltà (Ostlund-Nilsson, Mayer & Huntingford, 2006).

Per questi motivi sarebbe interessante negli studi futuri, visti i vantaggi che offre questo organismo nell'ambito dell'ecotossicologia e vista l'utilità delle metodologie epigenetiche, combinare le due materie ed analizzare le variazioni nella metilazione del DNA di questa specie in grado di dare buone risposte di *phenotypic plasticity* in seguito all'esposizione a diversi inquinanti ambientali.

È curioso osservare che ad oggi nelle banche dati non sono presenti molti studi simili a quelli proposti nelle sezioni precedenti e condotti sul soggetto della sezione 2 di questo elaborato (*Gasterosteus aculeatus*: esempi di metodologie epigenetiche). Ci sono tuttavia delle eccezioni.

Nel loro articolo del 2018, von Hippel et al. hanno analizzato le variazioni del metiloma di *Pungitius pungitius* (anche chiamato *Nine-spined stickleback*), parente prossimo del *Three-spined stickleback*, in risposta a diverse concentrazioni di PCBs (policlorobifenili), classe di composti chimici derivati dall'impatto antropico e trasportati in Alaska tramite l'atmosfera.

Un altro studio nell'ambito dell'ecotossicologia ha stimato gli effetti di due inquinanti ambientali (esabromociclododecano o HBCD e 17-β estradiolo o E₂), sui livelli di metilazione del DNA di fegato e gonadi di *G. aculeatus* (Aniagu et al., 2008). Al tempo, vari studi avevano già confermato l'estesa presenza di HBCD e di E₂ nelle acque Americane ed Europee ed altrettanti studi riportavano dati a sostegno del fatto che questi agenti inquinanti producessero effetti cancerogeni genotossici.

Gli autori ipotizzarono quindi la presenza di ipermetilazione nelle isole CpG dei genomi degli organismi esposti a queste sostanze, epimutazioni in grado di causare il silenziamento di geni di soppressori tumorali.

I risultati di questo studio mostrarono che l'HBCD, sia ad alte (300 ng/L) che a basse concentrazioni (30 ng/L), e gli E₂ non producevano effetti sulla metilazione del DNA degli epatociti. Tuttavia, l'esposizione al 17-β estradiolo causò un'ipermetilazione del DNA delle cellule gonadiche dei pesci, più precisamente un aumento del 45% nel rapporto 5mC/C quando paragonati ai valori del gruppo di controllo. Ciò può

effettivamente portare a ripercussioni importanti che riguardano la potenziale diminuzione dell'espressione di geni specifici come i soppressori tumorali.

Sebbene il lavoro di von Hippel et al. del 2008 risulti essere un interessante ed ottimo punto di partenza delle analisi ecotossicologiche che sfruttano le tecnologie epigenetiche per lo studio delle variazioni del metiloma di *G. aculeatus*, è piuttosto datato. Infatti, la tecnica utilizzata dagli autori è l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), una delle prime metodologie usate in questo campo.

In più le metodologie epigenetiche descritte negli scorsi capitoli si sono già rivelate utili nell'ambito dell'ecotossicologia, come nello studio di Šrut del 2022 che ha utilizzato l'epiRADseq sui lombrichi, organismi sentinella del suolo.

Potrebbe quindi rivelarsi più utile utilizzare tecnologie più recenti, come una di quelle con risoluzione al singolo nucleotide citate nei capitoli precedenti.

Attraverso questi approcci più moderni sarebbe possibile analizzare le risposte del metiloma di *three-spined stickleback* agli inquinanti già studiati in ambiti diversi dall'epigenetica, ed anche ad altre tipologie di composti chimici, ancora non testati su questa specie.

Sarà importante scegliere accuratamente la tecnica da adottare, se sono già conosciuti i geni che rispondono al contaminante preso in esame si rivelerà più semplice analizzare direttamente i loci di questi geni, altrimenti si rivelerà più utile un approccio *whole genome*.

Un altro aspetto su cui riporre l'attenzione sarà l'allestimento dell'esperimento: per essere sicuri che l'inquinante soggetto di studio sia l'unico fattore differente tra i gruppi sperimentali di pesci studiati, sarebbe più opportuno prelevare i campioni dallo stesso areale, separarli in vasche diverse ed aggiungere in ognuna di esse una concentrazione crescente di contaminante. Ovviamente, per lo stesso scopo, sarà importante anche manipolare e tenere sotto controllo altri fattori ecologici, come la luce, la temperatura, la salinità e la dieta, che dovranno mimare se non essere identici a quelli del luogo di provenienza dei soggetti di studio.

Sarà inoltre importante eseguire un controllo negativo su una parte dei campioni: questi dovranno essere allevati alle stesse condizioni degli altri pesci ma senza essere esposti all'inquinante. In questo modo sarà possibile verificare che le eventuali differenze nella metilazione del DNA dei diversi gruppi sperimentali non siano dovute a fattori diversi dalla presenza dell'inquinante nella vasca sperimentale.

Le diverse quantità di sostanza contaminante potrebbero permettere di individuare anche le concentrazioni massime vitali e/o le concentrazioni minime che consentono di rilevare delle differenze nella metilazione delle citosine.

Sarà necessario ricordare che il fattore tempo non è trascurabile in studi di ecologia molecolare, in quanto l'epigenoma è dinamico e può subire modificazioni nel tempo a seconda dello stadio vitale (Lamka et al., 2022). I campioni tissutali da analizzare tramite le tecniche epigenetiche andranno quindi prelevati da pesci della stessa età, sottoposti all'esperimento per la stessa durata di tempo.

Capitolo IV: Limiti e possibili sviluppi futuri delle metodologie epigenetiche per l'ecologia molecolare.

Lo scopo di questo elaborato è dimostrare l'utilità delle tecniche epigenetiche nel campo dell'ecologia. Lo studio delle mutazioni epigenetiche, mediatrici degli effetti che l'ambiente ha sul fenotipo, grazie all'esponenziale avanzamento delle tecnologie molecolari diventa sempre più sofisticato e può rappresentare un importante strumento di analisi ecologica.

Le metodologie moderne presentano alcune limitazioni che gli ecologi molecolari dovranno superare, cercando in futuro di minimizzare gli errori.

Complessivamente gli studi di ecologia molecolare differiscono molto nella loro organizzazione sperimentale, nei metodi di analisi delle epimutazioni e nella scelta dei *software* per le analisi bioinformatiche e statistiche, nonostante le domande di ricerca siano spesso simili (Laine et al., 2022). Ciò rende complicato delineare delle conclusioni generali che saranno dedotte in maniera più completa solo quando sarà possibile confrontare i diversi studi in maniera semplice ed immediata.

Un altro limite è dettato dal fatto che non tutti gli studi odierni tengono in conto la dinamicità dell'epigenoma, esso può essere diverso nei tessuti dello stesso individuo e può variare nel tempo. È perciò difficile basandosi solo sugli articoli pubblicati ad oggi, individuare il collegamento preciso tra le modifiche epigenetiche e le singole differenze fenotipiche (Lamka et al., 2022). Questa sfida potrà essere superata allestendo *design* sperimentali che includono il fattore tempo e la tessuto-specificità.

Nell'immediato futuro lo sviluppo tecnologico apporterà delle migliorie alle metodologie di analisi epigenetica descritte nei capitoli precedenti, minimizzando ad esempio gli errori di sequenziamento, e probabilmente le promettenti tecnologie che coinvolgono il *third generation sequencing* soppianderanno l'era del bisolfito.

Il rapido sviluppo tecnologico e la riduzione dei costi del sequenziamento hanno permesso ai ricercatori di produrre molti dati sui genomi di diversi taxa, anche di specie marine. Non va dimenticato però che per analizzare con successo il gran numero di risultati ottenuti attraverso i metodi di sequenziamento di nuova generazione è stato necessario sviluppare buoni software di analisi bioinformatiche.

Romani nel 2022 scrive: *'È ormai riconosciuto che i grandi progetti di genomica, trascrittomica, proteomica ed epigenomica non avrebbero neanche potuto essere lanciati senza un adeguato supporto informatico'*.

Per provare a dare un'occhiata alle prospettive future dell'ecologia molecolare va quindi tenuta in conto la velocità dello sviluppo delle tecnologie bioinformatiche, che negli ultimi decenni si sono evolute a pari passo con le tecniche di sequenziamento.

Anche se in questo elaborato l'epigenetica è stata considerata prettamente dalla prospettiva della metilazione, non bisogna dimenticare che esistono altre tipologie di variazioni epigenetiche, come la modifica di istoni.

Le diverse epimutazioni contribuiscono sinergicamente a determinare la struttura del DNA e ad alterare la regolazione della trascrizione che influenza la sintesi delle proteine e quindi il fenotipo. Perciò, per comprendere al meglio le risposte epigenetiche, in futuro si rivelerà utile considerare gli effetti di più di una mutazione epigenetica nello stesso studio.

Inoltre, sarà importante integrare sempre di più le analisi genetiche a quelle epigenetiche, in quanto anche le varianti alleliche dei geni presenti nelle popolazioni

possono influenzare i livelli di metilazione del DNA e quindi il fenotipo. Sono già presenti studi in cui si utilizzano nuovi approcci, come l'epiRADseq (Crotti et al., 2020), che permettono di ottenere contemporaneamente dati genetici ed epigenetici.

In futuro saranno condotti studi su specie ad oggi poco analizzate in questo campo, anche su organismi non modello, che potranno diventare soggetto di scoperte potenzialmente rivoluzionarie grazie ai loro vantaggi nella manipolazione sperimentale, come sta succedendo a *G. aculeatus*. La futura inclusione di molteplici specie allo studio dell'ecologia molecolare fornirà informazioni ad oggi sconosciute sui meccanismi e sugli effetti dell'ereditarietà epigenetica causata dalla variabilità ambientale (Lamka et al., 2022).

In conclusione, si può affermare che gli studi di ecologia molecolare vedranno sicuramente degli interessanti sviluppi in futuro, specialmente grazie alla multidisciplinarietà della materia che sta già attirando molti biologi in tutto il mondo. Sarà intrigante riuscire a rispondere a domande ecologiche (e non solo) ancora irrisolte in maniera efficace ed efficiente, servendosi degli strumenti dell'epigenetica, disciplina affascinante a complemento della genetica che può, tra le varie cose, rappresentare un importante ed innovativo strumento per la tutela ambientale e la salvaguardia delle specie.

BIBLIOGRAFIA:

- E.M. Adams, F.A. von Hippel, B.A. Hungate & C.L. Buck, Polychlorinated biphenyl (PCB) contamination of subsistence species on Unalaska Island in the Aleutian Archipelago, 2019, *Heliyon*, vol. 5, no. 12.
- S. O. Aniagu, T. D. Williams, Y. Allen, I. Katsiadaki, J. K. Chipman, Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17- β oestradiol, 2008, *Environment International*, Volume 34, Issue 3.
- A.V. Artemov, N.S. Mugue, S.M. Rastorguev, S. Zhenilo, A.M. Mazur, S.V. Tsygankova et al., Genome-Wide DNA methylation profiling reveals epigenetic adaptation of stickleback to marine and freshwater conditions, 2017, *Mol Biol Evol*, 34(9):2203-2213.
- O. Bossdorf, C.L. Richards, M. Pigliucci, Epigenetics for ecologists, 2008, *Ecol Lett*. 11(2):106-15.
- H. Cedar, A. Solage, G. Glaser, A. Razin, Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI, 1979, *Nucleic Acids Research*, Volume 6, Issue 6, Pages 2125–2132.
- M. Crotti, C.E. Adams, K.R. Elmer, Population genomic SNPs from epigenetic RADs: gaining genetic and epigenetic data from a single established next-generation sequencing approach, 2020, *Methods Ecol Evol* 11:839–849.
- M. Crotti, E. Yohannes, I.J. Winfield, A.A. Lyle, C.E. Adams & K.R. Elmer, Rapid adaptation through genomic and epigenomic responses following translocations in an endangered salmonid, 2021, *Evolutionary Applications*, 14(10), 2470-2489.
- G. De Kermoyan, S. Joachim, P. Baudoin, M. Lonjaret, C. Tebby, F. Lesaulnier, F. Lestremou, C. Chatellier, Z. Akrou, E. Pheron, J. Porcher, A.R.R. Péry & R. Beaudouin, Effects of bisphenol A on different trophic levels in a lotic experimental ecosystem, 2013, *Aquatic Toxicology*, vol. 144-145, pp. 186-198.
- M.K. Drown, A.N. DeLiberto, N. Flack, M. Doyle, A.G. Westover, J.C. Proefrock, S. Heilshorn, E. D'Alessandro, D.L. Crawford, C. Faulk, M.F. Oleksiak, Sequencing Bait: Nuclear and Mitogenome Assembly of an Abundant Coastal Tropical and Subtropical Fish, *Atherinomorus stipes*, 2022, *Genome Biology and Evolution*, Volume 14, Issue 8, evac111.
- J.R. Freeland, *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, 2005.
- M. Frommer, L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, C.L. Paul, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, 1992, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5):1827-31.
- T.C. Gibbons, D.C.H. Metzger, T.M. Healy, P.M. Schulte, Gene expression plasticity in response to salinity acclimation in threespine stickleback ecotypes from different salinity habitats, 2017, *Mol Ecol*. 26(10):2711–2725.
- A. Harrison, A. Parle-Mcdermott, DNA methylation: a timeline of methods and applications, 2011, *Front Genet.*;2:74.
- H. Hayatsu, Y. Wataya, K. Kai, S. Iida, Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives, 1970, *Biochemistry*, 9 (14), 2858– 65.
- F. A. von Hippel, P. K. Miller, D. O. Carpenter, D. Dillon, L. Smayda, I. Katsiadaki, T. A. Titus, P. Batzel, J. H. Postlethwait, C. L. Buck, Endocrine disruption and differential gene expression in sentinel fish on St. Lawrence Island, Alaska: Health implications for indigenous residents, 2018, *Environmental Pollution*, Volume 234, Pages 279-287.

- F.C. Jones, M.G. Grabherr, Y.F. Chan, P. Russell, E. Mauceli, J. Johnson, R. Swofford, M. Pirun, M.C. Zody, S. White et al., The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks, 2012, *Nature* 484:55–61.
- V.N. Laine, B. Sepers, M. Lindner, F. Gawehns, S. Ruuskanen & K. van Oers, An ecologist's guide for studying DNA methylation variation in wild vertebrates, 2022, *Molecular Ecology Resources*.
- G.F. Lamka, A.M. Harder, M. Sundaram, T.S. Schwartz, M.R. Christie, J.A. De-Woody, J.R. Willoughby, *Epigenetics in Ecology, Evolution and Conservation*, 2022, *Front. Ecol. Evol.*; 10:871791.
- D.C.H. Metzger, P.M. Schulte, The DNA Methylation Landscape of Stickleback Reveals Patterns of Sex Chromosome Evolution and Effects of Environmental Salinity, 2018, *Genome Biol Evol*, 1;10(3):775-785.
- G. Mottola, M. Nikinmaa & K. Anttila, 2022, Copper exposure improves the upper thermal tolerance in a sex-specific manner, irrespective of fish thermal history, *Aquatic Toxicology*, vol. 246.
- J.D. O'Connor, H.T. Lally, A.A. Koelmans, A.M. Mahon, I. O'Connor, R. Nash, J.J. O'Sullivan, J.J., M. Bruen, L. Heerey & S. Murphy, S., Modelling the transfer and accumulation of microplastics in a riverine freshwater food web, 2022, *Environmental Advances*, vol. 8.
- S. Ostlund-Nilsson, I. Mayer, F.A. Huntingford, *Biology of the three-spined stickleback* (1), 2006, CRC Press Group, ed. 1, pp 319-325.
- K. Oda, J. Marmur, Purification and properties of deoxyribonucleic acid methylase from *Bacillus subtilis*, 1966, *Biochemistry*, 5.2: 761-773.
- A.M. Polanowski, J. Robbins, D. Chandler, S.N. Jarman, Epigenetic estimation of age in humpback whales, 2014, *Molecular ecology resources*, 14(5), 976–987.
- A.D. Riggs, X inactivation, differentiation, and DNA methylation, 1975, *Cytogenet. Cell Genet.*, 14(1):9-25.
- M. Romani, *Epigenetica*, Zanichelli, 2021, pp. 108.
- D.R. Schield, M.R. Walsh, D.C. Card, A.L. Andrew, R.H. Adams & T.A. Castoe, EpiRADseq: Scalable analysis of genomewide patterns of methylation using next-generation sequencing, 2016, *Methods in Ecology and Evolution*, 7(1), 60-69.
- M. Šrut, *Environmental Epigenetics in Soil Ecosystems: Earthworms as Model Organisms*, 2022, *Toxics* 10, no. 7: 406.
- N.V. Terekhanova, M.D. Logacheva, A.A. Penin, T.V. Neretina, A.E. Barmintseva, G.A. Bazykin, A.S. Kondrashov, N.S. Mugue, Fast evolution from precast bricks: genomics of young freshwater populations of threes-pine stickleback *Gasterosteus aculeatus*, 2014, *PLoS Genet.* 10:e1004696.
- G. Vogt, Epigenetic variation in animal populations: Sources, extent, phenotypic implications, and ecological and evolutionary relevance, 2021, *J Biosci* 46, 24.
- G. Wang et al., Gene expression responses of threespine stickleback to salinity: implications for salt-sensitive hypertension, 2014, *Front Genet.*, 5:312.

SITOGRAFIA:

- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FMIB_47996_Gasterosteus_aculeatus_\(Linnaeus\).jpeg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FMIB_47996_Gasterosteus_aculeatus_(Linnaeus).jpeg) Wikimedia Commons, sito consultato nel settembre 2022.
- https://en.wikipedia.org/wiki/Whole_genome_bisulfite_sequencing Wikipedia, sito consultato nel settembre 2022.
- <https://www.iucnredlist.org/species/8951/58295405> IUCN Red List, sito consultato nell'ottobre 2022.