

**Dottorando Alessandro Lisi**

**Dottorato di ricerca in Biologia Ambientale ed Evoluzionistica XXXVI ciclo**

**Curriculum Antropologia**

**Comprendere le relazioni tra economia di sussistenza, diversità dei recettori dei geni del gusto amaro (TAS2R) e malaria da *P. falciparum* in Africa occidentale**

**Inquadramento della ricerca proposta in ambito nazionale ed internazionale**

Dalla comparsa del nostro genere, avvenuta circa 2,5 milioni di anni fa con *Homo habilis*, fino a gran parte della storia di *Homo sapiens*, i gruppi umani hanno basato la loro economia di sussistenza sulla caccia e sulla raccolta. Con la transizione neolitica, questo regime è stato sostituito dall'agricoltura e dalle pratiche di allevamento del bestiame, sebbene con tempi diversi nei continenti e nelle regioni (Diamond & Bellwood, 2003). Ancora oggi alcuni gruppi umani fanno affidamento esclusivamente o principalmente sulle risorse alimentari già disponibili negli ambienti naturali. A questo proposito, l'Africa centrale e occidentale è un'area di notevole interesse poiché ospita, sia cacciatori-raccoglitori che produttori di cibo. Tra questi, vale la pena menzionare i Pigmei, popolazioni semi-nomadi di bassa statura (maschi <150 cm) che vivono in ambiente forestale (Hewlett & Fancher, 2013) e i Bantu, un gruppo linguistico che comprende oltre 400 gruppi etnici ampiamente diffuso nell'Africa sub-sahariana (Lane et al., 2002).

Considerati tra i più antichi abitanti dell'Africa subsahariana, i Pigmei hanno uno stile di vita basato su una profonda conoscenza dell'ambiente, testimoniato non solo dalla loro capacità di cacciare e raccogliere, ma anche dall'utilizzo delle piante a scopo curativo (Maranz, 2012). I Pigmei praticano anche scambi culturali e materiali con gruppi vicini, spesso di lingua Bantu, dai quali ottengono, ad esempio, manioca in cambio di selvaggina (Allovio, 2014). Questi "popoli delle foreste" sono esposti ad un alto rischio di infezione malarica. Infatti, frequentano abitualmente aree paludose, conseguenza di estesi disboscamenti, particolarmente favorevoli alla diffusione dei vettori (*Anopheles*) del *P. falciparum* (Lewnard et al., 2014).

L'attuale distribuzione delle popolazioni Bantu è il risultato di un'espansione iniziata dagli altopiani nigeriano-camerunesi circa 4.000-5.000 anni fa (De Filippo et al, 2012). La loro economia di sussistenza si basa principalmente sulla produzione di cibo attraverso l'agricoltura e l'allevamento del bestiame. La diffusione di queste pratiche fu il principale motore del vasto disboscamento della foresta pluviale centrafricana, che portò alla diffusione della malaria con conseguenze anche sui suoi abitanti più antichi, come già accennato a proposito dei Pigmei.

Sia i Pigmei che i Bantu portano varianti genetiche che conferiscono protezione contro la malaria da *P. falciparum*, tra cui le varianti genetiche dell'emoglobina, degli enzimi eritrocitari e degli antigeni dei globuli rossi sono le più conosciute (Karlsson et al., 2014; Piel et al., 2010). Negli ultimi anni, è diventato chiaro che le abitudini alimentari possono rappresentare un altro fattore importante nella risposta adattativa alla malaria. Più in particolare, è stato riconosciuto che alcuni composti del gusto amaro, introdotti con la dieta, possono esercitare un'azione protettiva contro la malaria (Ancolio et al., 2002); la maggiore o minore percezione di questo sapore potrebbe essere fondamentale per il loro continuo apporto e per un possibile effetto protettivo.

La percezione del gusto amaro è determinata da una famiglia di geni (TAS2R) comprendente un totale di 25 geni, che codificano per recettori specifici aventi substrati differenti e suddivisi in base all'affinità con alcuni composti (ligandi) (Roudnitzky et al., 2015). Ad oggi sono stati effettuati test di associazione genotipo-fenotipo per tutti i geni noti utilizzando sei diversi ligandi in grado di legarsi ai recettori del gusto amaro (absintina, amarogentina, cascarillina, grosheimin, quassina e chinina), che hanno permesso l'identificazione di due fenotipi, quello ancestrale (non-Taster) e quello derivato (Taster) (Roudnitzky et al., 2015). Quest'ultima sarebbe stata favorita dalla selezione naturale, in quanto avrebbe consentito di evitare composti particolarmente nocivi dal gusto marcatamente amaro (Kim et al., 2003; Wooding et al., 2004; Soranzo et al., 2005). Tuttavia, il fenotipo non-Taster è noto per persistere nelle popolazioni dell'Africa

subsahariana. È stato proposto che la pressione selettiva contro questo fenotipo potrebbe essere stata allentata a causa di pratiche che consentono di evitare gli effetti tossici dei composti amari, principalmente tecniche di manipolazione ed alterazione del cibo (Wang et al., 2004). Ciò solleva una questione più specifica, ovvero se le pressioni selettive possano anche svolgere un ruolo nell'uso di alimenti contenenti composti amari nell'Africa sub-sahariana.

Purtroppo, ad oggi, sono state effettuate solo poche indagini su questo argomento. Uno studio condotto in Liberia ha suggerito che i composti amari contenuti negli alimenti di uso comune, i cianogeni trasportati dalla manioca (*Manihot esculenta*) (Jackson 1990), possono competere con l'emoglobina S come fattore di protezione dalla malaria da *falciparum*. Inoltre, il ruolo selettivo della diversità dei geni del gusto amaro è stato esplorato solo da due studi, entrambi analizzando lo stesso gene (TAS2R16) in popolazioni spesso rappresentate da pochi individui (Soranzo et al., 2005, Campbell et al., 2014). Tuttavia, solo uno di essi (Soranzo et al. 2005) supporta l'ipotesi che gli individui con minore sensibilità al gusto amaro dei cibi (non-Taster) siano favoriti dalla selezione naturale.

Date queste premesse, per approfondire le nostre conoscenze sulle possibili relazioni tra la diversità genetica del gusto e le abitudini alimentari in Africa Centrale, sarebbe utile svolgere un nuovo lavoro di ricerca che estenda sia il numero di popolazioni che la loro dimensione campionaria, insieme al numero di loci.

### **Descrizione obiettivi (generali e specifici) del progetto ed impianto metodologico**

L'obiettivo generale della presente ricerca è fornire nuovi dati sulla diversità dei recettori che codificano per i geni del gusto amaro (TAS2R) nelle popolazioni africane con diverse economie di sussistenza soggette a malaria endemica. A tal fine, intendo analizzare la diversità di tutti i geni del gusto amaro nelle popolazioni di cacciatori-raccoglitori e nei produttori di cibo dell'Africa centro-occidentale.

Il presente progetto mira a rispondere alle seguenti domande di ricerca:

- a. Le pressioni selettive hanno un ruolo nella persistenza di una bassa percezione del gusto amaro nelle popolazioni subsahariane?
- b. Nel caso positivo, la diversità dei geni del gusto gioca un ruolo nella protezione dall'infezione della malaria?

Per raggiungere questi obiettivi ci sono quattro passaggi necessari

1. Analizzare la variabilità dei 24 geni TAS2R e determinare la frequenza dei fenotipi Taster e non-Taster nei cacciatori-raccoglitori e allevatori dell'Africa centro-occidentale.
2. Valutare eventuali differenze tra cacciatori-raccoglitori e allevatori a livello genetico, in relazione anche alle diverse abitudini alimentari.
3. Rilevare possibili segnali di selezione in tutti i geni TAS2R e datare il tempo trascorso dalla loro scansione selettiva.
4. A seconda dei risultati della fase 3, testare l'associazione tra la variabilità dei geni TAS2R e la malaria utilizzando i dati epidemiologici.

### **Procedure sperimentali**

Saranno analizzate un totale di sei popolazioni dell'area centro-occidentale dell'Africa subsahariana per almeno 25 individui ciascuna. I campioni che soddisfano i requisiti del progetto sono già disponibili presso il

laboratorio di Antropologia Molecolare dell'Università La Sapienza di Roma. In particolare, dalla vasta raccolta di popolazioni africane disponibile, ho selezionato due gruppi di cacciatori-raccoglitori. I Mbenzele della regione occidentale della Repubblica Democratica del Congo e i Bakola della regione sud-occidentale del Camerun e due popolazioni di agricoltori di lingua Bantu Bassa e gli Ewondo nella zona meridionale del Camerun. Inoltre, verranno campionate e analizzate due nuove popolazioni gabonesi: gli agricoltori Fang, che rappresentano il principale gruppo etnico Bantu del paese, e i Pigmei Bagyele, che abitano le aree settentrionali vicino al confine con il Camerun. Per essere idonei allo studio e al campionamento, verranno scelti individui non imparentati fino a tre generazioni parentali con i nonni nati nella stessa area geografica.

Il campionamento sarà effettuato utilizzando gli "Oragene OG-250 Saliva Kit", che consentono al materiale biologico di rimanere stabile in un ampio intervallo di temperature, riducendo i costi di trasporto e conservazione e fornendo un'elevata quantità di DNA. Prima del campionamento, a tutti i soggetti verrà chiesto di firmare un consenso informato. Tutte le procedure di campionamento e analisi saranno preliminarmente sottoposte al vaglio della Commissione etica competente, sia in Italia che a livello locale, al fine di acquisire la relativa approvazione.

### **Analisi di laboratorio**

Le analisi di laboratorio riguarderanno dapprima l'estrazione del DNA utilizzando il kit prepIT L2P (DNA Genotek) seguendo il protocollo del produttore e sarà quantificato utilizzando il fluorimetro Qubit 3.0. In seguito, un totale di 91 polimorfismi associati alla percezione del gusto amaro in 24 dei 25 geni recettori del gusto amaro totali saranno genotipizzati (Roudnitzky et al. 2015) con la piattaforma Illumina Infinium OmniExpress. In aggiunta, questa piattaforma dà la possibilità di scegliere la versione "Plus" che permette di personalizzare fino a 30.000 marcatori oltre ai circa 720.000 SNP autosomici già inclusi e strategicamente selezionati per catturare la maggior quantità di variazioni comuni. Questa procedura ridurrà drasticamente i costi e il tempo necessari per le analisi genetiche.

### **Analisi statistica**

La parte di analisi statistica dei dati precedentemente elaborati in laboratorio seguirà un preciso protocollo partendo dall'analisi qualitativa dei dati utilizzando il software dedicato Illumina (GenomeStudio) seguendo procedure standard. Per ottenere un set di dati di alta qualità ed evitare possibili effetti batch, verrà applicata una serie di filtri utilizzando la suite Plink 1.9 (Purcell et al., 2007). La variabilità dei 91 SNP selezionati dei 24 geni recettori del gusto amaro sarà analizzata utilizzando approcci basati sia sulla frequenza allelica che sugli aplotipi. Innanzitutto, tutti i dati verranno suddivisi in fasi utilizzando l'algoritmo Shapeit (Delaneau et al., 2013). Successivamente, i fenotipi saranno dedotti sulla base dei risultati precedentemente riportati di studi di associazione genotipo-fenotipo (Roudnitzky et al., 2015). Sarà valutata la diversità all'interno della popolazione e saranno studiate le relazioni degli aplotipi utilizzando il median joining network.

A livello dell'intero genoma, verranno condotte analisi per indagare la struttura genetica delle popolazioni di cacciatori-raccoglitori e allevatori. In particolare, saranno condotte analisi delle componenti principali e dell'ADMIXTURE (Alexander et al., 2009). L'RFMix (Maples et al., 2013), un algoritmo che assegna le probabilità che un determinato blocco genomico derivi da una popolazione ancestrale, sarà impiegato per indagare componenti di ancestralità delle regioni che comprendono i 24 geni oggetto di studio. I dati SNP ottenuti per le sei popolazioni sopra menzionate saranno inoltre integrati con i dati di sequenziamento dell'intero genoma da letteratura al fine di estendere il contesto geografico e culturale dell'indagine e fornire una base di confronto. Test di selezione saranno condotti per rilevare le segnali di selezione naturale positiva per i 24 geni in esame. Inoltre saranno applicate statistiche per evidenziare, in una grana più fine, la possibile presenza di segnali di selezione per entrambi i fenotipi. Inoltre, al fine di verificare l'ipotesi che il fenotipo "non-Taster" possa essere protettivo contro la malaria, sarà effettuata un'analisi di correlazione tra le varianti e gli aplotipi associati a questo fenotipo ed i livelli della malaria endemica riportata nel World Malaria Report 2019 dell'OMS. Il coefficiente di correlazione di Spearman verrà calcolato a livello di singolo gene e procedendo con un'analisi di correlazione multipla per valutare i possibili effetti additivi.

## **Innovatività della ricerca, e potenzialità di realizzare un avanzamento delle conoscenze rispetto allo stato dell'arte**

Con questo progetto, non intendo solo espandere in modo significativo la nostra conoscenza della diversità dei geni del gusto amaro nelle popolazioni di cacciatori-raccoglitori e produttori di cibo della fascia centro-occidentale dell'Africa, ma anche tracciare un quadro evolutivo più completo sul ruolo delle abitudini alimentari nella protezione della malaria. Infatti, sebbene i geni del gusto amaro siano noti per svolgere un ruolo importante nella nutrizione, nella salute e in altri processi biologici, si sa molto poco sui loro modelli di diversità genetica e fenotipica nelle popolazioni umane, specialmente tra quelle africane (Risso et al. , 2017). Inoltre, ad oggi, solo due studi hanno indagato l'ipotesi di una possibile relazione tra nutrizione e malaria (Soranzo et al., 2005; Campbell et al., 2014). Entrambi questi studi si sono concentrati solo sul gene TAS2R16, raggiungendo conclusioni contraddittorie.

Oltre a forti segnali di selezione positiva del gene TAS2R16, Soranzo e colleghi (2005) hanno evidenziato un aumento significativo della frequenza delle varianti associate al fenotipo non-Taster nelle popolazioni dell'Africa occidentale, dove l'incidenza della malaria è particolarmente alta. Tuttavia, utilizzando un campionamento più ampio di popolazioni dell'Africa subsahariana principalmente dell'area orientale, Campbell e colleghi (2014) non sono stati in grado di replicare questi risultati.

Dato l'elevato grado di diversità, sia genetica che culturale, che caratterizza le popolazioni del continente africano, vale la pena verificare se i processi di interazione tra l'assunzione di composti amari e la protezione dalla malaria possano essere più complessi di quanto mostrato finora. Infatti, questi processi potrebbero coinvolgere altri geni della famiglia TAS2R le cui proteine codificate intervengono nel metabolismo di una vasta classe di composti amari diversi da salicina, amigdalina e beta-D-glucopiranosidasi che sono specifici per il recettore TAS2R16; queste altre sostanze sono presenti in oltre 2000 specie vegetali (Zagrobelyny et al., 2004) e sono in grado di inibire lo sviluppo di *P. falciparum* (Maranz, 2012). Pertanto, l'ampliamento del numero di geni indagati potrà consentire una migliore comprensione delle relazioni tra abitudini alimentari e malaria e portare a nuove ipotesi sull'importanza del ruolo della nutrizione nella storia adattativa delle popolazioni dell'Africa centro-occidentale. Poiché l'approccio proposto si concentra sugli aspetti genetici del problema, esso può rappresentare un primo passo, che potrebbe essere sviluppato da un'analisi più approfondita delle abitudini alimentari di queste popolazioni e da un'ulteriore conoscenza di specifici ligandi associati ai diversi recettori del gusto amaro. Infine, avendo l'opportunità di analizzare le popolazioni incluse nel presente progetto a un livello genomico fine, questo progetto aiuterà a inquadrare la loro diversità nel più ampio contesto africano e comprendere meglio i processi storici e adattativi che hanno modellato la loro struttura genetica.

Il rischio principale che questo progetto di ricerca deve affrontare è quello di non riuscire a campionare le popolazioni gabonesi. Infatti, l'emergere del Coronavirus, ancora in corso nelle regioni dell'Africa occidentale subsahariana, potrebbe rendere impossibile l'organizzazione di campagne di campionamento. In caso il campionamento non sia possibile, potrò utilizzare altri campioni disponibili presso il Laboratorio di Antropologia Molecolare della Sapienza senza compromettere il raggiungimento degli obiettivi del progetto.

## **Lista delle referenze bibliografiche**

- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655–1664.
- Allovio, S. (2014). *Pigmei, europei e altri selvaggi*. Gius. Laterza & Figli Spa.

- Ancolio, C., et al. (2002). Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytotherapy Research: PTR*, 16(7), 646–649.
- Campbell, M. C., et al. (2014). Origin and differential selection of allelic variation at TAS2R16 associated with salicin bitter taste sensitivity in Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 288–302.
- Delaneau, O., Zagury, J.-F., & Marchini, J. (2013). Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. In *Nature Methods* (Vol. 10, Issue 1, pp. 5–6).
- Diamond, J. & Bellwood, P. Farmers and their languages: the first expansions. *Science* 300, 597–603 (2003).
- Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693–709.
- Hewlett, B. S., & Fancher, J. (2013). Central African Hunter-Gatherer Research Traditions. In *Oxford Handbooks Online*. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199551224.013.007>
- Jackson, L. C. (1988). Behavioral effects of chronic sublethal dietary cyanide in an animal model: implications for humans consuming cassava (*Manihot esculenta*). *Human Biology*, 60(4), 597–614.
- Karlsson, E. K., Kwiatkowski, D. P., & Sabeti, P. C. (2014). Natural selection and infectious disease in human populations. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 6, pp. 379–393). <https://doi.org/10.1038/nrg3734>
- Lane, A. B., et al. (2002). Genetic substructure in South African Bantu-speakers: Evidence from autosomal DNA and Y-chromosome studies. In *American Journal of Physical Anthropology* (Vol. 119, Issue 2, pp. 175–185). <https://doi.org/10.1002/ajpa.10097>
- Lewnard, J. A., et al. (2014). Relative Undernourishment and Food Insecurity Associations with *Plasmodium falciparum* Among Batwa Pygmies in Uganda: Evidence from a Cross-Sectional Survey. In *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 91, Issue 1, pp. 39–49). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0422>
- Maples, B. K., et al. (2013). RFMix: A Discriminative Modeling Approach for Rapid and Robust Local-Ancestry Inference. In *The American Journal of Human Genetics* (Vol. 93, Issue 2, pp. 278–288). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.020>
- Maranz, S. An alternative paradigm for the role of antimalarial plants in Africa. *ScientificWorldJournal* 2012, 978913 (2012).
- Piel, F. B., et al. (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications*, 1, 104.
- Purcell, S., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575.
- Risso, D. S., et al. (2017). A bio-cultural approach to the study of food choice: The contribution of taste genetics, population and culture. In *Appetite* (Vol. 114, pp. 240–247). <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.03.046>
- Rocha, J., & Fehn, A.-M. (2016). Genetics and Demographic History of the Bantu. In *eLS* (pp. 1–9). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022892>
- Roudnitzky, N., et al. (2015). Receptor Polymorphism and Genomic Structure Interact to Shape Bitter Taste Perception. *PLoS Genetics*, 11(9), e1005530.
- Sabeti, P. C. (2006). Positive Natural Selection in the Human Lineage. In *Science* (Vol. 312, Issue 5780, pp. 1614–1620). <https://doi.org/10.1126/science.1124309>
- Soranzo, N., et al. (2005). Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Current Biology: CB*, 15(14), 1257–1265.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.

- Voight, B. F., et al. (2006). A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biology*, 4(3), e72.
- Wang, X., Thomas, S. D., & Zhang, J. (2004). Relaxation of selective constraint and loss of function in the evolution of human bitter taste receptor genes. *Human Molecular Genetics*, 13(21), 2671–2678.
- Wooding, et al. (2004). Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene. *American Journal of Human Genetics*, 74(4), 637–646.
- Zagrobelny, et al. (2004). Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry*, 65(3), 293–306.