

## **L'INTEGRAZIONE DI GENOTIPO E FENOTIPO ALLE SOGLIE DEL 2000**

Michele Sarà

*Dipartimento per lo studio del Territorio e delle sue Risorse*

*Corso Europa 26, 16132 Genova*

*email: sara@dipteris.unige.it*

### **Introduzione**

L'esigenza di una visuale più integrata di genotipo e fenotipo nel funzionamento del vivente si pone con grande attualità alle soglie del 2000. La genetica del 900 ha culminato con il sequenziamento praticamente completo dei genomi di alcuni procarioti ed eucarioti ivi compreso quello dell'uomo. Ma è opinione diffusa che a quest'era genomica debba seguire un'era postgenomica in cui quello che conta non è conoscere le sequenze geniche ma comprendere come tali sequenze operino nella produzione del fenotipo. Anche perché solo in tal modo sarà possibile agire correttamente nella manipolazione genica e raggiungere risultati efficaci ad esempio nella cura della patologia tumorale e di altre malattie umane. Si tratta cioè di superare il vuoto fra genotipo e fenotipo, un problema dell'era pregenomica che riaffiora in quella postgenomica (Brenner, 2000).

Il confronto fra i genomi sequenziati del lievito *Saccharomyces*, del nematode *Caenorhabditis elegans* e del moscerino *Drosophila melanogaster* ha dato ad esempio sorprendenti risultati (Rubin et al., 2000). I proteomi base (cioè il numero di proteine distinte codificate) nei tre organismi è rispettivamente di 4383 nel lievito, di 9453 nel nematode e di 8065 nella *Drosophila*. Meraviglia che la *Drosophila*, un eucariote pluricellulare complesso abbia un proteoma base che è solo il doppio di quello del lievito e un po' più piccolo di quello del nematode, nonostante le grandi differenze in termini di complessità di sviluppo e morfologia fra il moscerino e il verme. Ciò indica che la complessità di un organismo

non è in stretto rapporto con il numero dei suoi geni. Essa dipende da processi d'interazione e si inizia con una differenza nel tipo di proteine prodotte. Ad esempio nella *Drosophila* vi è un maggior numero e una maggiore diversità di proteine multidominio rispetto al nematode ed in entrambi vi sono proteine più grandi e più complesse, con domini extracellulari che funzionano nei rapporti intercellulari e col substrato, rispetto al lievito. Anche il genoma umano con i suoi circa 80.000 geni non è di molto superiore a quello degli altri metazoi, considerando che è molto amplificato, per cui il proteoma base non deve differire di molto da quello degli altri metazoi. Le più complesse funzioni dell'essere umano sono ottenute utilizzando in gran parte gli stessi componenti molecolari. L'evoluzione è quindi il risultato di fenomeni interattivi, di organizzazione, che non coinvolgono solo il genotipo, ma anche i rapporti fra genotipo e fenotipo e il fenotipo stesso.

Il modo in cui il genoma opera per costruire il fenotipo è oltremodo complesso e in gran parte sconosciuto. Ci appare ormai lontana l'epoca della semplicità, quella del detto: "un gene, una proteina" ma anche quella del cosiddetto dogma centrale della biologia molecolare per cui l'informazione fluisce dai geni alle proteine e non viceversa. Le ultime decadi di esplosivo sviluppo della biologia molecolare ci mostrano che l'espressione genica, l'atto fondante nella costruzione dei caratteri si verifica attraverso una stretta collaborazione di geni e proteine influenzata da stimoli ambientali, ad esempio nei complessi di trascrizione. Perciò il fenotipo non è solo il prodotto passivo dell'azione del genotipo ma è anche lo strumento attraverso cui quest'azione può verificarsi.

Schematizzando vi sono tre diversi livelli d'interazione in cui si attua la costruzione complessa del fenotipo. Il primo è quello delle interazioni geniche, dai fenomeni di dominanza ed epistasi ai processi di regolazione nell'ambito della struttura gerarchica del genoma sia, negli Eucarioti, ai gruppi di sovr-espressione di geni coinvolti in uno stesso processo biologico (Nyers e Pollet, 1999). Il secondo è nelle interazioni fra proteine, RNA e DNA, bidirezionali e con fenomeni di retroazione nei processi di espressione genica attraverso trascrizione e traduzione. Il terzo è dato da interazioni fra proteine ed altre sostanze che si verificano a livello fenotipico sia nell'ambito della cellula che intercellulare. Tutti sono influenzati da processi epigenetici collegati a stimoli ambientali esogeni ed endogeni, un insieme di effetti e di vincoli che nel loro insieme costituiscono l'epigenotipo (Fig.1). Questa trattazione vuole mettere a fuoco il fatto che i processi

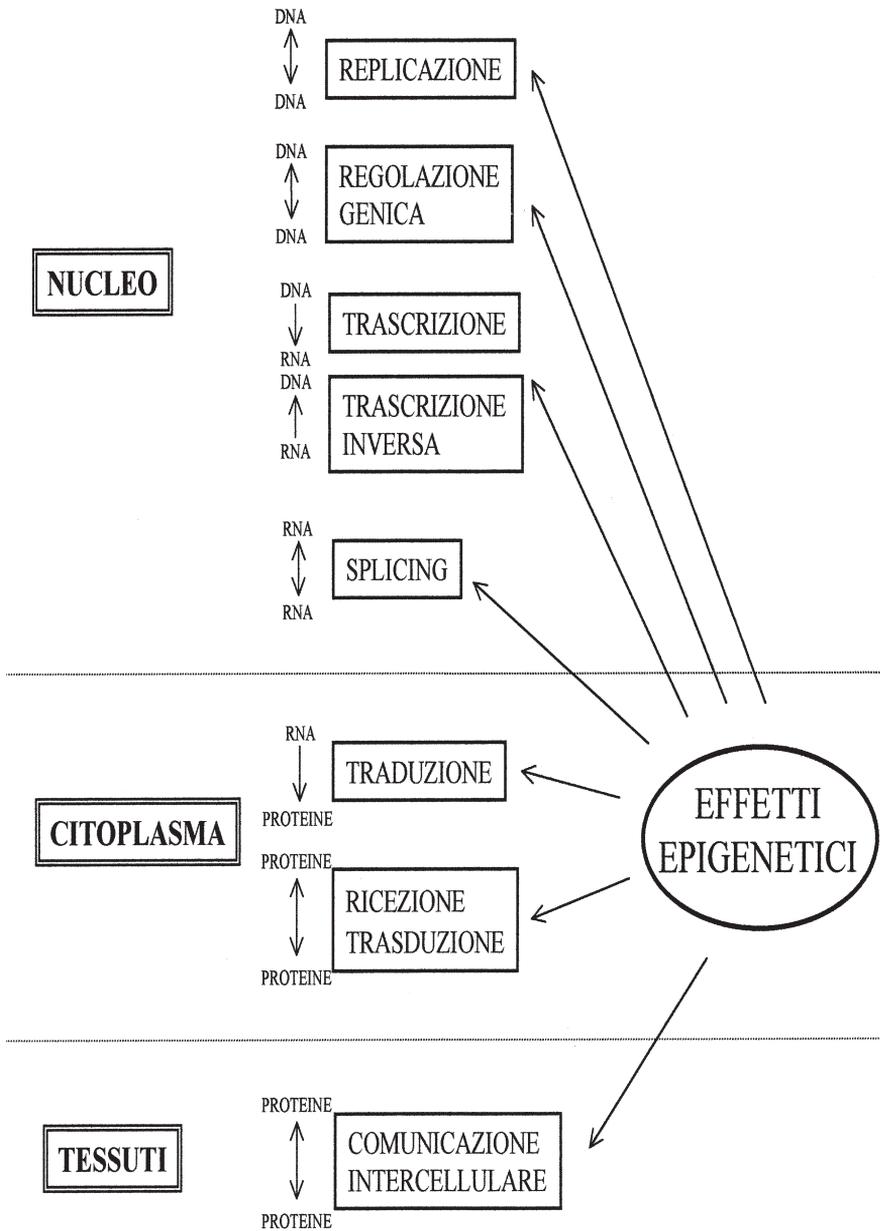


Fig. 1. Effetti epigenetici influenzati dall'ambiente nei processi di morfogenesi e sviluppo.

epigenetici rappresentano un'intima e onnipervasiva collaborazione fra genotipo e fenotipo e che la loro conoscenza rende inattuale ogni rigida contrapposizione fra di essi.

Inoltre, come si è detto, a livello dell'epigenotipo i messaggi ambientali, provengano essi dall'organismo o dall'ambiente, sono fondamentali. Nijhout (1990), ad esempio, sottolinea che tutta l'espressione genica è in ultima analisi dipendente dall'ambiente. Pertanto, un'approfondita conoscenza dei fenomeni epigenetici ha interesse anche per comprendere il ruolo dell'ambiente nella genesi della diversità biologica, e quindi nel decorso dell'evoluzione.

### **Storia del dualismo genotipo-fenotipo**

Il dualismo genotipo/fenotipo si apre teoricamente, ancor prima della nascita della genetica, a seguito della riscoperta delle leggi di Mendel agli inizi del 1900 e dei termini che lo definiscono, alla fine Ottocento, col dualismo somatico-germinale di Weismann. Weismann sulla base della teoria della continuità del plasma germinale pone una barriera invalicabile fra la linea germinale e il soma dell'individuo. In sostanza viene negata ogni possibilità di ereditarietà dei caratteri acquisiti (1883, 1885) perché l'informazione non può procedere dall'organismo ai gameti. Weismann è considerato il fondatore del neo-darwinismo. Infatti la barriera da lui tracciata sarà consolidata nel Novecento anche con lo sviluppo della genetica a seguito della riscoperta delle leggi di Mendel. I determinanti di Weismann diventano i fattori di Bateson e i geni di Johannsen. Nel 1911 Johannsen formula il termine di genotipo per il complesso di elementi ereditari che vengono trasmessi generazionalmente, cioè i geni, mentre quello di fenotipo indica i caratteri che si manifestano nell'individuo a seguito del suo sviluppo. Il genotipo diventa il campo d'indagine della genetica mentre il fenotipo quello dell'embriologia e si consuma in tal modo anche un divorzio fra queste due fondamentali scienze biologiche. Tale divorzio durerà fin alle ultime decadi di questo secolo, quando lo sviluppo della biologia molecolare dimostrerà che genetica ed embriologia sono intimamente legate. I geni, il genotipo, comunque, per tutta la prima metà del Novecento non sono chimicamente definiti. Per l'esatta definizione chimica e strutturale, occorrerà aspettare, attraverso differenti tappe, il 1953 quando Watson e Crick dimostrarono la struttura a doppia elica del

gene identificato col DNA e prospettarono la sua capacità di duplicarsi. La fine degli anni 50 e l'inizio degli anni 60 con la definizione dei processi di sintesi proteica ad opera di trascrizione e traduzione e la decifrazione del codice genetico portarono a formulare, insieme con l'universalità del codice, il dogma centrale della biologia molecolare secondo cui l'informazione passa dal gene alla proteina e non viceversa. Il gene codifica la proteina, "un gene - una proteina", e il fenotipo è del tutto subordinato al genotipo. Questi concetti saranno ulteriormente ribaditi nel neo-darwinismo estremo di Dawkins (1976). Egli, traendo le logiche conseguenze dai concetti base del neo-darwinismo, e in particolare dal ruolo egemone della selezione naturale, esprime la teoria dei geni selfish e dei replicatori (geni) contrapposti agli interattori (fenotipi) considerati solo come veicolo dei primi. Ciò porta ad un estremo riduzionismo: i fenotipi non sono solo prodotti dai geni ma al loro servizio. Anche se le idee di Dawkins hanno incontrato notevoli dissensi, il neo-darwinismo, con la subordinazione del fenotipo al genotipo, è tuttora largamente condiviso dall'opinione scientifica. Tuttavia, soprattutto negli anni 80 e 90, con gli sviluppi della biologia molecolare, si sono fatti strada nuovi orientamenti, che alle soglie del 2000, delineano il nuovo panorama dell'era postgenomica dopo quello dell'era genomica.

### **La rivalutazione del fenotipo**

Conseguenza del dualismo fra genotipo e fenotipo era stato, come si è detto, il divorzio fra genetica ed embriologia. Pochi scienziati, come Schmalhausen e Waddington, lavorano all'interfaccia fra le due discipline. Waddington (1942, 1953, 1957), in pieno fiorire del neo-darwinismo riduttivo, su base sperimentale e teorica, elabora concetti fondamentali come quelli di paesaggio epigenetico, canalizzazione dello sviluppo e assimilazione genetica, Schmalhausen (1949) quello di norma di reazione. Ma il riavvicinamento generalizzato fra embriologia e genetica e quindi lo studio congiunto del fenotipo e del genotipo per una loro confluenza nella teoria evolutiva, è dovuto soprattutto ai nuovi dati forniti dalla biologia molecolare per la conoscenza della biologia cellulare e del funzionamento del genoma. Paradossalmente proprio nello stesso periodo in cui nella sintesi proteica veniva sottolineato il flusso unidirezionale dell'informazione dai geni alle proteine, Jacob e Monod (1961) mostravano che nel funzionamento

dell'operon e quindi nella sintesi proteica è fondamentale il concetto di feedback, cioè di retroazione del prodotto (proteina) sull'operatività dei geni. In sostanza la regolazione del lac operon è una risposta plastica ad un fattore esterno, l'afflusso di un nutriente (Schlichting e Pigliucci, 1998). Un momento significativo del nuovo incontro fra problemi dello sviluppo e dell'eredità, cioè fra genetica ed embriologia si ebbe quando negli anni 70 e 80 venne sottolineato il concetto di constraints (vincoli) di sviluppo che operano nell'evoluzione insieme ai fattori propriamente neo-darwiniani e con la diffusione dei nuovi concetti ad opera di Gould (1977). Nasce allora quella corrente del pensiero evoluzionista che coniuga evoluzione e sviluppo, filogenesi ed ontogenesi e che recentemente è stata definita EVO-DEVO. Naturalmente anche in questa corrente si manifesta un contrasto fra coloro come Gehring che sottolineano il preformismo genetico dello sviluppo legato al ruolo egemone dei geni omeotici e delle relative cascate geniche nella determinazione della morfogenesi e coloro che invece sottolineano come tali geni operino in un contesto interattivo, campi morfogenetici che ne modificano l'attività (Aranda-Anzaldo, 2000). Ma se i primi spiegano la conservazione genetica di strutture e funzioni negli organismi, in particolare negli animali, i secondi mostrano come processi regolativi del genoma mediati dal citoplasma possano dare origine alle novità evolutive.

In effetti l'attuale paradigma del rapporto fra genotipo e fenotipo elaborato dal neo-darwinismo si fonda su due concetti che sono contraddetti da alcuni dati della ricerca biologico molecolare e sulla base della teoria della complessità: a) che i geni operino prescindendo da tutto il contesto biologico di cui fanno parte; b) che il flusso dell'informazione scorra solo dal genotipo al fenotipo e non in entrambe le direzioni e che quindi la selezione naturale sia l'unico agente che indirizzi il corso dell'evoluzione. Esiste invece una serie di constraints della selezione che operano a più livelli, genetici ed epigenetici (Sarà, 1999a).

### **Il genoma dinamico e le interazioni a livello del genotipo**

Il genoma appare oggi non come una semplice raccolta di geni ordinati lungo i cromosomi ma come un sistema altamente strutturato e dinamico in cui relazioni si possono stabilire anche fra geni situati a distanza. Nel genoma avvengono continue variazioni non solo ad opera di mutazioni

ma anche per intervento di particelle di DNA estranee, che s'inseriscono nelle sequenze nucleotidiche normali di batteri, piante e animali. Nel genoma eucariotico solo il 2% di questi elementi trasferibili (trasposoni) è dato da frammenti di DNA che si trasferiscono da un punto all'altro dei cromosomi: la parte di gran lunga più importante è data dai retrotrasposoni che provengono da RNA che ha subito il processo di trascrizione inversa, trasformandosi in DNA. Ciò si verifica, ad esempio, nel caso dei virus oncogeni e dell'HIV agente dell'AIDS (retrotrasposoni e retrovirus). La quantità dei trasposoni inseriti nel DNA in cui producono sequenze ripetute è altissima. Vi fanno parte elementi interspersi miniatura (MITES), corti (SINES), lunghi (LINES) e a lunghi repeats terminali retrovirali - simili. Nelle piante superiori costituiscono una gran parte del genoma, ad esempio nel mais, dove vennero scoperti da Mc Clintock negli anni 40, il 50 %, ma anche nell'uomo la loro quantità è grandissima, circa il 35 % del genoma (Kidwell e Lisch, 2000). Considerati inizialmente privi di valore, un DNA junk o parassita, la loro importanza nel funzionamento del DNA è gradualmente emersa ed oggi è stata chiaramente stabilita nei processi regolativi del DNA con influenza sulla normale fisiologia e morfogenesi della cellula. I trasposoni partecipano all'evoluzione del genoma essendo cooptati in ruoli strutturali e regolatori. Non sono elementi genetici autonomi ma piuttosto agiscono di concerto con il genoma preesistente attraverso effetti posizione entrando nelle reti regolative del genoma che li ospita. Si comportano quindi più da simionti che da parassiti. Questo non vale per gli alleli indotti da trasposoni in laboratorio che hanno in generale effetti neutrali o negativi ma per quelli naturali che derivano da antiche inserzioni, hanno superato il filtro della selezione e che sono stati cooptati per partecipare alla regolazione dei geni attuali. Come osservato da Girard e Freeling, (1999) l'inserzione di trasposoni può alterare sia il livello dell'espressione genica che il pattern spaziale di espressione di geni adiacenti essere con effetti regolatori quantitativi e qualitativi. I trasposoni possono contenere anche enhancers con specificità tissurale, come promoters di sistemi di espressione genica e anche, attraverso fattori trans e cambiamenti epigenetici quali la metilazione, agire come soppressori e silenziatori di geni.

Come indicato da Kidwell e Lisch (2000) i trasposoni hanno quindi un importante ruolo sia nella mutazione che nella riorganizzazione del genoma. Dati recenti indicano che la stessa telomerasi possa essersi evoluta da trasposoni o possa aver dato origine a varie famiglie di retroelementi

(Eickbush, 1997) e che quindi i trasposoni giochino un ruolo fondamentale anche nella divisione cellulare. Inoltre sembra importante il loro ruolo in fenomeni immunitari ad esempio nella ricombinazione in linfociti di Vertebrati (Agrawal et al., 1998). I trasposoni, prodotti in gran parte attraverso l'RNA e non direttamente dal DNA, rappresentano quindi una fonte attuale e importantissima di rinnovamento del genoma e delle sue attività informazionali. In sostanza agendo come simbionti integrati ripropongono oggi quanto si è verificato attraverso l'integrazione anche a livello genotipico di simbionti procarioti nella formazione degli organelli della cellula eucariotica (Sarà et al., 1998). La trascrizione inversa negli Eucarioti può anche avere il ruolo (Herbert e Rich, 1999) di conservare ribotipi vantaggiosi nel DNA e poi, con evidente ruolo evolutivo, trasferirli nella linea germinale.

Un fenomeno d'importanza evolutiva, che è stato anche associato agli elementi trasponibili è quello della paramutazione. Come indicato da Wolffe e Matzke (1999), la paramutazione, identificata inizialmente nelle piante, trasgredisce la prima legge di Mendel che stabilisce che gli alleli segregano immutati nella progenie. La paramutazione non è ben compresa ma si ritiene che coinvolga interazioni fisiche che trasmettano uno stato di attività o silenziamento genico fra alleli, che possono derivare da elementi trasponibili e loci diversi. In alcuni casi è coinvolta la metilazione ma in altri no, per cui sono possibili cambiamenti nella struttura della cromatina ereditabili meioticamente. L'eredità meiotica di stati epigenetici è stata osservata in mammiferi ed in organismi che non metilano il loro DNA, come lieviti e *Drosophila*. Comunque, come osservano Wolffe e Matzke, l'estensione generale dei fenomeni in cui cambiamenti epigenetici acquisiti o indotti persistono dopo la meiosi è un campo aperto di ricerca di grande importanza per la genetica e le malattie umane. Lo è naturalmente anche per la teoria evolutiva.

Purtroppo, come per la paramutazione, non si conosce l'esatto meccanismo in termini molecolari anche per altri fenomeni di grande importanza nella genetica delle popolazioni come la dominanza, interazione fra alleli di una coppia, l'epistasi, interazione fra alleli di coppie diverse, la pleiotropia, azione di un gene nella determinazione di caratteri diversi. Essi, esercitando un particolare effetto fenotipico, alterano la varianza additiva statistica ed hanno quindi un ruolo fondamentale nell'evoluzione (Schlichting e Pigliucci, 1998). Permane quella scissione tra genetica molecolare e genetica formale, soprattutto delle popolazioni, che non

giova certo alla chiarezza dell'attuale teoria evolutiva. Un caso analogo verrà successivamente discusso per un altro punto focale della teoria evolutiva, la plasticità fenotipica, in quanto dominio quasi esclusivo di ricerca dei genetisti di popolazione. Infine poco si sa sulle cause della duplicazione genica, fenomeno fondamentale per l'evoluzione di nuovi caratteri e funzioni negli organismi (Meyer e Schartl, 1999).

Un punto base per quanto riguarda le interazioni a livello del genoma è quello della sua organizzazione gerarchica. I geni non operano isolatamente ma attraverso cascate geniche organizzate in reti complesse. In tale sistema i geni strutturali agiscono in base alle istruzioni dei geni regolatori disposti a differenti livelli ma non si tratta di una distinzione assoluta fra due tipi di geni in quanto uno stesso gene può assolvere sia la funzione regolatrice che strutturale. Al sommo delle cascate si trovano i geni masters, come gli HOX che determinano il piano generale del corpo e di altre strutture fondamentali. I modelli di organizzazione genomica basati su semplici cascate è oggi sostituito da modelli più complessi a rete (networks) anche se si riconosce una certa autonomia alle cascate (modello misto, Rollo, 1994). Si tratta di reti altamente dinamiche in cui il livello e i tipi d'interazione genica cambiano continuamente. E' stato ad esempio ipotizzato che gli stadi filotipici, cioè quegli stadi dello sviluppo embrionale in cui i singoli phyla manifestano il massimo della loro caratterizzazione (Slack et al., 1993) corrispondano alla fase di sviluppo in cui si ha la massima interconnessione fra le cascate e quindi la rete operi al massimo. Come osservano Eizinger et al. (1999), attraverso le reti i geni possono assolvere nuove funzioni in nuovi anelli di regolazione (co-opzione) oppure possono cambiare la loro specificità molecolare pur rimanendo nello stesso, omologo, programma di sviluppo e mantenendo altre funzioni. In conclusione l'interplay fra conservazione e cambio di specificità dei geni e delle reti geniche genera novità di sviluppo nel tempo evolutivo.

L'interazione fra le molecole regolatrici è solo il primo atto di un processo che si conclude in sede citoplasmatica con alterazioni nelle interazioni fra proteine e che ha importanza evolutiva. La complessità dinamica delle reti e l'importanza del contesto in cui operano i geni spiega perché vi sia un notevole scollamento fra le sequenze di geni masters come *distalless* per le appendici, *eyeless* e *pax* per gli occhi e i caratteri del fenotipo che emergono sotto il loro controllo (Müller e Wagner, 1996). Ad esempio il gene *distalless* (*dll*), nonostante la stretta omologia, induce appendici molto diverse in vari gruppi animali e in animali privi di appendici come i Nematodi assolve

ad altre funzioni nell'ambito del sistema nervoso centrale (Panganiban et al., 1997). La varietà delle appendici espresse non dipende dalla struttura del gene perché nella sua storia vi è stato solo un evento di sostanziale modificazione, cioè una duplicazione, nella linea dei Deuterostomi.

Il contesto di una cascata genica inizia con l'interazione con geni di altre cascate ma poi interessa anche effetti interattivi con proteine ed altre sostanze nucleari e citoplasmatiche. Ai fattori endogeni della cellula occorre aggiungere fattori esogeni, basati su segnali del sistema recettori-transduttori (sistema sensitivo della cellula, Sarà 1996) che stabiliscono un rapporto fra il genoma di una cellula e quello di altre cellule dell'organismo (rapporti intercellulari) o anche l'ambiente. Regolazione ed espressione genica sono quindi fenomeni altamente complessi in cui il contesto non è meno importante dei geni direttamente coinvolti.

Un altro esempio della complessità di funzionamento del genoma viene dalla paleontologia. Col fenomeno detto dell'esplosione cambriana, nell'ambito di un periodo geologico relativamente breve (10-20 myr) compaiono improvvisamente tutti i phyla di animali pluricellulari oggi esistenti, oltre ad altri estinti. La durata del tempo intercorso non giustifica sul piano genetico la comparsa di una divergenza fenotipica espressa da Bauplan nettamente diversi. Ohno (1996) ha quindi enunciato la teoria del genoma pananimale, un genoma sostanzialmente unico, portato ad esprimersi in modi diversi per lo stabilirsi di differenti networks regolativi e quindi un utilizzo di potenzialità in esso celate. Una volta queste potenzialità utilizzate, tale genoma non ha più dato, negli oltre 500 myr successivamente trascorsi, nuovi phyla. Le novità evolutive successivamente comparse, ad esempio quella delle appendici con la loro diversificazione, possono essere dovute in larga misura ad un riutilizzo a un livello più basso del materiale genetico preesistente, rappresentato ad esempio dal gene *distalless*. Anche i geni HOX mostrano notevoli affinità in phyla diversi pur assolvendo funzioni molto diverse. Essi sono stati trovati, senza comprenderne la funzione, anche in Cnidari e Poriferi che mancano di asse cefalo-caudale. Fra l'altro nei Poriferi gli HOX hanno un'affinità con quelli del topo e dell'uomo di circa il 70% (Seimya et al., 1994). Comunque nei Poriferi, il più primitivo phylum animale pluricellulare, il macchinario molecolare, con sostanze come il collagene, è presente molto prima che si formino le strutture a cui esso presiede, cioè tessuti ed organi. I Poriferi hanno utilizzato questa primitività ai fini di una loro elevata plasticità morfogenetica. Ciò indica che le strutture si formano non perché siano presenti determinati geni ma

solo quando essi sono inseriti in determinati networks.

La storia paleontologica ci mostra anche l'emergenza di strutture che saranno alla base d'importanti novità evolutive, ancor prima che esse assumano la funzione a cui saranno devolute. Esse non sono quindi prodotte dalla selezione naturale ma appaiono come la realizzazione di potenzialità del Bauplan. Un esempio è dato dall'appendice anteriore di un pesce sarcopterigio del Devoniano in cui è configurata una struttura della pinna con 8 dita che precorre quella che nel tardo Devoniano comparirà in *Acanthostega*, antenato dei Tetrapodi (Daeschler e Shubin, 1997). Si tratta di un'innovazione chiave che compare con la formazione di determinati networks genetici e solo successivamente sarà perfezionata funzionalmente per via selettiva.

### **I processi epigenetici e il loro ruolo nell'espressione dei geni e nell'eredità**

S'intende, in senso stretto, con epigenetica lo studio di cambiamenti ereditari nell'espressione genica che si verificano senza un cambiamento nella sequenza del DNA (Wolffe e Matzke, 1999). Con essa viene stabilito un anello fondamentale di connessione fra genotipo e fenotipo. Processi epigenetici si verificano comunque, come si è precedentemente visto, anche nelle interazioni DNA-DNA e in quelle RNA-RNA. Si ritiene, pur se non se ne conosce il meccanismo (Wolffe e Matzke), che gli effetti epigenetici, in questi casi, dipendano da una ricognizione delle omologie delle sequenze degli acidi nucleici sia a livello del DNA che dell'RNA. Nel DNA le interazioni possono portare al silenziamento di geni inducendo modificazioni della cromatina e nell'RNA alla sua degradazione.

La scoperta di processi epigenetici basati sulla ricognizione della sequenza di acidi nucleici è derivata dallo sviluppo di metodi per introdurre geni nei genomi di funghi, piante e animali. I transgeni introdotti spesso s'integravano come copie multiple o erano identici alle sequenze endogene. Tuttavia, contrariamente alle aspettative, il dosaggio genico aumentato non portava ad un'espressione accresciuta ma al silenziamento dei geni. Successivamente si è visto che questi meccanismi basati sull'omologia potevano portare ad un silenziamento trascrizionale (TGS) o posttrascrizionale (PTGS). Le interazioni fra sequenze ripetute di DNA possono indurre la formazione e la trasmissione di stati genetici inattivi e modificazioni del DNA. Così nel

fungo filamentoso *Neurospora* si possono indurre mutazioni puntiformi (RIP) o un'intensa metilazione indotta premeioticamente (MIP). In piante, nella *Drosophila* e in mammiferi la percezione dell'omologia delle sequenze ripetute non si verifica ugualmente perché le sequenze ripetute non sono sempre silenziate e metilate e non portano a rapide mutazioni puntiformi. Tuttavia il silenziamento per metilazione (RIGS) è un fenomeno frequente che si verifica per cis e trans inattivazione. Dagli studi sulle piante è risultato che repeats di DNA invertiti possono rappresentare un segnale chiave per il silenziamento attraverso la metilazione. Ma una trans inattivazione può verificarsi anche per l'interazione fra il DNA e un RNA aberrante a doppia elica (ds RNA).

E' importante sottolineare che la trascrizione di un gene non dipende solo dalla sequenza di DNA e dalla disponibilità di fattori regolatori sequenza-specifici ma anche dalla presentazione dei geni entro la complessa architettura del cromosoma. Questa può quindi dirigere il silenziamento cromosomico dei repeats di DNA in piante, animali e funghi e nello stesso tempo la metilazione indotta dai repeats può indurre modificazioni della cromatina e TGS. In *Drosophila*, un organismo che non metila il suo DNA, i repeats transgenici interagenti possono indurre un silenziamento grazie all'associazione di proteine del gruppo Polycomb con la cromatina.

La metilazione indotta in molti casi di silenziamento in piante, funghi e vertebrati è una forma di difesa del genoma. Nei batteri la metilazione della citosina fa parte di un sistema che protegge l'ospite dai batteriofagi. I genomi eucariotici sono continuamente esposti alle attività degli elementi trasponibili e ai retrovirus endogeni. I retroelementi stessi possono dare origine a segnali RNA per la metilazione. Tuttavia non sembra che la metilazione sia una strategia efficace contro i retroelementi dato che i vertebrati ne hanno 10 volte in più degli'invertebrati che mancano della metilazione. Potrebbero quindi essere, secondo Wolffe e Matzke, i trasposoni stessi a provocare la metilazione per usarla come una strategia per nascondersi all'ospite e accrescere il loro numero nelle divisioni cellulari: una strategia paragonabile alla lisogenia dei procarioti e che può contribuire alla latenza virale nei Mammiferi.

Allo stesso modo come il genoma risponde al DNA intrusivo risponde anche agli RNA che derivano dai virus o all'iperespressione del DNA alieno. I meccanismi per neutralizzare l'RNA estraneo o aberrante si basano o su di un cambiamento della stabilità dell'RNA nel citoplasma o su meccanismi che usano lo stesso RNA per indurre la metilazione e il silenziamento dei

geni nucleari omologhi. Infatti, una crescente evidenza mostra che processi nucleari e citoplasmatici possono essere connessi attraverso forme aberranti di RNA che, come il ds RNA, possono prodursi nel citoplasma. Le ricerche sui transgeni hanno rappresentato un campo fondamentale d'indagine per la comprensione di meccanismi epigenetici di silenziamento dei geni ma occorre sottolineare che il controllo epigenetico dell'espressione genica è un fenomeno essenziale per lo sviluppo normale dell'organismo, dirigendo il differenziamento cellulare: se è alterato possono prodursi la patologia tumorale ed altre gravi sindromi.

Gli stati epigenetici sono ereditati attraverso le divisioni cellulari (E.I.S di Jablonka e Lamb, 1989, 1995) ma normalmente essi vengono erasi al momento della riproduzione sessuale. Tuttavia vi è una crescente evidenza che alcuni stati epigenetici acquisiti possono essere ereditati meioticamente. L'imprinting genomico, un fenomeno non-mendeliano in cui gli alleli sono espressi diversamente a seconda dell'origine parentale, è un caso di metilazione che passa attraverso i gameti ma deve comunque essere ristabilito ad ogni generazione. Casi in cui gli stati epigenetici diventano ereditari stabilmente sono quelli delle paramutazioni e delle epimutazioni (Holliday, 1990), entrambi scoperti nelle piante. Recentemente le mutazioni epigenetiche o epimutazioni sono state analizzate da Cubas et al. (1999) per una variazione naturale nella simmetria del fiore di *Linaria vulgaris*. Nel mutante un gene risulta estensivamente metilato e silente trascrizionalmente. Talora esso può revertire fenotipicamente durante lo sviluppo somatico e quindi la sua stabilità è minore di quella delle mutazioni geniche. Tuttavia le epimutazioni possono avere conseguenze di lunga durata, che dipendono dalle interazioni delle variazioni prodotte con quelle dei geni nucleari e dal fatto che il DNA metilato è più proclive a mutazioni e può influenzare la frequenza locale di ricombinazioni. L'epimutazione può quindi avere un significato per l'evoluzione delle piante, a breve e a lungo termine. Il meccanismo che genera epimutazioni nelle piante non è conosciuto ma può riflettere un'aberrante attivazione entro i meristemi di un processo che può operare per silenziare geni in alcune cellule non meristematiche. Negli animali le epimutazioni appaiono meno frequenti. Tuttavia epimutazioni sono state rinvenute come eventi somatici in alcuni tumori e recentemente anche in *Drosophila* e in mammiferi (Balter, 2000). Nel topo il colore della pelliccia può essere ereditato in modo stabile attraverso un'epimutazione del gene agouti (Morgan, 1999). Le piante sono favorite perché diversamente dagli animali non vi è una precoce separazione

fra soma e germe e un'epimutazione che sorge nel meristema può essere trasmessa alla generazione successiva o per via sessuale o per propagazione vegetativa. Ma i fenomeni di epimutazione negli animali attestano che la barriera somatico-germinale può essere elusa anche in questi.

Nei fenomeni epigenetici un collegamento fondamentale fra fenotipo e genotipo è esercitato dalla struttura della cromatina (ruolo paragenetico). Del resto i fenomeni che si verificano al momento dell'espressione nei rapporti fra proteine del complesso di trascrizione, come le TBP, e il DNA mostrano che questo per trascrivere deve alterare la sua configurazione spaziale (Klug, 1993). Oltre all'informazione regolatrice dovuta ai legami chimici specifici fra proteine e DNA vi è quindi un'informazione spaziale detta conformazionale. Perciò si può distinguere nello stesso DNA un fenotipo (la disposizione spaziale dell'elica) ed un genotipo (il codice genetico).

Ma l'introduzione nei fenomeni ereditari dei processi epigenetici e quindi di aspetti fenotipici - sia per la partecipazione attiva di metaboliti extra DNA di origine nucleare o citoplasmatica, sia per l'importanza delle configurazioni spaziali - si accompagna ad un altro aspetto fondamentale ma ancora meno noto dei cambiamenti epigenetici: il ruolo che fattori dell'ambiente sia endogeno che esogeno (e talora non è facile distinguere fra i due aspetti) possono esercitarvi con effetti nell'eredità e quindi anche nell'evoluzione. Ad esempio i processi epigenetici nucleici come quelli legati alla trasposizione possono essere influenzati indirettamente dall'ambiente, soprattutto per quanto riguarda la loro frequenza (Kellenberger, 1994). Processi epigenetici mediati dall'ambiente sembrano anche essere implicati nelle cosiddette mutazioni adattative dei batteri (Cairns et al., 1988), in cui il batterio risponde non per via selettiva alle condizioni di coltura. Anche le paramutazioni del granturco (Mikula, 1995) e le epimutazioni del lino (Cullis, 1988) hanno mostrato di essere indotte da fattori ambientali come luce e temperatura in rapporto a determinati momenti di sviluppo della pianta. In *Brassica nigra* (Waters e Schaal, 1996) shock termici inducono una risposta genomica portando a variazioni nella frequenza di copie dell'rRNA con probabile implicazione dei meccanismi di riparo del DNA. Le cellule vegetali rispondono con modificazioni dell'espressione genica agli shock termici (Czarnecka-Venier et al., 1994) e a quelli provenienti da simbionti e parassiti come nel caso di *Rhizobium* (De Bruijn et al., 1995) e di Nematodi (Opperman et al., 1994) e anche ai segnali che provengono dalla matrice intercellulare in via di sviluppo (Brownlee e Berger, 1995). Fattori ambientali esogeni come la forza di gravità e stress

meccanici agiscono sulle strutture nel corso dell'evoluzione attraverso meccanismi epigenetici non ancora noti, che si legano a constraints di sviluppo, ad esempio in tessuti connettivi. Un caso riguarda l'evoluzione del cranio dei Vertebrati (Herring, 1993). Infine effetti parentali non-mendeliani, indicati anche come effetti materni, possono produrre effetti ambientali ereditati generazionalmente (IEE) (Rossiter, 1996) e allo stesso modo possono esistere anche effetti genetici indiretti (IGE) fra differenti individui conspecifici con fonti ambientali di variazione che possono essere trasmesse attraverso le generazioni e contribuire ai cambiamenti evolutivi (Wolf et al., 1998).

Il significato evolutivo delle epimutazioni è naturalmente legato alla loro persistenza nel corso delle generazioni e quindi nel caso della riproduzione sessuale al loro passaggio nella linea germinale. Il problema posto dalla barriera somatico-germinale di Weissman può essere in vario modo superato (Buss, 1987). A parte le piante a riproduzione anche vegetativa o animali a riproduzione asessuale in cui la barriera non sussiste, essa è agevolmente superata anche negli organismi ad esclusiva riproduzione sessuale in cui si ha una segregazione tardiva degli elementi germinali, cioè una linea germinale aperta, come molti phyla d'invertebrati. In quelli a segregazione precoce, cioè a linea germinale chiusa, come i vertebrati, il passaggio dal soma al germe può verificarsi nelle prime fasi dell'ontogenesi quando ancora non si è specificata la linea germinale (Nieuwkoop e Sutasurya, 1981) oppure le variazioni possono essere dovute all'inserimento di elementi trasponibili nel genoma delle cellule germinali (Lidholm et al., 1993). E' stato anche ipotizzato che nelle cellule germinali influenze ambientali recepite direttamente o attraverso il soma, ad esempio mediante ormoni o retroposoni, possono determinare alterazioni del DNA di tipo epigenetico o dare luogo a processi di amplificazione genica (Lima de Faria, 1988). Che comunque le epimutazioni possano non essere erasabili è largamente dimostrato in lieviti, piante e *Drosophila*. Recentemente si aggiunto un convincente caso nel topo in relazione alla metilazione del gene agouti (Morgan et al., 1999). L'implicazione del sistema genetico nei processi epigenetici può essere più o meno grande. In base ad essa i meccanismi epigenetici (IAC) possono distinguersi in nucleici, epinucleici ed extranucleici (Landman, 1991). Nei meccanismi nucleici si ha perdita di RNA e DNA non essenziale o acquisizione di nuove sequenze nucleotidiche mediante elementi trasponibili. In quelli epinucleici vengono ereditate modificazioni conformazionali del DNA, dovute a metilazione delle basi,

con silenziamento, ad acetilazione degli istoni legati ai complessi regolatori della trascrizione genica o anche con attivazione di promoters alternativi di uno stesso gene che ne modulano l'espressione in rapporto alle condizioni ambientali (Schibler e Sierra, 1987). In quelli extranucleici viene ereditato un pattern morfogenetico prodotto da un'espressione genica stabilizzata da fattori citoplasmatici. Un esempio è dato dall'eredità corticale in *Paramecium* ed altri Ciliati. Quanto sia Landman (1991) che Jablonka et al. (1992) hanno sostenuto, cioè l'importanza dei meccanismi epigenetici rispettivamente chiamati IAC e EIS nella filogenesi ed evoluzione, in quanto trasmissibili ai discendenti ma con ereditarietà diversa da quella mendeliana, ha trovato successivi significativi riscontri. Molti problemi restano comunque aperti fra cui l'effettiva diffusione di questi fenomeni e il loro ruolo nei processi di speciazione (Varmuza, 1993) e di adattamento (Sarà, 1999b).

Un particolare tipo di eredità epigenetica è mostrata dai prioni in mammiferi e lieviti. I prioni sono proteine che dipendono dai geni solo per la produzione della forma normale. Nuove isoforme si originano spontaneamente dalla forma normale e trasmettono il loro stato alterato, che corrisponde ad una diversa struttura tridimensionale della proteina, ad altre proteine normali. Nelle divisioni cellulari i prioni sono trasmessi attraverso il citoplasma alle cellule figlie vi è trasmissione ereditaria del fenotipo prionico, cioè una trasmissione "molecolare-fenetica" del fenotipo prionico da una generazione cellulare alla successiva (Pagel e Krakauer, 1996).

Una trasmissione ereditaria di tipo prionico sembra più diffusa di quanto finora appurato. Recentemente Serio e Lindquist (1999) avanzano l'ipotesi prionica, cioè un'eredità basata sulla conformazione proteica anche per il fattore PSI+ del lievito, un modulatore epigenetico del termine della traduzione. PSI+ è, secondo questa ipotesi la forma prionica della proteina nucleare Sup35p, un componente del complesso terminale della traduzione. Questa proteina potrebbe quindi esistere in almeno due stati fisici distinti, ognuno associato con un diverso fenotipo e funzione.

## **Il ribotipo**

I fenomeni epigenetici riguardano tutte le fasi dello sviluppo e quindi vanno estesi a tutto ciò che si manifesta anche a valle della trascrizione genica nella realizzazione del fenotipo: una grande importanza è assunta in ciò

dal ribotipo. Il termine e il concetto di ribotipo come sistema intermedio fra genotipo e fenotipo sono stati introdotti da Barbieri considerando l'importanza degli RNA nella biologia cellulare. Essi, unendo le capacità dell'informazione e quella catalitica, secondo un'opinione diffusa (il mondo degli RNA), ebbero una funzione fondamentale all'origine della vita, prima che venissero prodotti le proteine (a funzione solo catalitica) e i DNA (a funzione d'informazione). La triade successivamente prodotta si è mantenuta e gli RNA esercitano oggi una fondamentale funzione di raccordo. Un aspetto essenziale in tale funzione è dato dalla capacità degli RNA di trascrivere DNA, cioè dalla trascrizione inversa scoperta da Temin (1964) e a cui è dovuta la formazione di gran parte degli elementi trasponibili, così importanti nella regolazione del genoma.

Herbert e Rich (1999) hanno ripreso recentemente il termine di ribotipo e sottolineato la sua funzione fondamentale soprattutto negli eucarioti chiamati perciò "soft-wired organisms". A differenza dei procarioti ("hard-wired organisms") negli eucarioti solo una piccola parte del genoma viene utilizzata per codificare le proteine mentre attraverso il processamento dell'RNA per splicing alternativo e il suo editing vengono generati molti messaggi differenti per lo stesso gene. Il risultato può variare secondo il tipo, la posizione e il destino della cellula e non è quindi pienamente specificato dall'informazione codificata nel gene. Infatti il ribotipo può essere influenzato dall'ambiente cellulare, il quale può determinare i siti di splicing usati e quali codoni debbano essere editi. L'informazione genica dipenda perciò da come sono processati i pre-mRNA. In un dato luogo le cellule generano solo un subset di ribotipi possibili codificati nel genoma. Il DNA sarebbe quindi solo un genoma virtuale in quanto non specifica direttamente e quindi necessariamente i fenotipi ma attraverso gli RNA solo i possibili fenotipi. In alcuni casi, come nel genoma mitocondriale dei tripanosomi, il genoma contiene geni difettivi i quali vengono compensati da opportune modificazioni nell'editing dei pre-mRNA. I risultati di tale processamento degli RNA s'influenzano a vicenda formando reti regolatrici che controllano sia il contenuto d'informazione che l'espressione del ribotipo.

Il ribotipo ha quindi un ruolo centrale nel processo evolutivo. Secondo Herbert e Rich i differenti sets di ribotipi prodotti nel processamento ed editing dell'RNA possono essere soggetti a selezione naturale, in base ai fenotipi prodotti, ma si richiede che i fenotipi di successo siano conservati in forma ereditaria. Ciò è reso possibile grazie alla trascrizione inversa,

attraverso soprattutto il dsRNA. Inoltre nuovi RNA e quindi nuove proteine possono essere prodotti per cambiamenti negli introni, le cui sequenze evolvono più rapidamente di quelle degli esoni.

I nuovi ribotipi possono essere conservati in forma ereditaria indipendentemente dall'essere trascritti nel DNA. Un esempio è dato dalla trasmissione verticale di mRNA materni dall'uovo all'embrione, con informazioni essenziali per stabilire il Bauplan degli organismi multicellulari. Un altro caso, con replicazione degli RNA, è dato dall'interferenza di RNA esogeni, soprattutto dsRNA, che possono interferire con l'espressione genica in *Caenorhabditis elegans*. Questa interferenza è trasmessa da cellula a cellula nell'intero organismo e nella progenie (Grishok et al., 2000).

L'importanza del ribotipo come agente d'intermediazione ed evolutivo nella cellula è sottolineata da Barbieri (1998) sulla base dell'esistenza di codici particolari legati all'RNA. Secondo Barbieri nei processi che portano alla realizzazione del fenotipo il fenomeno dell'assemblaggio molecolare che ne rappresenta la base può essere catalizzato o guidato. Nel primo caso vi è semplice transfer d'informazione, nel secondo vi è un processo semantico di trasferimento di significati. Ora l'assemblaggio che avviene nei processi di editing dell'mRNA non è solo catalizzato ma guidato come anche quello che si verifica a livello della traduzione. Gli adattatori del processo sarebbero gli spliceosomi, grandi strutture molecolari che si servono degli snurps, piccole molecole di RNA (snRNA). Si può avere anche uno splicing alternativo in cui un riconoscimento iniziale a livello degli introni porta a diversi tipi di riconoscimento finale. Per Barbieri quindi oltre al codice genetico che si esprime nella formazione dei trascritti primari vi è un secondo codice che regola una prima tappa epigenetica postrascrizionale nello splicing degli RNA (trasformazione dei trascritti primari in secondari). Un terzo codice, e si tratta di un'ulteriore tappa epigenetica regolata dagli RNA, agisce a livello della traduzione. Ulteriori codici, e quindi eventi d'importanza epigenetica, si hanno nella traduzione dei segnali, cioè nella formazione dei secondi messaggeri, e nell'integrazione dei segnali per regolare l'informazione contestuale della cellula (codici del piano corporeo). Ciò in quanto l'informazione sintattica di una proteina è diversa da quella contestuale, cioè la funzione ad essa assegnata nella cellula. Il codice in questo caso potrebbe essere dato dall'integrazione dei segnali in complessi circuiti tridimensionali. Infine altri codici possono trovarsi a livello della formazione dei patterns e far parte di un sistema di codici del piano corporeo. Poiché ad ogni codice corrisponde un salto

di significato l'informazione passa da un tipo di molecole ad un altro nettamente diverso e ciò rende il fenotipo dinamico e creativo. I codici non sono naturalmente dello stesso tipo. Quello genetico è il più rigido, gli altri, oltre che plurimi, sono più dinamici. L'ipotesi del Barbieri dà una visuale organismica dell'integrazione fra genotipo e fenotipo che aumenta i gradi di libertà del sistema. Ad ogni codice corrisponde infatti un grado di libertà. Ad esempio i processi dell'editing degli RNA sono in certa misura autonomi dal DNA. Tanto più che mentre il codice del DNA è universale (a parte qualche eccezione) i codici dello splicing e soprattutto di quello alternativo sono plurimi. E lo stesso si può dire degli altri codici che portano alla realizzazione del fenotipo. Naturalmente la sua realizzazione e il passaggio dell'informazione sono legati anche a fenomeni di catalisi e forse di risonanza fra molecole. A livello dei codici vi sarebbe contatto e lettura, della catalisi solo contatto e della risonanza solo lettura. Comunque il sistema dei codici plurimi, ognuno dei quali rappresenta una finestra aperta agli stimoli periferici esogeni ed endogeni, non è in contrasto con la bidirezionalità dell'informazione dal genotipo al fenotipo e dal fenotipo al genotipo su cui solo a mio avviso può reggersi una visione realistica ed integrata dell'organismo.

### **Plasticità fenotipica ed assimilazione genetica**

Per comprendere meglio l'integrazione fra fenotipo e genotipo occorre approfondire un campo praticamente sconosciuto e la cui esplorazione rappresenta un compito prioritario dell'era postgenomica, cioè l'intervento dell'ambiente nei processi genetici, epigenetici ed extragenetici dell'organismo. Usando una metafora si potrebbe dire che l'EVO-DEVO deve trasformarsi in un EVO-ECO-DEVO, compiendo la saldatura fra ecologia, embriologia e genetica, e quindi fra ecologia e biologia molecolare. Questo perché organismo ed ambiente (l'Umwelt o ambiente dell'organismo) formano un complesso inscindibile. E' quindi importante soffermarsi su quei fenomeni in cui l'informazione ambientale agisce in modo significativo su fenotipo e genotipo dell'organismo.

La plasticità fenotipica è il fenomeno diffuso in tutti gli organismi per il quale essi con modificazioni del loro fenotipo rispondono alle continue sollecitazioni dell'ambiente. Nel quadro del neo-darwinismo si è dato a questo fenomeno scarsa rilevanza perché le modificazioni fenotipiche non

sono ereditarie, in quanto risultano della norma di reazione di uno stesso genotipo. Tuttavia in tempi recenti è stato sottolineato che anche se la singola modificazione fenotipica non viene ereditata la presenza e l'intensità della plasticità fenotipica attenuano e quindi cambiano i regimi selettivi a cui le specie sono sottoposte (Sultan, 1987). Ciò è utile soprattutto quando l'ambiente presenta condizioni molto variabili nel tempo e nello spazio. Si è anche visto che, dato il vantaggio che può rappresentare la plasticità, questa può essere selezionata in base alla variabilità genetica presente nella popolazione (in base a questa variabilità le norme di reazione di un medesimo gene differiscono da individuo ad individuo). Possono quindi essere favoriti gli individui che hanno una più ampia norma di reazione. Vi è quindi un'evolubilità della plasticità.

Meno condivisa, e spesso avversata anche per la sua impronta lamarckiana che contrasta con l'ortodossia neo-darwiniana, per la quale l'adattamento all'ambiente è legato solo alla selezione naturale, è l'opinione che le modificazioni di un carattere prodotte negli organismi da uno stimolo ambientale possano essere canalizzate dall'organismo e quindi assimilate geneticamente diventando in tal modo evolutive. Abbiamo già visto che canalizzazione del fenotipo ed assimilazione genetica sono due aspetti fondamentali della biologia epigenetica dello sviluppo che Waddington suffragò coi suoi esperimenti sulla *Drosophila*. La produzione di un nuovo assetto genetico che determina l'assimilazione genetica del nuovo fenotipo è certo favorita, nel corso delle generazioni, dalla selezione naturale ma, com'anche nel caso dell'affine effetto Baldwin, il fenomeno è canalizzato, guidato da precisi stimoli ambientali.

A parte gli esperimenti di Waddington vi è ormai una considerevole mole di dati, che va infittendosi d'anno in anno, a sostegno di un'assimilazione genetica generalizzata, ipotesi che si può considerare rivoluzionaria nei confronti dell'assetto teorico oggi dominante in biologia evolutiva. Un fenomeno interessante è l'esistenza di fenocopie mimate da genocopie (Zuckerlandl e Villet, 1988) che, per il fenotipo bithorax di *Drosophila*, mostra un diverso supporto genico nel caso delle fenocopie e delle genocopie (Greenleaf et al., 1980). Un caso controverso è l'evoluzione rapidissima dei pesci Ciclidi nei laghi Vittoria e Tanganika con oltre 500 specie formatesi nell'arco di soli 12.000 anni: Gales e Metz (1998) la riconducono ad un meccanismo di assimilazione genetica della plasticità delle strutture boccali. Altri casi sono citati per le piante, come i fenotipi divergenti delle foglie acquatiche e terrestri del ranuncolo, che possono

coesistere in una medesima pianta ma possono anche caratterizzare specie diverse viventi nei due diversi ambienti, e i diversi tipo di lino indotti da fertilizzanti (Cullis, 1988). L'assimilazione genetica della plasticità è l'ipotesi più verosimile anche per l'ereditarietà delle callosità del dromedario dovute alla postura, ed è sostenuta da Losos et al. (2000) per le differenti lunghezze delle zampe di *Anolis*, un adattamento delle popolazioni di questa lucertola a differenti habitats strutturali.

Recentemente Schlichting e Pigliucci (1998) sostengono con forza il significato evolutivo diretto della plasticità fenotipica e l'importanza fondamentale dell'assimilazione genetica. Essi sottolineano che la norma di reazione è un fenomeno universale nei processi di sviluppo e che questi riguardano qualsiasi cambiamento di caratteri. La norma di reazione non va vista come l'espressione statica del cambiamento di un carattere ma come un fenomeno dinamico che si verifica sotto l'azione dell'ambiente e che va esteso a tutti i processi di sviluppo. Questi sono quindi influenzati dai parametri ambientali ed i loro cambiamenti sono soggetti ad assimilazione genetica entrando a far parte della storia evolutiva della specie. Ciò vale sia per le piccole e continue modificazioni manifestate nella cosiddetta modulazione fenotipica che in quelle più ampie e discontinue che si manifestano nella conversione di sviluppo (Smith Gill, 1983). La differenza dipende dal livello genetico e di sviluppo su cui opera l'azione perturbatrice dei fattori dell'ambiente endogeno ed esogeno.

In alcuni casi il meccanismo può essere ricondotto alla capacità intrinseca dei sistemi di sviluppo di produrre nuovi caratteri a seguito di minori perturbazioni genetiche o ambientali. Ad esempio stimoli ambientali possono rivelare e portare ad espressione una variabilità genetica latente ed i fenotipi relativi, elicitati dall'ambiente, dopo lo screening effettuato dalla selezione naturale essere assimilati geneticamente. E' quanto è stato dimostrato da suggestivi esperimenti di Rutherford e Lindqvist (1998) in *Drosophila*. In questi moscerini quando una heat-shock proteina, l'Hsp90, non viene espressa o per mutazione o perché inibita da farmaci o per shock termici si rivela una variabilità genetica criptica che viene espressa nella generazione successiva (fenomeno detto di capacitazione). Questa variabilità riguarda tutta una serie di fenotipi da occhio deforme a segmentazione alterata ad ali ridotte e a zampe deformi, ecc. che rappresenterebbero altrettante macromutazioni o "hopeful monsters" nel senso di Goldschmidt (1940). La loro emergenza si spiega considerando che Hsp90 è al crocevia di numerose vie metaboliche e trasduzionali e pertanto assicura la opportuna

omeostasi dell'organismo. Questa viene alterata se il livello normale di Hsp90 viene modificato. I moscerini mutanti si sviluppano quando il livello di Hsp90 viene ridotto attraverso la sperimentazione genica, l'uso di farmaci o shock termici. Dopo numerose generazioni in cui opera la selezione alcuni mutanti continuano a svilupparsi anche se l'Hsp90 viene riportato ai suoi livelli normali. E questi, come caratteri ereditari acquisiti grazie alla loro assimilazione genetica, possono costituire nuovi fenotipi d'importanza anche macroevolutiva. Rimane da assodare se un meccanismo analogo operi anche nell'assimilazione genetica della plasticità indotta non da shock ambientali improvvisi ma dalla comune e più morbida azione degli stimoli ambientali o se esistano meccanismi plurimi di assimilazione genetica anche se tuttora sconosciuti.

Comunque, con l'assimilazione genetica della plasticità fenotipica si compie nella sua interezza un processo d'informazione dal fenotipo al genotipo, che è l'inverso di quello normalmente ammesso dal genotipo al fenotipo, ristabilendo la completa bidirezionalità dell'informazione e dimostrando che genotipo e fenotipo non sono entità distinte e gerarchicamente ordinate ma polarità interconnesse di quell'unico sistema che è l'organismo.

## Conclusioni

1 - Il compito principale della cosiddetta era postgenomica sarà quello di spostare l'attenzione dall'identità dei geni alla loro espressione e quindi al contesto, cioè al fenotipo in cui operano. Il sequenziamento dei geni è solo un inizio ma non può costituire per se stesso un fine. Il superamento del riduzionismo riguarda non solo i geni ma anche le proteine da essi prodotte. Bisogna infatti risalire dalla loro funzione molecolare che spesso viene assegnata solo per analogia, a quella fisiologica, su cui le informazioni sono ancora lacunose (Brenner, 2000), nel contesto della cellula e dell'organismo.

2 - Occorrerà, per la specificazione del fenotipo, comprendere meglio sia le vie d'informazione che vanno dal genotipo al fenotipo, su cui restano questioni importanti da delucidare (vedansi codici plurimi di Barbieri), sia quelle che vanno dal fenotipo al genotipo con i processi epigenetici e, in primis, l'assimilazione genetica della plasticità fenotipica di sviluppo la quale è soggetta a selezione. Si delinea in tal modo un meccanismo evolutivo a due stadi, epigenetico e selettivo, già da me descritto (Sarà, 1993).

3 - Occorrerà valutare, in rapporto a quest'ultimo punto, l'importanza dell'informazione ambientale diretta accanto al filtro dalla selezione naturale negli adattamenti anche macroevolutivi degli organismi. Passare cioè dall'EVO-DEVO all'EVO-ECO-DEVO.

Aspetti emergenti dall'attuale stato dell'arte sono:

a) il DNA, con le sue sequenze nucleotidiche, è il luogo privilegiato dell'informazione biologica ma non il solo. Ad esempio anche l'RNA contiene un'autonoma e importante informazione biologica e così anche altri livelli dell'organizzazione biologica.

b) Genotipo e fenotipo non sono due realtà contrapposte ma interagenti e senza precisi confini. Nel DNA, nell'RNA e persino nelle proteine (prioni) aspetti fenotipici e genotipici s'intrecciano strutturalmente e funzionalmente. Limitare il genotipo alle sole sequenze codificanti può essere un utile espediente ma certo troppo riduttivo perché se genotipo è ciò che è latore d'informazione ereditaria il termine va esteso anche agli RNA, ai sistemi epigenetici e persino a proteine come i prioni.

In questo lavoro le espressioni genotipo (per il DNA), e fenotipo (per tutto ciò che non è DNA e quindi anche per il ribotipo) sono utilizzati in via convenzionale. Così anche appare convenzionale la separazione fra linee somatiche e linea germinale come due oggetti biologici chiaramente distinti. Basti pensare agli organismi inferiori a linea germinale aperta e alle attuali scoperte sulle cellule staminali che anche nei Mammiferi sono in grado di revertire in qualsiasi altro tessuto.

## BIBLIOGRAFIA

Agrawal, A., Eastman, QM, Schatz, D.G., 1998. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature*, 394: 744-751.

Aranda-Anzaldo, A., 2000. The Hox-gene research programme and the shortcomings of molecular preformationism. *Riv. Biol./Biol Forum*, 93: 57-82.

Balter, M., 2000. Was Lamarck just a little bit right ?, *Science*, 288: 38.

Barbieri, M. 1981. The ribotype theory on the origin of life. *J. Theor. Biol.*, 91: 545-601.

- Barbieri, M., 1998. I codici organici. Il meccanismo chiave della macroevoluzione. In: *I nuovi paradigmi della biologia. Systema Naturae. Ann. Biol. Teor.* 1: 9-40.
- Brenner, S., 2000. The end of the beginning. *Science*, 287: 2173-2174.
- Brownlee, C., Berger, F. 1995. Extracellular matrix and pattern in plant embryos: on the lookout for developmental information. *Tr. Genet.*, 11: 344-348.
- Buss, L.W., 1987. The evolution of individuality. Princeton University Press, Princeton.
- Cairns, J., Overbargh, J., Millar, S., 1988. The origin of mutants. *Nature*, 335: 142-145.
- Cubas, P., Vincent C., Coen, E., 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*: 401, 157-161.
- Cullis, C.A. 1988. Control of variation in higher plants. In: *Evolutionary processes and metaphors*. Ho M.W., Fox S. W. eds, J. Wiley, N.Y., p. 49-62.
- Czarnecka-Verner, E., Dulcebarros, M., Gurley, W.B., 1994. Regulation of heat shock gene expression. In: *Stress-induced gene expression in plants*, Barra, A.S. ed., Harwood Acad. Publ., Philadelphia, p. 131-162.
- Daeschler, E.B., Shubin, L., 1997. Fish with fingers?, *Nature*, 391: 133.
- Dawkins, R., 1976. The selfish gene. Oxford University Press.
- De Bruijn, F.J., Chen R., Fujimoto, S.Y., Pinaev, A., Silver, K., Szczyglowski, K., 1994. Regulation of nodulin gene expression. *Plants and Soil*, 161: 59-68.
- Eickbush, T.H., 1997. Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science*, 277: 911-912.
- Eizinger, A., Jungblut, B., Sommer, R.J., 1999. Evolutionary change in the functional specificity of genes. *Tr. Genet.*, 15: 197-200.
- Girard, L., Freeling, M., 1999. Regulatory changes as a consequence of transposon insertion. *Dev. Genet.*, 25: 291-296.
- Goldschmidt, R.B., 1940. The material basis of evolution. Yale University Press, New Haven, CT.
- Gould, S. J., 1977. Ontogeny and phylogeny. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Greenleaf, A.L., Weebs, J.R., Voelker, R.A., Ohnishi, S., Kickson, A., 1980. Genetic and biochemical characterization of mutants at a RNA polymerase II locus in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 21: 785
- Grishok, A., Tabara, H., Mello, C.G., 2000. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 287: 2494-2497.

- Herring, S.W., 1993. Formation of the vertebrate face: epigenetic and functional influences. *Am. Zool.*, 33: 472-483.
- Herbert, A., Rich, A., 1999. RNA processing and the evolution of eukaryotes. *Nat. Genet.*, 21:265-269.
- Holliday, R., 1990. Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol. Rev.*, 65: 431-471.
- Jacob, F., Monod, J., 1961. On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26: 193-210.
- Jablonka, E., Lachmann, M., Lamb, M.J., 1992. Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. *J. Theor. Biol.*, 158: 245-268.
- Jablonka, E., Lamb, M.J., 1989. The inheritance of acquired epigenetic variations. *J. Theor. Biol.*, 139: 69-83.
- Jablonka, E., Lamb, M.J., 1995. Epigenetic inheritance and Evolution. The Lamarckian dimension. Oxford University Press.
- Johannsen, W., 1911. The genotype conception of heredity. *Am. Nat.*, 45: 129-159.
- Kellenberger, E., 1994: Genetic ecology: a new interdisciplinary science, fundamental for evolution, biodiversity and biosafety evaluation. *Experientia*, 50: 429-437.
- Kidwell, M.G., Lisch, D. R., 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Tr. Ecol. Evol.*, 15: 95-99.
- Klug, A., 1993. Transcription, opening the gateway, *Nature*, 365: 486-487.
- Landman, O.E., 1991. The inheritance of acquired characteristics. *Annu. Rev. Genet.*, 25: 1-20.
- Lidholm, D.A., Lohe, A.R., Hartl, D.R., 1993. The transposable element mariner mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134: 859-868.
- Lima da Faria, A., 1988. Evolution without selection. Form and function by autoevolution. Elsevier, Amsterdam.
- Losos, J.B., Creer, D.A., Glossip, D., Goellner, R., Hampton, A., Roberts, G., Haskell, N., Taylor, P., Etlings, J., 2000. Evolutionary implications of phenotypic plasticity in the hindlimb of the lizard *Anolis sagrei*. *Evolution*, 54: 301-305.
- Meyer, A., Scharl, M., 1999. Gene and genome duplication in vertebrate: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene function. *Curr. Opinion Cell Biol.*, 11. 699-704.

- Mikula, B. C., 1995. Environmental programming of heritable epigenetic changes in paramutant r-gene expression using temperature and light at a specific stage of early development in maize seedlings. *Genetics*, 140: 1379-1387.
- Morgan, H.D., Sutherland, H.G.E., Martin, D.I.K., Whitelaw, E., 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.*, 23: 314-318.
- Müller, G.B., Wagner, G.P., 1996. Homology, Hox genes and developmental integration. *Am. Zool.*, 36: 4-13.
- Nijhout, H.F., 1990. Metaphors and the roles of genes in development. *Bioessays*, 12: 441-446.
- Nieuwkoop, P.D., Sutasurya, L.A., 1981. Primordial germ cells in the invertebrates. Cambridge University Press.
- Nyers, C., Pollet, N., 1999. Synexpression groups in eukaryotes. *Nature*, 402: 483-487.
- Ohno, S., 1996. The notion of the Cambrian pananimalia genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8475-8478.
- Opperman, C.H., Taylor, C.G., Conkling, M.A., 1994. Root-knot nematode different expression of a plant root-specific gene. *Science*, 263: 221-223.
- Pagel, M., Krakauer, D.C., 1996. Prions and the new molecular phenetics. *Tr. Ecol. Evol.*, 11: 487.
- Panganiban, G., Irvine, S.M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L.L.S., Sherbon, B., Grenier, C.K., Fallon, J.F., Kimble, J., Walker, M., Wray, G.B., Swalla, B.J., Martindale, M.Q., Carroll, S.B., 1997. The origin and evolution of animal appendages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 5162-5166.
- Rollo, C.D., 1994. Phenotypes: their epigenetic, ecology and evolution. Chapman and Hall, London.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Miklos, G.L.G., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchick, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R. A., Goldstein, L.S.B., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J.M., Kuehl, P.M., Lemaitre, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.K., Pickeral, O.K., Shue, C., Voshall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Zhong, F., Zhong, F., Gibbs, R., Venter, J.C., Adams, M.D., Lewis, S., 2000. Comparative genomics of eukaryotes. *Science*, 287: 2204-2215.

- Rossiter, M.C., 1996. Incidence and consequences of inherited environmental effects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 27: 451-476.
- Rutherford, S.L., Lindquist, S., 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396: 336-342.
- Sarà, M., 1993. Biological evolution: an holistic organism-centered approach. *Riv. Biol./Biol Forum*, 86: 347-359.
- Sarà, M., 1996. A "sensitive" cell system. *Riv. Biol./Biol. Forum*, 89: 139-148.
- Sarà, M., 1999a. New perspectives on the role of constraints in evolution. *Riv. Biol/Biol. Forum*, 92: 29-52.
- Sarà, M., 1999b. Lamarckian aspects in contemporary biology. *Epistemologia*, 22: 223-250.
- Sarà, M., Bavestrello, G., Cattaneo-Vietti, R., Cerrano, C. 1998. Endosymbiosis in Sponges: relevance for epigenesis and evolution. *Symbiosis*, 25: 57-70.
- Schibler, U., Sierra, F., 1987. Alternative promoters in developmental gene expression. *Annu. Rev. Genet.*, 21: 237-259.
- Schlichting, C.D., Pigliucci, M., 1998. Phenotypic evolution. A reaction norm perspective. Sinauer, Sunderland, MA.
- Schmalhausen, I.I., 1949. Factors of evolution. Blakiston, Philadelphia.
- Seimiya, M., Miura, I.K., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., 1994. Homeobox-containing genes in the most primitive metazoa, the sponges. *Eur. J. Biochem.*, 221: 219-225.
- Serio, T. R., Lindquist, S.L., 1999. PSI+: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15: 661-703
- Slack, J.M.W., Holland, P.W.H., Graham, C.F., 1993. The zootype and the phylotypic stage. *Nature*, 361: 490-492.
- Smith-Gill, S.J., 1983. Developmental plasticity: developmental conversion versus phenotypic modulation. *Am. Zool.*, 23: 47-55.
- Sultan, S.E., 1987. Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evolutionary Biology*, 21: 127-178.
- Temin, R.H., 1964: Homology between RNA from Rous sarcoma virus and DNA from Rous sarcoma virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53: 323-339.
- Varmuza, S., 1993. Gametic imprinting as a speciation mechanism in mammals. *J. Theor. Biol.*, 164: 1-13.
- Waddington, C.H., 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150: 563-565.

- Waddington, C.H., 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 7: 118-126.
- Waddington, C.H., 1957. The strategy of the genes. Allen & Unwin, London.
- Watson, J.D., Crick, F.C., 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171: 737-738.
- Weismann, A., 1883. *Über das Problem der Vererbung*, Gustav Fischer, Jena.
- Weismann, A., 1985. *Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung*, Gustav Fischer, Jena.
- Wolf, J.B., Brodie III, E.D., Cheverud, J.M., Moore, A.J., Wade, M.J., 1998. Evolutionary consequences of indirect genetic effects. *Tr. Ecol. Evol*, 13: 64-69.
- Wolffe., A.P., Matzke, M.A., 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 286: 481-486.
- Zuckerandl, E., Villet, R., 1988. Concentration-affinity equivalence in gene regulation: convergence of genetic and environmental effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4784-4787.