ESERCITAZIONE 2 – FILOGENESI MOLECOLARE

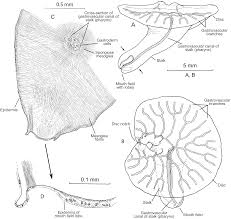
**CONSEGNA**

Questa esercitazione è organizzata per punti, come quella precedente, quindi restano valide le stesse indicazioni. Oltre a riprendere l’utilizzo di strumenti già utilizzati la scorsa volta, proveremo a scendere più a fondo in argomenti quali l’allineamento multiplo di sequenze e l’inferenza filogenetica. Questa esercitazione è suddivisa in 3 mini-task distinti, ispirati a situazioni reali e non di fantasia, che vi permetteranno quindi di capire che tipo di approccio viene utilizzato nella pratica di laboratorio per studiare l’evoluzione delle specie.

**MINITASK 1 – UNA MISTERIOSA CREATURA MARINA**

Nel 1986, una spedizione scientifica condotta nei mari al largo della Tasmania, ha recuperato i campioni che vedete illustrati nelle immagini qui sotto ad una profondità di circa 1,000 metri.

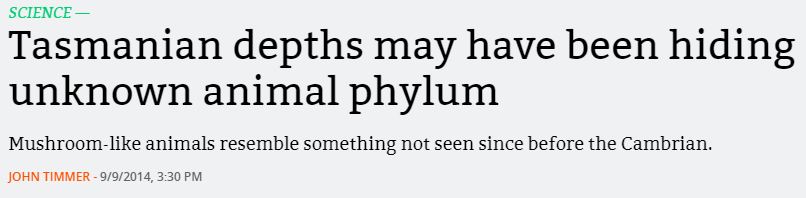
Conservati immediatamente in etanolo per ulteriori studi viste le loro caratteristiche uniche, questi organismi sono stati cercati a più riprese nelle campagne successive, fino ad essere finalmente trovati nuovamente nel 2014.

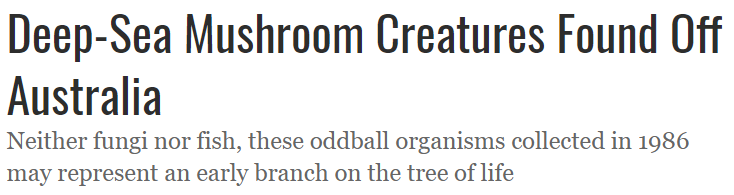


La classificazione, fatta sulla base di criteri morfologici, rivela un dato straordinario: ci si potrebbe trovare davanti ad un nuovo phylum di animali mai descritti in precedenza!

«*These mushroom-shaped organisms cannot be referred to either of the two phyla Ctenophora or Cnidaria at present, because they lack any specialised characters of these taxa. Resolving the phylogenetic position of Dendrogramma depends much on how the basal metazoan lineages (Ctenophora, Porifera, Placozoa, Cnidaria, and Bilateria) are related to each other, a question still under debate. At least Dendrogramma must have branched off before Bilateria and is possibly related to Ctenophora and/or Cnidaria. Dendrogramma, therefore, is referred to Metazoa incertae sedis*.”







Per giungere ad una classificazione corretta della specie, chiamata provvisoriamente *Dendrogramma enigmatica*, è stato necessario ricorrere a metodiche di identificazione genetica.

Proviamo a ripercorrere quanto è stato fatto, tentando di costruire un albero filogenetico delle specie, sfruttando la disponibilità di materiale genetico.

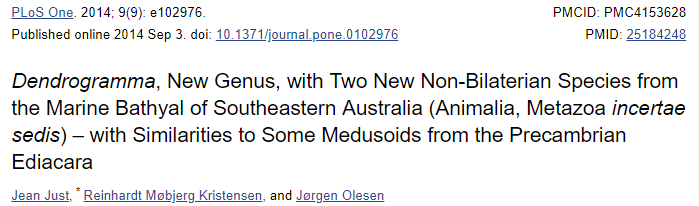
L’unica informazione a nostra disposizione è la seguente: siamo riusciti ad isolare questa sequenza, che è un mRNA completo che codifica il fattore di elongazione alfa, una proteina housekeeping che è presente in tutti gli eucarioti e che quindi può essere utilizzata come buona sequenza di riferimento per la costruzione di un albero filogenetico

>Dendrogramma\_enigmatica

GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAAGCTTCCTTCGTGAGAGATAGCTGCTTGAAAATACAAAATGGCACCGAAAGAAGATAAAACAAAAATTCACATCAACATTGTTGTAATCGGTCATGTCGATTCAGGAAAATCAACGAGTACCGGACATATGATTTACAAATGTGGTGGTATCGATAAACGAACCATCGAGAAATTCGAGAAAGAAGCCCAGGAGATGGGAAAAGGTTCCTTTAAATACGCATGGGTACTCGACAAATTAAAGGCCGAACGTGAACGAGGTATCACCATCGATATCCAGTTGATGAATTTCTGTACCAAGCGATACTATGTCACCATTATTGATGCCCCTGGACATCGTGATTTCATCAAGAACATGATTACAGGAACATCTCAAGCCGATTGTGCTGTGTTAATCGTTGCTGCCAGTACAGGTGAATTTGAAGCAGGTATTTCTAAGAATGGACAAACACGGGAACATGCTCTTCTGGCGTATACCTTAGGTGTGAAACAAATGATCGTTGGTATCAACAAGATTGATAACACCGAGCCACCTTACAGTGAAAACAGATTCAAGGAAATCAAGAAAGAGGTTGAAAGTTATGTGAAGAAAGTTGGTTACTCACCAAAAGCTGTTGCATTTGTGCCGATTTCTGGGTGGCATGGAGACAACATGGTGGAAAACTCTGACAAAATGCCTTGGTATGTCGGATGGAAGACGGAACCTAAAGGCAGTGATAAGACTTTGACAGGGAAGACTTTGTTCGATGCTATTGATGCCGTCCCTCCACCAGAGCGTCCAAGCTCAAAACCTTTGAGACTTCCTCTTCAAGATGTCTACAAGATCGGTGGTATTGGTACAGTTCCAGTAGGACGTGTCGAAACTGGTATATTGATACCTGGCATGGTTGTCACTTTCTCTCCAGCTAACTTAACAACTGAAGTCAAGTCTGTTGAAATGCATCACGAGACTATTCCTGAAGCTCATCCTGGTGATAATGTTGGTTTCAATGTCAAAAATATATCCATCAAAGATGTGAGGCGAGGTATGGTTGCTTCTGATAGCAAATGTGATCCTGCAAAAGAAACATCATCATTCCTTGCCCAGGTTATCATCTTGAACCATCCTGGTGAGATTCATGCAGGTTACCAACCAGTAGTGGATTGTCACACTGCTCACGTTGCTTGCAAGTTTGCTGAAATCAGGGAAAAAATTGATCGTCGTAGTGGTAAGGTTCTGGAAGAGAACCCTAAGATGGTGAAAACTGGCGATGCTGCTATGATAAATTTAATTCCATCAAAGCCCATGTGTGTTGAACCATTTGCGGACTATCAGCCATTGGGTCGTTTTGCTGTGCGTGACATGAGGCAAACAGTTGCTGTTGGTATCATCAAATCTGTCGACAAGAGTGGTGTGGCAGCTTGTAAAGTAACGAAATCTGCCCAGAAAGCACAGAAAGGAAAGTGACAACATGTTTCAAGCAGTGTACTTGTCTATTATCATTGTGTTATTCGTATTGTGGATTCCATCAATTCATTCAGGACTATAATTCTTCATAGAAAGCATTATAGAAGGAAAGCTTTCATAATCCTGTAAAATTGTGTTTCATATTGATAATAATTGAGTCGGATATTGTTTGGTTATAAATTGTATTCCCTCTTTCTTCTGTGGGGGTTCATTGTACATACAGCTCTTAAATATCTTTAAATTTTGAAGTTTACTCTATATTTTCTCTGAAATTTACAAGTCTGGAATCAAGGGTTAGCTTCTCCACATTATATTTCTTGTTATTCTTATGCCTTGTTACATTAATTTATATTACACAAGTGATATCTCGGATTGTCTAGGGTCTTTTGGGGGGTGCAGGCTGGATGAAACCATGCCATGAGATACGTATCTGCCTGTTAATATTGAAATCAGGAAATTTGGACCAAATTGGTCAGGGTAGTCGAGGAATCTGGAGCATAGCTGGCAGTGGGGAGCAAGTATTATAGTGAATGAAGTCAGCTTTGGGCAGAAACTGTTCTTAGCCCATGTCTTTAACATGTTTAATCTACGATTGTTTTGCCACATGGTTTTTGATTTGTGGCTCACTTACAATAATTTCTGGTGTTAGGTCGCCCTGGCCACTCGACTGCAAGAGCTGTGATAGCTGTAAACATAGTTGATTTATTTTACTTGGGTATTTTTTCATCTAAAACTTTGCGACGTCTAACTCTGAAAGTGAAATGTGATTGCTGTTATTTTTTGACCAAGGTTGAAAACAAATAATATTTTAGAAATTAATTTGGCCATTTGTAGATTCAAGTAGTTACTTTTCCTATGTTGCTAGATAATTTAGCAACATTAACATTTATTGAGCTTGATCATAAAATTTGCAAAATTAAGACTTGACATATAGTATTAGTGTGGTCTGAATTGTAAATCCATGAATTTTTTGTTTGAAGCAAGTGTTATACATTTTCGGAAAGCTTATTGAAAAAGAAGTAAAATTTACATGCTGTCTAATTTTATTTTCGGACATTTGTACATTTTACAGACCAGAATAATAAAACGTCAATCAAAAAAAAAAAAAAAA

Per risolvere il problema dobbiamo tenere in considerazione alcuni fattori fondamentali:

Abbiamo già a disposizione alcune indicazioni riguardo alla morfologia, che possiamo trovare leggendo l’articolo di Just e colleghi, di cui troviamo i dettagli nello screenshot che segue.

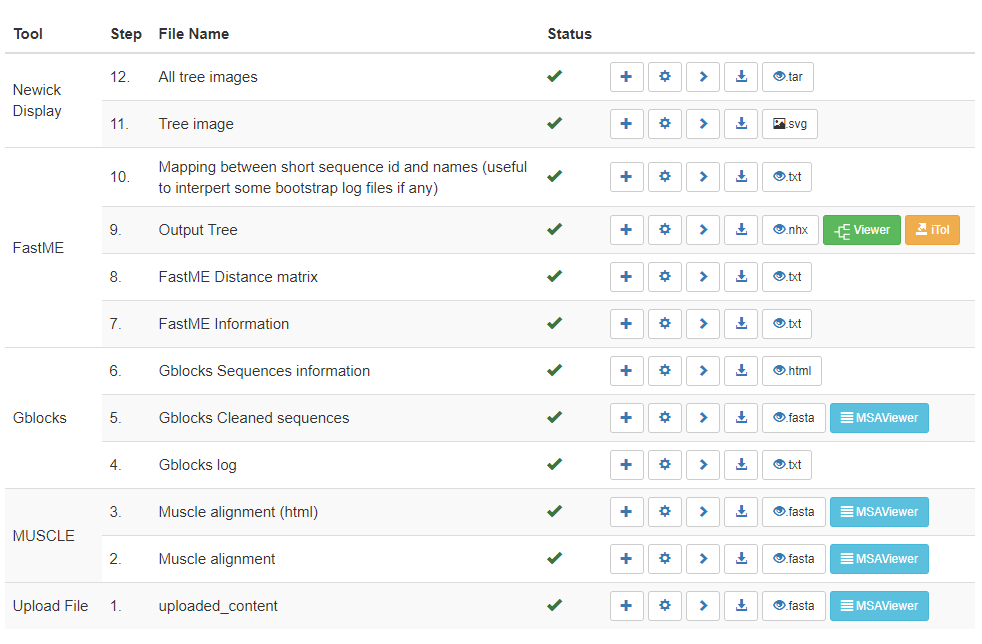


Queste informazioni suggeriscono già di limitare la ricerca a determinati gruppi tassonomici.

1. **Recuperate il paper da Pubmed e determinate quali sono i gruppi animali che è più ragionevole tenere in considerazione per la costruzione di un albero filogenetico**. NOTA BENE: non esiste un’unica risposta corretta! L’albero filogenetico che costruiremo potrà contenere più o meno specie a nostra scelta, ma l’importante è che la loro scelta ci consenta di risalire alla probabile classificazione di questa particolarissima specie. Se i risultati non vi soddisferanno, potrete sempre tornare indietro e recuperare ulteriori sequenze di altre specie.
2. Avremo bisogno di un outgroup, e per decidere quale (o quali) utilizzare fate riferimento alla definizione data a lezione. **Quale outgroup avete scelto?**
3. BLAST ci permetterà di recuperare direttamente dai database le sequenze di interesse, limitando la ricerca nel campo «organism». Il nostro scopo in questo caso è quello di recuperare le sequenze ORTOLOGHE all’EF1A di Dendrogramma. Di certo non siamo esperti di classificazione tassonomica degli invertebrati, quindi ci potrà tornare molto utile il database NCBI taxonomy per guidare la nostra ricerca (N.B. NON BARATE! Se cercate fin da subito Dendrogramma come parola chiave vi rovinerete la sorpresa di scoprirlo da soli!). Ultima cosa, ma non meno importante, ricordatevi che siamo davanti ad una sequenza codificante derivata da DNA genomico nucleare… **risulterà più agevole lavorare con la sequenza nucleotidica oppure con la sua traduzione in amino acidi? Di conseguenza che tipo di BLAST è più opportuno utilizzare?**
4. **Recuperate le sequenze in formato FASTA dalle specie che avete selezionato e copiatele in un file di testo** (NON DIMENTCATEVI di includere anche l’outgroup e la sequenza della nostra specie bersaglio!). NOTA: è consigliabile non usare Word per questo scopo… meglio fare affidamento ad editor di testo più semplici che lavorano senza formattazioni particolari del testo (che a volte introducono caratteri speciali), come wordpad o blocco note.
5. **Dobbiamo a questo punto generare un allineamento multiplo di sequenze con uno degli algoritmi visti a lezione, rifinirlo per eliminare le regioni scarsamente informative perché troppo divergenti e costruire l’albero filogenetico.** Per comodità utilizzeremo il portale Phylogeny.fr a cui potete accedere tramite questo indirizzo: <https://ngphylogeny.fr/workflows/alacarte>

Questo strumento è molto semplice ed intuitivo, perché vi permette di convertire automaticamente gli output di uno strumento nell’input per il passaggio successivo. Alla fine otterrete il risultato finale, cioè l’albero filogenetico, ma potrete anche recuperare tutti i file dei passaggi intermedi. **Costruite dunque la pipeline di analisi che preferite: dopo aver incollato le sequenze nella finestra apposita, bisogna scegliere un algoritmo di allineamento multiplo (MAFFT, MUSCLE o Clustal Omega), un metodo di pulizia dell’allineamento (selezionate Gblocks, l’unico che abbiamo visto a lezione) ed un metodo per l’inferenza filogenetica (potete scegliere liberamente tra varie opzioni per Minimum Evolution, Maximum Likelihood o Maximum Parsimony. L’analisi genererà un file in formato Newick pronto per la visualizzazione.**

1. A fine analisi dovreste vedere una schermata di questo tipo:



Cliccare s “fasta”, “txt”, ecc. vi permetterà di vedere il risultato delle varie fasi dell’analisi. MSAviewer è un comodo strumento per visualizzare l’allineamento multiplo, prima e dopo la pulizia di Gblocks. Provate a visualizzare i due allineamenti: vi sembra di notare differenze significative? Se si, in quale regione?

1. **Cliccate sul pulsante arancio iTol per visualizzare l’albero filogenetico. Cliccando con il tasto destro del mouse avrete la possibilità di ri-radicare l’albero, se necessario, sulla base dell’outgroup che avete selezionato. Dove si trova *Dendrogramma enigmatica*? Che idea vi siete fatti sulla sua posizione nell’albero della vita? Come classifichereste questa specie?**
2. **Verificate se la vostra ipotesi è supportata dalla letteratura. Collegatevi a Pubmed ed effettuate una ricerca degli articoli recenti che contengano la parola “Dendrogramma” nel titolo o nell’abstract. Traete le vostre conclusioni.**

**MINITASK 2 – UN PLESIOSAURO PESCATO DA UN PESCHERECCIO GIAPPONESE?**

Nel 1977, un peschereccio giapponese pescò al largo delle coste della Nuova Zelanda una carcassa putrefatta che divenne poi meglio nota con il nome di «Zuiyo-maru carcass »

Ributtata quasi subito in mare a causa dell’odore insopportabile, fu immortalata in alcune foto, che furono forse incautamente interpretate da alcuni professori giapponesi come evidenza della cattura dei resti di un plesiosauro. La cosa si gonfiò a tal punto che il governo giapponese rilasciò un francobollo commemorativo, nonostante lo scetticismo generale della comunità scientifica.





Fortunatamente dei campioni di materiale connettivo furono prelavati dai presenti permettendo, a distanza di decenni di risolvere la questione una volta per tutte

In questo caso il tessuto a nostra disposizione è altamente degradato, tanto da non permettere l’estrazione di materiale genetico

Immaginiamo però di essere entrati in possesso di un piccolo frammento di tessuto dal quale è stato possibile ottenere un frammento molto parziale di una proteina, che è comunque non di altissima qualità, in particolare nelle regioni N-terminale e C-terminale (le X indicano amino acidi ignoti):

LXXTXYTDFXLRTXXXMTVPAVLAKASAIYNPAIYAIIHPNYRKALAKSIPCLCVCCLSCIRRKDLVLGSISDTSERTLVMTRQSLGMXXHXDERTXGXFTRXA

La procedura da seguire è simile a quella utilizzata nel caso precedente, ma teniamo in considerazione il fatto che potrebbe essere necessario «ripulire» l’allineamento anche a mano se fosse necessario, magari eliminando alcune regioni palesemente non informative dal punto di vista filogenetico. Inoltre questo potrebbe essere soltanto un piccolo frammento di una proteina molto più grande, e di conseguenza potrebbe essere utile limitarci ad allineare la porzione condivisa tra tutte le sequenze prese in esame.

NOTA1: per il recupero delle sequenze dobbiamo prima di tutto capire di che proteina si tratti, di modo da poter recuperare le sequenze ortologhe da altre specie. Dobbiamo chiederci: quali sono le spiegazioni più plausibili oltre a quella di un plesiosauro? Che tipo di organismi di grandi dimensioni posso aspettarmi di ritrovare in un oceano? Naturalmente, non essendo disponibili sequenze di dinosauri in database, dovrete fare affidamento ad un po’ di fantasia e a quelli che sono i più stretti parenti di questi organismi attualmente presenti sul nostro pianeta.

Utilizzate sempre il portale Phylogeny.fr per le analisi filogenetiche.

**Sulla base della vostra ricerca, a che tipo di organismo pensate possa appartenere la «Zuiyo-maru carcass »?**

**MINITASK 3 – E’TORNATA LA TIGRE DELLA TASMANIA?**

Come saprete, la tigre della Tasmania, o tilacino, è uno degli esempi più famosi di specie portate all’estinzione dall’uomo in tempi recenti. Sebbene l’ultimo tilacino noto sia morto in cattività nel 1936 nel corso degli anni, anche in tempi recenti, si sono susseguiti numerosi presunti avvistamenti, sia in Tasmania che nell’Australia Occidentale.

L’ultimo avvistamento risale proprio ai giorni del recente lockdown forzato a cui anche l’Australia è stata sottoposta. È opinione di molti che specie rare e timorose dell’uomo abbiano ritrovato maggior coraggio per avvicinarsi ai centri abitati proprio a causa di questa situazione particolare.

La signora Beth Merryweather, residente nella città di Victoria, ha contattato un centro di biologia locale sostenendo di aver visto un tilacino del proprio giardino e di averlo fotografato. Purtroppo però la signora non è molto pratica con la tecnologia, e come spesso accade per questi avvistamenti la qualità della fotografia non è sufficiente per stabilire se la signora abbia preso un abbaglio oppure se l’avvistamento abbia un fondamento di credibilità.





Fortunatamente però la signora sostiene di aver scacciato l’animale lanciandogli una ciabatta, che avendolo colpito ha permesso di staccare un ciuffo di pelo dal quale è possibile estrarre del DNA.

I ricercatori si mettono all’opera, estraggono il DNA e decidono di effettuare una PCR sfruttando un marker molecolare ben noto, la citocromo B.

Ecco la sequenza ottenuta:

ATGACCAACATTCGAAAATCACACCCCCTTATCAAAATTATTAATCACTCATTCATCGATCTACCCACCC

CATCTAACATCTCAGCATGATGAAACTTCGGCTCCCTTCTAGGAGTCTGCCTAATCTTACAAATCCTCAC

CGGCCTCTTTTTGGCCATACACTACACATCAGACACAATAACCGCCTTTTCATCAGTTACCCACATCTGT

CGCGACGTTAATTATGGCTGAATCATCCGATATTTACACGCCAACGGAGCTTCTATATTCTTTATCTGCC

TGTACATACATGTAGGACGGGGAATGTACTACGGCTCCTACACCTTCTCAGAGACATGAAACATTGGAAT

CATACTATTATTTACAGTCATAGCCACAGCTTTTATGGGATACGTCCTACCATGAGGCCAAATGTCCTTC

TGAGGAGCAACCGTAATCACCAACCTCCTGTCAGCAATTCCATACATCGGGACTGAACTAGTAGAATGAA

TCTGAGGGGGCTTCTCAGTAGACAAAGCCACCCTAACACGATTCTTTGCCTTCCACTTCATTCTTCCATT

CATTATCTCAGCCTTAGCAGCAGTACACCTCTTATTCCTTCATGAAACAGGATCTAACAACCCCTCAGGA

ATTACATCCGATTCAGACAAAATCCCATTCCACCCATACTATACAATCAAAGACATCCTAGGTCTTCTAG

TACTAGTTTTAACACTCACACTACTCGTCCTRTTTTCACCAGACCTGCTAGGAGACCCAGACAACTACAT

CCCAGCCAACCCTTTAAATACCCCTCCCCATATTAAACCTGAATGATACTTCCTATTCGCATACGCAATT

CTCCGATCCATCCCCAACAAACTAGGGGGAGTCCTAGCCCTAGTACTCTCCATCCTAGTACTAGCAATCA

TTCCAATCCTCCACACCTCCAAACAACGAGGAATAATGTTTCGACCACTAAGCCAATGTCTATTCTGACT

TCTAGTAGCGGATCTCCTAACCCTAACATGAATCGGTGGCCAACCTGTAGAACATCCATTCATCACCATC

GGCCAACTAGCCTCCATCCTATATTTCTCAACCCTCCTAATCCTAATACCCATCTCAGGCATTATTGAAA

ACCGTCTACTCAAATGAAGA

Utilizzando un approccio molto semplice e simile a quello visto nei due casi precedenti, sapete risolvere questo mistero? La signora Beth ha davvero visto un tilacino?