

LEZIONE 1 (03/03/2015)

II DNA

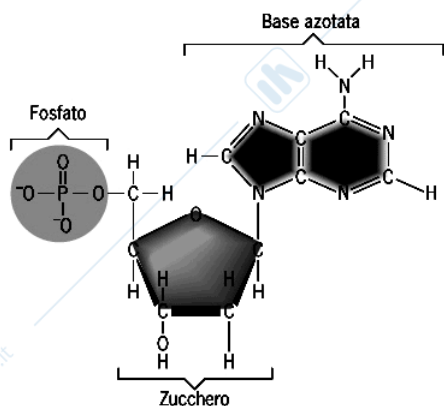


Figura 1.2 ► Struttura di un nucleotide. La molecola ha tre componenti: un gruppo fosfato, uno zucchero (in questo caso desossiribosio) e una base azotata (in questo caso adenina).

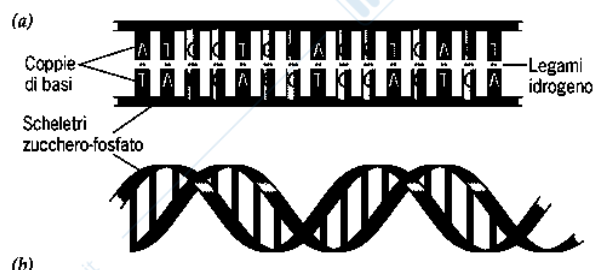


Figura 1.4 ► Il DNA, una molecola a doppio filamento tenuta assieme da legami idrogeno tra basi appaiate. (a) Rappresentazione bidimensionale della struttura di una molecola di DNA composta da catene nucleotidiche complementari. (b) Una molecola di DNA presentata come una doppia elica.

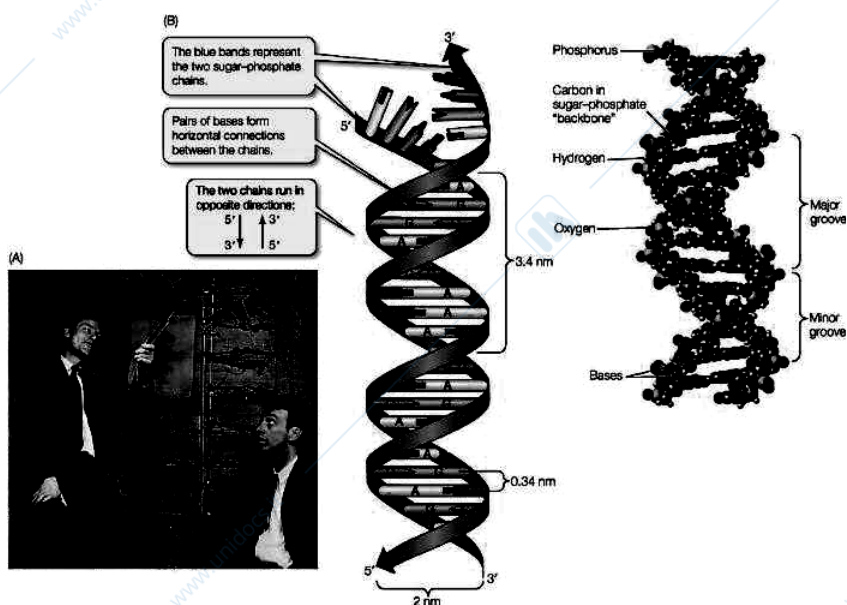


Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES

Il DNA è una molecola costituita da una serie di “mattoncini” che a loro volta sono costituiti da un gruppo fosfato, uno zucchero a 5 atomi di C e da una base azotata. Questi tre “elementi” sono uniti tra loro da legami covalenti. Lo zucchero presente nel DNA è il 2-desossiribosio. L’RNA è costituito dagli stessi mattoncini del DNA, ma presenta il ribosio invece del 2-desossiribosio. Una molecola di DNA, nella sua forma più stabile, la troviamo come una doppia elica, costituita da due filamenti tra loro complementari e antiparalleli. I filamenti sono complementari poiché tra le basi azotate si possono formare dei ponti idrogeno in maniera specifica (A-T e G-C); antiparalleli (un filamento presenta il primo nucleotide con il gruppo fosfato libero e l’ultimo con un gruppo OH libero; l’altro filamento avrà una situazione inversa). La distanza tra due coppie di basi nella doppia elica è di 0,34nm; la distanza dall’inizio del solco maggiore alla fine del solco minore è di 3,4nm poiché contiene 10 coppie di basi; la distanza tra due eliche è di circa 2nm.



La replicazione del DNA avviene in maniera semiconservativa: dopo la replicazione, da una doppia elica di DNA si avranno due doppie eliche di DNA ciascuna delle quali sarà costituita da un filamento parentale e da un filamento neosintetizzato. Ciò significa che in fase di replicazione del DNA, ciascun filamento della doppia elica funge da stampo per la sintesi di un filamento complementare. La doppia elica si separa con utilizzo di poca energia, grazie ai legami H tra le basi complementari.

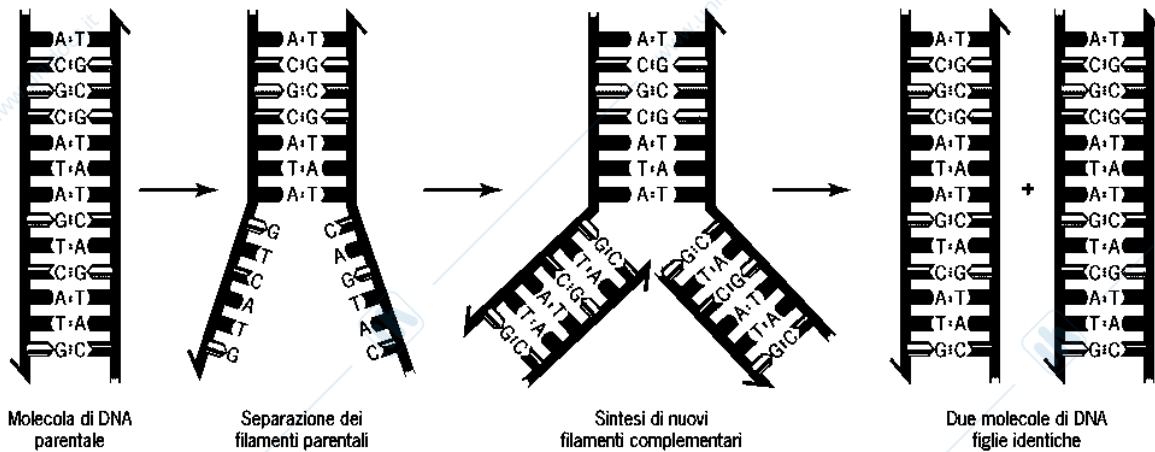
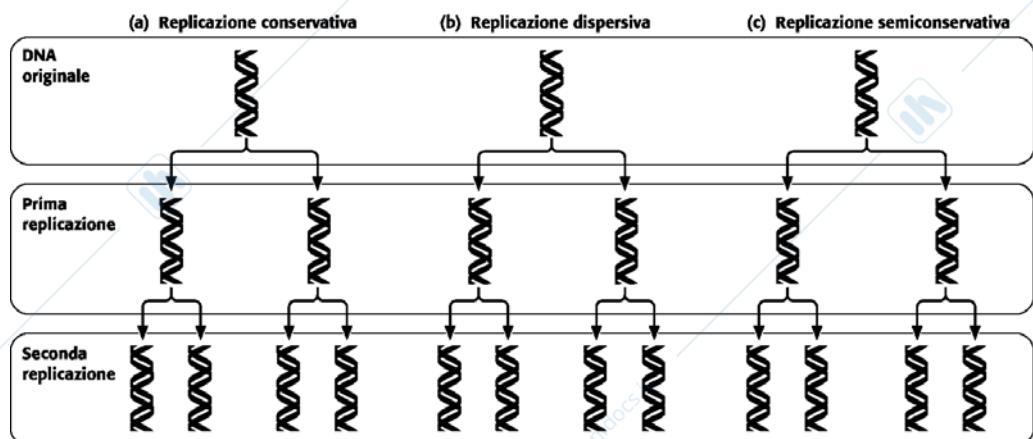


Figura 1.6 ▶ La replicazione del DNA. I due filamenti nella molecola parentale sono orientati secondo due direzioni opposte (freccie). Questi filamenti si separano e i nuovi filamenti sono sintetizzati usando i filamenti parentali come stampo. A replicazione completata, si ottengono due molecole di DNA a doppio filamento identiche tra loro.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
 Edises

Oltre al modello di replicazione semiconservativa erano plausibili altri due modelli: il modello di replicazione conservativa ed uno di replicazione dispersiva. Nel modello di replicazione **conservativa**, la doppia elica funge interamente da stampo per la sintesi di una doppia elica identica. Al termine di un ciclo di replicazione avremo come risultato una doppia elica completamente nuova e una "vecchia". Il modello di replicazione **dispersiva**, prevede invece una frammentazione della doppia elica in tanti pezzetti di doppia elica. Ciascuno di questi pezzetti di doppia elica funge da stampo per la sintesi di pezzetti di doppia elica uguali e alla fine si riasssemblano costituendo dei mosaici, ovvero delle molecole di DNA a mosaico che conterranno pezzetti di doppia elica completamente nuovi e pezzetti di doppia elica completamente vecchi. Dopo un secondo ciclo di replicazione le doppie eliche che si formeranno conterranno una quantità inferiore di pezzetti di doppia elica della molecola originale.



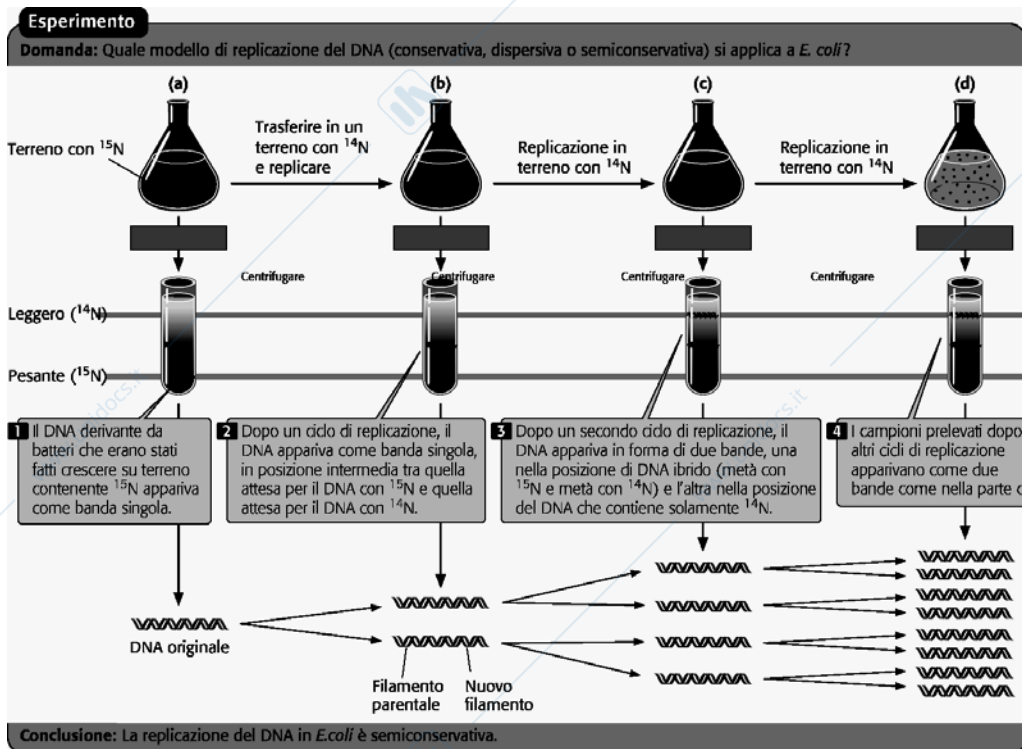
Esperimento di Meselson e Stahl

I due scienziati utilizzarono *Escherichia Coli* come organismo modello. Questo batterio riesce a crescere in terreni molto semplici con sale, amminoacidi a 37°C. Meselson e Stahl fecero crescere il ceppo in un terreno contenente azoto leggero (¹⁴N), dopo molte generazioni le lisavano con la tecnica di ultracentrifugazione in gradiente di densità di cloruro di cesio. Questa tecnica prevede velocità molto elevate e a seconda della sostanza utilizzata si può creare un gradiente di densità; cioè stratificare nella provetta la soluzione che è stata inserita, secondo una densità che va da un valore più alto verso il fondo della provetta ad una densità più bassa verso la parte superiore della provetta. Se inseriamo in provetta una macromolecola assieme al cloruro di cesio e facciamo un'ultracentrifugata, dopo la formazione del gradiente di densità la macromolecola si andrà a disporre nel punto della provetta corrispondente alla propria densità.

Quando Meselson e Stahl fecero l'ultracentrifugata del lisato batterico, di batteri cresciuti in un terreno contenente azoto leggero, osservarono la presenza del DNA disposto in una banda nella parte apicale della provetta. A questo punto i due scienziati sfruttarono l'isotopo ^{15}N per preparare il terreno di coltura. Fecero crescere *E. Coli* per molte generazioni in questo terreno contenente azoto pesante perché volevano essere sicuri che tutto il DNA di *E. Coli* contenesse esclusivamente azoto pesante. Dopo molte generazioni lisarono alcuni batteri e fecero

l'ultracentrifugata.

Osservarono la presenza di DNA disposto in una banda verso il fondo della provetta. A questo punto il ceppo replicato in azoto pesante venne trasferito in un terreno contenente azoto leggero ^{14}N e venne fatto replicare una sola volta, ovvero, prelevarono una parte di cellule batteriche dopo 17 minuti, le lisarono e fecero un'altra centrifugata. Non osservarono né la banda pesante né quella leggera, ma una banda di densità intermedia



(passaggio 2). A questo punto possiamo escludere che la replicazione avvenga in modo **conservativo** perché, dopo un ciclo di replicazione in azoto pesante, se la replicazione del DNA fosse stata conservativa avremmo dovuto aspettarci due bande di cui una leggera e l'altra intermedia. Il modello dispersivo però resta ancora in piedi. Meselson e Stahl fecero un secondo ciclo di replicazione in azoto leggero; presero le colonie, le lisarono, fecero l'ultracentrifugata e notarono una banda di densità intermedia e una di densità leggera (passaggio 3): questo risultato fece escludere l'ipotesi che la replicazione avvenisse in maniera **dispersiva**. Se fosse stata dispersiva, dopo il secondo ciclo di replicazione ci saremmo aspettati una banda ancora più leggera rispetto a quella intermedia al passaggio 2, perché di ciclo in ciclo di replicazione, la quantità di pezzettini del DNA originale sarà sempre più diluita e sarebbero gli unici pezzetti marcati in azoto pesante, per cui dovremmo avere sempre bande intermedie e sempre più leggere in progressione. Invece, secondo l'esperimento, di replicazione in replicazione la banda intermedia presenta sempre la stessa altezza, ma densità inferiore rispetto al passaggio 2 via via che procede la replicazione. Con altri cicli di replicazione la banda leggera avrà intensità maggiore rispetto al passaggio 3 perché aumenterà la quantità di doppie eliche che conterranno solo azoto leggero.

Il flusso dell'informazione genetica

L'informazione che si deve estrinsecare viene trasmessa dal DNA all'RNA. Questo processo nelle cellule eucariotiche avviene nel nucleo. L'RNA messaggero è un veicolatore dell'informazione dal nucleo al citoplasma, dove questa informazione si può estrinsecare attraverso la traduzione. Questa informazione viene così tradotta in un alfabeto di amminoacidi per formare le proteine. Attraverso la trascrittasi inversa, enzima virale, si può passare dall'RNA alla sintesi di DNA, cDNA (DNA copia). Un **cromosoma** appare come una sorte di crocetta, costituita da due cromatidi fratelli uniti a una strozzatura, il centromero. A seconda della posizione del

centromero classifichiamo i cromosomi in: **metacentrici** se il centromero divide il cromosoma in due metà uguali; **submetacentrici** se divide il cromosoma in una parte più grande ed una più piccola; **telocentrici** se è posizionato verso un'estremità; **acrocentrici** se il cromosoma è ridotto ad una "pallina" come il cromosoma Y dei mammiferi.

Mitosi e Meiosi

Le cellule somatiche attraverso la mitosi si replicano e i prodotti del processo mitotico sono identici alla cellula madre. La cellula madre è diploide ($2n$): quando troviamo $2n=1$ vuol dire che 1 è il numero di cromosomi presenti in quella specie nello stato diploide. Una cellula diploide possiede un assetto cromosomico costituito da coppie di cromosomi omologhi. I cromosomi omologhi dal punto di vista morfologico sono simili tra loro, hanno le stesse dimensioni, la stessa successione genica pur non essendo identici. Il nostro **cariotipo** è costituito da 22 coppie di autosomi più due cromosomi sessuali.

Nell'immagine partiamo da una cellula diploide il cui $2n=2c$ (contenuto di DNA); "c" si riferisce ad un contenuto di DNA come assetto aploide; "2c" come assetto diploide. Perché una cellula possa dividersi, sia mitoticamente che meioticamente, deve necessariamente replicare il suo DNA. Dopo la replicazione del DNA la cellula presenterà un contenuto doppio di DNA e come prodotto mitotico da questa cellula (con contenuto raddoppiato di DNA) si avranno due cellule, ciascuna della quali avrà contenuto di DNA identico a quella di partenza e numero cromosomico identico. Le cellule **germinali** non fanno mitosi, bensì meiosi. Logicamente la meiosi è caratteristica delle specie che si riproducono per via sessuale. Il prodotto della meiosi è il **gamete**: spermatozoo nella linea maschile e cellula uovo in quella femminile. La meiosi consta di due fasi di divisioni successive, per cui si parla di meiosi 1 e meiosi 2. Dopo la replicazione del DNA, il contenuto $2n=2c$ raddoppia a $4c$ e inizia la prima divisione meiotica che porta alla formazione di due cellule, ciascuna delle quali ha un contenuto di DNA pari a $2c$.

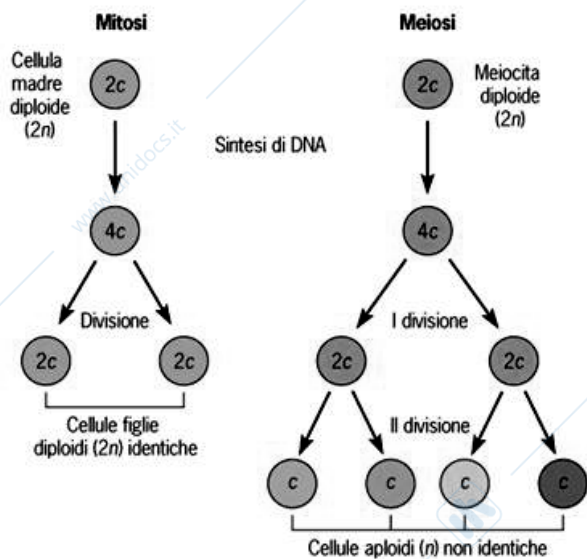


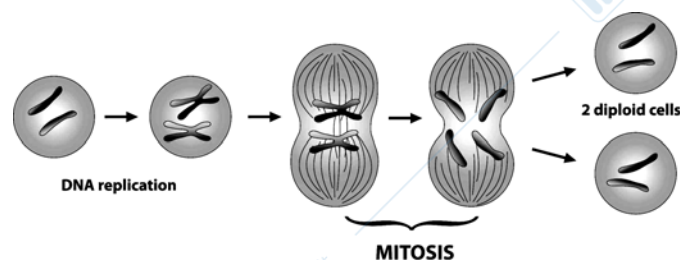
Figura 2.9 ▶ Confronto tra mitosi e meiosi; c indica il contenuto aploide di DNA nel genoma.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

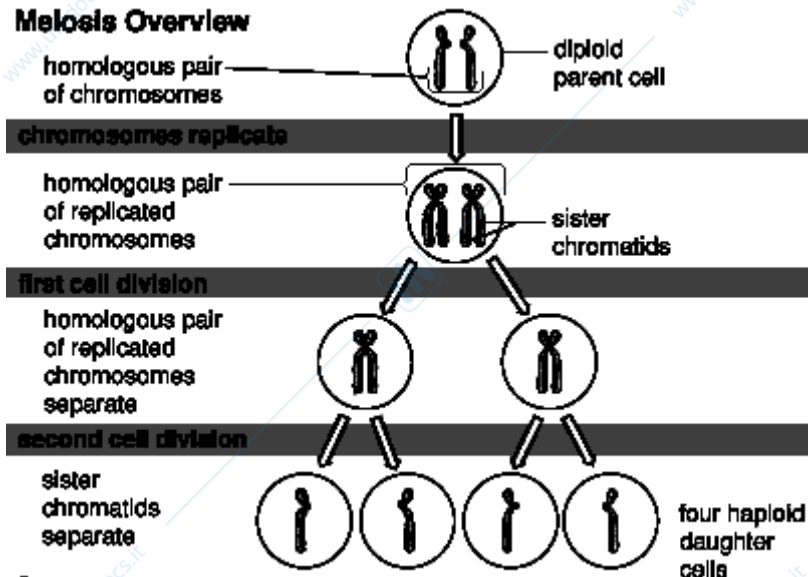
Da ciascuna di queste cellule, dopo una seconda divisione meiotica, si formeranno 2 cellule, per un totale di 4 cellule, ciascuna con un contenuto di DNA dimezzato rispetto alla cellula di partenza e con un assetto cromosomico dimezzato. Per cui non avremo più un assetto diploide, ma aploide. Nel caso di una cellula umana (spermatozoo o cellula uovo) a questo punto avrà un assetto $n=23$.

Se partiamo da una cellula **diploide** che contiene solo 2 cromosomi omologhi (vedi figura), quindi $2n=2c$; prima di fare **mitosi** la cellula deve replicare il suo DNA, per cui ciascun cromosoma diventa doppio. A questo punto ciascun omologo è costituito da **2 cromatidi fratelli**. Si forma quindi il fuso mitotico che consente la corretta separazione dei cromatidi fratelli. I cromatidi fratelli devono andare uno verso un polo e un altro verso il polo opposto. I cromosomi costituiti da coppie di cromosomi fratelli prendono contatto col fuso



mitotico attraverso il centromero. Avviene successivamente la citodieresi e si formeranno due cellule diploidi, ciascuna con $2n=2c$.

Meiosis Overview



non fratelli di cromosomi omologhi. Avvenuto lo scambio, ciascuna coppia di omologhi si allontana verso i poli. Al termine della prima divisione meiotica un omologo andrà in una cellula e l'altro in un'altra cellula. Può partire la seconda divisione meiotica in cui si separano i cromatidi fratelli, ognuno verso un polo della cellula e alla fine otterremo 4 cellule, ognuna contenente la metà del numero di cromosomi della cellula di partenza (aploidi). Devono essere aploidi proprio perchè dall'unione del gamete femminile con quello maschile si forma lo zigote, che ricostituisce l'assetto diploide della specie in esame. Contando i **chiasmi** al microscopio elettronico, si possono contare il numero di scambi che sono avvenuti tra coppie di cromosomi omologhi (tra cromatidi non fratelli). Il crossing-over è quindi il momento meiotico in cui avviene la variabilità genetica.

In quest'altra immagine partiamo da una cellula diploide che come prima possiede due cromosomi omologhi $2n=2c$ e che replica il proprio DNA prima di cominciare la **meiosi**. Anche in questo caso, dopo la replicazione ogni omologo risulta costituito da due cromatidi fratelli, uniti dal centromero. Adesso può cominciare la prima divisione meiotica. I cromosomi omologhi si respingono con la formazione del fuso meiotico, si formano le **tetradi**, strutture formate da coppie di cromosomi omologhi replicate che tra loro sono molto vicine, e può avvenire il **crossing-over**, ovvero uno scambio fisico di pezzi di DNA tra cromatidi

LEZIONE 2 (06/03/2015)**I principi mendeliani della trasmissione dei caratteri:****Le leggi di Mendel****Che cosa è la Genetica?**

- ▶ La **GENETICA** è la branca della Biologia che studia l'ereditarietà.
- ▶ L'**EREDITARIETA'** è ... il trasferimento di una caratteristica dai genitori alla progenie.
- ▶ Un **CARATTERE** ereditario è una **CARATTERISTICA** ereditabile, cioè trasmissibile dai genitori ai figli.

La genetica nella sua definizione più ampia possibile è un ramo della scienza che studia la trasmissione dei caratteri, ovvero in che modo da una generazione a quella successiva vengono tramandate (trasmesse) le caratteristiche di tutti gli organismi viventi. Prima di Mendel c'erano teorie più o meno fantasiose che venivano ritenute valide: per esempio la teoria del cosiddetto Homunculus che aveva credito nel XVII secolo,

- ▶ Tra il XVIII e il XIX secolo la teoria maggiormente diffusa dell'ereditarietà era la **mescolanza** dei caratteri: le qualità dei genitori si mescolano per determinare le qualità dei figli.
- ▶ Ad esempio, un genitore alto e un genitore basso produrranno un figlio di media statura.
- ▶ I gameti contengono "**essenze**" provenienti da diverse parti del corpo del genitore. Queste essenze si mescolano per formare il nuovo organismo.
- ▶ Questa teoria non spiega molte situazioni, ad esempio:
 - ▶ Due genitori con occhi marroni che generano un figlio con occhi azzurri.

piuttosto si parlava di essenze che da contributo paterno e da contributo materno si mescolassero tra loro per determinare poi la formazione del nuovo individuo nella generazione successiva. Con Mendel quindi si giunse ad una rivoluzione enorme dal punto di vista dell'idea della trasmissione dei caratteri perché lui fu il primo a sostenere che la trasmissione ereditaria avvenisse

- ▶ Alla fine del XVII secolo si riteneva che gli spermatozoi contenessero un individuo adulto in miniatura (homunculus). All'epoca si riteneva che gli spermatozoi contenessero tutti gli elementi necessari alla formazione di un adulto e che le cellule uovo servissero semplicemente da incubatori.

- ▶ I caratteri sono determinati da **unità discrete** che vengono trasmesse intatte da una generazione a quella successiva (1865).
- ▶ Riscoperta delle leggi di Mendel tra il 1898 e il 1902 (Bateson – De Vries – Correns – Von Tschermak).
- ▶ Il termine **gene** fu coniato nel 1909 da Johannsen.

attraverso il passaggio (prima nella produzione delle cellule che servono alla fecondazione e poi nella fecondazione) di fattori che erano degli elementi fisici, discreti, entità vere e proprie, che noi oggi indichiamo come cromosomi; e che su questi elementi si trovassero le informazioni che determinano la manifestazione delle nostre caratteristiche fenotipiche. Quindi, quando parliamo di fenotipo indichiamo la manifestazione di un carattere ereditario in un individuo; quando parliamo invece di genotipo indichiamo la costituzione genetica, ovvero come è fatto quel determinato individuo dal punto di vista del DNA. Nel 1865 nessuno degli scienziati lesse le pubblicazioni di Mendel dandogli importanza, solo agli inizi del 1900, circa 50 anni dopo vennero rivalutate e riscoperte da una serie di scienziati e seguì la nascita effettiva della genetica. Il termine gene fu coniato da Johannsen nel 1909. Mendel era un frate appassionato della natura che, nell'orticello del suo

Mendel e gli esperimenti con *Pisum sativum*

convento pensò di effettuare degli esperimenti perché era interessato alla trasmissione dei caratteri ereditari. Scelse come organismo per condurre i suoi studi una pianta molto comune, diffusa e di facile crescita, il *Pisum Sativum*, il cui fiore può essere bianco oppure di colore porpora: quest'alternativa fenotipica è stata una delle caratteristiche analizzate da Mendel. È una pianta che ben si presta ad esperimenti di incroci controllati perché è a fiore e come tale presenta (nel fiore) sia le strutture riproduttive maschili che femminili, inoltre è molto semplice tagliare via da un fiore le strutture maschili (sostanzialmente le antere) che portano i granuli di polline e quindi impedire che in quel fiore avvenga autoimpollinazione. È altrettanto facile prendere da una pianta un po' di polline con un pennellino e impollinare manualmente le strutture femminili di un'altra pianta, quindi molto semplice stabilire quale incrocio si vuole fare. Una volta avvenuta la fecondazione si sviluppa il baccello che contiene i nuovi semi (si sviluppa dall'ovaio fecondato). Mendel osservava nelle piante di pisello che normalmente coltivava nel suo orto delle caratteristiche alternative tra loro: il colore del fiore può essere bianco o porpora; il baccello liscio o settato. Il suo obiettivo era capire se si potesse formulare un principio che regolasse la trasmissione dei caratteri. I semi potevano essere verdi oppure gialli; lisci oppure rugosi. Mendel studiò 7 caratteristiche della pianta e riuscì a formulare i suoi principi. La prima cosa che si propose di fare fu quella di ottenere delle piante che manifestassero stabilmente un determinato

Gli esperimenti di Mendel

► L'auto-impollinazione e le linee pure:

L'auto-fecondazione di piante per numerose generazioni porta alla stabilizzazione del carattere. Tali linee vengono definite **PURE**.

carattere, cioè incrociandole tra loro di generazione in generazione il carattere rimaneva sempre lo stesso: piante a fiori bianchi che incrociate con piante a fiori bianchi dessero sempre piante a fiori bianchi; piante a fiori rossi che incrociate con piante a fiori rossi dessero sempre piante a fiori rossi). Lasciò che avvenisse quindi l'autofecondazione per molte generazioni di piante che avevano una certa caratteristica: quindi piante a fiori bianchi, autofecondate per molte generazioni, in modo tale da essere sicuro che incrociando tra loro piante a fiori bianchi ottenesse sempre piante a fiori bianchi. Poi piante a fiori rossi autofecondate per molte generazioni che

- Mendel prelevò il polline dalle antere di una pianta appartenente a una **linea pura a fiori bianchi** e lo pose sul pistillo di una pianta appartenente a una **linea pura a fiori porpora** dalla quale aveva rimosso le antere.
- I risultati furono...

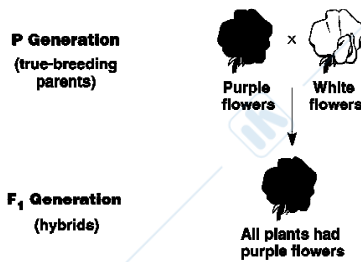
dessero piante a fiori rossi che a loro volta incrociate con piante a fiori rossi dessero sempre piante a fiori rossi. Queste linee di piante che

avevano un determinato fenotipo stabilizzato vengono definite linee pure. Una volta ottenute queste linee pure cominciò ad incrociare tra loro linee pure con caratteristiche diverse: in particolare tagliò le antere da una linea pura di piante a fiori porpora e prendeva il polline con un pennellino dalle antere di piante a fiori bianchi di una linea pura e lo traslocava sulle strutture

riproduttive femminili della linea pura di piante a fiori porpora: quindi eseguì un incrocio tra una linea pura a fiori bianchi ed una linea pura a fiori porpora. Fece anche l'incrocio inverso: la

► Prima Generazione Filiale (F₁)

► Porpora × Bianco = Porpora
(Parentali) (Progenie F₁)



Poi incrociò tra loro le piante della F₁ e il risultato fu...

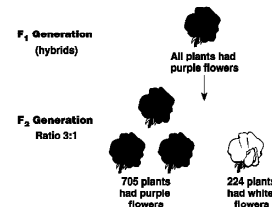
che chiamata generazione ibrida. A questo punto dell'esperimento Mendel non poteva dedurre ancora nulla, perché questi risultati non ci dicono molto. Così pensò di prendere le piante

ottenute alla F₁ e di incrociarle tra loro, o meglio ne consentì l'autofecondazione per andare ad osservare cosa accadeva nella seconda generazione filiale (o F₂), i figli della generazione F₁. (Se prendiamo gli individui della F₁ e li incrociamo tra loro, oppure, se la specie presa in esame ce lo consente li autofecondiamo, i figli che otterremo andranno a costituire la F₂, o seconda generazione filiale, facendo riferimento al primo incrocio di partenza). Cosa ottenne Mendel alla F₂? Ottenne la ricomparsa del fiore

bianco; o meglio di piante che presentavano il fiore bianco; quindi questa F₂ era costituita sia da piante a fiori bianchi che da piante a fiori porpora. Questa osservazione però era già stata fatta in precedenza: era noto che facendo determinati tipi di incroci si riuscissero ad ottenere, dall'incrocio tra piante che non presentavano un certo fenotipo (in questo caso stiamo incrociando piante con fiori rossi tra loro) piante con quel fenotipo mancante nei genitori. L'operazione innovativa attuata da Mendel fu la conta delle piante a fiori bianchi e delle piante a fiori porpora ottenute alla F₂, per capire se ci fosse un razionale matematico, una logica nei risultati ottenuti, oppure se i risultati fossero casuali e variabili. Nella fattispecie l'esperimento mendeliano presenta una F₂ costituita da circa 1000 piante (929 piante) di cui 705 con fiori porpora e 224 con fiori bianchi. Che tipo di rapporto è 705 a 224? 705 è circa il 75% di 929, mentre 224 è circa il 25% di 929; quindi Mendel osservava in F₂, innanzitutto la ricomparsa del carattere scomparso in F₁ (fiore bianco), ma il rapporto tra le piante a fiore porpora e quelle a fiore bianco era all'incirca 75% a 25%, cioè i $\frac{3}{4}$ delle piante avevano fiori rossi, mentre $\frac{1}{4}$ delle piante avevano fiori bianchi, il famoso rapporto 3:1; che corrisponde a $\frac{3}{4}:\frac{1}{4}$. Stiamo analizzando un esperimento fatto su circa 1000 piante, non su 10! Se avessimo analizzato solo 10 piante della progenie sarebbe stato estremamente improbabile individuare questo tipo di rapporto perché un campione di 10 piante non consente di effettuare un'analisi statisticamente significativa (non è possibile osservare un rapporto 3:1 su una progenie di 4 figli! Non è statisticamente plausibile!) Mendel ripeté gli stessi esperimenti per altri sei caratteristiche per verificare se ciò che aveva osservato fosse un comportamento peculiare (per il colore del fiore), o se coinvolgesse anche altri caratteri. Anche per tutti gli altri sei caratteri analizzati da Mendel, furono ottenuti sempre gli stessi

► Seconda Generazione Filiale (F₂)

► F₁ (Porpora) × F₁ (Porpora) = Porpora e bianco
(Parentali) (Progenie F₂)



► CONTA DEI RISULTATI:

- 929 fiori: 705 porpora, 224 bianchi
- $705:929=X:100$ $X=705 \times 100/929=75,89\%$ (porpora)
- $224:929=X:100$ $X=224 \times 100/929=24,11\%$ (bianco)
- Il rapporto porpora/bianco è circa **3:1** ($\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$)!

risultati: prendendo delle linee pure con caratteristiche opposte (piante alte e piante nane) e incrociandole tra loro otteneva una F1 costituita interamente da piante alte; scompariva anche in questo caso una delle due caratteristiche presenti in una linea parentale (il carattere basso); ma incrociando (autofecondando) le piante della F1 otteneva alla F2 la ricomparsa del carattere parentale che era scomparso alla F1 (carattere basso); e contando i risultati notò che anche in questo caso il rapporto piante alte:piante nane era di circa 3:1 ($\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$). In conclusione, Mendel verificò che questi 7 caratteri che aveva analizzato, caratteri che si presentavano con caratteristiche alternative tra di loro e facilmente discriminabili (colore del seme giallo o verde; colore del fiore bianco o porpora) si comportavano nella stessa maniera (utilizzando lo stratagemma di partire da linee pure). A tale punto Mendel doveva proporre una regola che potesse descrivere il comportamento omogeneo di tutti i 7 caratteri esaminati di generazione in generazione,

- ▶ Mendel notò che nella F1 si manifesta solo il carattere porpora.
- ▶ Osservò che il carattere bianco assente in F1 **ricompare** in F2 con una precisa proporzione.
- ▶ Dedusse che l'informazione per il carattere bianco è presente nella F1, anche se è "mascherata" dall'informazione per il carattere porpora.
- ▶ Definì **ibrida** la progenie F1 in quanto contiene le informazioni per entrambi i caratteri, ereditate da ciascuno dei due parentali.
- ▶ Condusse gli stessi tipi di incroci per **altri 6 caratteri**, ottenendo gli stessi risultati.

► TABELLA 3.1
Risultati degli incroci di Mendel tra monoibridi

Linee parentali	Progenie F ₂	Rapporto
Piante alte × piante nane	787 alte, 277 nane	2,84:1
Semi lisci × semi rugosi	5.474 lisci, 1.850 rugosi	2,96:1
Semi gialli × semi verdi	6.022 gialli, 2.001 verdi	3,01:1
Fiori viola × fiori bianchi	705 viola, 224 bianchi	3,15:1
Baccelli larghi × baccelli stretti	882 larghi, 299 stretti	2,95:1
Baccelli verdi × baccelli gialli	428 verdi, 152 gialli	2,82:1
Fiori assiali × fiori terminali	651 assiali, 207 terminali	3,14:1



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

quindi un principio che potesse spiegare questi risultati, ovvero interpretarli nella maniera più scientifica possibile. Ovviamente la descrizione dei risultati deve essere attenta, accurata, onesta e l'esperimento deve essere costruito in maniera logica e riproducibile, anche a distanza di anni: l'esperimento è valido soltanto se i risultati ottenuti la prima volta sono saranno esattamente gli stessi che si otterranno in futuro. Il primo principio che formulò Mendel, fu

quello che noi oggi definiamo come **principio della dominanza**: il comportamento dei caratteri mendeliani del tipo linea pura a fiori bianchi-linea pura a fiori porpora, F1 solo fiori porpora, F2 fiori porpora e bianchi, fece pensare che gli individui della F1 avessero anche l'informazione del colore bianco, ma questa informazione era mascherata dalla presenza (contemporanea) dell'informazione per il colore porpora.

Quindi l'informazione (quella che Mendel chiamava fattore), il fattore che determina il fiore porpora domina il fattore che determina il fiore bianco, per cui, nelle linee parentali porpora è presente solo l'informazione per i fiori porpora, e Mendel sosteneva che fosse in doppia copia; nelle piante a fiori bianchi è presente solo l'informazione per il fiore bianco: essendo quindi presente solo l'informazione per quel carattere (in doppia copia nel porpora e in doppia copia nel bianco) ciò che poteva venire fuori era

- ▶ “Ogni organismo ha 2 fattori che controllano ciascun carattere” (oggi i fattori si chiamano **alleli**, cioè forme alternative di un gene).
- ▶ Carattere **dominante**
 - ▶ Un carattere che domina (maschera/copre) quello recessivo; si indica con una lettera maiuscola.
- ▶ Carattere **recessivo**
 - ▶ Non si manifesta se è presente anche un carattere dominante; si indica con una lettera minuscola.
 - ▶ Fiore porpora, fenotipo dominante = P
 - ▶ Fiore bianco, fenotipo recessivo = p

solo fiore porpora e fiore bianco. Questi fattori sono contenuti in doppia copia perché attraverso la riproduzione sessuale, la pianta a fiori porpora dava la metà della sua informazione (porpora) alla F1 e la pianta a fiori bianchi dava la metà della sua informazione (bianco) alla F1: le piante

alla F1 si trovavano ad avere sia l'informazione per i fiori porpora, sia quella per i fiori bianchi.

Una di queste due copie è l'informazione colore porpora, l'altra colore bianco: quello che afferma il principio della dominanza è che quando sono presenti contemporaneamente questi due fattori all'interno di un individuo, ce n'è uno che domina sull'altro; in questo caso porpora domina su bianco, di conseguenza il fenotipo sarà porpora (il fenotipo del fattore dominante).

▶ Ci sono 2 alleli

- ▶ Un allele viene ereditato dal genitore femmina, l'altro dal maschio.

▶ Quindi:

- ▶ Fiore porpora = **PP** = linea pura dominante
 - ▶ **GENOTIPO OMOZIGOTE DOMINANTE**
- ▶ Fiore bianco = **pp** = linea pura recessiva
 - ▶ **GENOTIPO OMOZIGOTE RECESSIVO**

▶ E I fiori porpora **Pp**?

- ▶ **GENOTIPO ETEROZIGOTE**
 - ▶ "Ibridi"; portatori

L'altro fenotipo (fiore bianco) sarà definito recessivo. Come si stabilisce un fenotipo dominante e un fenotipo recessivo? Prendendo due linee pure con fenotipo opposto, incrociandole tra loro e osservando il fenotipo della F1. Questi fattori discreti, responsabili della manifestazione di un certo carattere sono quindi presenti in doppia copia in ogni organismo e vengono trasmessi uno per volta (da ciascun genitore) alla progenie. Il carattere dominante viene indicato con lettera maiuscola, quello recessivo con lettera minuscola. Quando incontriamo un genotipo costituito da due lettere maiuscole stiamo osservando il genotipo di una linea pura (omozigote dominante), quindi contiene entrambe le informazioni per un certo carattere identiche. Stessa cosa un genotipo caratterizzato da due lettere minuscole appartiene ad una linea pura, che però contiene entrambe le informazioni per il carattere recessivo. Questi due genotipi sono chiamati omozigoti; in particolare omozigote dominante, omozigote recessivo. Qualora invece ci troviamo dinanzi a un genotipo costituito da una lettera maiuscola ed una

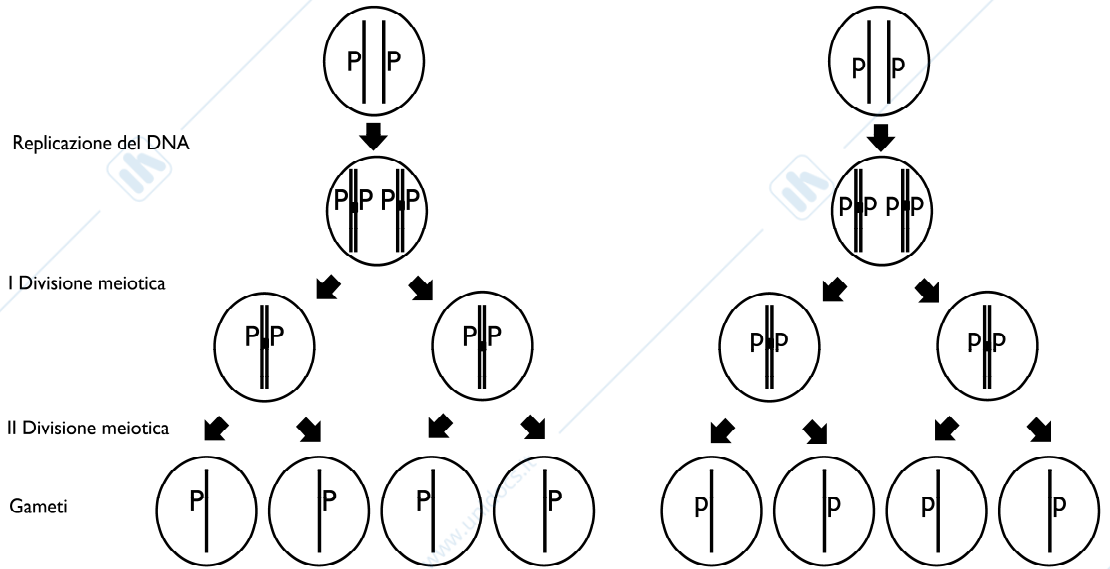
minuscola allora stiamo parlando di un genotipo ibrido perché contiene un'informazione per il carattere dominante ed una per quello recessivo, e secondo il principio della dominanza questo individuo ibrido che si chiama anche eterozigote, avrà un fenotipo dominante: quindi gli omozigoti dominanti e gli eterozigoti presentano lo stesso fenotipo (dominante). A volte i genotipi eterozigoti oltre ad essere definiti ibridi possono essere anche definiti portatori: portatori dell'informazione recessiva, che non si vede nel loro fenotipo, ma c'è comunque nel loro genotipo. Nella slide abbiamo l'esempio riferito al colore porpora o al colore bianco del fiore: la linea porpora ha un genotipo PP (omozigote dominante), la linea pura a fiore bianco un genotipo omozigote recessivo dd. L'eterozigote Pp presenterà fenotipo dominante, ma nel suo genotipo contiene anche l'informazione recessiva. Perché? Perché in F2 veniva fuori nuovamente il fenotipo recessivo; perché ogni genitore fornisce la metà della sua informazione alla progenie?

- ▶ Il **Principio della Dominanza** afferma che alcuni *fattori* (alleli dominanti) possono mascherare l'espressione di altri (alleli recessivi).

- ▶ Il **Principio della Segregazione** afferma che ciascun *fattore* (allele), contenuto in doppia copia in un organismo diploide, si separa dall'altro durante la formazione delle cellule sessuali (gameti).

questo fenotipo recessivo; perché ogni genitore fornisce la metà della sua informazione alla progenie?

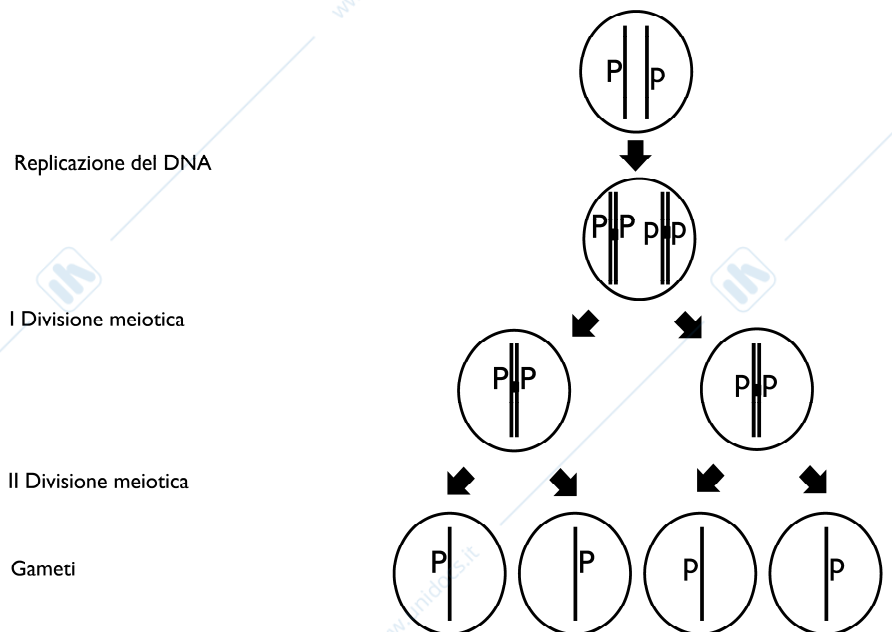
Perché Mendel ha pensato di spiegarsi in che modo potesse venir fuori il rapporto $\frac{3}{4}$ dominante: $\frac{1}{4}$ recessivo nella sua F2. Questi sono i primi due principi di Mendel. Quello che Mendel chiamava fattore noi oggi lo chiamiamo allele, cioè forma alternativa di un gene: durante la formazione dei gameti, questi due fattori (due alleli) segregano (si separano) l'uno dall'altro in maniera del tutto indipendente e statisticamente casuale. Abbiamo nella slide la **meiosi di una linea pura di piante a fiori porpora**: è schematizzata una sola coppia di cromosomi, ma *pisum sativum* non ha una sola coppia di cromosomi, per semplicità ne



meiosi di una linea pura di piante a fiori porpora:

è schematizzata una sola coppia di cromosomi, ma *pisum sativum* non ha una sola coppia di cromosomi, per semplicità ne

abbiamo indicato solo una in modo tale da guardare solo i cromosomi su cui si trovano i fattori (gli alleli) per il colore del fiore. Partiamo da una pianta, quindi una linea pura omozigote che contiene entrambi i fattori dello stesso tipo (in questo caso porpora): allele P su un cromosoma e P sull'altro cromosoma (2 cromosomi omologhi). Prima di fare divisione cellulare, la cellula deve necessariamente replicare il DNA, per cui dopo la replicazione, ciascun cromosoma sarà costituito da 2 molecole di DNA che chiamiamo cromatidi fratelli tenuti insieme da una struttura chiamata centromero, la quale prende contatto con le fibre del fuso e assicurerà poi la corretta segregazione degli omologhi e dei cromatidi poi. Questo è un punto cruciale della meiosi. Prima della prima divisione meiotica i cromosomi omologhi si appaiano, formano le tetradie, se è il caso avviene il crossing-over; dopodichè un omologo mira verso un polo del fuso l'altro omologo al polo opposto; non possono andare tutti e due dalla stessa parte; guai se avvenisse una cosa del genere. Le due cellule figlie, dopo la prima divisione meiotica devono subire la seconda divisione, che prevede la formazione del fuso mitotico, i cromosomi si dispongono a livello equatoriale, e a questo punto i cromatidi fratelli si separano e migrano uno verso un polo e l'altro verso l'altro polo. Questo accade per entrambe le cellule prodotte dalla prima divisione meiotica e alla fine avremo 4 gameti aploidi ciascuno contenente in questo caso un cromosoma (perché siamo partiti da una cellula diploide con 2 cromosomi) e questi gameti sono dello stesso tipo, ovvero contengono tutti l'informazione P, perché la cellula di partenza conteneva solo l'allele P. Specularmente è quello che accade anche nella **meiosi di un omozigote recessivo pp**, il



specularmente è quello che accade anche nella **meiosi di un omozigote recessivo pp**, il

quale alla fine produrrà 4 gameti contenenti esclusivamente l'informazione p. La F1 si forma dall'unione di un gamete prodotto dalla pianta omozigote dominante al gamete prodotto dalla pianta omozigote recessiva; quindi da un gamete P e da un gamete p; per cui lo zigote che si forma sarà Pp: avrà su un omologo il fatto P e sull'altro il fattore p. Nell'eterozigote che cosa accade durante la meiosi? La stessa cosa: avviene la replicazione del DNA, parte la prima divisione meiotica, un omologo migra verso un polo e l'altro verso il polo opposto; dopo la prima divisione le cellule figlie conterranno una l'informazione P e l'altra l'informazione p; in seconda divisione meiotica l'informazione P di una cellula e l'informazione p dell'altra cellula verranno ripartite nelle cellule figlie da loro prodotte. Il prodotto della meiosi di un monoibrido (perché stiamo considerando un solo carattere, Pp) non è più un solo tipo di gamete come nel caso dell'omozigote (sia esso dominante o recessivo), ma ben due tipi di gameti: sia gameti contenenti P che gameti contenenti p (50% gameti P e 50% gameti p) perché da ogni singola meiosi di un individuo eterozigote vengono fuori due gameti P e due gameti p; quindi la metà P e la metà p. Nell'incrocio tra piante alte e piante nane, il carattere per l'altezza è indicato con la lettera D: le piante con genotipo DD sono fenotipicamente alte, quelle con genotipo dd sono fenotipicamente nane. La pianta di linea pura alta produce un solo tipo di gamete D, quella di linea pura nana solo un tipo di gamete d perché sono le uniche informazioni contenute da queste piante. Nella formazione della F1 un gamete (D) si unisce con un gamete (d) e quindi queste piante saranno eterozigoti e avranno fenotipo alto per il principio della dominanza. Queste piante della F1 monoibride (eterozigoti) e producono due tipi di gameti (D e d) con un mezzo di probabilità per un tipo (D) e un mezzo di probabilità per l'altro tipo (d). cosa accade se autofecondiamo le piante eterozigoti della F1? Schematizziamo l'incrocio con il quadrato di Punnett sui cui lati scriviamo i tipi gametici prodotti da ciascuno dei due genitori: i genitori (F1) produce entrambi i gameti, quindi da un lato del quadrato scriviamo D e d, e dall'altro lato del quadrato D e d. Andiamo a riempire i 4 sottoquadrati con il risultato dell'incrocio di quei due tipi di gameti. Nel primo quadrato in alto a sinistra scriviamo DD perché deriva dalla fusione di un gamete contenente

l'allele D e un altro gamete contenente un altro allele D; nel primo in alto a destra e nel secondo in basso a sinistra inseriamo Dd perché derivano dalla fusione di un gamete contenente l'allele D e un altro gamete contenente l'allele d; nel secondo quadrato in basso a destra inseriamo dd che deriva dalla fusione di un gamete contenente un allele d e un gamete contenente anch'esso l'allele d. Per il genotipo DD avremo quindi fenotipo alto così come per Dd, e per il genotipo dd un fenotipo basso: è un rapporto fenotipico del tipo 3:1. Quindi possiamo affermare che ogni organismo possiede due informazioni che vengono ripartite in maniera indipendente durante la meiosi. La spiegazione di questo modello però non è completa ancora. Le piante della F2 potevano avere fenotipo dominante per $\frac{3}{4}$ e fenotipo recessivo per $\frac{1}{4}$. Mendel prese le piante della F2 con fenotipo recessivo, le autofecondava e otteneva sempre piante con fenotipo recessivo; se autofecondava le piante della F2 con fenotipo dominante (i $\frac{3}{4}$) non otteneva sempre lo stesso risultato: un certo numero di piante a fiori rossi della F2 se autofecondate davano sempre piante a fiori rossi (1/3), mentre gli altri 2/3 di piante a fiori rossi della F2, se autofecondate davano nuovamente una progenie costituita da piante a fiori rossi, e piante con

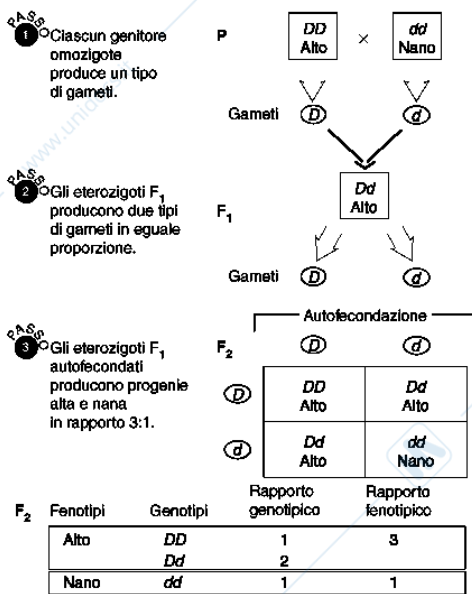


Figura 3.2 ► Rappresentazione simbolica dell'incrocio tra varietà alta e nana di piante di pisello.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

l'allele D e un altro gamete contenente un altro allele D; nel primo in alto a destra e nel secondo in basso a sinistra inseriamo Dd perché derivano dalla fusione di un gamete contenente l'allele D e un altro gamete contenente l'allele d; nel secondo quadrato in basso a destra inseriamo dd che deriva dalla fusione di un gamete contenente un allele d e un gamete contenente anch'esso l'allele d. Per il genotipo DD avremo quindi fenotipo alto così come per Dd, e per il genotipo dd un fenotipo basso: è un rapporto fenotipico del tipo 3:1. Quindi possiamo affermare che ogni organismo possiede due informazioni che vengono ripartite in maniera indipendente durante la meiosi. La spiegazione di questo modello però non è completa ancora. Le piante della F2 potevano avere fenotipo dominante per $\frac{3}{4}$ e fenotipo recessivo per $\frac{1}{4}$. Mendel prese le piante della F2 con fenotipo recessivo, le autofecondava e otteneva sempre piante con fenotipo recessivo; se autofecondava le piante della F2 con fenotipo dominante (i $\frac{3}{4}$) non otteneva sempre lo stesso risultato: un certo numero di piante a fiori rossi della F2 se autofecondate davano sempre piante a fiori rossi (1/3), mentre gli altri 2/3 di piante a fiori rossi della F2, se autofecondate davano nuovamente una progenie costituita da piante a fiori rossi, e piante con

fiori bianchi. Questo perché i $\frac{3}{4}$ delle piante dominanti della F2 non sono omogenee dal punto di vista genotipico: $\frac{1}{3}$ di queste piante ha genotipo omozigote dominante e quindi autofecondato darà sempre piante con fenotipo dominante, mentre $\frac{2}{3}$ di queste piante sono eterozigoti e quindi autofecondate si comporteranno come l'incrocio della F1; daranno quindi sia piante con fenotipo dominante che piante con fenotipo recessivo in rapporto 3:1. Quindi, solo dopo aver analizzato la progenie anche in questo modo il principio della dominanza e il principio della segregazione potevano essere validi per spiegare il comportamento dei caratteri. Se abbiamo detto che la probabilità che venga fuori un gamete D (T) è $\frac{1}{2}$ e che venga fuori un gamete d (t) è $\frac{1}{2}$ nella meiosi di un eterozigote (T sta per tall, ma possiamo utilizzare anche la lettera D come nell'esempio precedente), ovviamente la probabilità che si formi un individuo con genotipo omozigote dominante DD (TT) è $\frac{1}{2}$, così come la probabilità che si formi un individuo con genotipo omozigote recessivo dd (tt) è $\frac{1}{2}$, mentre invece la probabilità che si formi un individuo con genotipo eterozigote è $\frac{1}{4}$ più $\frac{1}{4}$, cioè $\frac{1}{2}$ perché i genotipi eterozigoti che vengono fuori dal quadrato di Punnett sono sia quelli in cui il gamete maschile porta l'allele D (T) e quello femminile l'allele d (t), sia quelli in cui avviene il contrario; quindi in due tipi di unioni gametiche si forma il genotipo eterozigote, ciascuno di questi due tipi di unioni gametiche ha frequenza $\frac{1}{4}$, quindi la somma di queste due probabilità mi dà $\frac{1}{2}$. Quindi, oltre a dare una descrizione della distribuzione fenotipica in F2 ($\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$), possiamo anche dare la descrizione genotipica che è ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$), ovvero $\frac{1}{4}$ la probabilità che si formi un individuo con genotipo omozigote dominante DD (TT), $\frac{1}{2}$ che si formi con genotipo eterozigote Dd (Tt), $\frac{1}{4}$ che si formi con genotipo omozigote recessivo dd (tt). Mendel provò anche a considerare il comportamento di due caratteri per volta nei suoi esperimenti: si costruì quindi delle linee pure omozigoti dominanti per due caratteri e linee pure omozigoti recessive per due caratteri, in questo caso una linea pura a semi gialli e lisci e una linea pura a semi verdi e rugosi. I genotipi erano GGWW per la linea pura dominante a semi lisci e gialli, e ggww per la linea pura recessiva a semi verdi e rugosi: incrociando tra loro queste due linee pure, la F1 era costituita da fenotipi dominanti per entrambi i caratteri (tutte piante con semi gialli e lisci); quindi sostanzialmente non cambiava molto rispetto alle osservazioni sui singoli caratteri perché in F1 notava la scomparsa di uno dei due caratteri parentali (in particolare scompariva sempre il carattere recessivo). Autofecondando le piante della F1, alla F2 osservava 4 tipi di fenotipi: sia piante con semi gialli e lisci (315), sia piante con semi gialli e rugosi (101), sia piante con semi verdi e lisci (108), sia piante con semi verdi e rugosi (32). Venivano fuori tutte le possibili combinazioni fenotipiche. Guardando i risultati proviamo a capire in che rapporti stanno tra di loro: ad esempio, 315 piante a semi gialli e lisci che frazione è del totale delle piante ottenute alla generazione F2? Rappresenta circa $\frac{9}{16}$: quindi in F2 le piante fenotipicamente dominanti per entrambi i caratteri avevano una frequenza di $\frac{9}{16}$; le piante verde-liscio o giallo-rugoso numericamente rappresentavano gli stessi valori (101 e 108) ovvero $\frac{3}{16}$. C'erano quindi $\frac{3}{16}$ di piante fenotipicamente dominanti per un carattere e recessive per l'altro, e altri $\frac{3}{16}$ di piante fenotipicamente dominanti per un carattere e recessive per l'altro;

- ▶ Genotipo: TT, Tt, tt
- ▶ Fenotipo: T (TT e Tt) e t (tt)
- ▶ Rapporto genotipico
 - ▶ 1/4: 1/2: 1/4
 - ▶ TT: Tt: tt
- ▶ Rapporto fenotipico
 - ▶ 3/4: 1/4
 - ▶ T: t

- ▶ Costruiamo un quadrato di Punnett.
- ▶ Scriviamo i tipi di **gameti** prodotti da ciascun parentale sui due lati esterni del quadrato.
- ▶ Ogni gamete insiste su un sotto-quadrato differente.
- ▶ Questo è un incrocio tra due **MONOIBRIDI**, cioè tra due **ETEROZIGOTI** per UN **SOLO CARATTERE**.

eterozigote, ciascuno di questi due tipi di unioni gametiche ha frequenza $\frac{1}{4}$, quindi la somma di queste due probabilità mi dà $\frac{1}{2}$. Quindi, oltre a dare una descrizione della distribuzione fenotipica in F2 ($\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$), possiamo anche dare la descrizione genotipica che è ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$), ovvero $\frac{1}{4}$ la probabilità che si formi un individuo con genotipo omozigote dominante DD (TT), $\frac{1}{2}$ che si formi con genotipo eterozigote Dd (Tt), $\frac{1}{4}$ che si formi con genotipo omozigote recessivo dd (tt). Mendel provò anche a considerare il comportamento di due caratteri per volta nei suoi esperimenti: si costruì quindi delle linee pure omozigoti dominanti per due caratteri e linee pure omozigoti recessive per due caratteri, in questo caso una linea pura a semi gialli e lisci e una linea pura a semi verdi e rugosi. I genotipi erano GGWW per la linea pura dominante a semi lisci e gialli, e

ggww per la linea pura recessiva a semi verdi e rugosi: incrociando tra loro queste due linee pure, la F1 era costituita da fenotipi dominanti per entrambi i caratteri (tutte piante con semi gialli e lisci); quindi sostanzialmente non cambiava molto rispetto alle osservazioni sui singoli caratteri perché in F1 notava la scomparsa di uno dei due caratteri parentali (in particolare scompariva sempre il carattere recessivo). Autofecondando le piante della F1, alla F2 osservava 4 tipi di fenotipi: sia piante con semi gialli e lisci (315), sia piante con semi gialli e rugosi (101), sia piante con semi verdi e lisci (108), sia piante con semi verdi e rugosi (32). Venivano fuori tutte le possibili combinazioni fenotipiche. Guardando i risultati proviamo a capire in che rapporti stanno tra di loro: ad esempio, 315 piante a semi gialli e lisci che frazione è del totale delle piante ottenute alla generazione F2? Rappresenta circa $\frac{9}{16}$: quindi in F2 le piante fenotipicamente dominanti per entrambi i caratteri avevano una frequenza di $\frac{9}{16}$; le piante verde-liscio o giallo-rugoso numericamente rappresentavano gli stessi valori (101 e 108) ovvero $\frac{3}{16}$. C'erano quindi $\frac{3}{16}$ di piante fenotipicamente dominanti per un carattere e recessive per l'altro, e altri $\frac{3}{16}$ di piante fenotipicamente dominanti per un carattere e recessive per l'altro;

- ▶ Come fece Mendel a determinare i *fattori* (gli alleli) presenti nella progenie F2 dei suoi incroci?
- ▶ Utilizzò l'**incrocio di prova** (o *test-cross* o **reincrocio**).
- ▶ Viene utilizzato per stabilire il genotipo ignoto di uno dei parentali.
- ▶ Consiste nell'incrocio del parentale con genotipo ignoto x parentale omozigote recessivo (linea pura).
- ▶ $\frac{1}{3}$ della progenie F2 con fenotipo porpora (dominante), incrociato con una linea pura pp dava tutta progenie porpora.
- ▶ $\frac{2}{3}$ della progenie F2 con fenotipo porpora, incrociato con pp dava 50% di progenie porpora e 50% bianca.

nella fattispecie verde-liscio= 3/16; giallo-rugoso= 3/16. Infine erano presenti anche piante con fenotipo recessivo per entrambi i caratteri che rappresentavano all'incirca 1/16 della progenie.

- ▶ Mendel esaminò poi due caratteri per volta.
- ▶ Ad esempio, linea pura a semi gialli, lisci (GG WW) x linea pura a semi verdi, rugosi (gg ww).
- ▶ F1 tutta a semi gialli, lisci (Gg Ww) **DIIBRIDI (ETEROZIGOTI PER DUE CARATTERI)**
 - ▶ Giallo è dominante su verde
 - ▶ Seme liscio è dominante su seme rugoso
- ▶ Quanti fenotipi e quali frequenze ci aspettiamo nella F2 prodotta dall'incrocio Gg Ww x Gg Ww?

Sostanzialmente in questa F2 Mendel osservava delle combinazioni in rapporto 9:3:3:1 (dove intendiamo 9/16 di piante fenotipicamente dominanti per entrambi i caratteri; 3/16 dominanti per un carattere e recessivo per l'altro e viceversa; 1/16 di piante recessive per entrambi i caratteri). Ma da dove viene fuori questo 9:3:3:1? Questo rapporto è "figlio" del rapporto 3:1; cioè se in questi numeri andiamo ad analizzare separatamente il fenotipo dei singoli caratteri, ovvero quante piante a semi

gialli e quante a semi verdi ci sono nella progenie (315 gialli + 101 verdi) e (108 verdi + 32 verdi), in che rapporto sono? Esattamente in rapporto 3:1 (3/4:1/4). Di conseguenza questo 9/16 viene fuori dal prodotto di 3/4 per 3/4, cioè 3/4 di piante a seme giallo e 3/4 di piante a seme liscio (che ci aspettiamo analizzando separatamente i due caratteri); il 3/16 viene fuori dal prodotto della probabilità fenotipica verde 1/4 perché è recessivo per la probabilità che sia liscio 3/4 perché è dominante (1/4 x 3/4 = 3/16); 3/16 dal prodotto giallo 3/4 dominante per rugoso 1/4 recessivo = 3/16; 1/16 dal prodotto verde 1/4 recessivo per 1/4 rugoso recessivo. Per cui quando li analizziamo contemporaneamente, i caratteri mendeliani assortiscono in maniera indipendente, ovvero non si influenzano. Il terzo principio di Mendel è il **principio dell'assortimento indipendente** e cioè, nel momento in cui si considerano due o più caratteri posti su cromosomi differenti, essi si comportano in maniera assolutamente indipendente l'uno dall'altro durante la formazione dei gameti. Nell'esperimento di prima siamo partiti dall'incrocio di due linee pure: GGWW (semi gialli e lisci) e ggww (semi verdi e rugosi); nella F1 otteniamo degli individui ibridi per due caratteri (individui diibridi) GgWw, perché le linee pure omozigoti GGWW produrranno un solo tipo di gamete (GW) e le linee pure omozigoti ggww produrranno un solo tipo di gamete (gw): incrociando queste due linee pure tra loro stiamo unendo i due tipi di gameti (GW x gw) ed è per questo che la F1 è GgWw. Un individuo eterozigote per due caratteri produce 4 tipi di gameti e la probabilità con cui produce ciascun tipo gametico è la stessa: dei quattro tipi gametici, in riferimento all'esempio, che sono GW, gw, Gw, gW, ciascuno ha il 25% di probabilità di essere prodotto, ovvero una probabilità di 1/4 (sono equiprobabili). Analizziamo quindi la meiosi di un individuo diibrido, con i geni posizionati su cromosomi differenti: le due coppie di cromosomi omologhi sono rappresentati in figura con due dimensioni differenti. Il carattere che determina il colore del seme (G) è posto su una coppia di omologhi di dimensioni maggiori rispetto a quella che porta il carattere per la forma del seme (W) che ha dimensioni minori. Poiché l'individuo è diibrido su un cromosoma porterà l'informazione di carattere dominante e sul cromosoma omologo porterà l'informazione di carattere recessivo: G su un cromosoma, g sul cromosoma omologo. Allo stesso modo l'informazione per la forma del seme sarà W su un cromosoma e w sul cromosoma omologo. Questo rappresenta il genotipo di una pianta F1 derivante dall'incrocio di due linee pure che differiscono per il genotipo. Quindi, prima che parta

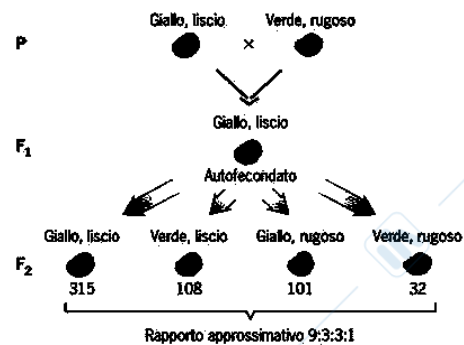


Figura 3.3 ▶ Incroci condotti da Mendel tra piante di pisello con semi gialli lisci e piante con semi verdi rugosi.

P	GG (giallo) x gg (verde)
F1	Gg (giallo)
F2	GG Gg gg
	1/4 1/2 1/4
	G- gg
	3/4 1/4
	giallo verde

P	WW (liscio) x ww (rugoso)
F1	Ww (liscio)
F2	WW Ww ww
	1/4 1/2 1/4
	W- ww
	3/4 1/4
	liscio rugoso

rispetto a quella che porta il carattere per la forma del seme (W) che ha dimensioni minori. Poiché l'individuo è diibrido su un cromosoma porterà l'informazione di carattere dominante e sul cromosoma omologo porterà l'informazione di carattere recessivo: G su un cromosoma, g sul cromosoma omologo. Allo stesso modo l'informazione per la forma del seme sarà W su un cromosoma e w sul cromosoma omologo. Questo rappresenta il genotipo di una pianta F1 derivante dall'incrocio di due linee pure che differiscono per il genotipo. Quindi, prima che parta

la meiosi, le cellule germinali dell'individuo diibrido devono replicare il DNA: ciascun cromosoma risulterà costituito da due cromatidi fratelli (GIIG; gllg; WIIW; wllw). Segue la prima divisione meiotica: gli omologhi si appaiano e poi migrano ciascuno verso poli opposti; ciò significa che se G migra verso un polo allo-

giallo, liscio	3/4 G-, 3/4 W-	9/16 è il prodotto di 3/4 x 3/4
verde, liscio	1/4 gg, 3/4 W-	3/16 è il prodotto di 1/4 x 3/4
giallo, rugoso	3/4 G-, 1/4 ww	3/16 è il prodotto di 3/4 x 1/4
verde, rugoso	1/4 gg, 1/4 ww	1/16 è il prodotto di 1/4 x 1/4

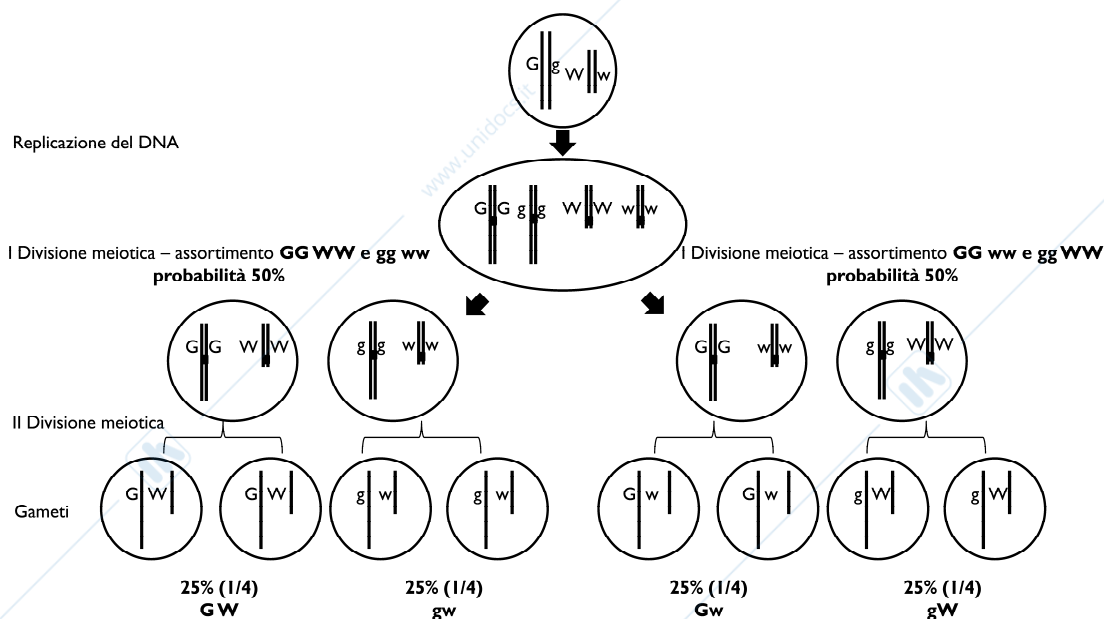
► Il Principio dell'Assortimento Indipendente

afferma che durante la formazione dei gameti gli alleli di geni differenti assortiscono (si separano gli uni dagli altri) in modo casuale, indipendentemente gli uni dagli altri.

► Vediamo praticamente cosa accade durante la meiosi....

ra g migrerà verso il polo opposto. Come si comporteranno gli altri due cromosomi? Possiamo avere due segregazioni differenti che sono equiprobabili: nell'immagine abbiamo una situazione in cui l'omologo che contiene WW va verso lo stesso polo in cui è andato l'omologo con GG, di conseguenza gg sarà andato verso lo stesso

polo di ww. Questa situazione è equiprobabile a quella in cui GG migra allo stesso polo di ww, e quindi gg migrerà allo stesso polo di WW: ciò significa che in ogni prima divisione meiotica può accadere la prima situazione o la seconda. In seconda divisione meiotica si separano i cromatidi fratelli. Poiché queste due situazioni avvengono con la stessa probabilità (o avviene una o l'altra); su cento meiosi 50 faranno una segregazione e 50 l'altra; alla fine otterremo che su 100 meiosi i prodotti meiotici saranno di 4 tipi differenti: GW gw Gw gW con la stessa probabilità (25% ciascuno, frequenza di $\frac{1}{4}$, rapporto 1:1:1:1).



o l'altra); su cento meiosi 50 faranno una segregazione e 50 l'altra; alla fine otterremo che su 100 meiosi i prodotti meiotici saranno di 4 tipi differenti: GW gw Gw gW con la stessa probabilità (25% ciascuno, frequenza di $\frac{1}{4}$, rapporto 1:1:1:1).

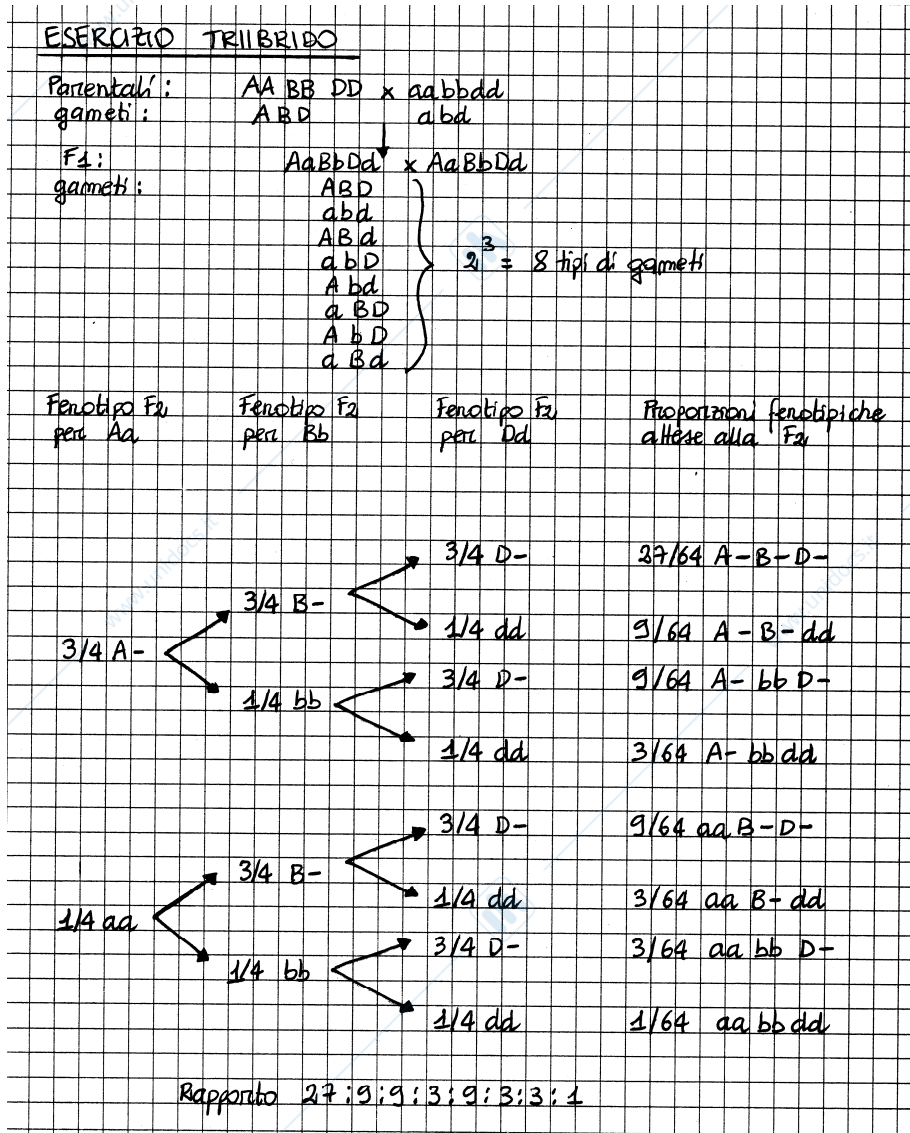
► **La regola del prodotto:** la probabilità di un evento il cui accadimento dipende da due eventi tra loro indipendenti che devono verificarsi contemporaneamente è pari al **PRODOTTO** delle singole probabilità.

► **La regola della somma:** la probabilità di un evento il cui accadimento dipende da due eventi mutualmente esclusivi è pari alla **SOMMA** delle singole probabilità.

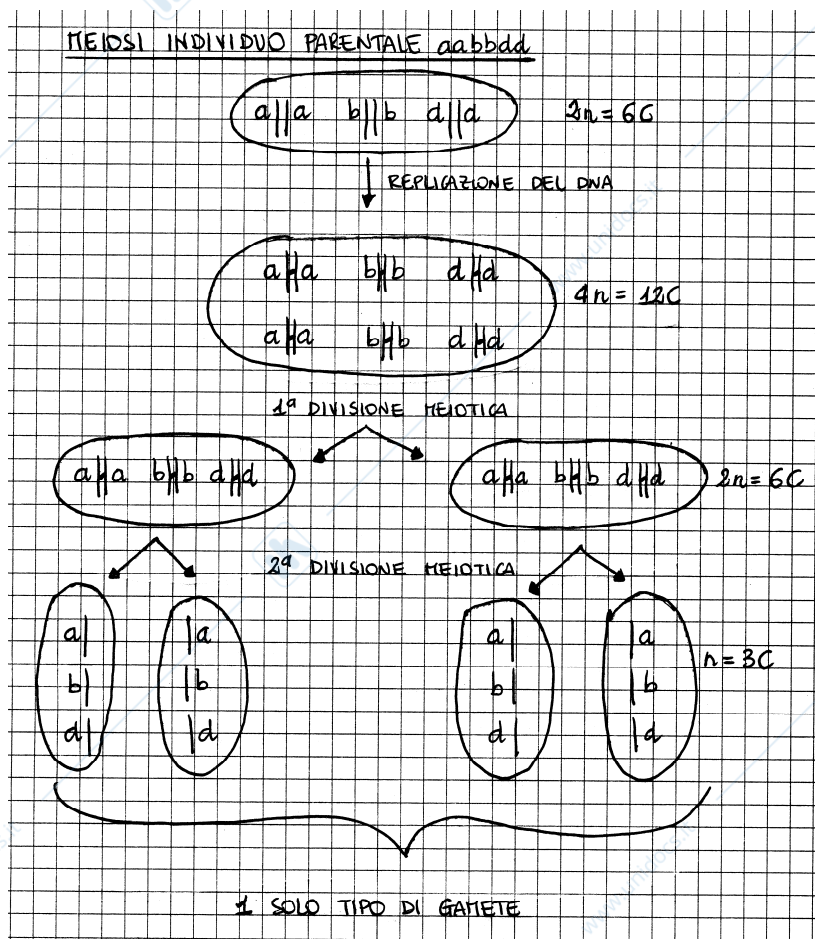
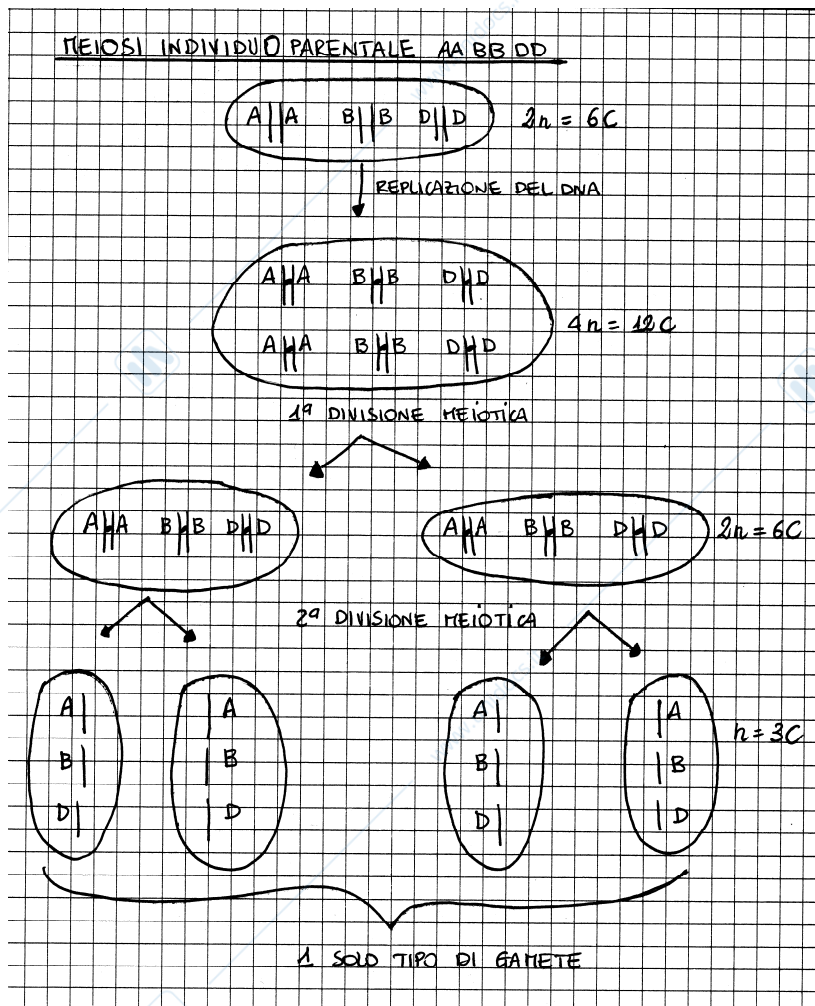
La regola del prodotto la applichiamo quando vogliamo conoscere la probabilità di un evento che si verifica nel momento in cui due eventi tra loro indipendenti, di cui conosciamo la probabilità, devono accadere contemporaneamente: è la stessa situazione che si è verificata

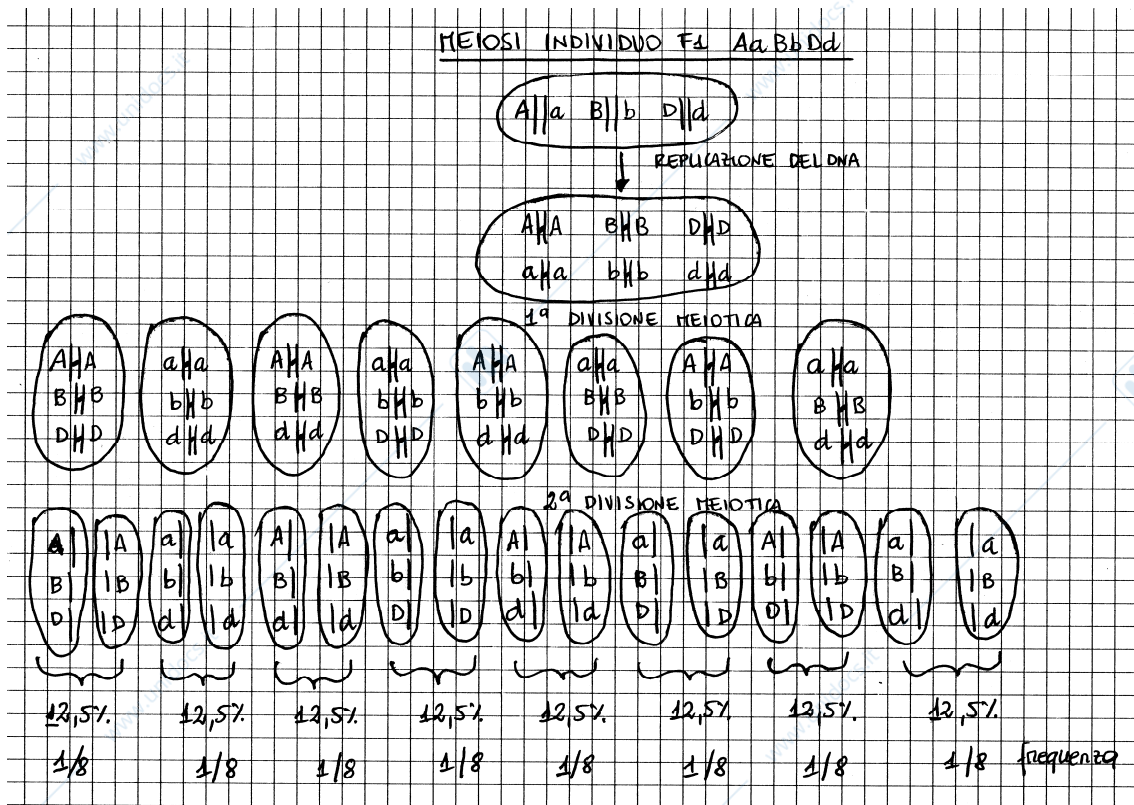
nel rapporto 9:3:3:1 (nel fenotipo dominante per entrambi i caratteri è necessaria la manifestazione del fenotipo dominante di un carattere e per l'altro carattere contemporaneamente: i due eventi tra di loro sono indipendenti e ciascuno ha probabilità $\frac{3}{4}$ di accadere, si devono verificare contemporaneamente, quindi la probabilità dell'evento finale è $\frac{3}{4}$ per $\frac{3}{4}$ = 9/16). Un'altra è la **regola della somma** che si applica quando si tratta di eventi indipendenti ma che tra loro si escludono vicendevolmente; in questo caso le probabilità dei singoli eventi si sommano. Esercizio per casa: Cosa accade se vogliamo fare gli esperimenti di Mendel considerando non uno, non due, ma ben tre caratteri? Stabiliamo quindi un incrocio tra due linee pure, una dominante

per i tre caratteri ed una recessiva per i tre caratteri, cosa ci aspettiamo alla F1 con relativa meiosi del parentale omozigote dominante e del parentale omozigote recessivo; cosa ci aspettiamo in F2 dal punto di vista fenotipico della progenie, e indichiamo quindi anche la meiosi del tribrido.



- **La regola del prodotto:** la probabilità di un evento il cui accadimento dipende da due eventi tra loro indipendenti che devono verificarsi contemporaneamente è pari al **PRODOTTO** delle singole probabilità.
- **La regola della somma:** la probabilità di un evento il cui accadimento dipende da due eventi mutualmente esclusivi è pari alla **SOMMA** delle singole probabilità.





LEZIONE 3 (10/03/2015)

DISCUSSIONE DELL'ESERCIZIO PER CASA

Partendo dalla logica mendeliana costruiamo delle linee pure, una delle quali presenta tre caratteri stabilizzati nella forma dominante (omozigoti dominanti per tre caratteri) AABBDD, l'altra linea presenta tre caratteri stabilizzati nella forma recessiva (omozigoti recessivi per i tre caratteri) aabbdd. Domanda: incrociando queste due linee pure, quanti e quali fenotipi ci aspettiamo nella F1? Ci aspettiamo una sola classe di progenie fenotipicamente dominante per tutti e tre i caratteri: quindi se stiamo considerando l'altezza della pianta (A), la consistenza del seme (B), e il colore del seme (D) ci aspetteremo figli (F1) tutta fenotipicamente dominante per i tre caratteri, e genotipicamente eterozigote (AaBbDd). Perché la F1 viene fuori tutta eterozigote? La risposta è tutta nella meiosi. Ricordiamo che ogni gamete deve necessariamente contenere l'informazione per tutti i caratteri che stiamo considerando, quindi l'informazione per l'altezza della pianta, della consistenza del seme e del colore del seme. La linea pura AABBDD parentale fa un solo tipo di gameti (ABD), l'altra linea pura aabbdd parentale fa un solo tipo di gameti (abd), questo perché sono le uniche informazioni presenti nel loro genotipo. Lo zigote che si formerà dall'unione di questi due tipi di gameti avrà genotipo AaBbDd e fenotipo ABD; che viene fuori grazie al principio della dominanza di Mendel: dall'incrocio di linee pure che portano una l'informazione dominante e l'altra quella recessiva, l'informazione che si manifesterà nell'ibrido sarà dominante, mentre quella recessiva è mascherata da quella dominante. A questo punto Mendel avrebbe costruito una F2 autofecondando le piante della F1 (metteva un cappuccio sulla pianta in modo tale da consentire l'autofecondazione e impedire la fecondazione con polline proveniente da altre piante). Il triibrido AaBbDd quanti tipi di gameti fa? Secondo il principio della segregazione indipendente, il triibrido presenta 6 tipi di alleli che vanno combinati tre a tre per un totale di 8 combinazioni (8 tipi di gameti): ABD, abd, ABd, abD, Abd, aBD, AbD, aBd. Qual è la probabilità che un individuo triibrido produca ciascuna di queste classi gametiche? Queste 8 classi gametiche hanno la stessa probabilità di essere prodotte. Quindi, nella meiosi del triibrido AaBbDd, la cellula di partenza prima della replicazione del DNA ha un contenuto di DNA di $2n=6C$. Dopo la replicazione del DNA il contenuto sarà $4n=12C$: ora i cromosomi sono costituiti da due cromatidi fratelli attaccati dal centromero (AHA; BHB; DHD; aHa, bHb; dHd). Ora i cromosomi omologhi si appaiano (i cromosomi AHA si appaieranno con i cromosomi aHa; BHB con bHb; DHD con dHd) e queste strutture di omologhi appaiati (tetradi) prendono contatto tra loro e possono scambiare pezzi di DNA tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi: crossing-over o ricombinazione. Sono visibili i chiasmi al microscopio. Avvenuto il crossing-over può avvenire la migrazione degli omologhi attraverso il contatto che i centromeri prendono con le fibre del fuso meiotico: gli omologhi migrano ai poli (se AHA migra verso un polo, aHa migrerà al polo opposto rispetto ad AHA). Ora l'omologo BHB può migrare sia verso il polo dove è migrato AHA, sia verso il polo dove è migrato aHa, sono due possibilità egualmente probabili: quando consideriamo un triibrido già in prima divisione meiotica le segregazioni di assortimento possibili sono più di 2 rispetto al diibrido, perché abbiamo considerato 3 differenti geni e quindi dobbiamo considerare tutte le possibili migrazioni alternative e poi a seconda del tipo di segregazione avvenuta, in seconda divisione meiotica si ha la segregazione dei cromatidi arrivando alla produzione di 8 tipi di gameti. Ora 8 tipi di gameti li produce la femmina, e 8 li produce il maschio, di conseguenza la progenie possibile, che viene fuori dall'autofecondazione di questo triibrido (o anche incrocio di un triibrido) dipende dal numero di geni che si trovano in eterozigoti, ed esiste una regola per calcolare il numero dei tipi gametici che possono essere prodotti: 2^n dove n è il numero di geni in eterozigosi in un determinato genotipo. Nel triibrido abbiamo 3 geni in eterozigoti, quindi $2^3=8$ tipi di gameti; in un tetraibrido abbiamo 4 geni in eterozigoti, quindi $2^4=16$ tipi di gameti. Ovviamente, poiché parliamo di geni posizionati su cromosomi diversi, la probabilità di produzione di ciascuna di queste classi gametiche sarà sempre la stessa. Ritornando al triibrido, le classi gametiche avranno tutte la stessa probabilità di essere prodotte cioè $1/8$ essendo 8 classi, oppure $12,5\%$ di frequenza, oppure il rapporto è $1:1:1:1:1:1:1:1$. E perché? Per il principio della segregazione

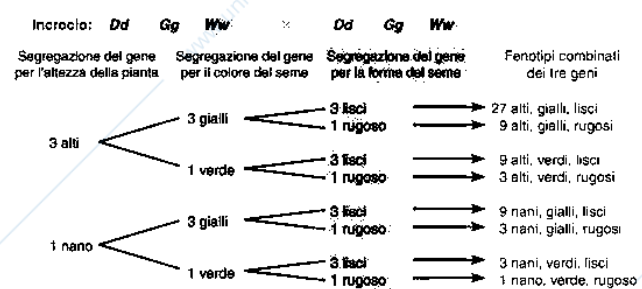
indipendente! Quindi ritornando all'esercizio del triibrido alla F1 abbiamo ottenuto progenie interamente con genotipo AaBbDd: autofecondiamo la progenie F1 (AaBbDd x AaBbDd). Quante classi fenotipiche ci aspettiamo nella progenie F2? Esattamente 8 classi fenotipiche, che in realtà possiamo dedurre dalle classi gametiche prodotte dagli individui della F1; ma la simbologia che utilizziamo si riferisce al fenotipo e al genotipo presentato da una determinata classe gametica: nella progenie avremo sicuramente una classe che sarà fenotipicamente dominante per tutti e tre i caratteri, quindi indichiamo questo fenotipo ABD, ma, per il principio della dominanza il fenotipo dominante può essere manifestato sia dal genotipo omozigote dominante AABBDD, sia dal genotipo eterozigote AaBbDd. Per questo motivo non indichiamo il secondo allele (non sapendo se si tratta di un allele dominante o recessivo) ma inseriamo un trattino per indicare l'incertezza del secondo allele: A-B-D-. con che frequenza viene fuori questo tipo di progenie? Mendel ci ha detto che i fattori per i differenti caratteri durante la meiosi non si influenzano tra di loro, ma si comportano in maniera indipendente; quindi possiamo considerare indipendentemente l'uno dall'altro questi tre caratteri e poi mettere insieme le varie probabilità. Considerando quindi un unico carattere tipo Aa x Aa, la probabilità di avere A- è di $\frac{3}{4}$, dove includiamo in questo valore la probabilità $\frac{1}{4}$ di avere progenie dominante omozigote AA e $\frac{1}{2}$ la probabilità di avere progenie eterozigote Aa: stesso discorso vale per il carattere Bb e per il carattere Dd. La regola del prodotto ci dice che se conosciamo la probabilità di accadimento di eventi fra loro indipendenti ma che si devono verificare contemporaneamente, allora possiamo conoscere la probabilità di quell'evento complessivo semplicemente moltiplicando le probabilità dei singoli eventi; quindi moltiplichiamo $\frac{3}{4}$ (probabilità A-) x $\frac{3}{4}$ (probabilità B-) x $\frac{3}{4}$ (probabilità D-) = $\frac{27}{64}$ di frequenza incrociando due triibridi. Osserviamo anche classi fenotipiche che mostrano due caratteri dominanti e uno recessivo: usando sempre la regola del prodotto A-B-dd, avremo $\frac{3}{4}$ (probabilità A-) x $\frac{3}{4}$ (probabilità B-) x $\frac{1}{4}$ (probabilità dd) = $\frac{9}{64}$ di frequenza incrociando due triibridi. E così procediamo per le altre classi fenotipiche. Possiamo fare anche delle previsioni **genotipiche**: i differenti genotipi possibili sono parecchi facendo un incrocio tra triibridi. Se volessimo conoscere la probabilità che da questo incrocio venga fuori un figlio genotipicamente eterozigote per tutti e tre i caratteri (AaBbDd) utilizziamo sempre la regola del prodotto: quindi, ragionando con un carattere per volta (da Aa x Aa la probabilità di avere un figlio Aa è $\frac{1}{2}$) moltiplichiamo il valore per le probabilità degli altri caratteri (Bb x Bb = $\frac{1}{2}$ probabilità di avere un figlio Bb; Dd x Dd = $\frac{1}{2}$ probabilità di avere un figlio Dd) = $\frac{1}{2}$ Aa x $\frac{1}{2}$ Bb x $\frac{1}{2}$ Dd = $\frac{1}{8}$ di probabilità di avere un figlio con genotipo AaBbDd. Un altro metodo utilizzato è quello della biforcazione, che ci aiuta a ricavare tutti i fenotipi: nell'esempio in figura abbiamo un incrocio tra due triibridi (DdGgWw x DdGgWw). Scomponiamo sempre l'incrocio in tre incroci monoibridi (Dd x Dd; Gg x Gg; Ww x Ww).

Rispetto all'incrocio Dd x Dd ci aspettiamo $\frac{3}{4}$ di progenie fenotipicamente dominante e $\frac{1}{4}$ di progenie fenotipicamente recessiva: quindi $\frac{3}{4}$ D- e $\frac{1}{4}$ dd. Ciascuno di questi fenotipi dominanti per il primo carattere D- potrà segregare con fenotipo giallo o verde (fenotipo dominante G- per il secondo carattere e fenotipo recessivo gg per il secondo carattere), allo stesso modo il fenotipo recessivo dd per il primo carattere potrà segregare con $\frac{3}{4}$ di fenotipo giallo G- e con $\frac{1}{4}$ di fenotipo verde gg, e ciascuna di queste combinazioni potrà segregare con $\frac{3}{4}$ di fenotipo liscio

Ww x Ww). Rispetto all'incrocio Dd x Dd ci aspettiamo $\frac{3}{4}$ di progenie fenotipicamente dominante e $\frac{1}{4}$ di progenie fenotipicamente recessiva: quindi $\frac{3}{4}$ D- e $\frac{1}{4}$ dd. Ciascuno di questi fenotipi dominanti per il primo carattere D- potrà segregare con fenotipo giallo o verde (fenotipo dominante G- per il secondo carattere e fenotipo recessivo gg per il secondo carattere), allo stesso modo il fenotipo recessivo dd per il primo carattere potrà segregare con $\frac{3}{4}$ di fenotipo giallo G- e con $\frac{1}{4}$ di fenotipo verde gg, e ciascuna di queste combinazioni potrà segregare con $\frac{3}{4}$ di fenotipo liscio

Figura 3.6 Il metodo della biforcazione per prevedere il risultato di un incrocio che coinvolga tre geni ad assortimento indipendente nelle piante di pisello.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES



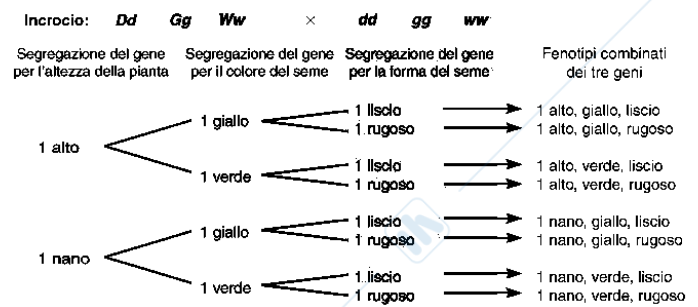
W- e con $\frac{1}{4}$ di fenotipo rugoso ww. Quindi per ciascun punto ci sarà una biforcazione che ci porterà alla costituzione del fenotipo. Nell'altra immagine vediamo rappresentato un incrocio tra un tribrido (DdGgWw) e un triplo omozigote recessivo (ddggww):

questo tipo di incrocio si chiama reincrocio, o incrocio di prova o anche test-cross; perché incrociare un individuo di qualsivoglia fenotipo o genotipo ignoto con un omozigote recessivo (che fornisce un solo tipo di gamete dgw) produrrà una progenie che rifletterà in maniera precisa le meiosi dell'individuo con genotipo ignoto e quindi sull'analisi dei numeri della progenie possiamo risalire al genotipo. In questa immagine però conosciamo il genotipo che viene reincrociato con l'omozigote recessivo; quindi le classi fenotipiche attese nella progenie sono sempre le stesse che abbiamo osservato nell'incrocio tra due tribridi, ma osserviamo un rapporto fenotipico che riflette la meiosi del tribrido, cioè le 8 classi fenotipiche saranno equiprobabili, avranno tutte la stessa probabilità di essere prodotte (ciascuna $\frac{1}{8}$ o 12,5%); l'omozigote recessivo invece produrrà un solo tipo gametico (dgw) e quindi andrà a fecondare uno degli 8 tipi equiprobabili di gameti differenti prodotti dal tribrido, generando una progenie costituita da 8 possibili classi fenotipiche, ciascuna con la stessa probabilità di tutte le altre di essere prodotta. Quindi facendo un incrocio Dd x dd ci aspettiamo metà progenie Dd, quindi fenotipicamente dominante, e metà progenie dd fenotipicamente recessiva; e ciascuno di questi fenotipi può segregare con giallo e verde sempre equiprobabili tra loro, quindi alto può segregare con giallo e verde, nano può segregare con giallo e verde, e ciascuna di queste combinazioni può segregare con liscio e rugoso che sono due alternative equiprobabili tra loro. Quindi otteniamo $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{8}$ di probabilità di ottenere ciascuno degli otto fenotipi possibili.

Figura 3.7 Il metodo della biforcazione per prevedere il risultato di un reincrocio che coinvolga tre geni ad assortimento indipendente nelle piante di pisello.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES







Questo tipo di incrocio si chiama reincrocio, o incrocio di prova o anche test-cross; perché incrociare un individuo di qualsivoglia fenotipo o genotipo ignoto con un omozigote recessivo (che fornisce un solo tipo di gamete dgw) produrrà una progenie che rifletterà in maniera precisa le meiosi dell'individuo con genotipo ignoto e quindi sull'analisi dei numeri della progenie possiamo risalire al genotipo. In questa immagine però conosciamo il genotipo che viene reincrociato con l'omozigote recessivo; quindi le classi fenotipiche attese nella progenie sono sempre le stesse che abbiamo osservato nell'incrocio tra due tribridi, ma osserviamo un rapporto fenotipico che riflette la meiosi del tribrido, cioè le 8 classi fenotipiche saranno equiprobabili, avranno tutte la stessa probabilità di essere prodotte (ciascuna $\frac{1}{8}$ o 12,5%); l'omozigote recessivo invece produrrà un solo tipo gametico (dgw) e quindi andrà a fecondare uno degli 8 tipi equiprobabili di gameti differenti prodotti dal tribrido, generando una progenie costituita da 8 possibili classi fenotipiche, ciascuna con la stessa probabilità di tutte le altre di essere prodotta. Quindi facendo un incrocio Dd x dd ci aspettiamo metà progenie Dd, quindi fenotipicamente dominante, e metà progenie dd fenotipicamente recessiva; e ciascuno di questi fenotipi può segregare con giallo e verde sempre equiprobabili tra loro, quindi alto può segregare con giallo e verde, nano può segregare con giallo e verde, e ciascuna di queste combinazioni può segregare con liscio e rugoso che sono due alternative equiprobabili tra loro. Quindi otteniamo $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{8}$ di probabilità di ottenere ciascuno degli otto fenotipi possibili.

Le previsioni, gli osservati e gli attesi:

Il test del Chi-quadro. Alcuni esempi.

Quando abbiamo descritto gli esperimenti di Mendel, abbiamo accettato in maniera passiva che i numeri osservati da Mendel nella progenie F2 erano all'incirca in un rapporto 3:1, allo stesso modo nel caso del diibrido il rapporto 9:3:3:1 osservato nella F2. Proprio nell'analisi dell'incrocio di due diibridi, i 315 giallo-liscio osservati alla F2 rappresentano più o meno i $\frac{9}{16}$ dell'intera progenie di 556: il problema è questo più o meno perché non è un rapporto numericamente esatto, e c'è bisogno di stabilire un range entro il quale i valori osservati che si discostano dal numero atteso, siano statisticamente insignificanti e oltre il quale invece siano da considerare significativi. Facciamo un esempio osservando i numeri osservati nella progenie ottenuto dall'incrocio tra due diibridi: utilizzando i caratteri Mendeliani colore del seme e forma del seme, autofecondando la F1 fenotipicamente gialla e liscia, ottenuta dall'incrocio di due linee parentali pure, si ottengono nella progenie quattro classi fenotipiche differenti con una distribuzione di 315 piante con seme giallo e liscio, 108 verde e liscio, 101 giallo e rugoso, 32 verde e rugoso; su un totale di

556 piante. Abbiamo detto che ipotizziamo che questi numeri siano in un rapporto 9:3:3:1, ma quale sarebbe la reale distribuzione numerica se questo fosse un esatto rapporto 9:3:3:1? Su 556 piante per avere un rapporto esatto 9:3:3:1 quante piante dovrebbero avere seme giallo e liscio, verde e liscio, giallo e rugoso, verde e rugoso?

Fenotipo F ₂		Numero osservato	Numero atteso	$\frac{(\text{Osservato} - \text{Atteso})^2}{\text{Atteso}}$
Incrocio tra diibridi di Mendel	Giallo, liscio 	315	313	0,01
	Verde, liscio 	108	104	0,15
	Giallo, rugoso 	101	104	0,09
	Verde, rugoso 	32	35	0,26
Totale:		556	556	0,51 = χ^2

Possiamo calcolarlo in maniera molto semplice perché conosciamo il totale delle piante ottenute (556) e ci calcoliamo i 9/16 di 556 (312,75); i 3/16 di 556 (104,25); 1/16 di 556 (34,75). Questi numeri rap-

presentano i valori attesi da un rapporto 9:3:3:1. Esiste un test statistico che ci consente di confrontare i valori osservati e quelli attesi e stabilire la significatività degli scostamenti che osserviamo, ed è il test del Chi-quadro. Il Chi-quadro è la sommatoria del quadrato della differenza degli osservati meno gli attesi fratto gli attesi; quindi se volessimo applicare questo test ai numeri che abbiamo osservato nel diibrido, dovremmo calcolare $\left\{ \frac{(315-313)^2}{313} + \frac{(108-104)^2}{104} + \frac{(101-104)^2}{104} + \frac{(32-35)^2}{35} \right\}$, in questo modo otteniamo un valore del Chi-quadro pari a 0,51. Ora dobbiamo fare riferimento alla tabella dei valori critici del Chi-quadro.

Nell'esempio abbiamo a che fare con 4 classi fenotipiche differenti, e in questo sistema ci sono 3 gradi di libertà: questi gradi di libertà rappresentano il numero di variabili che bisogna conoscere in un sistema, per comprendere tutte le variabili del sistema. In questo caso siamo capaci di conoscere i valori di tutte le variabili del sistema solo se ne conosciamo almeno tre, dalle quali possiamo poi ricavarci la quarta. Generalmente il numero di gradi di libertà è ottenuto dal numero di classi che stiamo considerando, meno uno. Nel nostro esempio allora dobbiamo fare riferimento alla riga dei 3 gradi di libertà presenti nella tabella: all'interno di questa tabella è rappresentato il valore critico al 5%, che significa che, se il valore del chi quadro che abbiamo trovato per quel grado di libertà supera il valore critico, dobbiamo rifiutare l'ipotesi che abbiamo fatto; ovvero, lo scostamento tra i dati osservati e quelli attesi è troppo grande e quindi statisticamente significativo, e quindi rifiutare che sia un rapporto 9:3:3:1.

Formula del chi-quadro statistico per saggiare l'accordo tra i numeri osservati e quelli attesi:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Osservato} - \text{Atteso})^2}{\text{Atteso}}$$

Nel nostro esempio il valore 0,51 è molto inferiore rispetto al valore critico per 3 gradi di libertà che è maggiore di 7; quindi siamo certi che gli scostamenti che abbiamo ottenuto tra i dati osservati e quelli attesi siano degli scostamenti casuali, non statisticamente significativi e quindi quello che stiamo osservando è un reale rapporto 9:3:3:1. In altre parole abbiamo una probabilità inferiore al 5% che gli scostamenti osservati nel nostro caso siano statisticamente significativi. Riassumendo: Nel nostro esercizio

► TABELLA 3.2	
Tabella dei valori critici di chi-quadro (χ^2) al 5% ^a	
Gradi di libertà	Valore critico al 5%
1	3,841
2	5,991
3	7,815
4	9,488
5	11,070
6	12,592
7	14,067
8	15,507
9	16,919
10	18,307
15	24,996
20	31,410
25	37,652
30	43,773

^aDa R. A. Fisher and Yates, 1943, *Statistical Table for Biological, Agricultural, and Medical Research*. Oliver and Boyd, London.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

calcoliamo il valore del Chi-quadro; poi calcoliamo i gradi di libertà del sistema: poiché abbiamo a che fare con 4 classi fenotipiche il numero di gradi di libertà corrisponderà a numero di classi fenotipiche -1, quindi 3 gradi di libertà; che poi corrispondono al numero di variabili del sistema

che bisogna conoscere per poter comprendere tutte e quattro le variabili. Abbiamo stabilito in maniera certa che i numeri osservati sono realmente in un rapporto 9:3:3:1. Se il valore di Chi-quadro fosse stato superiore al valore critico avremmo dovuto rifiutare l'ipotesi del rapporto 9:3:3:1. Nell'altro esercizio in figura, abbiamo 3 genotipi indicati: il primo è Rr Yy, un genotipo di un individuo diibrido; il secondo è Aa Bb CC Dd, il terzo è Mm Nn Oo PP QQ Rr ss Tt Bb. Quanti tipi di gameti differenti sono prodotti da genotipi?

Il primo è semplice: 4 tipi di gameti differenti; il secondo non è un tetraibrido perché anche se stiamo considerando 4 geni, ma il termine ibrido fa riferimento al numero

di geni in eterozigoti, quindi solo 3 sono in eterozigoti, quindi è un triibrido che può produrre 8 tipi di gameti; il terzo genotipo è un esaibrido e può produrre 2^6 tipi di gameti.

- ▶ Rr Yy
- ▶ Aa Bb CC Dd
- ▶ Mm Nn Oo PP QQ Rr ss Tt Bb

N.B. numero di tipi gametici = 2^n (n corrisponde al numero di coppie alleliche in eterozigosi)

Risposta

- ▶ Rr Yy
 - ▶ $2^n = 2^2 = 4$ tipi di gameti
 - ▶ RY Ry rY ry
- ▶ Aa Bb CC Dd
 - ▶ $2^n = 2^3 = 8$ tipi di gameti
 - ▶ ABCD ABCd AbCD AbCd
 - ▶ abCd abCD aBCd aBCD
- ▶ Mm Nn Oo PP QQ Rr ss Tt Bb
 - ▶ $2^n = 2^6 = 64$ tipi di gameti

Problema 1

- ▶ La sensibilità al gusto amaro della feniltiocarbammide (PTC) nell'uomo è determinata da un singolo gene biallelico la cui forma allelica dominante (T) conferisce la sensibilità e quella recessiva (t) l'insensibilità. Supponiamo che due individui sensibili eterozigoti Tt si sposino.
 - ▶ A) Quali sono le frequenze attese di figli sensibili e non sensibili?
 - ▶ B) Qual è la probabilità che il loro primo figlio sia sensibile? E che il loro quarto figlio sia sensibile?
 - ▶ C) Qual è la probabilità che i loro primi tre figli non siano sensibili?

Soluzione 1

- ▶ A) Quali sono le frequenze attese di figli sensibili e non sensibili?
 - ▶ Tt x Tt (Parentali)
 - ▶ TT (1/4) Tt (1/2) tt (1/4) (Rapporti genotipici)
 - ▶ T- = $\frac{1}{4} + \frac{1}{2} = \frac{3}{4}$ (sensibili) tt $\frac{1}{4}$ (non sensibili)
- ▶ B) Qual è la probabilità che il loro primo figlio sia sensibile? E che il loro quarto figlio sia sensibile?
 - ▶ $\frac{3}{4}$ è la probabilità che il loro primo figlio sia sensibile.
 - ▶ $\frac{3}{4}$ è la probabilità che il loro quarto figlio sia sensibile (ogni nascita è un evento indipendente)
- ▶ C) Qual è la probabilità che i loro primi tre figli non siano sensibili?
 - ▶ $\frac{1}{4}$ (tt) x $\frac{1}{4}$ (tt) x $\frac{1}{4}$ (tt) = $\frac{1}{64}$

Problema 2

- ▶ Immaginiamo un incrocio tra due piante con genotipo AaBbDdEeFf.
- ▶ A) Qual è la probabilità che generino un figlio con fenotipo dominante per i cinque geni?
- ▶ B) Qual è la probabilità che generino un figlio con genotipo AABbDDeeFf?

Soluzione 2

- ▶ A) Qual è la probabilità che generino un figlio con fenotipo dominante per i cinque geni?
 - ▶ $\frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4} = 243/1024$
- ▶ B) Qual è la probabilità che generino un figlio con genotipo AABbDDeeFf?
 - ▶ $\frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{2} = 1/256$

Problema 3

- ▶ Una linea pura di piante con fiore rosso e foglie allungate viene incrociata con una linea pura a fiore bianco e foglie tonde. La F1 è costituita da tutte piante a fiore rosso e foglie allungate. Autofecondando gli individui della F1 si ottengono 381 piante, così distribuite:

216 Fiore rosso, foglie lunghe
 79 Fiore rosso, foglie tonde
 65 Fiore bianco, foglie lunghe
 21 Fiore bianco, foglie tonde

Proponi una spiegazione genetica di questi risultati e verificala statisticamente.

Soluzione 3

- ▶ Parentali RR LL (fiore rosso, foglia allungata) x rr ll (fiore bianco, foglia tonda)
- ▶ F1 Rr Ll (fiore rosso, foglia allungata)
- ▶ F2

R- L-	(fiore rosso, foglia allungata)	9/16
R- ll	(fiore rosso, foglia tonda)	3/16
rr L-	(fiore bianco, foglia allungata)	3/16
rr ll	(fiore bianco, foglia tonda)	1/16

- ▶ Calcolo osservati e attesi

Fenotipo	Osservati	Attesi	(O-A) ² /A
fiore rosso, foglia allungata	216	$381 \times 9/16 = 214$	$(216-214)^2/214=0,019$
fiore rosso, foglia tonda	79	$381 \times 3/16 = 71$	$(79-71)^2/71=0,901$
fiore bianco, foglia allungata	65	$381 \times 3/16 = 71$	$(65-71)^2/71=0,507$
fiore bianco, foglia tonda	21	$381 \times 1/16 = 24$	$(21-24)^2/24=0,375$
totale	381	381	1,80 (Chi-quadro)
gradi di libertà			3

LEZIONE 4 (13/03/2015)

La teoria cromosomica dell'ereditarietà

I caratteri legati al sesso

Abbiamo in qualche modo dato per scontato che i fattori di Mendel (quelli che noi chiamiamo geni) si trovano sui cromosomi perché durante lo studio del mendelismo abbiamo in parallelo osservato come si comportano i geni durante la produzione dei gameti (meiosi). All'inizio del 1900, durante la rivalutazione del lavoro di Mendel, venne formulata la **teoria cromosomica dell'ereditarietà**, secondo a quale, i fattori di cui aveva parlato Mendel si trovano sui cromosomi. Ma non basta solo formulare una teoria affinché essa abbia un valore scientifico, è necessaria una dimostrazione. La dimostrazione di tale teoria si è avuta nel 1910 grazie al lavoro di due scienziati, **Morgan e Bridges**, i quali lavoravano con **Drosophila**, e da questo momento questo moscerino diventa l'organismo modello per la genetica e per lungo tempo è stato il principale organismo modello. Gli esperimenti di Morgan e Bridges sono importanti perché, se è vero che i geni si trovano sui cromosomi, la segregazione di geni che si trovano su cromosomi particolari deve seguire esattamente la segregazione di quei cromosomi particolari, e allo stesso tempo, se avviene una segregazione anomala durante la meiosi, allo stesso modo si deve verificare una segregazione anomala dei geni che stanno su quei cromosomi. Negli esperimenti di Bridges, in entrambi i casi l'organismo modello è rappresentato da Drosophila e in entrambi i casi i cromosomi presi in considerazione sono i cromosomi sessuali di Drosophila. Nell'esperimento di Morgan veniva fatto

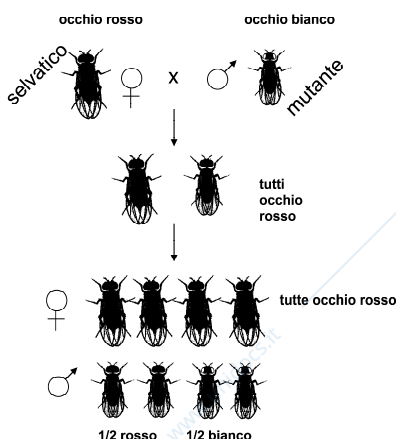
La teoria cromosomica dell'ereditarietà dei caratteri—

I fattori che determinano i caratteri sono localizzati sui cromosomi
(Walter Sutton, Theodor Boveri, 1902-1903)

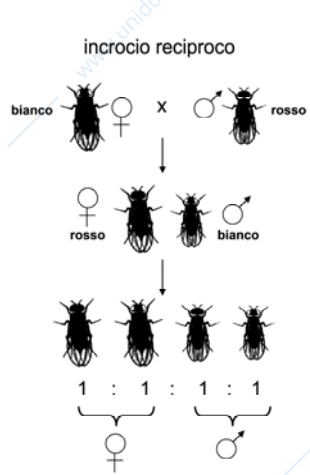
Dimostrazione—

1. La trasmissione di specifici caratteri deve essere identica alla trasmissione di specifici cromosomi
Thomas Hunt Morgan, 1910
2. L'alterazione della segregazione di specifici cromosomi deve alterare la trasmissione di specifici caratteri
Calvin Bridges

Esperimenti di Morgan: il colore dell'occhio di *Drosophila* un **incrocio** tra linee pure di *Drosophila* con colore dell'occhio differente: abbiamo visto che il colore dell'occhio selvatico di *Drosophila* è rosso e questo colore è dominante rispetto al colore occhio bianco, che viene definito mutante. In questo incrocio Morgan prendeva delle linee pure di femmine di *Drosophila* con occhio selvatico rosso (il simbolo di Venere indica la femmina, quello di Marte il maschio) e le incrociava con linee pure di maschi mutanti con occhio bianco. La progenie che veniva fuori da questo incrocio aveva occhi rossi e questo dimostra che il colore dell'occhio selvatico rosso è dominante sul colore bianco mutato. Incrociando tra loro le femmine e i maschi della prima generazione filiale F1, si otteneva alla F2 una progenie costituita da **femmine** tutte con occhi rossi e **maschi** che per metà avevano occhi rossi e per metà occhi bianchi. Quindi siamo già di fronte ad un risultato un po' strano perché nel sesso femminile della progenie F2 non compare il carattere recessivo che dovrebbe



ricomparire, ma compare nei maschi e viene fuori nel 50% dei maschi, mentre l'altro 50% ha occhi rossi. Morgan effettuò un **incrocio reciproco**, costruì quindi una linea pura di femmine con occhio bianco mutato e lo incrociò con una linea pura di maschi con occhio rosso selvatico. Quale fu il risultato? Già in prima generazione F1 notò un risultato differente dall'incrocio precedente, e cioè, in prima generazione questa volta venivano fuori tutte femmine con occhio rosso e tutti maschi con occhio bianco. Questo tipo di comportamento è la **prima eccezione ai principi di Mendel** che incontriamo. In sostanza non è poi un'eccezione, perché la logica proposta da Mendel viene comunque rispettata. Qual è l'eccezione? La **non equivalenza dell'incrocio reciproco**. A questo punto Morgan si costruì una F2 incrociando gli individui della F1, e otteneva una progenie costituita da femmine sia con occhio selvatico che con occhio mutato e maschi sia con occhio selvatico che occhio mutato esattamente nelle stesse proporzioni, ovvero; otteneva il 50% di femmine con occhio rosso e 50% di femmine con occhio bianco; e 50% di maschi con occhio rosso e 50% di maschi con occhio bianco: una progenie in cui il colore dell'occhio era rappresentato al 50% come selvatico e al 50% come mutato. Perché questi due incroci reciproci tra loro non danno lo stesso risultato? Quale può essere la causa che determina l'eccezione? L'**ipotesi** di Morgan fu che il fattore che determina il colore dell'occhio in *Drosophila* è posizionato su dei cromosomi particolari: questa ipotesi fu proposta da Morgan sulla base della



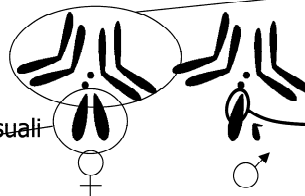
teoria cromosomica dell'ereditarietà, secondo cui i fattori sono localizzati sui cromosomi. Nell'immagine notiamo il cariotipo di una *Drosophila* femmina e una *Drosophila* maschio: *Drosophila* ha un cariotipo di $2n=8$, cioè ha 4 coppie di cromosomi, ma queste 4 coppie di cromosomi sono suddivise in 3 coppie di autosomi e una coppia di cromosomi sessuali, che nel sesso maschile e nel sesso femminile sono diverse. Le femmine hanno due cromosomi sessuali uguali tra loro, che noi chiamiamo cromosomi X, per cui esse sono XX; i maschi hanno invece una particolarità, ovvero il cromosoma X nel maschio ha un omologo, ma questo non è uguale per morfologia e dimensioni al cromosoma X per cui si chiama cromosoma Y: i maschi sono carilogicamente XY. Cosa comporta il fatto che il cromosoma X e quello Y siano diversi? La maggior parte dei geni che si trovano sul cromosoma X non si trovano sul cromosoma Y, quindi i maschi (XY) per i geni presenti sul cromosoma X vengono definiti **emizigoti** perché, anziché avere due copie alleliche per un determinato gene presente sul cromosoma X ne avranno solo una, a causa dell'assenza dell'altro cromosoma X. In realtà non è del tutto vero che i geni presenti sul cromosoma X siano assenti sul cromosoma Y, perché ci sono delle regioni che vengono chiamate **pseudoautosomiche**, che sono comuni al cromosoma X e al cromosoma Y, per le quali viene rispettata la condizione di diploidia. Ora analizziamo i geni presenti sul cromosoma X e assenti su quello Y. Una femmina (XX) avrà due copie alleliche per un gene posto sul cromosoma X, rispettivamente un allele su un cromosoma X e l'altro allele sull'altro cromosoma X; un maschio avrà solo un cromosoma X e quindi solo una copia all'elica per un certo gene. L'ipotesi di Morgan fu che, il

L'ipotesi di Morgan...

Se il gene per il colore dell'occhio si trova sul cromosoma X:

- Le femmine dovrebbero averne due copie
- I maschi dovrebbero averne solo una copia—**emizigoti** per il gene del colore dell'occhio, se l'allele recessivo è presente viene espresso

cromosomi di *Drosophila*



cromosomi sessuali

questi geni non saranno presenti sul cromosoma Y

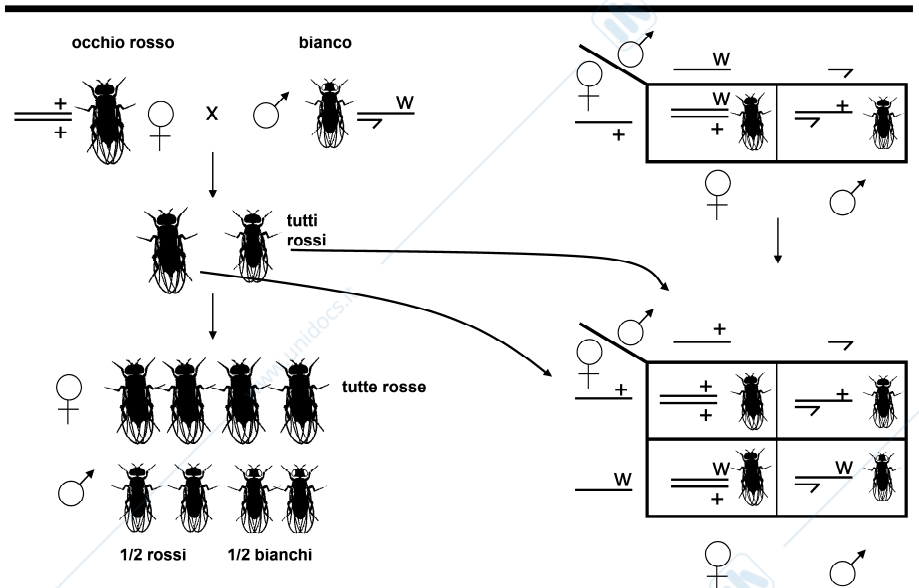
w^+ (o solo "+") = allele per il colore normale, selvatico, rosso $\text{---} + \text{---} = X^+$
 w = allele recessivo per il fenotipo occhio bianco $\text{---} w \text{---} = X^w$
 $\text{---} \text{---} \text{---} \rightarrow = Y$

il cromosoma X nel maschio ha un omologo, ma questo non è uguale per morfologia e dimensioni al cromosoma X per cui si chiama cromosoma Y: i maschi sono carilogicamente XY. Cosa comporta il fatto che il cromosoma X e quello Y siano diversi? La maggior parte dei geni che si trovano sul cromosoma X non si trovano sul cromosoma Y, quindi i maschi (XY) per i geni presenti sul cromosoma X vengono definiti **emizigoti** perché, anziché avere due copie alleliche per un determinato gene presente sul cromosoma X ne avranno solo una, a causa dell'assenza dell'altro cromosoma X. In realtà non è del tutto vero che i geni presenti sul cromosoma X siano assenti sul cromosoma Y, perché ci sono delle regioni che vengono chiamate **pseudoautosomiche**, che sono comuni al cromosoma X e al cromosoma Y, per le quali viene rispettata la condizione di diploidia. Ora analizziamo i geni presenti sul cromosoma X e assenti su quello Y. Una femmina (XX) avrà due copie alleliche per un gene posto sul cromosoma X, rispettivamente un allele su un cromosoma X e l'altro allele sull'altro cromosoma X; un maschio avrà solo un cromosoma X e quindi solo una copia all'elica per un certo gene. L'ipotesi di Morgan fu che, il

fattore che determina il colore dell'occhio in *Drosophila* (il gene) è localizzato proprio sul cromosoma X. Poiché in inglese "bianco" si dice "white", l'iniziale del fenotipo mutante (w) viene utilizzata per indicare il gene che determina il colore bianco; per indicare la forma selvatica dominante (rosso) si utilizza la simbologia w^+ , o anche solo +. Se volessimo schematizzare un cromosoma X sul quale è presente un allele selvatico disegneremmo un cromosoma e collochiamo il simbolo + sopra; se volessimo schematizzare un cromosoma X con l'allele mutante, disegneremmo un cromosoma e collochiamo su di esso il simbolo w; se volessimo rappresentare un cromosoma Y disegneremmo un cromosoma più corto di quello X con una codina.

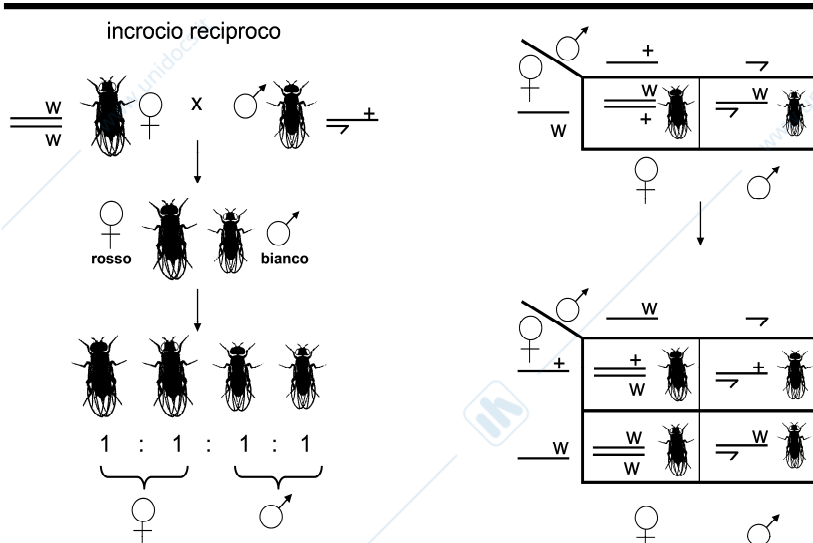
Nel **primo incrocio di Morgan** avevamo una linea pura di femmine con occhio rosso: linea pura perché si tratta di individui con genotipo omozigote per quel carattere, quindi queste femmine prese da Morgan per fare l'incrocio, secondo la sua ipotesi, dovrebbero avere su ciascun cromosoma X l'allele selvatico. Queste femmine erano incrociate con maschi aventi occhio bianco: per avere il colore dell'occhio bianco, questi maschi dovevano avere l'allele recessivo w sul cromosoma X e non sull'altro cromosoma sessuale (Y). Quindi questi maschi sono **emizigoti** per il gene w e ovviamente manifestano il fenotipo determinato da quell'unico allele che presentano: hanno quindi fenotipo occhio bianco perché hanno un unico allele per il colore dell'occhio, oltretutto recessivo. Per capire cosa accadeva alla F1, costruiamo un quadrato di Punnett (già presente dell'immagine) utilizzando i gameti prodotti dalla femmina e i gameti prodotti dal maschio. La femmina produrrà un solo tipo di gamete in quanto è omozigote per l'allele selvatico, ovvero un gamete che contiene un cromosoma X con l'allele selvatico. Il maschio produrrà due tipi di gameti: il 50% dei gameti conterranno il cromosoma X e il 50% conterranno il cromosoma Y (X ed Y sono cromosomi omologhi e quindi durante la meiosi si comportano come cromosomi omologhi, ovvero in prima divisione meiotica il cromosoma X duplicato sotto forma di due cromatidi fratelli migra verso un polo, e il cromosoma Y duplicato sotto forma di due cromatidi fratelli migra verso il polo opposto a quello dove è migrato X; di conseguenza dalla seconda divisione meiotica verranno fuori due gameti che contengono il cromosoma X e due gameti che contengono il cromosoma Y). Nei gameti del maschio che contengono il cromosoma X, questo cromosoma porta l'allele recessivo w, perché è l'unico allele per il colore dell'occhio presente in questi maschi che hanno occhio bianco. Ora se una cellula uovo di *Drosophila* viene fecondata da uno spermatozoo che contiene il cromosoma X si formerà una femmina eterozigote, con occhio selvatico rosso; se invece una cellula uovo viene fecondata da uno spermatozoo che contiene il cromosoma Y si formerà un maschio con occhi rossi (selvatico): il maschio riceve quindi il suo cromosoma X dalla madre, che è l'unico genitore che possiede un cromosoma X che può donare; perché l'altro genitore per forza deve dargli la Y altrimenti non sarebbe maschio. Le femmine ricevono invece un cromosoma X dal padre e un cromosoma X dalla madre. Quindi ci siamo spiegati fino a questo punto con l'ipotesi di Morgan i risultati ottenuti, cioè tutti i figli con occhi rossi sia maschi che femmine. Nel momento in cui andiamo ad incrociare tra loro gli individui della F1, dobbiamo tenere presente che la femmina (della F1) è eterozigote per il gene del colore dell'occhio, quindi avrà un cromosoma X con l'allele selvatico e un cromosoma X con l'allele mutato, quindi, quanti tipi di gameti farà questa femmina? Due tipi; il

Spiegazione del primo incrocio di Morgan



50% di essi conterrà il cromosoma X con l'allele selvatico, il 50% il cromosoma X con l'allele mutato. Il maschio della F1, quanti tipi di gameti farà? Sempre 2 tipi, il 50% di essi conterranno il cromosoma X (con l'allele selvatico perché portano occhio selvatico) e il 50% conterranno il cromosoma Y, senza alcun allele. Ricostruendo un altro quadrato di Punnett in cui siano presenti i due tipi di gameti sia della femmina che del maschio ed effettuando l'incrocio, possono venire fuori femmine omozigoti dominanti (per l'allele selvatico) se lo spermatozoo prodotto dal maschio contiene il cromosoma X va a fecondare la cellula uovo contenente il cromosoma X con l'allele selvatico; oppure questo stesso tipo di spermatozoo può fecondare una cellula uovo che contiene il cromosoma X con l'allele mutato e quindi viene fuori una femmina con genotipo eterozigote (ma con fenotipo rosso perché l'allele selvatico è dominante su quello mutato). Uno spermatozoo contenente un cromosoma Y che feconda una cellula uovo contenente un cromosoma X con allele mutato darà una progenie di maschi con fenotipo mutato (occhio bianco); uno spermatozoo contenente un cromosoma Y che feconda una cellula uovo contenente un cromosoma X con l'allele selvatico darà una progenie di maschi con fenotipo selvatico (occhio rosso).

Spiegazione dell'incrocio reciproco



tico + sul suo unico cromosoma X. I gameti prodotti da questa femmina saranno di un solo tipo (X^w), mentre quelli prodotti dal maschio saranno di due tipi (X^+) e (Y). Dall'unione di questi gameti otteniamo femmine eterozigoti con occhio rosso (X^+X^w) e maschi emizigoti per l'allele recessivo con occhi bianchi (X^wY). Incrociando tra loro questi individui cosa avremo nella F2? Le femmine eterozigoti della F1 produrranno due tipi di gameti, il 50% X^w e il 50% X^+ ; i maschi produrranno due tipi di gameti, il 50% X^w e il 50% Y. Sviluppando un quadrato di Punnett con questi gameti otterremo: possiamo osservare femmine eterozigoti con fenotipo selvatico, o femmine omozigoti recessive con occhio mutato bianco; i maschi potranno essere emizigoti per l'allele selvatico e quindi fenotipicamente con occhio rosso, o emizigoti per l'allele mutato e quindi con occhio bianco. Ci ritroviamo esattamente col risultato dell'incrocio reciproco osservato da Morgan. L'ipotesi fatta da Morgan spiega perfettamente il comportamento del fenotipo del colore dell'occhio in *Drosophila*. Il gene *white* è stato il primo gene attribuito ad uno specifico cromosoma. Per i pochissimi geni attribuiti al cromosoma Y si ha una trasmissione **oloandrica**, cioè quel carattere è

Quindi si otterrà una progenie maschile del 50% con occhio selvatico e del 50% con occhio mutato.

Quindi per il **primo tipo di incrocio** effettuato da Morgan, l'ipotesi del gene per il colore dell'occhio di *Drosophila* sul cromosoma X è un'ipotesi che spiega in maniera completa ed esaustiva i fenotipi da lui osservati. Non bastava fermarsi a questo punto dell'esperimento. Verifichiamo cosa accade nell'**incrocio reciproco**: la femmina in questo incrocio ha occhio bianco, quindi è omozigote recessiva (X^wX^w), mentre il maschio è selvatico con occhio rosso (X^+Y) perché ha l'allele selva-

Conclusione

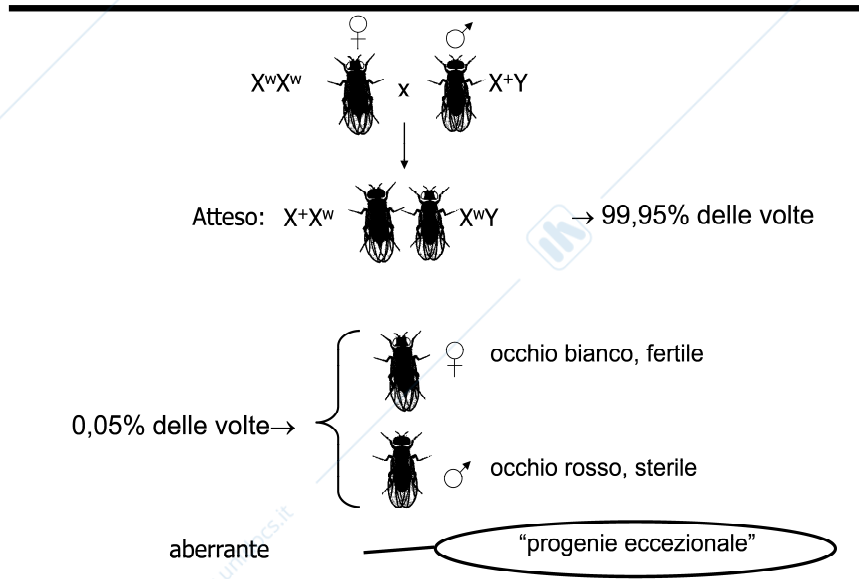
✓ Il fattore (gene) che determina il colore dell'occhio di *Drosophila* co-segrega con il cromosoma X quindi deve essere localizzato sul cromosoma X. I geni si trovano sui cromosomi.

✓ Il gene *white* di *Drosophila* è stato il primo gene ad essere "mappato"!

✓ Un'ulteriore prova della teoria cromosomica dell'ereditarietà viene dagli esperimenti di Calvin Bridges sulla "progenie eccezionale" di *Drosophila*.

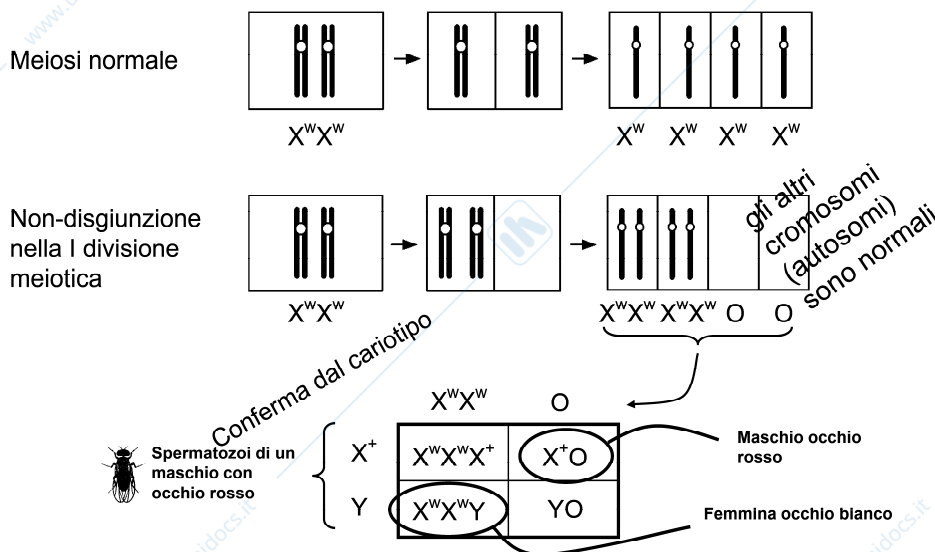
presente solo nei maschi, e viene trasmesso solo ai figli maschi, mentre per i caratteri attribuiti al cromosoma X bisogna valutare i genotipi dei genitori e della progenie e si parla di trasmissione **X-linked**. Una ulteriore conferma della presenza dei geni sui cromosomi, e quindi della teoria cromosomica dell'ereditarietà, è stata ottenuta con una serie di esperimenti sul colore dell'occhio di *Drosophila* da un altro scienziato, **Bridges**, il quale dimostrò che in presenza di segregazioni anomale dei cromosomi sessuali (segregazioni aberranti), il fenotipo colore dell'occhio di *Drosophila* seguiva lo stesso andamento dell'aberrazione cromosomica. Dunque, se incrociamo una femmina omozigote recessiva per il colore dell'occhio bianco (X^wX^w) con un maschio selvatico (X^+Y), il risultato atteso è una progenie costituita da tutte femmine con occhio rosso e tutti maschi con occhio bianco, perché tutte le femmine riceveranno un cromosoma X con l'allele mutato dalla madre e un cromosoma X con l'allele dominante selvatico dal padre; mentre i maschi riceveranno l'unica X con allele recessivo dalla madre e la Y dal padre. In realtà Bridges analizzando grandi numeri di progenie, si accorse che questo risultato è il più comune ma in alcuni casi può venir fuori un risultato diverso. Nel più del 99,9% dei casi il risultato osservato da Bridges era quello descritto. Nello 0,05% dei casi osservava un risultato anomalo, la cosiddetta **progenie eccezionale**: venivano fuori femmine con occhio bianco fertili e maschi con occhio rosso sterili. Progenie eccezionale in questo caso vuol dire **progenie aberrante**. Bridges cercò di trovare una spiegazione ai risultati. La stragrande maggioranza dei risultati era in perfetto accordo con l'ipotesi di Morgan, e quindi anche il risultato aberrante doveva essere sicuramente in accordo con essa, perché se i geni si trovano sui cromosomi, si troveranno sempre sui cromosomi e basta; quindi era necessaria una spiegazione cromosomica.

Gli esperimenti di Bridges: la "progenie eccezionale"



progenie costituita da tutte femmine con occhio rosso e tutti maschi con occhio bianco, perché tutte le femmine riceveranno un cromosoma X con l'allele mutato dalla madre e un cromosoma X con l'allele dominante selvatico dal padre; mentre i maschi riceveranno l'unica X con allele recessivo dalla madre e la Y dal padre. In realtà Bridges analizzando grandi numeri di progenie, si accorse che questo risultato è il più comune ma in alcuni casi può venir fuori un risultato diverso. Nel più del 99,9% dei casi il risultato osservato da Bridges era quello descritto. Nello 0,05% dei casi osservava un risultato anomalo, la cosiddetta **progenie eccezionale**: venivano fuori femmine con occhio bianco fertili e maschi con occhio rosso sterili. Progenie eccezionale in questo caso vuol dire **progenie aberrante**. Bridges cercò di trovare una spiegazione ai risultati. La stragrande maggioranza dei risultati era in perfetto accordo con l'ipotesi di Morgan, e quindi anche il risultato aberrante doveva essere sicuramente in accordo con essa, perché se i geni si trovano sui cromosomi, si troveranno sempre sui cromosomi e basta; quindi era necessaria una spiegazione cromosomica.

L'ipotesi di Bridges: meiosi aberrante → uova XX



Nell'immagine vediamo la meiosi di una femmina di *Drosophila* omozigote recessiva per il colore dell'occhio: questi sono cromosomi sessuali X già duplicati (ovviamente in ognuna di queste cellule sono presenti tutti gli autosomi, ma scriviamo solo quelli sessuali perché facciamo riferimento a geni presenti su cromosomi sessuali). Questi cromosomi sessuali duplicati sono costituiti da cromatidi fratelli legati dal centromero, in prima divisione meiotica un cromosoma X va verso un polo l'altro cromosoma X va verso l'altro polo, e in seconda

meiotica un cromosoma X va verso un polo l'altro cromosoma X va verso l'altro polo, e in seconda

divisione meiotica ciascun cromatidio si separa dal fratello e andranno a finire nelle cellule finali che saranno 4 gameti dello stesso tipo (4 gameti contenenti il cromosoma X con l'allele recessivo w). Può accadere durante la meiosi un errore di segregazione (gli errori di segregazione non sono eventi rari; accadono anche nelle meiosi che facciamo noi, il vantaggio è che la maggior parte delle meiosi avvengono correttamente). Se questo errore di segregazione avviene a carico dei cromosomi sessuali per molte specie è compatibile con la vita; se invece avviene a carico degli autosomi difficilmente è compatibile con la vita. Riguardo l'esperimento di **Bridges** accade una non corretta segregazione degli omologhi: i due omologhi migrano verso lo stesso polo, per cui dopo la prima divisione meiotica ci sarà una cellula che contiene ancora entrambi gli omologhi X, mentre nell'altra cellula ci saranno solo gli autosomi, perché dei cromosomi sessuali X non ce ne sta nemmeno uno. E quindi dalla seconda divisione meiotica della cellula che contiene entrambi gli omologhi verranno fuori due cellule gametiche che contengono ciascuna due cromosomi X con l'allele w e dall'altra cellula che contiene solo gli autosomi verranno fuori due cellule anch'esse senza i cromosomi X: saranno cellule 0 rispetto ai cromosomi X. Sostanzialmente vengono fuori gameti che definiamo **aneuploidi**, cioè che non hanno la ploidia corretta per un gamete (un tipo di gamete avrà un assetto aploide per gli autosomi tranne che per l'assetto sessuale, perché avrà due copie di cromosomi sessuali anziché una; mentre un altro tipo di gamete anch'esso aneuploide, non avrà neppure una copia dei cromosomi sessuali ma solo l'assetto aploide degli autosomi). Cosa viene fuori se una femmina che ha fatto meiosi aberrante di questo tipo si incrocia con un maschio selvatico? Il maschio selvatico produrrà il 50% dei gameti contenente cromosoma X^+ selvatico e il 50% dei gameti contenente il cromosoma Y. Invece la femmina ha prodotto il 50% di gameti ciascuno contenente due copie del cromosoma X con l'allele w (mutato), e il 50% di gameti aneuploidi, contenenti 0 copie di cromosoma X. Dal quadrato di Punnett dove incrociamo i gameti ottenuti dalla meiosi aberrante e i gameti del maschio selvatico, otterremo X^+0 (maschio con occhio rosso) e X^wX^wY (femmina con occhio bianco), quindi ci spieghiamo il risultato osservato da Bridges, e cioè, nello 0.05% dei casi

Conclusioni:

- I determinanti genetici co-segregano con i cromosomi
- La segregazione aberrante di cromosomi determina un profilo alterato di trasmissione dei caratteri

⇒ I geni si trovano sui cromosomi

evidentemente nelle femmine di *Drosophila* avviene una meiosi aberrante: in prima divisione meiotica, i due omologhi anziché separarsi, vanno allo stesso polo e si formeranno gameti con due cromosomi X e gameti privi di cromosomi X; andando ad essere poi fecondati da gameti selvatici prodotti quindi dal maschio con occhio rosso, il risultato che viene fuori è maschio con occhio rosso e femmina con occhi bianchi. Abbiamo spiegato dal punto di vista genetico che l'eccezione alla segregazione cromosomica corrisponde ad un'eccezione nella segregazione del fenotipo colore dell'occhio. Abbiamo detto che i cromosomi sessuali sono presenti nel maschio e nella femmina con due assetti di tipo differenti e cioè, la femmina presenta due cromosomi X, il maschio presenta un cromosoma X ed uno Y: questo è vero per molte specie, ma non per tutte, ad esempio negli uccelli il sesso eterogametico (il sesso che ha due cromosomi sessuali diversi) è quello femminile; ci sono specie che non hanno cromosomi sessuali eteromorfi, ma sono identici tra loro, ma contengono geni che

La determinazione del sesso

Possibilità:

- La presenza di due cromosomi X determina il sesso femminile (indipendentemente dalla presenza del cromosoma Y)
- oppure
- La presenza del cromosoma Y determina il sesso maschile (indipendentemente dal numero di cromosomi X presenti)

In *Drosophila*:

XXY = femmina

XO = maschio

} La presenza del cromosoma Y non è sufficiente a determinare il sesso maschile

Ipotesi: un cromosoma X = maschio
due cromosomi X = femmina

determinano un fenotipo maschile e un fenotipo femminile. Anche la determinazione del sesso è un fenomeno che nel corso dell'evoluzione ha adottato vie differenti, ovvero, non in tutte le specie per le quali esiste un sesso maschile e un sesso femminile la determinazione del sesso avvenga allo stesso modo. Volendo schematizzare delle possibilità potremmo dire che il sesso femminile è caratterizzato dalla presenza di due cromosomi X indipendentemente dal fatto che ci sia o meno un cromosoma Y e la presenza del cromosoma Y determini lo sviluppo del sesso maschile: queste possibilità sono vere entrambe! Nei mammiferi infatti la presenza del cromosoma Y determina lo sviluppo del sesso maschile. In *Drosophila* non è così! Non è sufficiente la presenza del cromosoma Y nel cariotipo perché si sviluppi il sesso maschile: infatti in *Drosophila* XXY è una femmina; XO è un maschio, abbiamo quindi una Y presente in un cariotipo femminile e abbiamo l'assenza di Y in un cariotipo maschile. L'ipotesi fatta da Bridges sulla determinazione del sesso di *Drosophila*, fu che il sesso di *Drosophila* non dipende dalla presenza del cromosoma X ma dal rapporto tra il numero di cromosomi X e il numero di autosomi presenti nelle cellule; in particolare il rapporto X:A cioè cromosomi X assenti:autosomici. In particolare, se sono presenti due cromosomi X e un assetto autosomico normale, cioè 2, abbiamo un rapporto X:A=1, abbiamo lo sviluppo del sesso femminile. Se invece abbiamo un solo cromosoma X a fronte di un assetto autosomico normale, il rapporto X:A=0,5, in questo caso si ha sviluppo in senso maschile. Nel caso in cui i cromosomi X siano 3 e gli autosomi sono in assetto diploide, 2, il rapporto X:A=1,5 e si ha sviluppo di un individuo metafemmina. Nel caso abbiamo due cromosomi X e 3 assetti autosomici, il rapporto X:A= 0,67 e ci dà un intersesso; infine una coppia XY in presenza di 3 assetti autosomici, il rapporto X:A=0,33, e ci dà un individuo metamaschio. In *Drosophila* quindi la determinazione del sesso non dipende dalla presenza del cromosoma X ma dal rapporto tra numero di cromosomi X e assetti autosomici. Nei mammiferi le osservazioni di alcuni tipi di aneuploidie, ci danno un'idea: le aneuploidie compatibili con la vita sono quelle che riguardano i cromosomi sessuali. Per esempio la sindrome di Klinefelter, (individui XXY) che ha una frequenza elevata; o la sindrome di Turner (individui XO) più rara: nel primo caso abbiamo due XX e un cromosoma Y, fenotipicamente l'individuo è maschio; nell'XO, cioè in presenza di un cromosoma X e nessun cromosoma Y, si sviluppa e vive una femmina. Nei mammiferi infatti la determinazione del sesso dipende strettamente dalla presenza del cromosoma Y. Nei mammiferi il cromosoma Y contiene diversi geni anche se pochi, e tra questi compare il gene che determina la mascolinizzazione, la determinazione del sesso; invece sul cromosoma X sono presenti alcuni geni coinvolti nella determinazione del sesso e altri geni che non hanno nulla a che vedere con la determinazione del sesso. Nel sesso omogametico (nelle femmine XX) ci sarà il prodotto di due coppie geniche, mentre nei maschi ce ne sarà la metà perché possiedono un solo cromosoma X, e questo crea un problema in termini di dosaggio; e cioè, in qualche modo si deve uniformare il livello di messaggio e di prodotto di quei geni presenti

Proseguimento degli esperimenti di Bridges

Cromosomi sessuali	# di X	# di assetti autosomici	rapporto X	Fenotipo
XX	2	2	1,0	Femmina
XY	1	2	0,5	Maschio
XXX	3	2	1,5	Metafemmina
XX	2	3	0,67	Intersesso
XY	1	3	0,33	Metamaschio

Conclusione: in *Drosophila*, il sesso è determinato dal rapporto tra il numero di cromosomi X e il numero di assetti autosomici (autosoma = cromosoma non sessuale)

E nei mammiferi?

Determinazione del sesso nell'uomo

Suggerimenti dall'aneuploidia assetto cromosomico alterato

individui **XXY** (sindrome di Klinefelter; 1/1000)... maschio

individui **XO** (sindrome di Turner; 1/2500)... femmina

Conclusione:

Nell'uomo (e negli altri mammiferi), la presenza del cromosoma Y determina lo sviluppo maschile

Questo comportamento non è universale...

Uccelli: il sesso eterogametico è quello femminile, WZ; i maschi sono ZZ

Api: uova non fecondate (aploidi) → maschio

uova fecondate (diploidi) → femmina

sui cromosomi X, perché altrimenti i maschi ne avrebbero la metà e le femmine il doppio. Anche in questo caso ci sono delle strategie di compensazione di dosaggio: il Corpo di Barr ad esempio, altro non è che uno dei due cromosomi X fortemente condensato e reso quasi completamente trascrizionalmente inattivo, in modo tale da mantenere attiva solo una copia e avere quindi un eguale prodotto dei geni presenti su quel cromosoma sia nei maschi che nelle femmine. In altre specie, ad esempio *Drosophila*, si ha l'iperattivazione dei geni presenti sul cromosoma X del maschio per controbilanciare il dosaggio delle femmine (in *Drosophila* quindi non avviene la lyonizzazione). Ricordiamo che all'interno dei gameti oltre ai cromosomi sessuali troviamo anche gli autosomi, e nella formazione dei gameti è essenziale che vada a finire il corretto assetto cromosomico sia per la frazione autosomiale che per quella sessuale, e per quanto riguarda gli autosomi ogni coppia di omologo presente all'interno di una cellula proviene da un genitore diverso; cioè una copia di un omologo viene data dal padre e una copia di un omologo viene data dalla madre e se questo non viene rispettato si hanno alterazioni che, a seconda del cromosoma a cui facciamo riferimento, possono avere effetti deleteri. Nell'immagine se indichiamo i cromosomi materni e paterni, dopo la replicazione abbiamo i cromatidi fratelli sia per quanto riguarda l'omologo ereditato dal padre (cromosoma che porta l'allele a), sia per quanto riguarda l'omologo ereditato dalla madre (cromosoma che porta l'allele A), dopo la replicazione, la migrazione degli omologhi in questo caso avviene correttamente, un omologo va verso un polo e l'altro al polo opposto, segue la formazione delle due cellule figlie che contengono una un cromosoma che è stato

dato dalla madre, e l'altra un cromosoma che è stato dato dal padre.

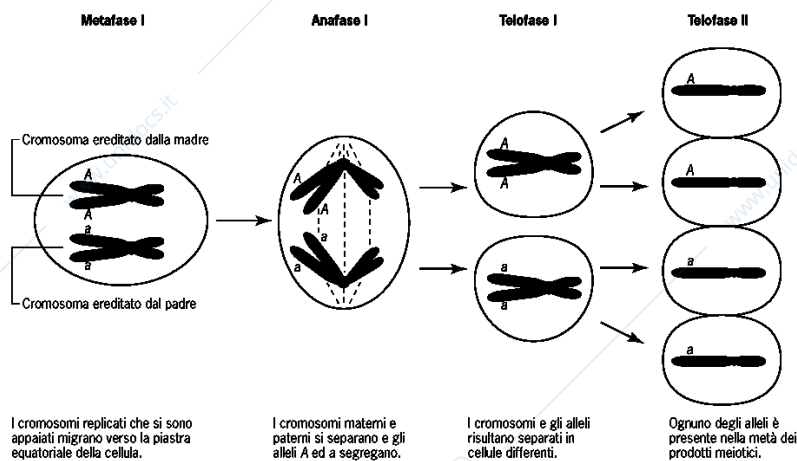


Figura 5.7 ► Il principio della segregazione di Mendel e il comportamento cromosomico alla meiosi. La segregazione degli alleli corrisponde alla separazione, durante l'anafase della prima divisione meiotica, dei cromosomi appaiati.

dato dalla madre, e l'altra un cromosoma che è stato dato dal padre.

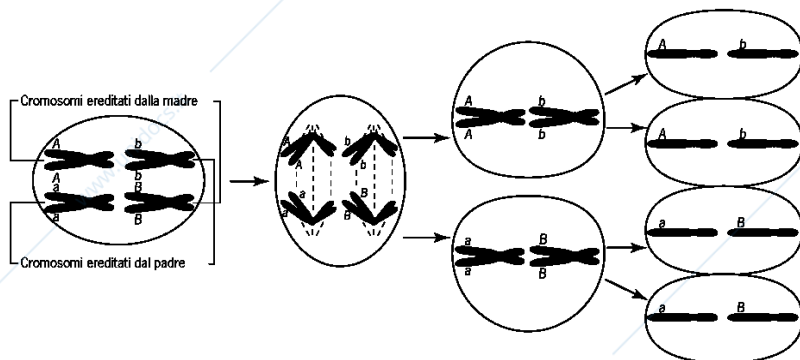


Figura 5.8 ► Il principio dell'assortimento indipendente di Mendel e il comportamento dei cromosomi alla meiosi. Gli alleli su differenti coppie di cromosomi assortiscono in modo indipendente durante l'anafase della prima divisione meiotica, perché i cromosomi ereditati per via materna e paterna si allineano in modo casuale sulla linea equatoriale della cellula.

LEZIONE 5 (17/03/2015)

Nella lezione precedente abbiamo detto che per molte specie, anche se non per tutte, il sesso maschile e il sesso femminile hanno dei cromosomi sessuali morfologicamente differenti e anche dal punto di vista del contenuto genico sono diversi. Abbiamo fatto a tal proposito l'esempio degli esperimenti di Morgan e Bridges su *Drosophila*, che presenta un sesso omogametico per il sesso femminile (omogametico perché produce, rispetto ai cromosomi sessuali, gameti che contengono lo stesso tipo di cromosomi) mentre il sesso eterogametico è il sesso maschile (eterogametico perché produce, rispetto ai cromosomi sessuali, due tipi differenti di gameti; 50% di gameti conterranno il cromosoma X e 50% di gameti conterranno il cromosoma Y). Stessa situazione nei mammiferi, anche se abbiamo visto che la determinazione del sesso in *Drosophila* e nei mammiferi avviene con meccanismi profondamente differenti: nei mammiferi la presenza del cromosoma Y è necessaria per lo sviluppo del sesso maschile; in *Drosophila* non è la presenza del cromosoma Y a determinare lo sviluppo del sesso maschile, ma il rapporto tra il numero di cromosomi X e l'assetto autosomico. Il problema che viene fuori per tutte le specie con sessi separati e con cromosomi sessuali differenti, è quello della compensazione del dosaggio perché, abbiamo specificato che il contenuto genico tra cromosomi X e cromosomi Y è profondamente differente dato che il cromosoma X è molto grande rispetto a quello Y; nelle femmine il cromosoma X è presente in 2 copie, mentre nei maschi in una sola copia (sono emizigoti XY, perché possiedono una sola copia del cromosoma X). Come è possibile che nelle femmine ci sia una doppia espressione dei geni che sono sul cromosoma X e i maschi possono fare le stesse cose con la metà del prodotto di quei geni? Sul cromosoma X non ci sono solo geni coinvolti nella determinazione del sesso, ma anche geni responsabili di altre manifestazioni fenotipiche che col sesso non c'entrano un piffero e quindi tutte le specie hanno il problema della compensazione del livello dell'espressione dei geni presenti sul cromosoma X tra maschi e femmine. Facciamo riferimento a ciò che accade nei mammiferi: nei mammiferi avviene un fenomeno che si chiama **inattivazione del cromosoma X**, che porta alla formazione di strutture citologicamente visibili all'interno del nucleo, che sono chiamati corpi di Barr. Un corpo di **Barr** altro non è che un cromosoma X estremamente condensato che diventa eterocromatico e che dal punto di vista trascrizionale (ovvero dell'espressione genica) non è più attivo, o quasi completamente inattivo. Di conseguenza nelle femmine si esprimeranno solo i geni presenti sul cromosoma X che non è stato inattivato, ovvero quello che resta eucromatico. In linea generale l'**eterocromatina** è una cromatina molto condensata, estremamente spiralizzata, che tende a non essere trascrizionalmente attiva; quando invece parliamo di **eucromatina** ci riferiamo a una cromatina lassa e che è trascrizionalmente più attiva rispetto all'eterocromatina. C'è da dire che nelle cellule delle **femmine dei mammiferi**, l'inattivazione del cromosoma X è del tutto casuale; avviene nelle fasi molto precoci dello sviluppo femminile e quindi ci saranno gruppi di cellule che inattivano il cromosoma X ereditato dalla madre, altri gruppi di cellule che inattivano il cromosoma X ereditato dal padre: nello sviluppo dell'organismo femminile, in alcune cellule viene inattivata la X materna, in altre cellule quella paterna. Dal punto di vista genetico è importante perché nel caso di una femmina eterozigote, essa avrà sul cromosoma X ereditato dalla madre una forma all'elica per un certo gene, su quello ereditato dal padre un'altra forma allelica: siccome l'inattivazione è casuale, nelle cellule si esprimerà solo una delle due forme alleliche, che potrà essere o la forma allelica ereditata dal padre o quella ereditata dalla madre a seconda di quale dei due cromosomi X viene inattivato e se le due forme alleliche sono differenti si esprimerà un allele differente. Se per esempio su un cromosoma X è presente l'allele A, sull'altro cromosoma X l'allele a, nelle cellule in cui viene inattivata la X con l'allele a si esprimerà solo la X con l'allele A; viceversa nelle cellule in cui viene inattivata la X con l'allele A si esprimerà solo la X con l'allele a. Questa situazione porta alla formazione di **mosaici** dal punto di vista fenotipico per l'espressione di quei geni. Cosa intendiamo per mosaici? Che ci saranno dei tessuti derivati da quel gruppo di cellule in cui inizialmente è avvenuta l'inattivazione del cromosoma X materno ad esempio, in cui si esprimerà solo l'allele paterno; altri gruppi di cellule che daranno origine ad altri tessuti o

ad altre zone dello stesso tessuto che invece esprimeranno l'altro allele se hanno inattivato l'altro cromosoma X. Quindi le **femmine di mammiferi**, rispetto ai geni presenti sui cromosomi X sono dei mosaici. Questo mosaicismo può essere esplicito in tanti esempi, di cui uno molto evidente riguarda un fenotipo dei gatti, il **fenotipo italico**, in cui il colore del mantello è a macchie nere e macchie arancioni su un fondo bianco: questo è il risultato dell'inattivazione dell'uno o dell'altro cromosoma X in una situazione di **eterozigosi**. Facciamo riferimento ad un gene che presenta due forme alleliche alternative, una che determina la colorazione arancione del mantello e una la colorazione nera del mantello e questo gene si trova proprio sul cromosoma X. Se osserviamo il fenotipo dei gatti maschi ci accorgiamo che hanno o il mantello nero o il mantello arancione; mentre le femmine possono presentare il fenotipo a macchie nere e arancioni proprio perché sono dei mosaici per quanto riguarda l'espressione di questo gene presente sul cromosoma X. I corpi di **Barr** sono le strutture che ci consentono di visualizzare anche citologicamente l'inattivazione del cromosoma X e in cellule con un numero di cromosomi X maggiori di 2 nelle femmine osserviamo un numero di corpi di Barr superiore a 1 e sempre inferiore di un'unità rispetto al numero di cromosomi X presenti all'interno di una cellula: in un individuo XXX mammifero, anziché osservare un solo corpo di Barr come si osserva nelle femmine XX, osserveremo 2 corpi di Barr; vengono quindi inattivati 2 dei 3 cromosomi X presenti in quell'individuo. In **Drosophila** la compensazione del dosaggio avviene in maniera completamente diversa: l'inattivazione del cromosoma X non avviene, ma avviene l'**ipertrascrizione dei geni** presenti sul cromosoma X del maschio, per compensare l'espressione doppia della femmina. Si chiama **compensazione trascrizionale**.

ALBERI GENEALOGICI

L'eredità legata al sesso rappresenta da un certo punto di vista un'eccezione al mendelismo in quanto per i caratteri legati al sesso **non vale l'equivalenza degli incroci reciproci**, che invece vale per i caratteri studiati da Mendel. Al di là del fatto che l'eredità dei caratteri X-linked segue la trasmissione dei cromosomi X, e quindi la segregazione a livello meiotico dei cromosomi X e dei cromosomi Y, la logica di manifestazione del carattere non cozza con ciò che ci ha insegnato Mendel nelle femmine; mentre nei maschi la situazione cambia in quanto essi sono emizigoti, possono avere solo due genotipi alternativi: emizigote per l'allele dominante o emizigote per l'allele recessivo. Possiamo applicare i principi mendeliani per analizzare la trasmissione dei caratteri di generazioni in generazione all'interno delle famiglie, e questo approccio viene chiamato **studio degli alberi genealogici** o **pedigree**. Lo studio degli alberi genealogici ci consente di capire se un carattere che stiamo analizzando è dominante o recessivo, se è un carattere autosomico o un carattere legato al cromosoma X; ci consente di fare non solo delle previsioni sui genotipi degli individui che appartengono all'albero, ma anche la previsione dei genotipi e fenotipi della progenie di specifici incroci all'interno dell'albero genealogico. Ha grandissimi risvolti nella consulenza genetica, in particolar modo se i caratteri che si analizzano riflettono su patologie. Non sempre è possibile affermare con certezza la modalità di trasmissione di un carattere e dipende dall'ampiezza dell'albero genealogico in esame. Molto spesso quanto più piccolo è l'albero genealogico minori sono le informazioni a nostra disposizione; per cui, se abbiamo la fortuna in un albero molto piccolo di osservare incroci informativi, allora riusciamo a formulare delle ipotesi che possono diventare certezze al termine dell'analisi. In altri casi non riusciamo a discriminare neanche tra la dominanza e la recessività; ci sono delle situazioni che sono compatibili sia con la trasmissione dominante che con quella recessiva; ciò non significa che il carattere che stiamo analizzando è sia dominante che recessivo; ma significa che l'albero che stiamo analizzando non ci dà l'informazione sufficiente per discriminare tra dominanza e recessività. Ci sarebbe quindi bisogno di risalire ad un numero di informazioni maggiori in quella famiglia rispetto al carattere in questione, oppure di analizzare lo stesso carattere in altre famiglie, magari più ampie, cercando di risalire, di capire ed affermare con certezza quale possa essere la modalità di trasmissione di quel carattere. Gli alberi genealogici sono delle rappresentazioni grafiche per cui è necessario utilizzare una simbologia univoca. Il **maschio** viene indicato con un quadrato, la **femmina** con un cerchio; l'**individuo di sesso non**

specificato è un rombo; quando vediamo una freccia che indica un individuo di un carattere quell'individuo è il **probando**, cioè è l'individuo per il quale vogliamo sapere determinate informazioni. Indicare un maschio con il simbolo quadrato vuoto non colorato, vuol dire dare un'informazione sul fenotipo di questo maschio; cioè non manifesta fenotipicamente il carattere che stiamo analizzando, così come la femmina vuota non manifesta il carattere in analisi. Indicare la femmina o il maschio col simbolo pieno, nero, significa dire che quella femmina o quel maschio manifestano quel fenotipo di quel carattere in esame. In altri casi possiamo avere maschi o femmine colorati per metà: è un'informazione sia fenotipica che genotipica perché indica che quel maschio o quella femmina sono portatori. Dal punto di vista genotipico è un sinonimo di **eterozigosi**, quindi quegli individui sono eterozigoti per il carattere **autosomico** che stiamo analizzando: se il carattere lo chiamiamo A, quel maschio o quella femmina quando sono rappresentati col simboletto mezzo pieno e mezzo vuoto hanno genotipo Aa; e quindi, se stiamo parlando di un carattere **recessivo**, questi individui non manifesteranno fenotipicamente quel carattere, però hanno l'allele recessivo nel loro genotipo. Mentre per le femmine eterozigoti per geni legati al sesso la femmina portatrice si indica con un pallino nero all'interno del cerchietto che rappresenta il simbolo femminile; e vale lo stesso discorso: è eterozigote per un locus X-linked; quindi sarà genotipicamente $X^A X^a$, fenotipicamente non manifesta il carattere recessivo. Quando invece i simboli hanno un segno diagonale sopra, vuol dire che quegli individui non sono più in vita. Una **linea orizzontale** che collega un maschio e una femmina significa che tra quel maschio e quella femmina c'è stato o ci potrebbe essere un accoppiamento; se c'è un tratto che interrompe questa linea indica un divorzio. Quando invece un maschio e una femmina sono collegati da una **linea orizzontale doppia** vuol dire che i due individui coinvolti nell'incrocio sono **consanguinei**, cioè appartengono alla stessa famiglia e si stanno accoppiando. L'individuo con una sorta di **parentesi** attorno indica che è stato adottato, mentre i **parti gemellari** non presentano una linea verticale, ma una biforcazione che include gemelli che possono essere **monozigotici** quando presentano oltre alla biforcazione anche un tratto lineare che li collega, o **dizigotici** senza la linea orizzontale tra di loro, oppure con **punto interrogativo** se non si sa se siano monozigotici o dizigotici.

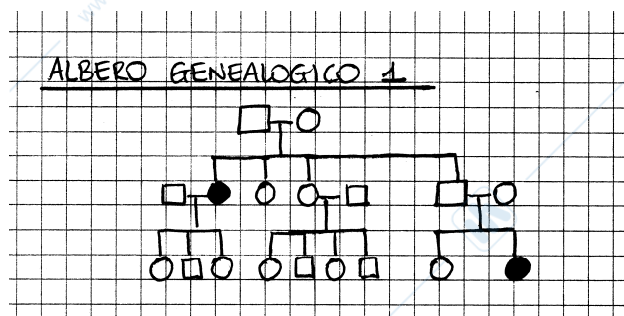
Caratteri recessivi

Possiamo cogliere dei comportamenti caratteristici dei caratteri recessivi? Certo, esistono delle caratteristiche che ce lo consentono e la principale ci viene fornita da Mendel: se abbiamo due genitori che entrambi non presentano il carattere, ma hanno figli che presentano il carattere, necessariamente il carattere in questione è **recessivo**. Negli esperimenti di Mendel lo abbiamo capito dal principio della dominanza; ovvero, un incrocio tra individui che fenotipicamente sono dominanti entrambi danno figli all'interno dei quali compare il fenotipo dei genitori e anche l'altro, quello che era scomparso in prima generazione. Quindi per definire un carattere recessivo con certezza, dobbiamo andare a cercare gli incroci informativi che si riflettano in una situazione del genere. Figli che presentano un carattere recessivo possono sia avere entrambi i genitori che non lo presentano, ma anche che lo presentano! Un genitore o entrambi i genitori. Se entrambi i genitori manifestano un carattere recessivo, ovviamente tutti i figli di quei genitori dovranno manifestare quel carattere, perché, dal punto di vista genotipico quei genitori sono omozigoti recessivi per poter manifestare il carattere; per cui incrociando due individui omozigoti recessivi si avrà una progenie interamente omozigote recessiva.

Albero genealogico 1

Ogni generazione viene indicata con i numeri romani, e all'interno di ogni generazione gli individui vengono indicati con i numeri arabi partendo da sinistra verso destra. Abbiamo due individui (maschio e femmina) che non manifestano il carattere. Fanno 4 figli, quelli che sono collegati ai genitori secondo l'immagine. Di questi figli possiamo descrivere il fenotipo perché lo vediamo. Se il carattere in questione fosse una patologia allora potremmo dire che i genitori sono sani e dei 4 figli 3 sono sani e uno presenta la malattia. La figlia che quindi manifesta il carattere è l'individuo II-2: essa sposa un individuo esterno all'albero (individuo II-1); di questo individuo non

abbiamo alcuna informazione se non quella fenotipica, ma non sappiamo i suoi genitori, fratelli che fenotipo hanno rispetto al carattere in esame; allo stesso modo non abbiamo alcuna informazione oltre che quella fenotipica dell'individuo II-7 che sposa l'individuo II-6. Nella generazione successiva notiamo 3 figli che non manifestano il carattere (individui III-1; III-2; III-3), e due figli di cui uno manifesta in carattere (III-9). Cosa possiamo dire rispetto alla dominanza o recessività di questo carattere? È chiaro che si tratta di un carattere recessivo; e rispetto a tutti gli incroci presenti nell'albero, l'incrocio che ci conferma l'ipotesi del carattere recessivo è già il primo incrocio: perché abbiamo due genitori che non manifestano il carattere, ma nella loro progenie hanno un figlio che



presenta il carattere, di conseguenza è un carattere recessivo. L'incrocio tra gli individui II-1 e II-2 ci mostra che l'individuo II-2 manifesta il carattere (ha genotipo recessivo), l'individuo II-1 non manifesta il carattere e nemmeno i tre figli di questo incrocio. Anche l'incrocio tra gli individui II-6 e II-7 ci conferma che il carattere è recessivo in quanto loro due non manifestano il carattere ma una delle due figlie sì. Possiamo fare anche dei ragionamenti riguardo i genotipi degli individui in questione: stabilito che il carattere è recessivo, è molto semplice dedurre il genotipo degli individui che lo manifestano; ovvero tutti gli individui col simboletto pieno in questo albero, ammettendo che il carattere si chiami A, avranno genotipo aa. Possiamo stabilire con certezza il genotipo di tutti gli individui? No, ma di alcuni sì. Sicuramente possiamo stabilire il genotipo dei genitori dell'albero, proprio perché hanno fatto una figlia omozigote recessiva, quindi in ciascuno dei due genotipi deve essere presente l'allele recessivo, e necessariamente questi individui devono essere eterozigoti! Il genotipo di entrambi i genitori I-1 e I-2 è Aa. Pensiamo al genotipo dell'individuo II-6: possiamo stabilirlo con certezza o no? Sì. Perché questo individuo sposandosi con la donna II-7 esterna all'albero ha una figlia III-9 che presenta il carattere. Né lui né la moglie presentano il carattere, ma il fatto che sia nata una figlia che manifesta il carattere e che quindi deve necessariamente avere un genotipo aa, automaticamente ci dà la certezza anche sul loro genotipo; entrambi devono essere eterozigoti, per cui entrambi saranno Aa secondo la famosa legge di Mendel. Qual è la probabilità che l'individuo II-3 sia omozigote dominante AA o eterozigote Aa? Di sicuro non potrà essere omozigote recessiva perché non manifesta il carattere, per cui escludendo la probabilità $\frac{1}{4}$ del genotipo aa derivante dall'incrocio dei due genitori entrambi eterozigoti, automaticamente restano $\frac{1}{3}$ di genotipo omozigote dominante AA e $\frac{2}{3}$ di genotipo eterozigote Aa. Guardiamo l'incrocio tra l'individuo II-1 e l'individuo II-2: abbiamo una femmina omozigote recessiva aa (individuo II-2) e un maschio esterno all'albero (II-1) che non manifesta il carattere; da questo incrocio nascono tre figli che non manifestano il carattere. Non possiamo fare delle affermazioni certe sul genotipo dell'individuo II-1, in quanto non abbiamo alcuna informazione sulla sua discendenza; ma qualora vorremmo sapere quale sia la probabilità che dall'incrocio tra II-1 e II-2 nasca un figlio che manifesti il carattere fenotipicamente, a questo livello delle nostre conoscenze dovremmo fare un'assunzione sul genotipo dell'individuo II-1 di cui non sappiamo altro se non che non manifesta il carattere: lo assumiamo omozigote dominante nonostante sia un errore perché nessuno ci dice che non possa essere omozigote; ma poiché non riusciamo a risalire in nessun modo alle informazioni sul carattere relative alla sua famiglia e non conosciamo nemmeno la popolazione da cui proviene, dobbiamo necessariamente considerarlo omozigote dominante per il carattere in questione. A questo punto possiamo rispondere alla domanda dicendo che la probabilità che nascano figli che manifestino il carattere dall'incrocio tra l'individuo II-1 e II-2 è pari a 0.

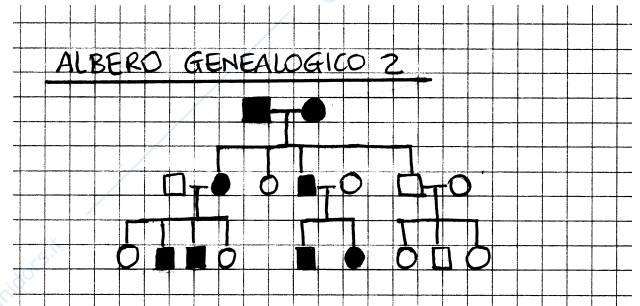
Caratteri dominanti

Sicuramente se un carattere è dominante e viene manifestato da un individuo della progenie, almeno uno dei genitori deve presentare il carattere. Se abbiamo due genitori che presentano entrambi il carattere dominante, nella progenie possiamo avere sia figli che presentano il

carattere, sia figli che non presentano il carattere: questo è uno degli errori che gli studenti commettono nell'analisi di alberi genealogici con trasmissione dominante. La regola è valida per i caratteri recessivi!! Se un carattere dominante è presente in una progenie almeno uno dei genitori deve manifestare il carattere.

Albero genealogico 2

Nell'albero genealogico in figura, l'incrocio tra gli individui I-1 e I-2 è quello informativo, perché entrambi i genitori manifestano il carattere: se il carattere fosse recessivo tutti i figli di questo incrocio dovrebbero manifestare il carattere; invece abbiamo sia figli che lo manifestano, sia figli che non lo manifestano; di conseguenza il carattere non potrà essere recessivo. Possiamo dire qualcosa sul genotipo di questi individui? Sì: i genitori sono eterozigoti Aa perché fanno figli che non manifestano il carattere che quindi hanno genotipo aa (omozigote recessivo); per nascere un individuo con genotipo recessivo da due genitori che hanno fenotipo dominante, implica che i genitori debbano essere eterozigoti, altrimenti non potrebbe formarsi un genotipo aa . A questo punto tutti gli individui che non manifestano il carattere nell'albero genealogico avranno genotipo recessivo aa . L'individuo II-2 ha genotipo eterozigote Aa perché dal suo incrocio con l'individuo II-1 che manifesta genotipo e fenotipo aa dovrebbero nascere sia figli che manifestano il carattere, sia figli che non lo manifestano: se II-2 fosse stata omozigote dominante AA allora tutti i figli ottenuti dall'incrocio con II-1 dovevano manifestare il carattere, in quanto da un incrocio $AA \times aa$ si ottengono tutti genotipi Aa e fenotipi A .

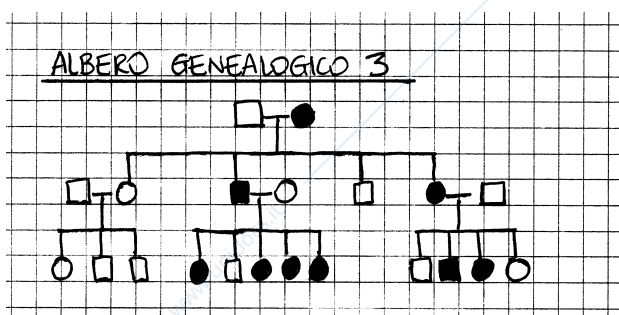


Eredità legata al sesso

Il carattere che vogliamo esaminare, oltre ad essere dominante o recessivo, può essere autosomico (come negli esempi precedenti) o legato ai cromosomi sessuali. Possiamo dall'analisi di un albero genealogico stabilire anche se la trasmissione di un carattere è legata al sesso o meno. Nelle specie col sesso maschile eterogametico e col sesso femminile omogametico i maschi producono due tipi di gameti (il 50% dei gameti conterrà il cromosoma X e il 50% dei gameti conterrà il cromosoma Y), mentre le femmine produrranno gameti contenenti il cromosoma X; quindi la probabilità ad ogni incrocio di ottenere un figlio maschio o femmina è il 50%. Andiamo ad osservare se possiamo trarre delle conclusioni sul comportamento di un carattere dominante presente sul cromosoma X. In base a quanto detto, se un **carattere dominante è legato al cromosoma X**, tutti i maschi che presentano il carattere, e che quindi sono genotipicamente X^AY , emizigoti per l'allele dominante, genereranno figlie femmine che presentano il carattere, perché i padri danno la loro unica X alle figlie femmine. Poiché la X paterna possiede l'allele dominante A, indipendentemente dall'allele presente sulla X materna, le figlie femmine avranno tutte fenotipi dominante, cioè manifesteranno il carattere.

Albero genealogico X-linked dominante

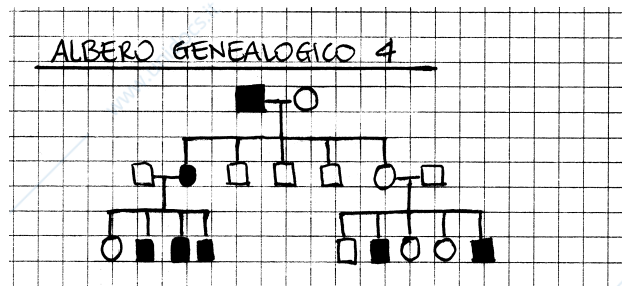
Assumiamo per l'albero genealogico in figura che il carattere sia dominante. La trasmissione del carattere può essere legata al cromosoma X (X-linked)? Ci sono dei maschi che presentano il carattere (II-3), quindi poiché il carattere è dominante, il genotipo di quei maschi sarà emizigote dominante (X^AY). In questo caso tutte le figlie femmine di quel maschio dovranno presentare quel carattere (III-4; III-6; III-7; III-8). Verifichiamo per tutto l'albero se il carattere è legato al sesso. La femmina I-2 deve essere eterozigote (X^AX^a) perché dal



suo incrocio con il maschio I-1 che non presenta il carattere (X^aY) vengono fuori una figlia che manifesta il carattere (II-6) e una che non lo manifesta (II-2); un maschio che presenta il carattere (II-3) e uno che non lo manifesta (II-5). La femmina II-2 che non manifesta il carattere, e quindi con genotipo X^AX^a , sposa un uomo II-1 che non manifesta il carattere, che quindi ha genotipo (X^aY); dalla loro unione nasceranno tutti figli maschi e femmine che non presentano il carattere, perché entrambi i genitori hanno i cromosomi X con l'allele recessivo. La femmina II-6 deve avere genotipo (X^AX^a) e il suo sposo II-7 genotipo (X^aY) e dalla loro unione nascono sia figli maschi che presentano il carattere (III-10) che figli maschi che non lo manifestano (III-9); sia figlie femmine che manifestano il carattere (III-11) che figlie femmine che non lo manifestano (III-12).

Albero genealogico X-linked recessivo

Anche in questo caso possiamo dire che i figli maschi di femmine che manifestano quel carattere manifesteranno tutti quel carattere perché, se stiamo parlando di un carattere recessivo posto sul cromosoma X, la donna affetta deve essere omozigote recessiva (X^aX^a), tutti i figli maschi di questa femmina (indipendentemente dal genotipo del padre) riceveranno la X dalla madre, che sarà solo ed esclusivamente X^a . I figli saranno tutti (X^aY). Nell'immagine, possiamo capire che il carattere in esame è recessivo in quanto lo possiamo dedurre dall'incrocio tra gli individui (II-6 e II-7), i quali non manifestano il carattere, ma dalla loro unione nascono sia figli che manifestano il carattere, sia figli che non lo manifestano. Verifichiamo la compatibilità con l'eredità legata al sesso. Se fosse un carattere presente sul cromosoma X, il maschio



do avrebbe dovuto essere emizigote recessivo (X^aY), e la moglie I-2 eterozigote (X^AX^a), dato che nella progenie ci sono sia figli che presentano il carattere che figli che non lo presentano. È possibile da questo incrocio avere una figlia che presenti il carattere? Sì. Se la mamma è eterozigote perché presenta una X^a nel suo genotipo, può dare questo cromosoma alla figlia II-2, la quale riceverà dal padre la sua unica X con l'allele a. Può venir fuori un figlio maschio che non presenti il carattere? Sì. Quello che ha ereditato dalla madre la X con l'allele A: quindi i figli II-3; II-4; II-5. La femmina II-6 deve essere eterozigote (X^AX^a) perché eredita dal padre la X con l'allele a, e della madre la X con l'allele A.

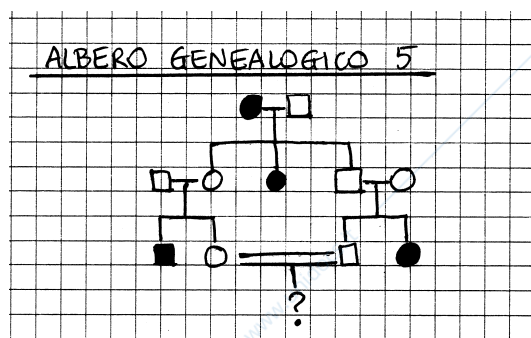
I-1 dovrebbe essere emizigote recessivo (X^aY), e la moglie I-2 eterozigote (X^AX^a), dato che nella progenie ci sono sia figli che presentano il carattere che figli che non lo presentano. È possibile da questo incrocio avere una figlia che presenti il carattere? Sì. Se la mamma è eterozigote perché presenta una X^a nel suo genotipo, può dare questo cromosoma alla figlia II-2, la quale riceverà dal padre la sua unica X con l'allele a. Può venir fuori un figlio maschio che non presenti il carattere? Sì. Quello che ha ereditato dalla madre la X con l'allele A: quindi i figli II-3; II-4; II-5. La femmina II-6 deve essere eterozigote (X^AX^a) perché eredita dal padre la X con l'allele a, e della madre la X con l'allele A.

Trasmissione oloandrica (Y-linked)

È la trasmissione di un carattere legato al cromosoma Y, presenta un andamento facilmente riconoscibile, perché è presente solo nei maschi e viene trasmesso solo ai figli maschi. Esiste una banca dati che comprende tutti i caratteri mendeliani e legati al sesso nell'uomo; oggi presenta circa 10.000 caratteri.

Calcolo della probabilità negli alberi genealogici

Nell'albero genealogico nell'immagine abbiamo una coppia di genitori che hanno tre figli, uno dei due genitori (I-1) presenta il carattere, l'altro no (I-2); nella progenie solo una figlia femmina












presenta il carattere (II-3): il carattere come viene trasmesso? È dominante o recessivo? È recessivo e lo capiamo dall'incrocio tra l'individuo II-4 e l'individuo II-5, che non manifestano il carattere ma hanno una figlia III-4 che lo manifesta: ciò implica che i genitori siano eterozigoti affinché la figlia sia omozigote recessiva; se i due individui avessero avuto genotipo omozigote recessivo, non avrebbero potuto generare una figlia con fenotipo e genotipo diverso dal loro. Anche l'incrocio tra gli individui II-1 e II-2 dimostrano la recessività del carattere. La tra-

smissione non può essere legata al cromosoma sessuale X perché, se così fosse, la madre I-1 avrebbe genotipo (X^aX^a), il padre I-2 genotipo (X^AY), e poiché il padre darà alle figlie femmine sempre il cromosoma X con l'allele A, la figlia II-3 non manifesterebbe il carattere, in quanto l'allele A sul cromosoma X ricevuto dal padre dominerebbe sull'allele a presente sul cromosoma X ricevuto dalla madre; per lo stesso principio tutti i figli maschi dovrebbero manifestare il carattere perché riceverebbero dalla madre la X con l'allele a. Di conseguenza si tratta di un carattere recessivo autosomico. Ora vogliamo conoscere la probabilità che dall'incrocio tra gli individui III-2 e III-3 nasca un figlio che presenti il carattere. Innanzitutto dobbiamo attribuire i genotipi a tutti gli individui dell'albero. Dall'incrocio dei genitori I-1 e I-2 nasce un figlio II-4 con genotipo eterozigote Aa poiché il padre è eterozigote e la madre omozigote recessiva. Procedendo con tutti i vari genotipi possiamo dire che l'individuo III-2 può essere per $2/3$ eterozigote Aa e per $1/3$ omozigote dominante AA; stessa cosa dicasi per l'individuo III-3. Quindi, affinché dal loro incrocio possa nascere un figlio con genotipo omozigote recessivo aa, è necessario che entrambi gli individui (III-2 e III-3) siano eterozigoti e che entrambi diano un gamete che contenga l'allele a. Di conseguenza, la probabilità che nasca un figlio che manifesti il carattere è: ($2/3$ che la mamma III-2 sia Aa x $1/2$ che dia il gamete contenente l'allele a x $2/3$ che il padre III-3 sia Aa x $1/2$ che dia il gamete contenente l'allele a) = $1/9$. E perché? Dobbiamo applicare la regola del prodotto, in quanto eventi tra loro indipendenti devono verificarsi contemporaneamente affinché si verifichi l'evento in esame, e cioè che nasca un figlio omozigote recessivo. Quindi moltiplichiamo la probabilità che la madre abbia genotipo eterozigote per la probabilità che dia l'allele a al figlio per la probabilità che anche il padre possa essere eterozigote per la probabilità che dia anche lui l'allele a: sono quindi eventi tra loro indipendenti ma che devono tassativamente verificarsi contemporaneamente affinché il figlio possa avere genotipo aa e quindi manifestare il carattere.

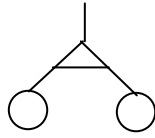
L'ANALISI DEGLI ALBERI GENEALOGICI (DISPENSA PROF. ACETO)

Lo studio di un albero genealogico è volto a determinare, quando possibile, le modalità di trasmissione di un carattere fenotipico in una famiglia. Ciò significa stabilire, nel caso in cui il carattere sia determinato da un singolo gene, se esso sia **DOMINANTE** o **RECESSIVO**, **AUTOSOMICO** o legato a un **CROMOSOMA SESSUALE**. Una volta chiarita la modalità di trasmissione, è possibile attribuire i genotipi (e la loro probabilità) ai membri della famiglia analizzata.

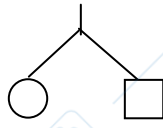
LA SIMBOLOGIA

Maschio	
Femmina	
Presenza del carattere	 
Aborto	
Sesso ignoto	
Accoppiamento tra consanguinei	
Eterozigoti	 

Gemelli monozigoti



Gemelli dizigoti



Probando



Eterozigoti



I circoletti rappresentano le femmine e i quadrati rappresentano i maschi.

I simboli completamente pieni rappresentano individui che manifestano il carattere in analisi.

I simboli pieni a metà rappresentano gli eterozigoti.

I numeri romani (I, II, III, ...) designano le generazioni, i numeri arabi (1, 2, 3, ...) specificano gli individui in una particolare generazione.

Una linea orizzontale che congiunge il simbolo di un maschio e il simbolo di una femmina indica un accoppiamento. Una doppia linea orizzontale indica un accoppiamento tra consanguinei.

Tutti i discendenti con almeno un genitore in comune formano una fratria.

I membri di una fratria sono disposti in ordine di nascita discendente, con il membro più anziano a sinistra.

Una linea diagonale tracciata attraverso un simbolo indica che il particolare individuo era deceduto al momento in cui si è costruito l'albero genealogico.

Quando non si conosce il sesso di un individuo, si usa un simbolo a forma di rombo.

I gemelli monozigoti sono indicati da una linea biforcata condotta a ciascun simbolo da una linea di un singolo individuo e con una linea orizzontale congiungente i due rami della linea biforcata.

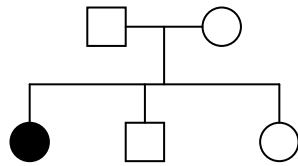
I gemelli di zigoti sono indicati con una linea biforcata condotta a ciascun simbolo da una linea di un singolo individuo.

I simboli di dimensioni ridotte indicano che l'individuo è morto durante la gestazione, nel periodo neonatale o nella prima infanzia.

Una freccia indica l'individuo (probando) che è stato la causa iniziale della costruzione dell'albero genealogico.

L'analisi di un albero genealogico deve sempre essere condotta partendo dall'osservazione dell'albero e prendendo in considerazione tutte le ipotesi possibili.

ESEMPIO I



OSSERVAZIONE DELL'ALBERO:

I genitori non presentano il carattere. Tra i figli, solo una femmina presenta il carattere.

DOMANDA:

Il carattere in questione è dominante o recessivo?

RAGIONAMENTO:

Se il carattere fosse dominante, entrambi i genitori non dovrebbero avere alleli dominanti per il locus in questione (altrimenti manifesterebbero il carattere), quindi non potrebbero trasmettere alleli dominanti alla progenie. Si può escludere che il carattere sia dominante, quindi è recessivo.

DOMANDA:

Il carattere è autosomico o legato ad un cromosoma sessuale?

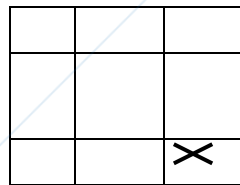
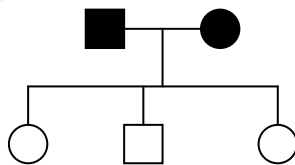
Stabiliamo ora se la trasmissione di questo carattere recessivo sia legata ad un cromosoma sessuale o a un autosoma. Si può escludere con certezza un'ereditarietà oloedrica (Y-linked), in quanto non si osserva una trasmissione del carattere dal padre ai figli maschi. Si potrebbe trattare di un carattere X-linked? Se così fosse, il padre dovrebbe avere genotipo emizigote dominante (ad esempio $X^A Y$). Poiché il padre trasmette il cromosoma X alle figlie femmine, tutte le figlie dovrebbero avere almeno un allele dominante per il locus in questione. Non sarebbe possibile, quindi, avere una figlia con il carattere.

CONCLUSIONE:

Il carattere, di conseguenza, deve essere autosomico recessivo (ignorando spiegazioni più complesse).

ATTRIBUZIONE DEI GENOTIPI:

Attribuiamo ora i genotipi ai membri di questo albero genealogico. I genitori devono necessariamente essere eterozigoti ($Aa \times Aa$), in quanto, per avere una figlia con il carattere, devono entrambi avere l'allele recessivo da poterle trasmettere. La figlia che presenta il carattere è omozigote recessiva (aa). Gli altri due figli potrebbero essere omozigoti dominanti (AA) oppure eterozigoti (Aa). E' possibile esprimere quale sia la probabilità che ciascuno sia AA oppure Aa . L'unica certezza è che questi due figli non presentano il carattere in questione (non sono aa). Escludendo la probabilità di ottenere progenie aa , qual è la probabilità di ottenere progenie AA da un incrocio tra due eterozigoti per un locus? La risposta è $1/3$. E qual è la probabilità di ottenere progenie Aa da un incrocio tra due eterozigoti? La risposta è $2/3$.

**ESEMPIO II****OSSERVAZIONE DELL'ALBERO:**

In questo esempio, entrambi i genitori presentano il carattere, mentre nessuno dei figli lo presenta.

DOMANDA:

Il carattere è dominante o recessivo?

RAGIONAMENTO:

Se il carattere fosse recessivo, i genitori dovrebbero avere entrambi gli alleli recessivi, ma, in tal caso, li trasmetterebbero alla progenie che dovrebbe quindi presentare il carattere. E', dunque, un carattere dominante.

DOMANDA:

Il carattere è autosomico o legato ad un cromosoma sessuale?

RAGIONAMENTO:

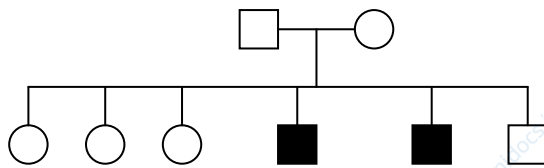
Non è evidentemente Y-linked. Potrebbe essere X-linked? Se così fosse, il padre dovrebbe essere $X^A Y$ e trasmetterebbe l'allele dominante a tutte le figlie femmine (che dovrebbero manifestare il carattere).

CONCLUSIONE:

Sulla base di quanto discusso, si tratta di un carattere autosomico dominante.

ATTRIBUZIONE DEI GENOTIPI:

Entrambi i genitori sono eterozigoti (Aa), mentre tutta la progenie è omozigote recessiva (aa).

ESEMPIO III**OSSERVAZIONE DELL'ALBERO:**

I genitori non presentano il carattere. Nella progenie, due figli maschi presentano il carattere, un maschio e le tre femmine non lo presentano.

DOMANDA:

Il carattere è dominante o recessivo?

RAGIONAMENTO:

Sulla base di quanto detto analizzando l'albero genealogico dell'ESEMPIO I, il carattere è recessivo.

DOMANDA:

IL carattere è autosomico o legato ad un cromosoma sessuale?

RAGIONAMENTO:

In questo caso l'ipotesi di ereditarietà legata al cromosoma X è valida.

ATTRIBUZIONE DEI GENOTIPI:

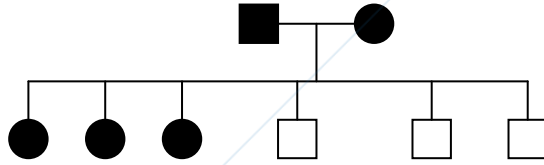
La madre potrebbe essere eterozigote $X^A X^a$, il padre $X^A Y$. Le figlie femmine potrebbero essere $X^A X^A$ (1/2 di probabilità) oppure $X^A X^a$ (1/2 di probabilità); il figlio maschio che non presenta il carattere dovrebbe essere $X^A Y$; i figli maschi con il carattere dovrebbero essere $X^a Y$.

CONCLUSIONE:

Perché dobbiamo usare il condizionale? Perché l'ipotesi di carattere autosomico è comunque valida, con i genitori eterozigoti e i figli che presentano il carattere omozigoti recessivi.

Poiché i figli affetti sono maschi, mentre le femmine non presentano il carattere, è probabile che si tratti di un carattere X-linked.

ESEMPIO IV



OSSERVAZIONE DELL'ALBERO:

I genitori presentano il carattere e, nella progenie, le tre figlie femmine lo presentano, i tre maschi non lo presentano.

DOMANDA:

Il carattere è dominante o recessivo?

RAGIONAMENTO:

Sulla base di quanto detto analizzando l'albero genealogico dell'ESEMPIO II, il carattere è dominante.

DOMANDA:

Il carattere è autosomico o legato a un cromosoma sessuale?

RAGIONAMENTO E ATTRIBUZIONE DEI GENOTIPI:

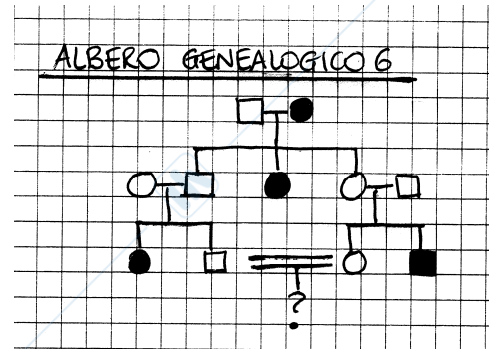
Potrebbe essere un carattere X-linked, con il padre X^aY , la madre $X^A X^a$, i figli maschi X^aY e le figlie femmine $X^A X^A$ (1/2 di probabilità) oppure $X^A X^a$ (1/2 di probabilità). È plausibile anche l'ipotesi di carattere autosomico dominante, con genitori eterozigoti, figlie omozigoti dominanti o eterozigoti e figli omozigoti recessivi.

CONCLUSIONE:

Poiché solo le figlie presentano il carattere (e lo presentano tutte), è probabile che si tratti di un carattere X-linked.

LEZIONE 6 (20/03/2015)

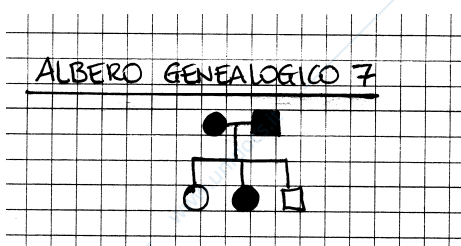
Nell'albero in figura partiamo da un maschio che non presenta il carattere e una femmina che invece lo manifesta; questi due hanno dei figli: l'individuo II-2 non manifesta il carattere, II-3 lo manifesta e II-4 non lo manifesta. L'individuo II-2 si incrocia con una femmina esterna che non manifesta il carattere, hanno una figlia che manifesta il carattere e un figlio che non lo manifesta; dall'altra parte la femmina II-4 sposa un individuo che non manifesta il carattere, hanno un figlio che lo manifesta e una figlia che non manifesta il carattere. Per prima cosa dobbiamo cercare di stabilire con quale modalità il carattere viene trasmesso di generazione in generazione. L'incrocio che ci fa capire la modalità di trasmissione è quello tra l'individuo II-4 e II-5: se



il carattere fosse dominante, i due individui sarebbero genotipicamente omozigoti recessivi, e da due omozigoti recessivi non potrà mai nascere un individuo che manifesti il carattere dominante; poiché da questa unione nascono due figli di cui il maschio III-4 manifesta il carattere allora sarà un **carattere recessivo**. Stessa riflessione per l'incrocio tra gli individui II-1 e II-2. Dobbiamo andare a vedere se questa trasmissione può essere compatibile anche con una X-linked. Non può essere legato al cromosoma X questo carattere perché, essendo il carattere recessivo, se fosse legato al cromosoma X, la femmina I-2 dovrebbe essere omozigote recessiva (X^aX^a) mentre il maschio I-1 dovrebbe essere emizigote per l'allele dominante (X^AY). Abbiamo imparato che una femmina con questo genotipo avrà tutti figli maschi che presentano il carattere, perché l'unica X nei figli maschi viene ereditata dalla madre. Poiché l'individuo II-2 non presenta il carattere, allora non può essere X-linked. Oltretutto, da un padre (I-1) che non presenta il carattere (X^AY), non può nascere nessuna femmina che manifesti il carattere, perché erediterebbero una X con l'allele recessivo dalla madre e una con l'allele dominante dal padre, e quest'ultimo dominerebbe su quello recessivo. Possiamo escludere allora che il carattere sia legato al cromosoma X, quindi il carattere sarà **autosomico**. Tutti gli individui che manifestano il carattere dovranno avere un genotipo omozigote recessivo (aa). Il maschio II-2, poiché ha avuto una figlia che manifesta il carattere recessivo, dovrà essere tassativamente eterozigote Aa, così come la sua compagna II-1. Per gli individui III-2 e III-3 non siamo in grado di attribuire con certezza il genotipo, sappiamo solo che fenotipicamente non manifestano il carattere. Entrambi questi individui provengono da un incrocio tra due genitori eterozigoti Aa, per cui avranno $1/3$ di probabilità di essere omozigoti dominanti AA e $2/3$ di probabilità di essere eterozigoti Aa. (dobbiamo ragionare in probabilità di terzi e non di quarti in quanto essendo escluso il genotipo omozigote recessivo a causa del fenotipo dominante, dobbiamo considerare solo le possibilità che possano essere AA ed Aa, cioè i 3 quadranti che restano dal quadrato i Punnett escludendo aa). Se a questo punto volessimo conoscere la probabilità che da questo incrocio nasca un figlio che presenti il carattere dovremmo applicare la regola del prodotto, moltiplicando quindi le singole probabilità per ciascuno dei due individui coinvolti, perché questi eventi indipendenti tra loro devono verificarsi contemporaneamente. Per cui la probabilità sarà: $(2/3 \times 1/2 \times 2/3 \times 1/2)$, ovvero $1/9$.

Il calcolo binomiale

Nel momento in cui gli eventi di cui vogliamo conoscere la probabilità non sono così netti come nell'esempio precedente dobbiamo effettuare delle considerazioni differenti. Guardando l'immagine notiamo che entrambi i genitori manifestano il carattere e hanno avuto tre figli, di cui una femmina manifesta il carattere e l'altro maschio e l'altra femmina non lo manifestano. Dall'analisi di questo albero stabiliamo che il carattere è dominante, perché se fosse stato un carattere recessivo, tutti e tre i figli ottenuti dall'incrocio avreb-



bero tassativamente dovuto manifestare il carattere. I due genitori sono eterozigoti, i figli che non manifestano il carattere sono omozigoti recessivi, i figli che manifestano il carattere possono essere omozigoti dominanti o eterozigoti. Potrebbe essere un carattere legato al sesso? No, perché qualora fosse X-linked, il papà I-2 avrebbe genotipo $X^A Y$ e darebbe a tutte le figlie il suo cromosoma X con l'allele dominante, di conseguenza tutte le figlie dovrebbero manifestare il carattere. Il carattere è quindi **dominante e autosomico**. Immaginiamo ora che questa coppia I-1 e I-2 voglia avere **altri 3 figli**, e immaginiamo di voler calcolare tutte le possibilità fenotipiche che possiamo avere rispetto alla nascita di questi altri tre figli. Stiamo quindi parlando di possibilità **fenotipiche**, quindi ci riferiamo esclusivamente al fenotipo dominante oppure al fenotipo recessivo. Quali sono le possibili situazioni su tre nascite? Una **prima possibilità** è che questi altri tre figli siano fenotipicamente recessivi; un'**altra possibilità** (indicata come possibilità 4) è che abbiamo tutti e tre fenotipo dominante. Abbiamo altre due possibilità: 2) due figli abbiano fenotipo recessivo e l'altro dominante; 3) un figlio abbia fenotipo recessivo e gli altri due dominante. Abbiamo esaurito tutte le possibili combinazioni fenotipiche. Stiamo esaminando eventi alternativi; cioè il fenotipo del figlio o è dominante o è recessivo, non c'è altra possibilità; sono eventi tra loro alternativi. Per ciascuno di questi eventi conosciamo la probabilità di accadimento perché abbiamo stabilito che il carattere è autosomico dominante e la probabilità che nasca un figlio fenotipicamente dominante è $\frac{3}{4}$, mentre la possibilità che nasca un figlio fenotipicamente recessivo è $\frac{1}{4}$. Nell'albero genealogico abbiamo definito il gene "B", poiché i genitori sono eterozigoti Bb, la probabilità che nasca un (B-) è $\frac{3}{4}$, mentre la possibilità che nasca un (bb) è $\frac{1}{4}$. Per la **possibilità 1** e per la **possibilità 4**, rapidamente possiamo calcolarci la probabilità di accadimento utilizzando la regola del prodotto. Nel caso 1 la probabilità che vengano fuori tre figli tutti e tre fenotipicamente recessivi è $(\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4}) = \frac{1}{64}$. Nel caso 4 la possibilità che vengano fuori tre figli tutti e tre fenotipicamente dominanti è $(\frac{3}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4}) = \frac{27}{64}$. Analizziamo la **situazione 2**: è un po' più complessa. Questa situazione si può verificare con ordini di nascita differenti: i primi 2 figli abbiano fenotipo recessivo e il terzo dominante; oppure, il primo figlio recessivo, il secondo dominante e il terzo recessivo; oppure ancora, il primo figlio dominante mentre il secondo e il terzo recessivi. Quindi, in questa situazione possiamo avere tre sottosituazioni, tre ordini di nascita differenti. Per ciascuno di questi ordini la probabilità di accadimento è sempre $(\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{3}{4}) = \frac{3}{64}$. Ma dobbiamo tenere conto di **tutti e tre** gli ordini possibili, che sono **ordini** che **tra loro si escludono vicendevolmente**, perché se si verifica uno di essi non potranno verificarsi gli altri due. Di conseguenza, per poter rispondere alla domanda "qual è la probabilità che nascano due figli recessivi e uno dominante?" dobbiamo sommare le probabilità di ciascuno di questi tre ordini; e quindi $(\frac{3}{64} + \frac{3}{64} + \frac{3}{64}) = \frac{9}{64}$. Per la **situazione 3** avevamo la possibilità che un figlio fosse fenotipicamente recessivo e gli altri due fenotipo dominante: anche in questo caso abbiamo tre possibili ordini di nascite differenti, cioè; un primo figlio recessivo, secondo e terzo dominante, oppure primo dominante, secondo recessivo e terzo dominante; oppure i primi due figli dominati e il terzo recessivo. Facendo lo stesso ragionamento fatto per la situazione 2, questa probabilità (tenendo conto dei 3 ordini possibili) sarà di $(\frac{1}{4} \times \frac{3}{4} \times \frac{3}{4}) = \frac{9}{64} \times 3 = \frac{27}{64}$. Ci viene in aiuto il **calcolo binomiale**, in particolar modo il **calcolo fattoriale** (n!). ricordiamo che per definizione, $0! = 1$. Immaginiamo di dover calcolare la probabilità su n nascite di 2 eventi tra loro alternativi che si devono verificare uno x volte e uno y volte; cioè, su n nascite, x devono essere in un modo e y in un altro. Ovviamente questi due modi diversi (x e y) sono due eventi tra loro alternativi di cui cono-

CALCOLO BINOMIALE	
$\frac{n!}{x! y!}$	$p^x q^y$

sciamo la probabilità di accadimento rispettivamente p e q. Possiamo calcolare le probabilità di accadimento applicando la formula nell'immagine. Riferendoci sempre all'incrocio dell'albero genealogico di prima, (quello del carattere autosomico dominante), ipotizziamo che la coppia volesse avere **6 figli** e ammettiamo che su questi 6 figli volesse conoscere la probabilità che **4 fossero dominanti** e **2 fossero recessivi**: sostanzialmente abbiamo $n=6$, $x=4$; $y=2$; $p=\frac{3}{4}$; $q=\frac{1}{4}$. La formuletta diventerà come descrit-

$\frac{6!}{4! 2!}$	$(\frac{3}{4})^4 (\frac{1}{4})^2$
--------------------	-----------------------------------

to nell'immagine. Possiamo fare un altro tipo di esempio: la probabilità di nascita di maschi o femmine. Supponiamo quindi che una coppia voglia fare sei figli e vuole conoscere la probabilità di avere almeno 4 figlie femmine (almeno 4): ragioniamo sulla possibilità di avere 4 figlie e due figli, e poi riflettiamo sul significato di "almeno 4 figlie". Domanda: in un incrocio qual è la probabilità di avere un figlio maschio o una femmina? Il 50% maschio e il 50% femmine, perché $\frac{1}{2}$ è la probabilità che il padre dia il cromosoma X e $\frac{1}{2}$ la probabilità che dia il cromosoma Y, mentre per la madre la probabilità di dare il cromosoma X è 1, perché ha solo quel tipo di cromosoma. Volendo utilizzare la formula del calcolo binomiale, in questo caso: $n=6$; $x=4$; $y=2$; $p=1/2$; $q=1/2$. Sostituendo i valori nella formula otteniamo il calcolo descritto in figura. Svolgendo i calcoli potremo dire che la probabilità di nascita di 4 femmine e 2 maschi è uguale a $2/64$. La domanda iniziale era differente: qual è la probabilità di avere almeno 4 femmine su sei figli, per cui dobbiamo prendere in considerazione anche la possibilità di nascita di 5 femmine e 1 maschio e la possibilità di nascita di 6 femmine e 0 maschi perché tutte e 3 queste situazioni descritte rispecchiano la nascita di "almeno 4 femmine", quindi un valore al di sotto di quattro femmine non ci interessa, ma da 4 a salire ad un massimo di 6 sì. Dobbiamo quindi considerare la situazione di 5 femmine e 1 maschio, e la situazione 6 femmine e 0 maschi. La probabilità totale di questi accadimenti sarà data dalla **somma** di queste probabilità: $22/64$.

$$\frac{6!}{4! 2!} \left(\frac{1}{2}\right)^4 \left(\frac{1}{2}\right)^2$$

Estensioni del mendelismo:

Pleiotropia

Cosa si intende per pleiotropia? Si intende avere a che fare con un gene la cui espressione (manifestazione fenotipica) non influenza un solo carattere, ma una serie di caratteri. Un esempio classico di carattere pleiotropico, per quanto riguarda la nostra specie è una patologia chiamata **sindrome di Marfan** che è una malattia a trasmissione autosomica dominante, determinata dall'alterazione di un gene che codifica una proteina chiamata **fibrillina**, che non funziona bene nelle persone affette dalla sindrome di Marfan. Il non funzionamento della fibrillina determina a livello fenotipico alterazioni a carico di vari tessuti e vari organi; quindi non vediamo solo un fenotipo alterato, ma numerosi fenotipi: si hanno problemi oculari, problemi al sistema circolatorio, al sistema respiratorio. Sostanzialmente una manifestazione pleiotropica è un effetto fenotipico multiplo, cioè su vari fenotipi, determinato da un solo gene.

Questa è una situazione che non rispecchia esattamente il comportamento mendeliano, nel quale un fattore (un gene) influenza una manifestazione fenotipica. Dobbiamo renderci conto che la manifestazione di un fenotipo non dipende (nella stragrande maggioranza dei casi) esclusivamente dalla situazione genica di un singolo gene, ma dall'interazione dell'individuo con l'ambiente e dall'interazione da prodotti di geni differenti, che possono influenzare un unico fenotipo: la situazione a livello genomico è quindi piuttosto complessa per avere la manifestazione del fenotipo finale di un individuo. Un primo esempio molto semplice di estensione del mendelismo è la cosiddetta **dominanza incompleta** o **semidominanza**. Noi abbiamo imparato dal principio della dominanza di Mendel che il fenotipo dominante si manifesta in due genotipi: l'omozigote dominante e l'eterozigote; mentre l'omozigote recessivo ha un altro fenotipo. Quindi, a tre genotipi possibili per un **locus biallelico** corrispondono due fenotipi possibili: il dominante e il recessivo. Nei caratteri a dominanza incompleta o semidominanza non accade questo, ma l'eterozigote non ha lo stesso fenotipo dell'omozigote dominante, presenta un fenotipo interme-




Fenotipo	Genotipo	Quantità di prodotto genico
 Rosso	WW	2x
 Rosa	Ww	x
 Bianco	ww	0

Figura 4.1 ► Base genetica del colore del fiore nella bocca di leone. L'allele *W* è parzialmente dominante su *w*. Differenze tra i fenotipi possono essere dovute a differenze nella quantità di prodotto specificato dall'allele *W*.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

dio tra il fenotipo presentato dall'omozigote dominante e il fenotipo presentato dall'omozigote recessivo. Generalmente quando si parla di semidominanza si fa riferimento a geni che influenzano caratteri la cui manifestazione fenotipica dipende dalla dose di un certo prodotto, quindi l'omozigote dominante avendo due copie dell'allele dominante produrrà una quantità pari a 2 del prodotto dell'allele A, perché nel suo genotipo ne ha due copie AA; l'omozigote recessivo non ha l'allele A per cui non ne fa proprio di prodotto A; l'eterozigote ha una sola copia dell'allele A, quindi ha la metà del prodotto dell'allele A rispetto al genotipo AA, e questo si riflette in un fenotipo diluito rispetto a quello dell'omozigote dominante. Se volessimo fare un esempio potremmo fare riferimento al colore del fiore della **bocca di leone**, che schematizzandola può presentarsi in tre fenotipi differenti: un rosso intenso, un rosa e un bianco. Il rosso intenso corrisponde al genotipo omozigote dominante, il bianco al genotipo omozigote recessivo, il rosa che è una diluizione tra i due fenotipi descritti corrisponde al genotipo eterozigote. Questo è valido per molti caratteri per i quali a tre genotipi corrispondono 3 fenotipi differenti, quindi non vale per questi caratteri la regola della manifestazione dello stesso fenotipo da parte dell'omozigote dominante e dell'eterozigote.

Un esempio di alleli multipli, co-dominanza e interazioni geniche: I gruppi sanguigni

Un ulteriore esempio delle estensioni del mendelismo è rappresentato dal sistema ABO di classificazione dei gruppi sanguigni. I gruppi sanguigni della nostra specie possono essere classificati in qualche modo. Dal punto di vista storico, la scoperta e la definizione del sistema dei gruppi sanguigni risale agli inizi del 1900. Un medico, che svariati anni dopo ha avuto il Nobel per la medicina, di nome Karl Landsteiner si era prefissato di capire quale fosse la base di un fenomeno importante: in alcune patologie umane c'è bisogno di fare alcune trasfusioni di sangue (nelle forme di anemia, dopo interventi chirurgici) da un individuo donatore ad uno ricevente; in alcuni casi questa pratica salvava la vita al ricevente, in altri casi invece la trasfusione generava una reazione sistema (diffusa in tutto l'organismo) violenta ed incontrollata che portava alla morte. Landsteiner si prefissò di studiare perché in alcuni casi la trasfusione aveva un esito positivo e in altri un fenomeno deleterio. Mescolò dapprima diversi sieri di sangue animali tra loro in vitro, e successivamente ripeté l'esperimento utilizzando diversi sieri di sangue umano (quello dei suoi collaboratori) e notava che in alcuni casi avveniva una reazione di **agglutinazione**, cioè, le componenti cellulari del sangue formavano dei precipitati visibili. Questa reazione è di tipo antigene-anticorpo, una reazione immunitaria che avviene perché il fenotipo del nostro sangue può essere differente. Esistono tanti sistemi di gruppi sanguigni, ma ci soffermiamo su quello **ABO** e quello **Rh** perché sono quelli che hanno un potere immunogeno maggiore. Nel corpo umano circolano all'incirca 6 litri di sangue che è un tessuto costituito da una componente cellulare eterogenea, che possiamo raggruppare in tre ordini: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. I globuli rossi hanno questa particolare forma a

- Karl Landsteiner scoprì che la emo-agglutinazione è una **reazione immunitaria** che si verifica quando in una trasfusione di sangue il ricevente possiede anticorpi contro le cellule ematiche del donatore.
- Gli studi di Landsteiner hanno reso possibile la determinazione dei **gruppi sanguigni**, rendendo le trasfusioni più sicure.
- Grazie alle sue scoperte, nel 1930 Landsteiner ricevette il **premio Nobel** per la Fisiologia e la Medicina.

La reazione di emo-agglutinazione

- Nel corpo di un essere umano adulto circolano 4-6 litri di sangue.
- Il sangue è un tessuto costituito da vari tipi di cellule che circolano in un fluido detto plasma.
- I **globuli rossi** trasportano, grazie all'emoglobina, l'ossigeno ai tessuti.
- I **globuli bianchi** combattono le infezioni.
- Le **piastrine** favoriscono la coagulazione.
- Il **plasma** contiene sali e vari tipi di proteine.

lente concava, alla maturità sono enucleati nella nostra specie, sono deputati al trasporto dell'emoglobina; i globuli bianchi sono una frazione molto eterogenea di cellule nucleate che sono coinvolte nel nostro sistema immunitario, in particolare sono cellule che producono anticorpi, le immunoglobuline, nel momento in cui vengono a contatto e riconoscono qualcosa di estraneo all'organismo stesso, ovvero quello che tecnicamente viene chiamato **non-self**, cioè, non sé; qualcosa di diverso contro cui bisogna reagire producendo queste molecole (Ig) che hanno una specificità, si legano all'antigene (alla molecola che viene riconosciuta come estranea) e una volta avvenuta la reazione immunitaria si innescano una serie di altri processi che, (se il sistema immunitario non è danneggiato) riescono a tenere a bada e ad eliminare quell'agente estraneo. Le piastrine invece rappresentano la componente cellulare coinvolta nei fenomeni di coagulazione del sangue. Questi tre ordini cellulari si trovano in una componente plasmatica, una componente liquida contenente sali e alcuni tipi di proteine. Le differenze che esistono tra il sangue dei vari organismi riguardano la presenza di particolari antigeni presenti sulla superficie dei globuli rossi e anticorpi circolanti nella componente plasmatica del sangue. A seconda del fenotipo presentato rispetto al sistema ABO si hanno determinati antigeni sulla superficie dei globuli rossi e determinati anticorpi circolanti. Un'altra caratteristica fondamentale del fenotipo che riguarda il sistema ABO dei gruppi sanguigni è la **base ereditaria**, ovvero viene trasmesso dai genitori ai figli. Sono noti più di 20 sistemi differenti di classificazione dei gruppi sanguigni. Per il sistema **ABO** possiamo avere 4 fenotipi possibili: un individuo può essere di fenotipo A o gruppo A, di fenotipo B o

- Nella specie *Homo sapiens* sono noti più di 20 sistemi di gruppi sanguigni con base genetica.
- I sistemi **ABO** e **Rhesus (Rh)** sono i più importanti e i più conosciuti.
- Non tutti i gruppi sanguigni sono compatibili. La mescolanza di sangue appartenente a gruppi sanguigni incompatibili genera una reazione di agglutinazione, estremamente pericolosa *in vivo*.

gruppo B, di fenotipo AB o gruppo AB, di fenotipo O o gruppo O. Ovviamente ciascuno di questi fenotipi dipende dalla costituzione genetica particolare. Vediamo la base della **incompatibilità trasfusionale**: perché un individuo di gruppo A è ritenuto appunto di gruppo A? quali sono le caratteristiche che ci consentono di attribuire l'appartenenza al gruppo A, B, AB e O? Un individuo di gruppo A sulla superficie dei globuli rossi presenta antigeni di tipo A e in circolo presenta anticorpi anti-B: vuol dire che in circolo ha degli anticorpi che sono proteine, che se notano da qualche parte l'antigene B lo riconoscono, si legano ad esso e fanno avvenire la reazione di emoagglutinazione. Al contrario, gli individui di gruppo B presentano sulla superficie dei globuli rossi antigeni di tipo B e in circolo hanno anticorpi anti-A; quindi questi anticorpi anti-A all'interno dell'individuo di gruppo B non scatenano nessuna reazione immunitaria perché gli antigeni sui globuli rossi sono di tipo B, ma se l'individuo di tipo B viene a contatto con antigeni di tipo A, gli anticorpi anti-A in circolo reagiscono generando l'emoagglutinazione. Gli individui di tipo AB sulla superficie dei globuli rossi presentano sia gli antigeni di tipo A che gli antigeni di tipo B e quindi in circolo non possono avere né anticorpi anti-A né quelli anti-B, altrimenti scatterebbe una reazione autoimmune; negli individui di gruppo O la situazione è speculare rispetto a quella del gruppo AB, e cioè, sulla superficie dei globuli rossi non sono presenti né antigeni A né antigeni B e in circolo sono presenti anticorpi anti-A e anticorpi anti-B. Un indivi-

- Le differenze del sangue umano di individui diversi sono dovute alla presenza o all'assenza di molecole: **antigeni** e **anticorpi**.
- Gli antigeni sono presenti sulla superficie dei globuli rossi e gli anticorpi si trovano nel plasma.
- Gli individui hanno differenti tipi e combinazioni di queste molecole.
- Il gruppo sanguigno di appartenenza dipende da quello dei genitori: **carattere ereditario**.

Gruppo A

Gli individui di gruppo A hanno **antigeni A** sulla superficie dei globuli rossi e **anticorpi anti-B** nel plasma.

Gruppo B

Gli individui di gruppo B hanno **antigeni B** sulla superficie dei globuli rossi e **anticorpi anti-A** nel plasma.

Gruppo AB

Gli individui di gruppo AB hanno **antigeni A** e **antigeni B** sulla superficie dei globuli rossi e **NON** hanno né **anticorpi anti-A** né **anticorpi anti-B** nel plasma.

Gruppo O

Gli individui di gruppo O **NON** hanno né **antigeni A** né **antigeni B** sulla superficie dei globuli rossi e hanno **anticorpi anti-A** e **anticorpi anti-B** nel plasma.

duo di gruppo 0 non ha sulla superficie dei globuli rossi né antigeni A né B, quindi il sangue di un individuo di gruppo 0 può essere utilizzato per fare trasfusioni sia negli individui di gruppo 0, sia degli individui di tutti gli altri gruppi sanguigni perché non hanno antigeni sui globuli rossi che

- Antigeni "A-like" e "B-like" sono prodotti da alcuni microrganismi. Gli individui che non riconoscono come **self** uno di questi antigeni (o entrambi) produrranno anticorpi contro di essi.



Virus influenzale



Escherichia coli

- Questi anticorpi reagiranno anche contro i rispettivi antigeni umani (A e B) in seguito a trasfusioni non controllate.

possono scatenare una reazione immunitaria; per cui il gruppo 0 è detto **donatore universale**. Ma, i poveri individui di gruppo 0 possono ricevere solo dagli individui di gruppo 0; gli individui di gruppo A possono donare ad individui di gruppo A e di gruppo AB; gli individui di gruppo B possono donare ad individui di gruppo B e AB, gli individui di gruppo AB possono donare solo ad individui di gruppo AB, ma possono ricevere da A, da B e da 0; quindi sono i cosiddetti **accettori universali**. Com'è possibile che negli individui di gruppo A ci sono anticorpi anti-B circolanti, com'è possibile che in individui di gruppo B ci siano anticorpi anti-A circolanti?

da dove vengono fuori questi anticorpi? Com'è possibile che negli individui di gruppo 0 ci siano anticorpi anti-A e anticorpi anti-B circolanti? Abbiamo detto che gli anticorpi sono proteine prodotte dai linfociti nel momento in cui l'individuo viene a contatto con un particolare antigene e sappiamo anche che il sistema immunitario alla nascita non è completamente funzionante (il sistema immunitario di un neonato comincia a funzionare alla nascita e l'allattamento garantisce la trasmissione delle immunoglobuline dalla madre al neonato): la presenza di questi anticorpi fa parte dell'**immunità innata**, che non è realmente innata in quanto in natura esistono vari microrganismi, varie sostanze, pollini, virus, batteri molto comuni e molto diffusi che presentano sulla loro superficie delle molecole che sono molto simili agli antigeni A e agli antigeni B (molecole A-like e molecole B-like) ed è praticamente impossibile che non si venga a contatto con questi tipi di antigeni, che portano alla formazione di questi anticorpi anti-A e anti-B; che reagiscono in maniera precisa e perfetta con gli antigeni A e gli antigeni B della superficie dei globuli rossi. Qual è la base genetica secondo cui il fenotipo di un gruppo sanguigno è ereditabile? Ci deve essere un gene responsabile del fenotipo. Esiste un locus autosomico, posto sul **cromosoma 9 umano**, che si chiama **I**, locus I. Perché il locus I contiene al suo interno varie estensioni del mendelismo? Perché è un gene per il quale non esistono solo 2 forme alleliche alternative: per tutti gli esempi visti in precedenza per i caratteri mendeliani, per il colore dell'occhio di Drosophila, abbiamo sempre analizzato caratteri determinati dalla coesistenza di 2 forme alleliche alternative presenti in una sola forma negli omozigoti o entrambe presenti nell'eterozigote. In realtà per la maggior parte dei geni non è vero che esistono due forme alleliche alternative, ne possono esistere più di due: negli organismi diploidi sono presenti in due copie per volta; quelli che esistono sono molti, ma nei diploidi ce ne sono solo due. Il **locus I** è proprio un esempio di locus **con alleli multipli**, cioè ha più di due forme alleliche alternative e ciascuna delle due forme alleliche viene ereditata una dal padre e una dalla madre. Le **relazioni di dominanza** tra i fenotipi possibili dei gruppi sanguigni sono in alcuni semplici, in altri casi ci danno un esempio di un altro tipo di estensioni del mendelismo. Il fenotipo A è dominante rispetto al fenotipo 0; il fenotipo B è dominante rispetto al fenotipo 0; ma A e B tra loro sono **codominanti**: vuol dire che la presenza in contemporanea nello stesso genotipo di un allele che determina il fenotipo A e di un allele che determina il fenotipo B porta alla manifestazione di entrambi i fenotipi; da non confondere con la **semidominanza**. Nella semidominanza l'eterozigote ha un fenotipo diverso dall'omozigote dominante e dall'omozigote recessivo, ha un fenotipo intermedio; nel caso della codominanza, invece, si ha la manifestazione di entrambi i fenotipi nell'eterozigote. Se una madre che ha due copie dell'allele che determina il fenotipo A e un padre è omozigote per l'allele che determina il fenotipo B, dalla loro unione,

- Il locus che controlla il sistema AB0 è **autosomico** (non è localizzato sui cromosomi sessuali).
- Il locus che controlla il sistema AB0 si chiama locus **I** ed è localizzato sul **cromosoma 9**.
- Il fenotipo **A** e il fenotipo **B** sono **dominanti** rispetto al fenotipo **0**.
- I fenotipi **A** e **B** sono **co-dominanti**.
- Ogni individuo ha **due alleli** per il locus **I**, uno di origine **materna** e uno di origine **paterna**.

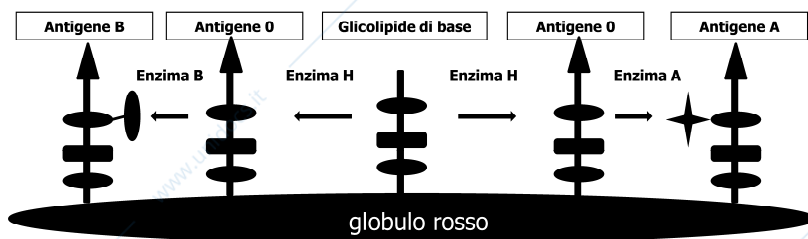
il figlio che viene fuori eredita una copia cromosomica dalla madre contenente l'allele A e una copia cromosomica dal padre contenente l'allele B, quindi il neoindividuo si esprimeranno contemporaneamente l'allele che determina il fenotipo A e l'allele che determina il fenotipo B. Quindi il figlio avrà fenotipo AB. La nomenclatura esatta degli alleli del locus I è semplice: I^A è l'allele che determina il fenotipo A, I^B è l'allele che determina il fenotipo B, I^0 è l'allele responsabile del fenotipo 0 che non codifica una

proteina funzionale, cosa che invece viene fatta dall'allele A e dall'allele B. L'allele I^A e l'allele I^B codificano una classe di enzimi (proteine con attività catalitica, catalizzano un certo tipo di reazione) che sono **glicosiltrasferasi**, enzimi in grado di catalizzare l'aggiunta di uno zucchero da qualche parte. E le glicosiltrasferasi codificate dall'allele I^A e I^B aggiungono uno zucchero differente; l'allele I^0 invece, non riesce a codificare una glicosiltrasferasi funzionale. Nell'immagine abbiamo una rappresentazione della membrana di un globulo rosso e di quello che accade in presenza della glicosiltrasferasi A o della glicosiltrasferasi B. Sulla membrana dei globuli rossi c'è un glicolipide di base che sporge nell'ambiente extracellulare con una coda di tre zuccheri (2 molecole di galattosio e una N-acetilglucosammina): questo glicolipide di base così come si presenta non ha alcuna proprietà antigenica, cioè il sistema immunitario dinanzi a questa situazione non ha alcuna reazione in quanto non lo riconosce. L'**enzima H** è una glicosiltrasferasi diversa sia dalla glicosiltrasferasi A che dalla glicosiltrasferasi B, talmente diversa che viene codificata da un altro gene (l'enzima H non è codificato dal locus I, quindi né dall'allele I^A né dall'allele I^B , ma da un altro gene posto su un altro cromosoma che si chiama **gene H**). Noi abbiamo tutti e due i geni perché la glicosiltrasferasi codificata dal gene H attacca un **fucosio** al glicolipide di base. Anche la presenza del fucosio sul glicolipide di base non conferisce al glicolipide attività antigenica. Se però non viene aggiunta questa molecola di fucosio al glicolipide di base (ovvero se l'enzima H non funziona nella maniera corretta) non può formarsi né l'antigene A né l'antigene B, cioè, la glicosiltrasferasi A o la glicosiltrasferasi B se non trovano un fucosio montato sul glicolipide di base non riescono a funzionare. Quindi, perchè la glicosiltrasferasi di tipo A e quella di tipo B possano svolgere la loro funzione, cioè attaccare lo zucchero giusto al glicolipide di base affinché si formi l'antigene A o l'antigene B o entrambi, è necessaria la preventiva aggiunta di fucosio al glicolipide di base. Questa aggiunta di fucosio è ad opera sempre della glicosiltrasferasi, ma codificata da un altro gene. Una volta che il fucosio si è legato al glicolipide di base (o anche chiamato antigene 0) l'enzima A riesce ad attaccare una molecola di N-acetilgalattosammina al glicolipide di base che ora è chiamato **antigene A**; oppure l'enzima B riesce ad attaccare un'altra molecola di galattosio che porta alla formazione dell'**antigene B**. Ovviamente se è presente solo l'enzima A ci



Gli antigeni dei gruppi sanguigni presenti sugli eritrociti derivano dalla modificazione di **glicolipidi** di membrana ad opera di differenti **glicosiltrasferasi**:

- l'**enzima H** aggiunge **fucosio** all'estremità del glicolipide di base
- l'**enzima A** (codificato dall'allele I^A) aggiunge **N-acetil-galattosammina** al galattosio terminale del glicolipide
- l'**enzima B** (codificato dall'allele I^B) aggiunge un **galattosio** al galattosio terminale del glicolipide



Gli enzimi A e B sono glicosiltrasferasi

Sulla membrana dei globuli rossi c'è un glicolipide di base che sporge nell'ambiente extracellulare con una coda di tre zuccheri (2 molecole di galattosio e una N-acetilglucosammina): questo glicolipide di base così come si presenta non ha alcuna proprietà antigenica, cioè il sistema immunitario dinanzi a questa situazione non ha alcuna reazione in quanto non lo riconosce. L'**enzima H** è una glicosiltrasferasi diversa sia dalla glicosiltrasferasi A che dalla glicosiltrasferasi B, talmente diversa che viene codificata da un altro gene (l'enzima H non è codificato dal locus I, quindi né dall'allele I^A né dall'allele I^B , ma da un altro gene posto su un altro cromosoma che si chiama **gene H**). Noi abbiamo tutti e due i geni perché la glicosiltrasferasi codificata dal gene H attacca un **fucosio** al glicolipide di base. Anche la presenza del fucosio sul glicolipide di base non conferisce al glicolipide attività antigenica. Se però non viene aggiunta questa molecola di fucosio al glicolipide di base (ovvero se l'enzima H non funziona nella maniera corretta) non può formarsi né l'antigene A né l'antigene B, cioè, la glicosiltrasferasi A o la glicosiltrasferasi B se non trovano un fucosio montato sul glicolipide di base non riescono a funzionare. Quindi, perchè la glicosiltrasferasi di tipo A e quella di tipo B possano svolgere la loro funzione, cioè attaccare lo zucchero giusto al glicolipide di base affinché si formi l'antigene A o l'antigene B o entrambi, è necessaria la preventiva aggiunta di fucosio al glicolipide di base. Questa aggiunta di fucosio è ad opera sempre della glicosiltrasferasi, ma codificata da un altro gene. Una volta che il fucosio si è legato al glicolipide di base (o anche chiamato antigene 0) l'enzima A riesce ad attaccare una molecola di N-acetilgalattosammina al glicolipide di base che ora è chiamato **antigene A**; oppure l'enzima B riesce ad attaccare un'altra molecola di galattosio che porta alla formazione dell'**antigene B**. Ovviamente se è presente solo l'enzima A ci

Le relazioni di dominanza per i tre alleli del locus I sono:

- I^A è dominante su I^0
- I^B è dominante su I^0
- I^A e I^B sono co-dominanti

Fenotipo	Genotipi possibili	Antigeni presenti sugli eritrociti	Anticorpi presenti nel plasma
A	$I^A I^A$ o $I^A I^0$	A	Anti-B
B	$I^B I^B$ o $I^B I^0$	B	Anti-A
AB	$I^A I^B$	A e B	nessuno
0	$I^0 I^0$	nessuno	Anti-A e Anti-B

La base genetica del sistema ABO

Ovviamente se è presente solo l'enzima A ci

sarà solo l'aggiunta di N-acetilgalattosammina e quindi formazione sulla superficie dei globuli rossi solo dell'antigene A; in presenza solo dell'enzima B ci sarà la formazione dei soli antigeni B; in presenza sia dell'enzima A che dell'enzima B si produrranno sia antigeni A, sia antigeni B sulla superficie del globulo rosso. Quindi capiamo che un individuo di gruppo A presenta solo la glicosiltrasferasi di tipo A e quindi riuscirà a formare sulla superficie dei globuli rossi solo gli antigeni A, un individuo di tipo B presenta solo la glicosiltrasferasi di tipo B e formerà sulla superficie dei globuli rossi solo l'antigene B; un individuo di gruppo AB ha in circolo sia l'enzima A che l'enzima B, di conseguenza riesce a formare sulla superficie dei suoi globuli rossi sia antigeni A che antigeni B; un individuo di gruppo 0 non ha una glicosiltrasferasi funzionale né di tipo A né di tipo B, quindi non forma né antigeni A né antigeni B sulla superficie dei globuli rossi. Il fenotipo A viene presentato sia da individui con genotipo omozigote $I^A I^A$ che da individui eterozigoti $I^A I^0$; un fenotipo B viene presentato sia da individui con genotipo omozigote $I^B I^B$, che da individui eterozigoti $I^B I^0$; il fenotipo AB viene presentato da un solo tipo di genotipo $I^A I^B$; il fenotipo 0 è determinato da individui con genotipo $I^0 I^0$. Negli individui di gruppo A avremo antigeni sui globuli rossi di tipo A e anticorpi anti-B; negli individui B antigeni B sui globuli rossi e anticorpi anti-A; negli individui AB antigeni A e antigeni B sui globuli rossi e nessun anticorpo; negli individui 0 non avremo né antigeni A né B e avremo anticorpi anti-A e anticorpi anti-B. L'allele I^A è dominante sull'allele I^0 ; l'allele I^B è dominante sull'allele I^0 ; $I^A I^B$ sono fra loro codominanti. Per questo sistema **triallelico** sono possibili sei differenti genotipi, 4 differenti fenotipi. Il sistema AB0 è un esempio di interazione genica: né l'enzima A né l'enzima B riescono a funzionare se a monte della loro azione è mancata l'azione dell'enzima H (che aggiunge un fucosio al glicolipide di base) questa situazione di può verificare in una situazione particolare, il **fenotipo Bombay**. Si chiama così perché è stato descritto per la prima volta a Bombay, ed è un fenotipo anomalo: un individuo che geneticamente (a causa del genotipo dei suoi genitori) non poteva essere di gruppo 0 e invece, facendo il test di emoagglutinazione, il suo sangue non agglutinava né con il siero contenente anticorpi anti-A né con il siero contenente anticorpi anti-B, per cui si deduceva che questo individuo fosse di gruppo 0, ma non poteva esserlo dati i genotipi dei genitori. Ciò che si è capito in quella situazione è stata proprio l'esistenza di questo gene H, che codifica per l'enzima H, e che in questo individuo di fenotipo Bombay era in omozigosi recessiva: il locus H presenta due forme alleliche alternative H/h con dominanza completa, quindi omozigote HH ed eterozigote Hh hanno fenotipo dominante che si manifesta nella produzione di enzima H funzionale che aggiunge fucosio. Gli omozigoti hh invece, non producono enzima H funzionale e quindi non aggiungono il fucosio al glicolipide di base, per cui anche in presenza di una situazione genotipica per il locus $I^A I^B$; non si ha né la formazione di antigeni A né di antigeni B sulla superficie dei globuli rossi, proprio perché in una situazione di omozigosi recessiva hh del locus H non si ha la produzione di enzima H funzionale. Questa ragazza in cui è stato descritto per la prima volta il fenotipo Bombay era proprio omozigote recessiva per il locus H ed era figlia di due individui eterozigoti per il locus H, da cui la probabilità di avere un figlio omozigote recessivo (di Bombay) è del 25% (1/4).

Gameti	I^A	I^B	I^0	♂
I^A	$I^A I^A$ Gruppo A	$I^A I^B$ Gruppo AB	$I^A I^0$ Gruppo A	
I^B	$I^A I^B$ Gruppo AB	$I^B I^B$ Gruppo B	$I^B I^0$ Gruppo B	
I^0	$I^A I^0$ Gruppo A	$I^B I^0$ Gruppo B	$I^0 I^0$ Gruppo 0	

♀

Genitori e figli

presentato sia da individui con genotipo omozigote $I^A I^A$ che da individui eterozigoti $I^A I^0$; un fenotipo B viene presentato sia da individui con genotipo omozigote $I^B I^B$, che da individui eterozigoti $I^B I^0$; il fenotipo AB viene presentato da un solo tipo di genotipo $I^A I^B$; il fenotipo 0 è determinato da individui con genotipo $I^0 I^0$. Negli individui di gruppo A avremo antigeni sui globuli rossi di tipo A e anticorpi anti-B; negli individui B antigeni B sui globuli rossi e anticorpi anti-A; negli individui AB antigeni A e antigeni B sui globuli rossi e nessun anticorpo; negli individui 0 non avremo né antigeni A né B e avremo anticorpi anti-A e anticorpi anti-B. L'allele I^A è dominante sull'allele I^0 ; l'allele I^B è dominante sull'allele I^0 ; $I^A I^B$ sono fra loro codominanti. Per questo sistema **triallelico** sono possibili sei differenti genotipi, 4 differenti fenotipi. Il sistema AB0 è un esempio di interazione genica: né l'enzima A né l'enzima B riescono a funzionare se a monte della loro azione è mancata l'azione dell'enzima H (che aggiunge un fucosio al glicolipide di base) questa situazione di può verificare in una situazione particolare, il **fenotipo Bombay**. Si chiama così perché è stato descritto per la prima volta a Bombay, ed è un fenotipo anomalo: un individuo che geneticamente (a causa del genotipo dei suoi genitori) non poteva essere di gruppo 0 e invece, facendo il test di emoagglutinazione, il suo sangue non agglutinava né con il siero contenente anticorpi anti-A né con il siero contenente anticorpi anti-B, per cui si deduceva che questo individuo fosse di gruppo 0, ma non poteva esserlo dati i genotipi dei genitori. Ciò che si è capito in quella situazione è stata proprio l'esistenza di questo gene H, che codifica per l'enzima H, e che in questo individuo di fenotipo Bombay era in omozigosi recessiva: il locus H presenta due forme alleliche alternative H/h con dominanza completa, quindi omozigote HH ed eterozigote Hh hanno fenotipo dominante che si manifesta nella produzione di enzima H funzionale che aggiunge fucosio. Gli omozigoti hh invece, non producono enzima H funzionale e quindi non aggiungono il fucosio al glicolipide di base, per cui anche in presenza di una situazione genotipica per il locus $I^A I^B$; non si ha né la formazione di antigeni A né di antigeni B sulla superficie dei globuli rossi, proprio perché in una situazione di omozigosi recessiva hh del locus H non si ha la produzione di enzima H funzionale. Questa ragazza in cui è stato descritto per la prima volta il fenotipo Bombay era proprio omozigote recessiva per il locus H ed era figlia di due individui eterozigoti per il locus H, da cui la probabilità di avere un figlio omozigote recessivo (di Bombay) è del 25% (1/4).

Il fenotipo Bombay: un esempio di interazione genica

- In alcuni rari casi, il fenotipo del gruppo sanguigno può essere 0 anche se nel genotipo sono presenti alleli I^A e/o I^B .
- Questo particolare fenotipo, detto Bombay, è dovuto ad una mutazione in omozigosi recessiva del locus $H(hh)$.
- Il locus H è localizzato su un cromosoma differente dal locus I e codifica la glicosiltrasferasi H che catalizza l'aggiunta di una molecola di fucosio al glicolipide di base presente sulla membrana degli eritrociti, rendendolo suscettibile all'azione delle glicosiltrasferasi A e/o B.
- In assenza di una glicosiltrasferasi H funzionale, al glicolipide di base non possono essere aggiunti altri zuccheri, indipendentemente dalla presenza di glicosiltrasferasi A e/o B funzionali, determinando un fenotipo di gruppo sanguigno assimilabile a quello 0.
- L'incrocio tra due individui $I^A I^B Hh \times I^A I^B Hh$ può quindi generare prole di gruppo 0. Qual è la probabilità di questo evento?

LEZIONE 7 (24/03/2015)

Nell'ambito del sistema AB0 dei gruppi sanguigni possiamo fare delle previsioni riguardo la paternità di un certo individuo (il discorso non è sempre valido a causa della probabilità del fenotipo Bombay). Considerando quindi individui che non sono omozigoti recessivi per il locus H (hh), che sono quindi in grado di sintetizzare una glicosiltrasferasi H, possiamo analizzare la situazione in figura. Abbiamo una madre di fenotipo A che ha un figlio di fenotipo 0 e abbiamo due possibili padri; il padre 1 ha fenotipo AB, il padre 2 ha fenotipo B: vogliamo capire non chi è il padre (col sistema AB0 non si possono fare test di attribuzione di paternità, ma di esclusione di paternità; si può escludere che un certo individuo sia il genitore di un figlio in questione, ma non si può invece attribuire ad un individuo la reale paternità), ma chi di sicuro non può esserlo. Nel nostro caso il figlio, che presenta fenotipo 0, di sicuro deve avere genotipo (I^0I^0) perché sappiamo che questo è l'unico genotipo che può determinare il fenotipo 0; la madre di questo figlio è fenotipicamente di gruppo A, quindi il suo genotipo non potrebbe mai essere (I^AI^A) perché altrimenti non avrebbe potuto avere un figlio con fenotipo 0 in quanto l'allele (I^A) è dominante su quello (I^0); di conseguenza dovrà contenere nel suo genotipo un allele (I^0) che di sicuro ha dato al figlio, la madre sarà quindi genotipicamente (I^AI^0). Un altro genotipo certo che possiamo attribuire è quello del padre 1 che presenta fenotipo AB, di conseguenza il suo genotipo sarà (I^AI^B). Sul padre 2 che è fenotipicamente di gruppo B abbiamo comunque il dubbio che possa avere genotipo (I^BI^B) o (I^BI^0). A questo punto possiamo dire che sicuramente il padre 1 non può essere il padre di questo figlio perché, avendo nel suo genotipo un allele (I^A) e un allele (I^B) non avrà nessun allele (I^0). Noi stiamo quindi cercando un padre che abbia l'allele (I^0) nel suo genotipo che abbia trasmesso al figlio. Possiamo escludere con certezza che il padre 1 sia quello biologico, mentre il padre 2 di gruppo B potrebbe tranquillamente esserlo (se è eterozigote I^BI^0).

Madre gruppo A
 Figlio gruppo 0
 Probabile padre 1 gruppo AB
 Probabile padre 2 gruppo B

Possiamo attribuire o escludere la paternità?

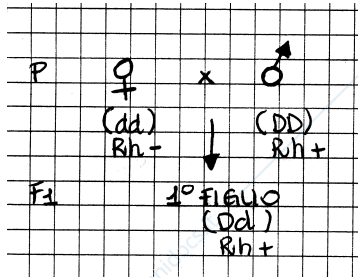
Individuo	Fenotipo	Genotipo	Esito
Madre	A	I^AI^0	
Figlio	0	I^0I^0	
Padre 1	AB	I^AI^B	NO
Padre 2	B	I^BI^0	SI

Un semplice test di paternità

Il sistema Rh

Nella lezione precedente abbiamo detto che oltre al sistema AB0, un altro che ci interessa perché presenta delle ricadute importanti non solo dal punto di vista trasfusionale ma anche per le sue implicazioni nella incompatibilità materno fetale, è quello **Rh**. Si chiama Rh perché è stato scoperto in una scimmia (il *Macacus Rhesus*). Esistono 2 possibili fenotipi rispetto al sistema Rh: si può essere Rh positivi (Rh+) oppure Rh negativi (Rh-). Cosa significa dal punto di vista antigenico? Gli individui Rh+ hanno sulla superficie dei globuli rossi delle proteine transmembrinarie con attività antigenica che sono coinvolte nel trasporto di CO_2 e di ammonio NH_4^+ attraverso la membrana plasmatica. La formazione di questo antigene dipende dalla costituzione genetica di un altro locus autosomico, il **locus D**, diverso sia dal locus I che dal locus H. Questo locus D è biallelico e gli individui omozigoti dominanti (DD) oppure eterozigoti (Dd) presentano sulla superficie dei globuli rossi queste proteine transmembrinarie; mentre gli individui omozigoti recessivi (dd) non le presentano. Di conseguenza gli individui omozigoti dominanti o quelli eterozigoti sono **Rh+**; gli individui omozigoti recessivi sono **Rh-**. Dal punto di vista di compatibilità trasfusionale un individuo Rh- può ricevere solo da individui Rh-, ma può donare anche ad indi-

vidui Rh+. Un individuo Rh+ può donare solo ad Rh+ e può ricevere sia da individui Rh+ che da individui Rh-. Volendo ritornare alla classificazione del sistema AB0 di donatori universali e accettori universali possiamo estendere la suddivisione includendo anche il sistema Rh: gli individui di gruppo 0 Rh- sono i donatori universali; mentre gli individui AB Rh+ sono gli accettori universali. Il funzionamento di questo sistema è molto semplice, segue le regole mendeliane: un locus autosomico biallelico a dominanza completa, non presenta alcun tipo di particolarità. Il sistema Rh è coinvolto nella **sindrome da incompatibilità materno-fetale**. Questa patologia si può verificare quando abbiamo a che fare con una madre che è Rh-, la quale concepisce un feto Rh+. Come fa a concepire un feto Rh+? Accoppiandosi con un uomo Rh+ (che sia omozigote DD o eterozigote Dd): nel caso in cui l'uomo sia eterozigote si ha la probabilità del 50% che il feto sia Rh+; nel caso in cui sia omozigote dominante il figlio sarà sempre Rh+.



Nell'esempio in figura abbiamo una madre con genotipo dd (Rh-) e un padre con genotipo DD (Rh+); il figlio necessariamente sarà Dd (Rh+): consideriamo che sia la **prima gravidanza** di questa donna con questo uomo. Il figlio Rh+, durante il suo sviluppo embrionale non determina alcun tipo di problema alla madre perché la madre non ha ancora **anticorpi anti-Rh**; al contrario del sistema AB0 dove c'è un'immunità innata che determina la presenza di anticorpi. Questa gravidanza procede senza fastidi perché durante la gestazio-

ne non c'è contatto tra il sistema circolatorio materno e il sistema circolatorio fetale, non c'è un contatto diretto. Al momento del parto si può avere un contatto tra il circolo sanguigno materno e quello fetale, e se avviene questo contatto, la madre si **immunizza** contro l'antigene Rh; cioè produce **anticorpi anti-Rh**. Questo evento al momento del parto non genera alcun problema nei confronti del primo figlio; ma la madre ora possiede degli anticorpi anti-Rh per cui, se dovesse fare un altro figlio con questo stesso padre, o con qualunque altro padre che determini la formazione di un feto Rh+, si potrebbe avere una reazione immunitaria della madre nei confronti di questo secondo feto (si avrà un riconoscimento **non-self** del feto, perché la madre ha anticorpi anti-Rh). Come si ovvia a questo problema? Dopo ogni parto si somministrano alla madre degli anticorpi anti-Rh (somministrati dall'esterno e non prodotti dalla donna), in modo tale che lei non abbia una **memoria immunologica**, ma possa distruggere gli antigeni Rh circolanti ed evitare che il sistema immunitario della madre produca anticorpi contro questi antigeni. La somministrazione va però ripetuta dopo ogni nascita.

L'**esperienza di laboratorio di genetica** consiste nella tipizzazione rispetto al sistema AB0 e al sistema Rh del genotipo di ogni studente. Bisogna pungersi un dito facendo cadere tre gocce di sangue su due vetrini differenti, e su ciascuna goccia di sangue verrà aggiunta una goccia di siero contenente gli anticorpi anti-A, su un'altra goccia di sangue verrà aggiunta una goccia di siero contenente gli anticorpi anti-B; su un'altra goccia ancora il siero contenente anticorpi anti-Rh. Gli individui di gruppo A osserveranno una reazione di agglutinazione in corrispondenza della gocciolina alla quale è stato aggiunto il siero contenente gli anticorpi anti-A, perché sulla superficie dei loro globuli rossi sono presenti antigeni A, mentre per la gocciolina alla quale è stato aggiunto il siero contenente gli anticorpi anti-B non si osserverà la reazione di agglutinazione. La situazione è speculare per gli individui di gruppo B; i quali osserveranno agglutinazione in corrispondenza della gocciolina alla quale è stato aggiunto il siero contenente gli anticorpi anti-B, ma non in corrispondenza di quella a cui è stato aggiunto il siero contenente anticorpi anti-A; gli individui di gruppo AB agglutineranno entrambe le goccioline, quella alla quale è stato aggiunto il siero contenente gli anticorpi anti-A e quella che ha ricevuto il siero con anticorpi anti-B; gli individui di gruppo 0 non agglutineranno né la gocciolina che ha ricevuto il siero contenente anticorpi anti-A né quella che ha ricevuto il siero contenente anticorpi anti-B. Rispetto al sistema Rh, gli individui Rh+ agglutineranno la terza gocciolina di sangue alla quale è stato aggiunto il siero contenente anticorpi anti-Rh; gli individui Rh- non agglutineranno la terza gocciolina di sangue perché non presentano antigeni Rh.

Estensioni del mendelismo:

Alleli multipli e serie alleliche

Abbiamo già visto per il sistema ABO la possibilità per determinati loci anziché avere solo due forme alleliche alternative più forme alleliche (I^A , I^B , I^0), ovviamente negli individui diploidi sono presenti solo due alleli per locus; quindi parliamo degli alleli possibili. Un altro esempio utile per capire che possono esistere più forme alleliche rispetto anche a 3 è quello che riguarda un fenotipo del coniglio, in particolare il colore del mantello del coniglio, che può essere di almeno 4 fenotipi differenti. Partiamo da un **fenotipo selvatico** rosso bruno, una sorta di marrone per passare ad un fenotipo con peli bianchi dalla punta nera che si chiama **chinchilla**, poi ad un fenotipo **Himalayano** caratterizzato dalla presenza di peli neri alle estremità del coniglio (orecchie, muso, zampe) mentre il resto del corpo è ricoperto da peli bianchi; ad un fenotipo **albino** rappresentato da peli bianchi su tutto il corpo. Il fenotipo della pelliccia del coniglio dipende dal **locus C**, che può esistere in varie forme alleliche differenti. In figura possiamo osservare le quattro situazioni. Il fenotipo selvatico è determinato dalla costituzione genetica di omozigosi per l'allele selvatico che si chiama c^+ (un altro modo per indicare forme alleliche differenti è utilizzare un apice che può essere una lettera, un numero o un simbolo, il simbolo + si utilizza per indicare la forma selvatica dell'allele).

Quindi un omozigote c^+c^+ avrà fenotipo selvatico (fenotipo marroncino). Il fenotipo **chinchilla** è determinato dall'omozigosi di un altro allele che si chiama c^{ch} , il fenotipo **Himalayano** dall'omozigosi per l'allele c^h ; il fenotipo **albino** dall'omozigosi per l'allele c . Ovviamente non ci sono solo genotipi omozigoti, quindi dobbiamo chiederci, in eterozigosi questi alleli come si comportano. Stiamo parlando di quattro alleli differenti. Le relazioni di dominanza esistenti in questa serie allelica sono così schematizzabili: $c^+ > c^{ch} > c^h > c$. Cioè, l'allele c^+ è dominante su tutti gli altri: significa che il fenotipo selvatico sarà determinato non solo dal genotipo omozigote c^+c^+ ma anche da tutte le altre possibili combinazioni di eterozigosi che vedono la presenza di un allele c^+ . Quindi (c^+c^{ch} , c^+c^h , c^+c) avranno tutti fenotipo selvatico marrone perché l'allele c^+ è dominante rispetto a tutti gli altri, quindi indipendentemente dalla presenza di un'altra forma allelica se è presente l'allele c^+ il fenotipo sarà dominante.

L'allele c^{ch} è dominante su c^h e su c : sia la combinazione $c^{ch}c$, sia la combinazione $c^{ch}c^h$ darà un fenotipo chinchilla. In realtà è leggermente diverso il fenotipo chinchilla che viene fuori a seconda delle due combinazioni alleliche possibili in eterozigosi, ma resta comunque un fenotipo chinchilla. Infine l'allele himalayano c^h è dominante solo sull'allele c e quindi il fenotipo Himalayano, oltre ad essere determinato dal fenotipo $c^h c^h$ sarà determinato anche dal genotipo eterozigote $c^h c$. Comprendendo le relazioni di dominanza esistenti tra forme alleliche differenti possibili per un certo locus, è possibile poi risalire ai fenotipi possibili e poter fare tutte le previsioni genotipiche applicando i principi del mendelismo.





	Genotipo	Fenotipo
 Albino	cc	Peli bianchi su tutto il corpo
 Himalayano	$c^h c^h$	Peli neri sulle estremità e peli bianchi sul resto del corpo
 Chinchilla	$c^{ch} c^{ch}$	Peli bianchi con punte nere su tutto il corpo
 Selvatico	$c^+ c^+$	Peli colorati su tutto il corpo

Figura 4.3 ► I diversi colori del pelo dei conigli. I differenti fenotipi sono determinati da quattro diversi alleli del gene c .





Fenotipo	Genotipo
 Selvatico	$c^+ c^+$ $c^+ c^{ch}$ $c^+ c^h$
 Chinchilla chiaro	$c^{ch} c$
 Chinchilla chiaro con punte nere	$c^{ch} c^h$
 Himalayano	$c^h c$

Figura 4.4 ► Fenotipi corrispondenti alle differenti combinazioni di alleli c nei conigli. Gli alleli formano una serie, con l'allele selvatico c^+ dominante su tutti gli altri e l'allele nullo c (albino) recessivo rispetto agli altri alleli; un allele ipomorfo, c^{ch} (chinchilla), è parzialmente dominante sull'altro, c^h (himalayano).

Alleli letali

Un altro esempio di estensione del mendelismo è costituito dai cosiddetti **alleli letali**. Ci sono degli alleli che in situazioni di omozigosi determinano letalità: la fecondazione avviene, lo zigote si forma, ma in fasi precoci dello sviluppo embrionale la crescita dell'embrione si arresta per cui l'individuo non nasce. Nell'esempio, l'allele mostrato si comporta in due modi differenti a seconda che si trovi in eterozigosi o in omozigosi. È un allele che determina la colorazione del pelo del topo.

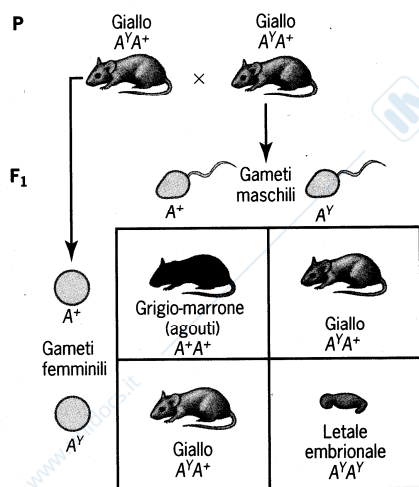


Figura 4.7 ▶ A^Y , la mutazione *yellow-lethal*, letteralmente giallo-letale, nei topi: una mutazione visibile dominante, che è anche letale recessiva. Un incrocio tra individui portatori di questa mutazione produce eterozigoti gialli e omozigoti grigio-marroni (agouti) in un rapporto 2:1. Gli omozigoti gialli muoiono allo stadio di embrioni.

Il colore del pelo del topo **aguti**, che rappresenta la forma selvatica, è di un colore marrone; l'altra forma è rappresentata da un colore giallo. Il locus del gene del colore della pelliccia del topo si chiama **locus A**, da aguti, l'apice utilizzato per indicare la forma allelica che determina il colore giallo è Y, da yellow (A^Y): questa forma allelica che determina il colore giallo ha per l'esattezza nome **Yellow letal** (giallo letale) perché in una condizione di omozigosi, questo allele determina letalità, gli embrioni con genotipo $A^Y A^Y$ non riescono a svilupparsi, mentre gli embrioni $A^Y A^+$ (A^+ rappresenta l'allele selvatico per il colore marrone) si sviluppano e hanno fenotipo giallo. Quindi l'allele A^Y rispetto all'allele selvatico A^+ è dominante, perché in un genotipo $A^Y A^+$ il topo avrà colore giallo. È un allele dominante rispetto a quello selvatico, ma in omozigosi si comporta da letale recessivo. È un allele ambivalente perché rispetto al

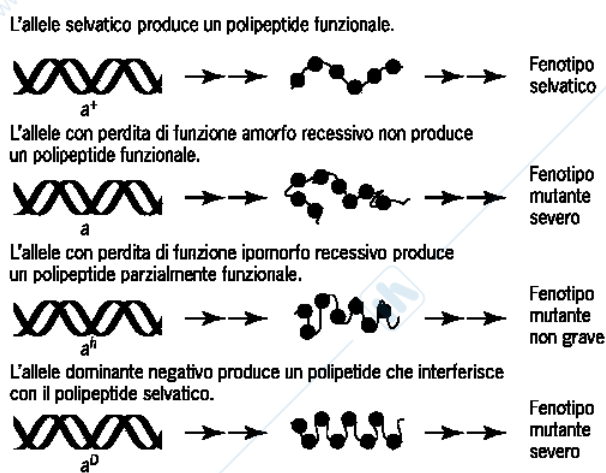
colore è dominante, rispetto alla letalità è recessivo. Nell'immagine viene proposta la progenie che può venir fuori da un incrocio tra due topi yellow, cioè due topi con colore del mantello giallo che necessariamente devono essere eterozigoti: non possono essere omozigoti per yellow perché non si sarebbero sviluppati. Se incrociamo due topi gialli che tipo di progenie ci aspettiamo? In virtù del comportamento letale recessivo di questo allele ci aspettiamo un rapporto fenotipico colore selvatico marrone: colore giallo nella progenie di 1:2 (1/3 della progenie avrà fenotipo selvatico e 2/3 avranno fenotipo giallo). Perché facciamo il calcolo ristretto a queste probabilità? Perché ovviamente gli embrioni omozigoti $A^Y A^Y$ non si svilupperanno, quindi abbiamo un'alterazione del rapporto fenotipico mendeliano 3:1 che ci aspetteremmo normalmente, ad un rapporto 1:2.

La pleiotropia, penetranza incompleta ed espressività variabile

Nella lezione precedente abbiamo accennato il discorso sulla pleiotropia. Abbiamo detto che ci sono alcuni geni, singoli geni, il cui effetto fenotipico (manifestazione fenotipica) non influenza un solo carattere: per i caratteri mendeliani abbiamo imparato che un gene determina un fenotipo (un carattere come quello del colore del pisello, forma del pisello, forma del baccello, colore del fiore). In alcuni casi la costituzione genotipica che riguarda un solo gene influenza una gamma molto ampia di fenotipi possibili e questo evento si chiama **effetto pleiotropico**. Molte patologie monogeniche hanno un effetto pleiotropico: l'alterazione di un gene determina non solo la manifestazione fenotipica, ma una serie di manifestazioni fenotipiche. La penetranza incompleta e l'espressività variabile sono entrambi concetti che riguardano alleli dominanti.

Penetranza incompleta: un individuo che ha una determinata costituzione genetica non necessariamente manifesta alla nascita il fenotipo determinato dalla presenza dell'allele dominante, ma lo potrà manifestare nel corso della vita ad età differenti: un esempio tipico di penetranza incompleta è rappresentato da una patologia molto grave neurodegenerativa, il **morbo di Huntington**, malattia autosomica dominante dell'uomo che determina una degenerazione progressiva del sistema nervoso (causa problemi a livello cognitivo e a livello motorio). La caratteristica di questa patologia è che comincia a manifestarsi dai 30 anni di età in poi con un

range di possibilità di manifestazione molto ampio: le manifestazioni precoci si verificano verso i 30 anni, manifestazioni non precoci verso i 40 e manifestazioni tardive anche più avanti. Un individuo che non sa di essere affetto da questo morbo potrebbe aver già prodotto progenie prima della manifestazione della malattia nel suo organismo ed essendo una malattia dominante, nel caso in cui l'individuo fosse eterozigote ha il 50% di probabilità di dare l'allele dominante alla progenie. **Espressività variabile**: ci sono dei caratteri determinati da un certo genotipo, specifico, che però non hanno una manifestazione fenotipica univoca: il fenotipo che si manifesta può essere più severo o meno severo, con una gamma di manifestazioni piuttosto ampia. Un esempio banale è rappresentato dalla fossetta sul mento che può essere più pronunciata, meno pronunciata, assente, appena accennata: sono fenotipi variabili determinati da una sola condizione genotipica; quindi a seconda della interazione tra genotipo e ambiente si avrà una certa manifestazione fenotipica. Un altro esempio di **effetto pleiotropico** è rappresentato da una patologia chiamata **fenilchetonuria**, patologia autosomica recessiva, che determina l'accumulo di fenilalanina perchè è presente un blocco in una via metabolica che normalmente promuove la degradazione della fenilalanina. In presenza di accumulo di fenilalanina gli individui presentano forme di ritardo mentale, una sintesi non corretta di melanina (che col ritardo mentale non ha nulla a che fare), accumulo di una serie di sostanze nelle urine. Questo è un esempio di quelli che **Garrod** definiva **difetti congeniti del metabolismo** e che provò a spiegare.



(a)

Genotipo	Polipeptidi presenti	Fenotipo	Natura delle allele mutante
$a^+ a$		Selvatico	Recessivo
$a^+ a^h$		Selvatico	Recessivo
$a^+ a^d$		Mutante	Dominante

(b)

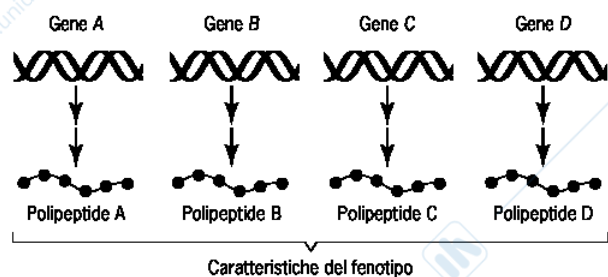


Figura 4.8 ▶ Correlazione tra geni e polipeptidi. Ogni gene specifica un differente polipeptide. Tali polipeptidi funzionano influenzando il fenotipo dell'organismo.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

I vari esempi descritti (gruppi sanguigni) ci hanno portato ad intuire che un gene determina una certa manifestazione fenotipica perché codifica un prodotto polipeptidico, una proteina: nel sistema AB0 dei gruppi sanguigni l'allele I^A codifica l'enzima A, l'allele I^B codifica l'enzima B; gli enzimi sono proteine, quindi un gene codifica una proteina. Se noi immaginiamo che un determinato allele selvatico produca un prodotto polipeptidico funzionale (che svolge una certa funzione) e il fatto che questo polipeptide svolga

una certa funzione determina un certo fenotipo possiamo trovarci di fronte ad una situazione di un allele recessivo che non determina la manifestazione di quel fenotipo, perché il polipeptide codificato dall'allele recessivo non riesce a svolgere la stessa funzione che svolge l'allele selvatico (non lo sa fare). L'esempio del sistema AB0 ci viene in aiuto perché abbiamo detto che I^A codifica una proteina funzionale, I^B codifica una proteina funzionale mentre I^O , che è recessivo rispetto ad I^A e ad I^B , codifica un enzima non funzionale, che non sa fare la glicosiltrasferasi; non è in grado di trasferire nessuno zucchero da nessuna parte. Potrebbero esserci anche delle forme recessive, completamente mutate che, anziché essere incapaci di codificare un enzima funzionale codifica un enzima che funziona poco, che comunque non consentirà la manifestazione

del fenotipo selvatico che si manifesta in presenza dell'allele selvatico. Immaginiamo che un allele dominante mutato codifichi per un polipeptide, non solo non è in grado di svolgere la stessa funzione del polipeptide selvatico, ma che impedisce al polipeptide selvatico di funzionare, altrimenti non sarebbe dominante: quindi anche in presenza dell'allele selvatico il fenotipo che si manifesta sarà quello determinato dall'allele dominante mutato. In una situazione di omozigosi per l'allele selvatico avremo un fenotipo selvatico perché viene tradotto solo il polipeptide selvatico; in eterozigosi se abbiamo l'allele selvatico con l'allele mutato recessivo si osserverà solo il fenotipo selvatico perché la presenza dell'allele selvatico assicura che all'interno della cellula che lo contiene ci sia una quantità sufficiente di polipeptide selvatico per svolgere la sua funzione: è come se l'allele mutato non fosse presente (se è recessivo). In una situazione di eterozigosi per l'allele mutato dominante e per l'allele selvatico, nonostante sia presente il prodotto dell'allele selvatico (potenzialmente potrebbe svolgere la sua funzione), la presenza del prodotto dell'allele mutato dominante impedisce in qualche modo il funzionamento del polipeptide selvatico.

La complementazione

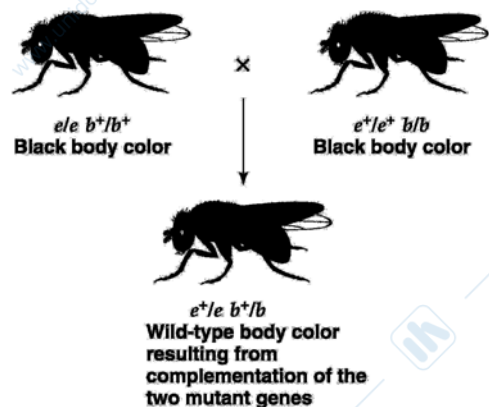
Immaginiamo di avere due linee pure di *Drosophila* che hanno lo stesso genotipo, che non è

quello selvatico, sono quindi mutanti: nell'immagine abbiamo un incrocio tra due ceppi di *Drosophila*, entrambe linee pure per il colore del corpo nero (fenotipo mutato, perché il colore del corpo selvatico è marrone). Sulla base del mendelismo, ci aspettiamo che dall'incrocio si ottenga una progenie con colore del corpo nero. In alcuni tipi di incroci tra linee pure di *Drosophila* con corpo nero viene fuori una progenie con colore del corpo selvatico: questo fenomeno prende il nome di **complementazione**. La **complementazione** è l'interazione del prodotto di geni differenti che però sono coinvolti in un unico fenotipo: in riferimento all'incrocio di *Drosophila*, il colore del corpo

- Immaginiamo di avere due linee pure di *Drosophila* con colore del corpo nero (mutanti recessivi). Il colore del corpo selvatico è marrone (dominante).
- Incrociamo queste due linee pure.
 - Cosa ci aspettiamo nella progenie?
- La progenie presenta colore del corpo **selvatico!**
 - Come è possibile?

La complementazione: interazione del prodotto di geni differenti coinvolti in un unico fenotipo

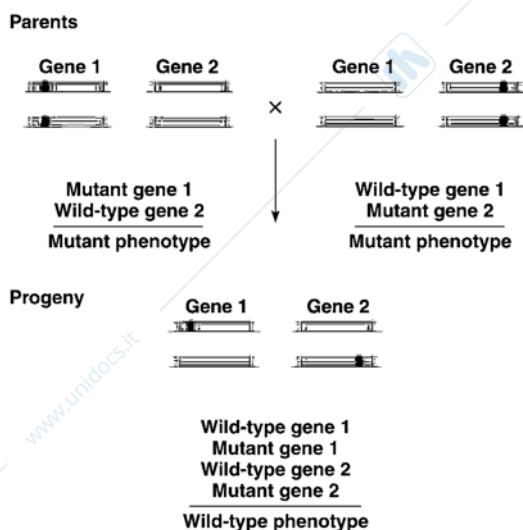
del moscerino non dipende da un solo gene, ma da due geni differenti. Possiamo immaginare che gli incroci di *Drosophila* che ci danno una progenie "anomala" siano semplicemente incroci tra due linee pure (perché sono omozigoti) di un ceppo omozigote recessivo per il locus *e* (e/e b^+/b^+) ed un ceppo omozigote dominante per il locus *b* (e^+/e^+ b/b). Entrambi questi genotipi determinano fenotipo mutato del colore del corpo. La progenie che viene fuori da questo incrocio genotipicamente eterozigote per entrambi i loci, perché la mosca 1 produrrà un solo tipo di gameti (e b^+) e la mosca 2 produrrà un solo tipo di gameti (e^+ b); questi gameti unendosi daranno origine ad eterozigoti (e^+/e b^+/b), che hanno colore del corpo selvatico. Cosa significa dal punto di vista funzionale? Per avere colore del corpo marrone, in *Drosophila*, c'è bisogno del prodotto funzionale di due loci differenti (del locus **e** e del locus **b**), che se sono entrambi funzionali all'interno dell'organismo daranno colore marrone: basta che uno dei due non funzioni e il colore del corpo risulterà nero. Nella progenie eterozigote marrone stiamo osservando **complementazione**, cioè l'interazione del prodotto di due geni differenti per avere un unico fenotipo (colore del corpo).



Il fatto che esista la complementazione fornisce ai genetisti la possibilità di capire se, nel momento in cui ci troviamo di fronte mutanti dello stesso tipo, quei mutanti siano tali per lo stesso gene o siano mutanti di geni differenti. Se incrociamo linee pure di mutanti per geni differenti, otterremo una progenie con fenotipo selvatico perché si osserva la complementazione; se invece incrociamo linee pure di mutanti per lo stesso gene, il fenotipo della progenie sarà mutato. La possibilità di allestire incroci tra linee pure di ceppi mutanti che presentano lo stesso fenotipo ci consente di capire se le mutazioni che stiamo osservando in questi ceppi differenti siano mutazioni alleliche (cioè mutazioni dello stesso gene) o mutazioni non alleliche (cioè mutazioni di geni differenti).

Nell'immagine abbiamo due genitori che presentano due geni che si trovano su cromosomi differenti, sono quindi geni indipendenti: nel genitore 1 il gene 1 è mutato e il gene 2 è selvatico; nel genitore 2 il gene 1 è selvatico e il gene 2 è mutato. I gameti del genitore 1 conterranno il gene 1 mutato e il gene 2 selvatico; i gameti del genitore 2 conterranno il gene 1 selvatico e il gene 2 mutato: nel momento in cui si forma la progenie ottenuta dall'incrocio di questi due individui, essa presenterà un genotipo eterozigote per entrambi i 2 geni, perché riceve il gene 1 mutato dal genitore 1 e il gene 1 selvatico dal genitore 2; il gene 2 selvatico dal genitore 1 e il gene 2 mutato dal genitore 2. La progenie quindi sarà doppia eterozigote, che per ciascuno dei due geni conterrà una copia selvatica, i cui prodotti completeranno e daranno un fenotipo selvatico. Nel caso in cui, invece, abbiamo nel genitore 1 un gene mutato in una certa posizione, nel genitore 2 lo stesso gene mutato in una posizione differente, i gameti che si formeranno avranno il gene mutato sia nella posizione del genitore 1, sia in quella del genitore 2, quindi la progenie che si formerà sarà sempre una progenie eterozigote per le due mutazioni differenti, ma il fenotipo sarà comunque mutato, perché non c'è nulla di selvatico che possa consentire la manifestazione del fenotipo selvatico. Di conseguenza, se facendo incroci tra linee pure che presentano lo stesso fenotipo otteniamo sempre una progenie mutata deduciamo che

a) Mutations in different genes: complementation



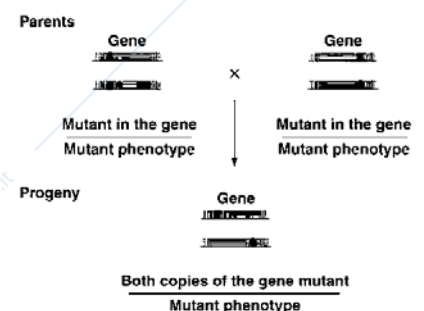
stiamo osservando mutazioni dello stesso gene; se invece facciamo incroci tra due linee pure che presentano lo stesso fenotipo e otteniamo una progenie selvatica deduciamo che le due mutazioni che stiamo osservando sono a carico di geni differenti, i cui prodotti nella progenie complementano per dare il fenotipo selvatico.

Test di complementazione

Il colore selvatico dell'occhio di *Drosophila* è rosso scuro: esistono tante mutazioni del colore dell'occhio di *Drosophila*. Soffermiamoci su mutazioni che determinano colore dell'occhio scarlatto (rosso brillante). Esistono tre mutazioni che hanno lo stesso fenotipo e si chiamano **cinnabar**, **cinnabar-2**, **scarlet**.

- La complementazione consente di allestire test per comprendere se due mutazioni **recessive** che determinano lo stesso fenotipo sono alleliche o meno
 - cioè se sono mutazioni dello stesso gene o di geni differenti.
- La complementazione **avviene** se le due mutazioni si trovano in **geni differenti** (fenotipo selvatico nel doppio eterozigote).
- La complementazione **non avviene** se le due mutazioni si trovano nello **stesso gene** (fenotipo mutante nel doppio eterozigote).

b) Mutations in the same gene: no complementation



Immaginiamo di voler comprendere se queste mutazioni fenotipiche che hanno lo stesso genotipo, siano mutazioni dello stesso gene o mutazioni di geni differenti. Ci costruiamo quindi

delle linee pure cinnabar, cinnabar-2, scarlet. Incorciamo poi mosche cinnabar con mosche scarlet e osserveremo il fenotipo della progenie: viene fuori una progenie con fenotipo selvatico. Possiamo dedurre che **cinnabar** e **scarlet** sono mutanti di geni differenti e quindi in questi selvatici stiamo osservando complementazione. Se facciamo invece un incrocio tra una linea pura **cinnabar** e una linea pura **cinnabar-2**, il fenotipo osservato nella progenie sarà mutato, quindi cinnabar e

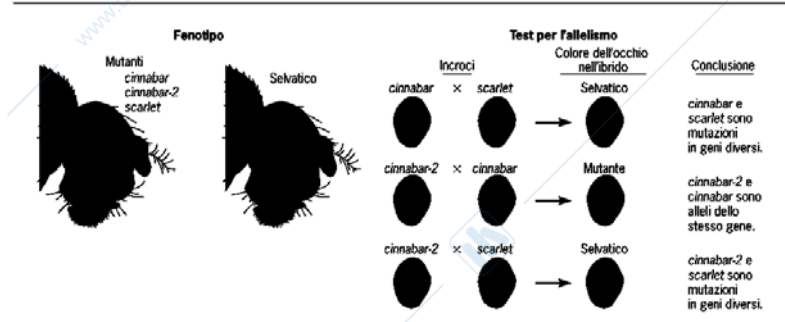


Figura 4.6 ► Un test di allelismo relativo a mutazioni recessive del colore dell'occhio in *Drosophila*. Tre mutazioni fenotipicamente identiche, *cinnabar*, *scarlet* e *cinnabar-2*, sono testate per l'allelismo, facendo incroci a due a due tra moscerini omozigoti per le varie mutazioni. Il fenotipo degli ibridi mostra che le mutazioni *cinnabar* e *cinnabar-2* sono alleli di un singolo gene, mentre la mutazione *scarlet* è un allele di un altro gene.

cinnabar-2 sono mutanti dello stesso gene. Se facciamo un incrocio tra **cinnabar-2** e **scarlet** osserviamo progenie con fenotipo selvatico, indice che cinnabar-2 e scarlet sono mutanti di geni differenti.

Rapporto di complementazione (Rapporto 9:7)

Immaginiamo di incrociare due linee pure di piante a fiori bianchi e alla F1 otteniamo solo piante a fiori rossi. Dobbiamo escludere che il fenotipo sia legato ad un carattere monogenico e adottiamo l'ipotesi che siano coinvolti due geni che stanno complementando. Di conseguenza i parentali sono individui appartenenti a linee pure con genotipi speculari: se chiamiamo C e P i

due geni coinvolti nel colore del fiore, una linea pura sarà CCpp e l'altra linea pura sarà ccPP. La linea CCpp produrrà un solo tipo di gameti (Cp), la linea pura ccPP produrrà un solo tipo di gameti (cP); l'unione di questi due tipi di gameti produrrà necessariamente una progenie CcPp, che avrà fenotipo rosso. Perché? Sta avvenendo una complementazione: per avere il fenotipo rosso è necessario che in entrambi i loci sia presente almeno un allele dominante; ci serve per avere il rosso, il prodotto funzionale del gene C e ci serve il prodotto funzionale del gene P; entrambi questi prodotti insieme determinano il colore rosso. Quale rapporto ci aspettiamo alla F2 autofecondando le piante rosse della F1? Mendel ci ha insegnato che se facciamo un incrocio tra due eterozigoti il rapporto fenotipico della progenie sarà 9:3:3:1; perché ad ogni carattere corrisponde una manifestazione fenotipica. Nel nostro esercizio invece, abbiamo due geni che determinano una manifestazione fenotipica e non due; abbiamo

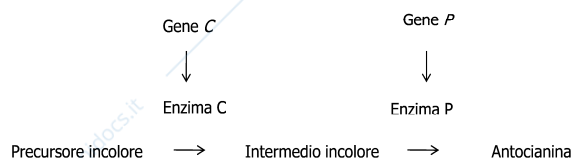
solo due alternative fenotipiche: o fiore bianco o fiore rosso, quindi osserveremo una F2 rispetto a queste due possibilità. È semplice perché noi sappiamo che dal punto di vista genotipico ci troviamo in una situazione identica a quella della segregazione di due caratteri mendeliani, stiamo incrociando due diibridi; ciò che cambia è la manifestazione fenotipica: in questo caso la manifestazione del fenotipo fiore rosso si ha soltanto se è presente almeno un allele dominante in ciascuno dei due loci; cioè avremo fenotipo rosso quando nel locus C è presente almeno un allele C indipendentemente dalla configurazione dell'altro allele, e nel locus P è presente almeno

un allele P indipendentemente dalla configurazione dell'altro allele. Quindi, C-P- saranno tutte piante fenotipicamente a fiore rosso e saranno fra tutte le possibili combinazioni genotipiche le uniche ad avere fenotipo rosso, perché sono le uniche che presentano almeno un allele dominante in entrambi i loci e saranno 9/16. tutte le altre combinazioni genotipiche (C-pp; ccP-; ccpp) ci daranno fiori bianchi e saranno in totale 7/16. Osserviamo quindi alla F2 un rapporto 9:7, che è una delle modificazioni del rapporto 9:3:3:1 e si chiama **rapporto di complementazione** perché viene fuori grazie al fatto che questi due loci che sono coinvolti nel fenotipo che stiamo osservando possono complementare.

Spiegazione biochimica

Possiamo immaginare che ciascuno di questi loci C e P (facendo riferimento al colore del fiore dell'esercizio descritto) codifichi un enzima, e ciascuno di questi enzimi immaginiamo sia coinvolto nella catalisi di passi differenti di una via biosintetica che porta alla fine alla formazione del pigmento rosso: partendo da un precursore bianco, e passando attraverso un intermedio bianco ed arrivando ad un prodotto finale rosso. Potremmo immaginare che l'allele dominante del locus C codifichi un enzima funzionale che sia in grado di catalizzare la trasformazione del precursore bianco in intermedio bianco; l'allele P codifichi per un altro enzima che sia in grado di catalizzare la reazione di trasformazione dell'intermedio bianco in prodotto finale antocianina; di conseguenza l'assenza di questo enzima funzionale (condizione cc) determinerà il blocco di questa via metabolica perché non si forma l'enzima C e il precursore bianco rimarrà tale. Anche il presenza dell'enzima P funzionale, questo non agisce su precursore bianco, ma sull'intermedio; ma se l'intermedio non si è formato l'enzima P non sa cosa catalizzare. Allo stesso modo in presenza di un genotipo pp non abbiamo un enzima P funzionale e l'intermedio bianco non sarà catalizzato in antocianina, indipendentemente dal fatto che ci sia un enzima C funzionale: anche se l'enzima C è presente e ha catalizzato la trasformazione del precursore bianco nell'intermedio bianco, l'assenza dell'enzima P rende impossibile il raggiungimento del prodotto finale della via metabolica, cioè dell'antocianina.

La spiegazione biochimica del rapporto 9:7



Se il locus C o il locus P (o entrambi) sono in omozigosi recessiva, non viene prodotto l'enzima C o P (o entrambi) funzionale e l'antocianina non viene prodotta. Il fenotipo selvatico è determinato dalla presenza di almeno un allele selvatico in entrambi i loci.

- C- P- si forma il pigmento (selvatico)
- C- pp si forma l'intermedio incolore, ma non si forma il pigmento (bianco)
- cc P- il precursore incolore non viene trasformato nell'intermedio (bianco)
- cc pp il precursore incolore non viene trasformato nell'intermedio (bianco)

Il rapporto 9:3:3:1

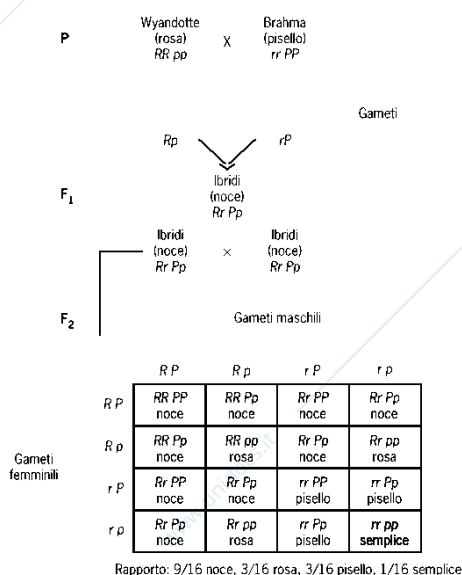


Figura 4.13 Esperimento di Bateson e Punnett sulla forma della cresta nei polli. Gli incroci nella F1, producono 4 fenotipi nel rapporto 9:3:3:1, ciascuno rappresentato da un differente colore nel quadrato di Punnett.

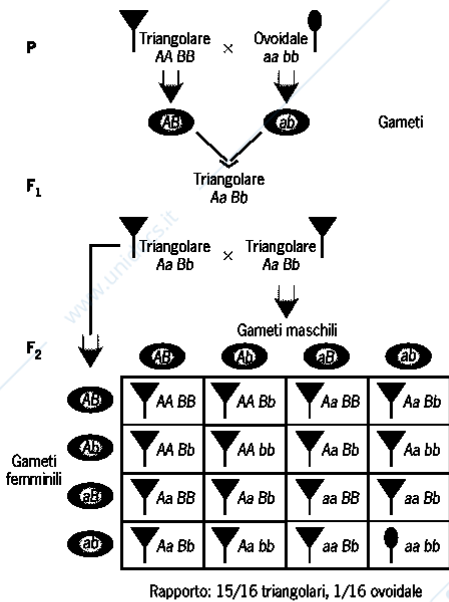
Abbiamo modifiche del rapporto 9:3:3:1 facendo però riferimento sempre ad un solo carattere, anziché due come nei diibridi mendeliani. L'esempio che meglio rappresenta questa estensione è quello della forma della **cresta dei galli**, che può avere 4 possibili fenotipi alternativi: un primo fenotipo a **rosa**, un secondo fenotipo a **pisello**, un terzo fenotipo a **noce**, e un quarto fenotipo **semplice**. il fenotipo della forma della cresta dei polli è determinato da due geni differenti e indipendenti e a seconda della costituzione genotipica di questi due geni avremo una manifestazione fenotipica differente nella forma della cresta. Immaginiamo di incrociare una linea pura di cresta a rosa (RRpp) con una linea pura con cresta a pisello (rrPP). Otteniamo una F1 che ha un fenotipo che non corrisponde né all'uno né all'altro, presenta un fenotipo a noce rappresentato da individui RrPp. Cosa otteniamo incrociando tra loro gli individui della F1? Otteniamo la comparsa

della progenie di tutti i fenotipi possibili, avremo progenie con cresta a rosa, a noce, a pisello e comparirà anche il fenotipo semplice, i meno abbondanti in assoluto nella progenie (1/16) e genotipo $rrpp$. Avremo 9/16 di fenotipo a noce perché per avere questo fenotipo è necessario che ci sia un allele dominante per entrambi i loci R e P (R-P-); gli altri due fenotipi in rapporto 3/16: almeno un allele dominante per uno dei due loci, quindi cresta a rosa R-pp, e cresta a pisello rrP-.

Il rapporto 15:1 (Geni duplicati)

Un altro tipo di rapporto è osservato nell'analisi della **pianta borsa del pastore**, che può avere una capsula di forma triangolare o di forma completamente ovale. Immaginiamo di incrociare

due linee pure di una pianta a capsule triangolari con una a capsule ovoidale. Otteniamo una F1 tutta con capsule triangolari: se ci fermassimo a questo punto dell'incrocio potremmo dire che si tratta di un carattere monogenico in cui l'allele per la forma triangolare sia dominante su quello ovoidale. Nel momento in cui andiamo a costruirci una F2 otteniamo sia piante con capsula triangolare che ovoidale ma in un rapporto sbilanciato: osserviamo un rapporto 15:1. Questo significa che il fenotipo ovoidale è determinato esclusivamente dalla omozigosi recessiva per entrambi i geni, quindi se chiamiamo i geni A e B, $aabb$ è l'unico genotipo che da fenotipo ovoidale. Tutte le altre combinazioni genotipiche ($A-B-$; $A-bb$; $aaB-$) danno fenotipo triangolare. $9/16 + 3/16 + 3/16 = 15/16$ fenotipo triangolare; $1/16$ fenotipo ovoidale.



(b) **Figura 4.15** ► (a) *Capsella bursa-pastoris*, la pianta borsa del pastore. Il riquadro mostra un ingrandimento della capsula. (b) Incroci che mostrano il controllo esercitato sulla forma della capsula in *Capsella bursa-pastoris* da geni duplicati.

sono coinvolti nello stesso passo della via metabolica, quindi, se sono presenti tutti e due gli alleli funzionali otteniamo entrambi i prodotti funzionali, e quindi si ha la catalisi di quel passaggio metabolico; se uno dei due non funziona c'è l'altro che sopperisce, perché ha esattamente la stessa funzione sua ed è in grado di catalizzare lo stesso passo della via metabolica. Di conseguenza $A-B-$; $A-bb$; $aaB-$ sono in grado di catalizzare la reazione senza la necessità dell'altro prodotto genico; solo $aabb$ (è assente sia il prodotto funzionale del gene A che di quello B) avrà fenotipo ovoidale perché non è possibile catalizzare lo step della via metabolica che porta al fenotipo selvatico triangolare.

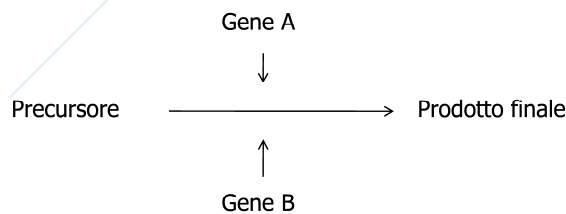
Rapporto 12:3:1 (Epistasi dominante)

L'esempio in figura parte da un incrocio tra due eterozigoti per due geni che hanno lo stesso fenotipo (bianco): stiamo parlando del colore delle zucchine. Incrociamo queste due linee eterozigoti di zucchine bianche e otteniamo una progenie in cui

Spiegazione biochimica

Possiamo ipotizzare che il gene A e il gene B abbiano la stessa funzione, cioè codifichino lo stesso prodotto: sono geni ridondanti, che si sono originati per una duplicazione iniziale. Ciò implica che entrambi i prodotti

La spiegazione biochimica del rapporto 15:1



I prodotti dei geni A e B hanno funzione ridondante: entrambi catalizzano la trasformazione di un precursore nel prodotto finale. La presenza di almeno un allele selvatico in almeno uno dei due loci determina fenotipo selvatico.

- $A-B-$ selvatico
- $A-bb$ selvatico
- $aaB-$ selvatico
- $aa bb$ mutato

compaiono 3 fenotipi differenti: abbiamo piante con zucchine verdi; piante con zucchine gialle; e piante con zucchine bianche in rapporto: 12/16 di piante con zucchine bianche; 3/16 di piante con zucchine gialle; 1/16 di piante con zucchine verdi. Quel 12/16 viene fuori da un 9/16 + 3/16, possiamo immaginare che se abbiamo almeno un allele dominante in ciascuno dei due loci o anche un solo allele dominante in uno solo dei due abbiamo fenotipo bianco; se invece abbiamo un allele dominante nel locus G e omozigosi recessiva nel locus C osserviamo fenotipo giallo; mentre l'omozigosi recessiva per entrambi i loci darà fenotipo verde.

Spiegazione biochimica

In questo caso immaginiamo una via biosintetica che parte da un precursore bianco, passa attraverso l'intermedio giallo, e arriva ad un prodotto finale verde. In questo caso gli enzimi che catalizzano la trasforma-

La spiegazione biochimica del rapporto 12:3:1



In omozigosi recessiva, il locus *c* codifica l'enzima *c* funzionale che catalizza la trasformazione di un precursore incolore in un intermedio giallo. Sempre in omozigosi recessiva, il locus *g* codifica l'enzima *g* funzionale che catalizza la trasformazione dell'intermedio giallo in pigmento verde. La presenza di un allele mutante dominante nel locus *c* (*C*) blocca la via metabolica impedendo la trasformazione del precursore incolore in intermedio giallo. La presenza di un allele mutante dominante nel locus *g* (*G*) blocca la via metabolica impedendo la trasformazione dell'intermedio giallo in pigmento verde.

- C- G-* il precursore incolore non viene trasformato nell'intermedio (bianco)
- C- gg* il precursore incolore non viene trasformato nell'intermedio (bianco)
- cc G-* si forma l'intermedio giallo, ma non si forma il pigmento (giallo)
- cc gg* si forma il pigmento (verde)

Possiamo quindi avere fenotipo bianco, se il blocco avviene nel primo passo della via metabolica o un fenotipo giallo se il blocco avviene al secondo passo della via.

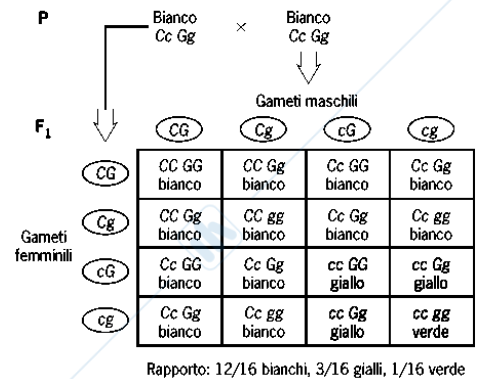


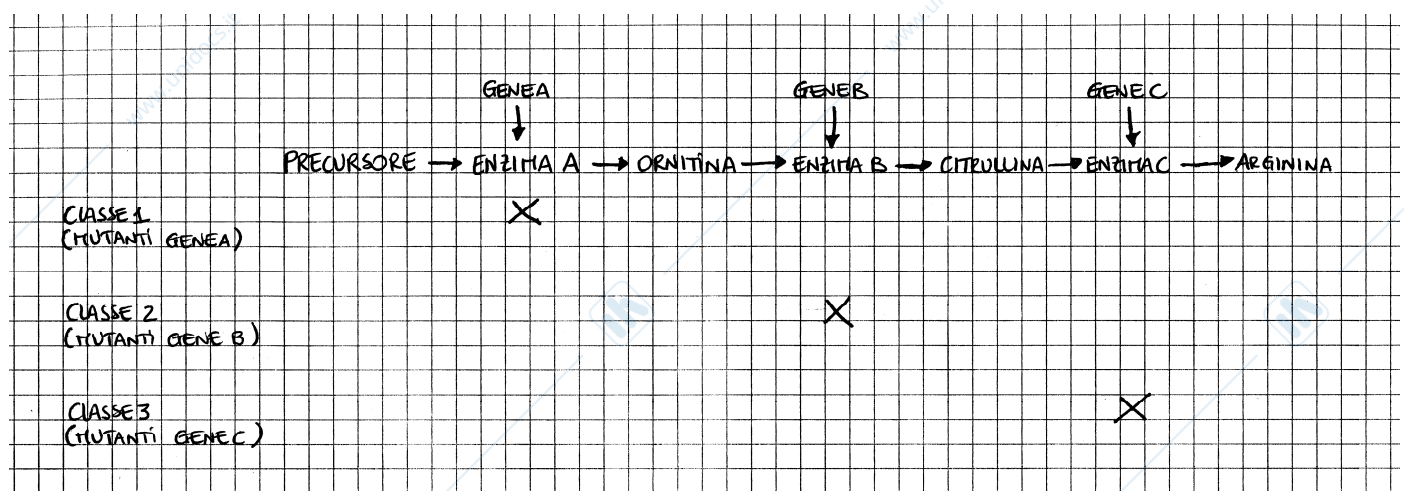
Figura 4.16 : Segregazione nella progenie di un incrocio tra piante di zuccina eterozigoti per due geni che controllano il colore del frutto.

zione del precursore bianco in intermedio giallo, e dell'intermedio giallo in prodotto finale verde siano codificati dalle forme alleliche recessive. L'allele *c* codifica un enzima *c* in grado di trasformare il precursore bianco in intermedio giallo; l'allele *g* codifica l'enzima *g* in grado di trasformare l'intermedio giallo in prodotto finale verde. Entrambi gli alleli funzionali saranno presenti ovviamente solo nell'omozigote recessivo perché la presenza dell'allele *C* codificherà qualcosa che interferisce con il funzionamento dell'enzima codificato dall'allele *c*; e la presenza di un allele *G* codificherà un qualcosa che interferisce con il funzionamento del prodotto dell'allele *g*.

LEZIONE 8 (27/03/2015)

I difetti congeniti del metabolismo

Nel 1909 Archibald Garrod propose che i geni determinano il fenotipo attraverso la formazione di enzimi che catalizzano reazioni cellulari specifiche. I sintomi di alcune malattie ereditarie (errori congeniti del metabolismo) dipendono dall'incapacità di sintetizzare uno specifico enzima. Garrod ipotizzò che l'**alcaptonuria**, una malattia ereditaria, fosse causata dall'assenza di un enzima in grado di metabolizzare uno specifico substrato, l'**alcaptone**, che negli individui affetti viene accumulato. Nel 1930 **Beadle** ed **Ephrussi** ipotizzarono che alcune mutazioni del colore dell'occhio di *Drosophila* dipendessero dal blocco di passaggi specifici della via biosintetica che determina la produzione del pigmento, in cui ciascun passaggio è catalizzato da un enzima specifico. All'epoca non erano note né le relazioni chimiche né gli enzimi coinvolti in questo processo. **Beadle** ed **Edward Tatum** riuscirono a stabilire la relazione "**Un gene – un enzima**" utilizzando la muffa del pane (***Neurospora Crassa***). *Neurospora* è un fungo a riproduzione sessuale, ma presenta una fase del ciclo vitale in forma aploide. Essi mutagenizzarono *Neurospora* con raggi X e analizzarono i mutanti in base alle capacità di crescere solo su terreni contenenti specifiche aggiunte nutrizionali rispetto al terreno minimo. La *Neurospora* selvatica cresce su un **terreno minimo** di agar, sali inorganici, glucosio e biotina (vitamina). La maggior parte dei mutanti nutrizionali cresce su un **terreno completo** contenente i 20 aminoacidi. A questo punto i due scienziati cercarono di capire se i mutanti, che crescevano su un terreno completo, in realtà avessero bisogno di uno specifico aminoacido anziché tutti e 20: prepararono 20 terreni minimi differenti, ognuno addizionato con un aminoacido differente e andarono a vedere se questi mutanti crescevano in aggiunta (al terreno minimo) di un solo aminoacido. Capirono per ciascuno dei ceppi mutanti ottenuti per mutagenesi, quale fosse la carenza aminoacidica specifica: addizionando uno specifico aminoacido al terreno minimo, se il ceppo cresceva, allora necessitava di quell'amminoacido aggiunto successivamente. La loro idea di partenza era che, se è vero che ad uno specifico gene corrisponde uno specifico passaggio di una via metabolica allora uno specifico gene codifica uno specifico enzima, quindi, l'ipotesi *un gene - un blocco metabolico* si trasforma in *un gene – un enzima*; per cui conoscendo la via biochimica che porta alla sintesi di determinati aminoacidi possiamo capire in quale dei passaggi della biosintesi di uno specifico aminoacido avviene il blocco metabolico; ovvero, qual è l'enzima mutato nei ceppi carenti di elementi nutrizionali.



L'esempio in figura riguarda dei mutanti per la carenza nutrizionale per l'amminoacido **arginina**: questi mutanti non sono in grado di sintetizzare questo aminoacido. Il ceppo selvatico è in grado di crescere su un terreno minimo e di conseguenza anche in un terreno minimo con l'aggiunta di tre differenti sostanze: l'**ornitina**, la **citrullina**, e l'**arginina**. In un terreno avevano aggiunto ornitina, in un altro terreno la citrullina, in un altro terreno l'arginina perché queste

molecole corrispondono al metabolita iniziale, a quello intermedio e al prodotto finale della via biosintetica dell'arginina. L'**ornitina** è il precursore, la **citrullina** è l'intermedio e l'**arginina** il prodotto finale. Analizzarono, rispetto a questi tre passaggi della via metabolica dell'arginina, tutti i vari mutanti nutrizionali che necessitavano per crescere dell'aggiunta di arginina. I vari mutanti che avevano come fenotipo finale necessità di aggiunta di arginina al terreno per poter crescere, si comportavano in maniera differente rispetto alle aggiunte del precursore e dell'intermedio. Osservarono che una classe di mutanti (classe 1), la quale su terreno minimo non era in grado di crescere, ma sicuramente in grado di crescere in presenza di arginina (altrimenti non avrebbero potuto dedurre che erano mutanti nutrizionali per l'arginina), era in grado di crescere in presenza di **ornitina** nel terreno minimo: bastava quindi aggiungere il precursore della via metabolica dell'arginina nel terreno minimo di questa classe di mutanti per far crescere *Neurospora* (ovviamente era in grado di crescere anche in presenza di citrullina). Osservarono un'altra classe di mutanti (classe 2), che non cresceva su terreno minimo, né in presenza del precursore ornitina, ma cresceva in presenza del metabolita intermedio citrullina. Fu osservata anche una terza classe di mutanti (classe 3) in grado di crescere solo in presenza di arginina: se nel terreno minimo invece dell'arginina veniva aggiunta l'ornitina, o la citrullina, questa classe di mutanti non cresceva. Dedussero che, nella via biosintetica dell'arginina fossero coinvolti 3 geni che codificano per 3 enzimi che catalizzano specifici passaggi metabolici: un primo passaggio che porta alla formazione dell'ornitina, (un gene A che codifica un enzima A che, da un precursore determina la formazione dell'ornitina); un secondo passaggio che porta alla formazione della citrullina, (un gene B che codifica un enzima B che, determina la trasformazione dell'ornitina in citrullina); un terzo passaggio che porta alla formazione dell'arginina (un gene C che codifica un enzima C che, determina la trasformazione della citrullina in arginina). Quindi per la classe di mutanti (**classe 1**) che cominciava a crescere con la sola aggiunta di ornitina al terreno minimo, possiamo dedurre che l'enzima che non funziona in questa via metabolica è quello che agisce a monte della sintesi dell'ornitina: nel terreno minimo privo di aggiunta di amminoacidi l'enzima A non funziona e di conseguenza la via metabolica è bloccata al primo passaggio; ma se a questo terreno minimo viene somministrata ornitina, che sta a valle del blocco metabolico o se viene somministrata citrullina, che sta due passi a valle del blocco metabolico, questo ceppo di mutanti riesce a crescere, perché evidentemente possiede un enzima B e un enzima C funzionali. Per la classe di mutanti (**classe 2**) che cominciava a crescere con la sola aggiunta di citrullina al terreno minimo, possiamo dedurre che l'enzima che non funziona in questa via metabolica è quello che agisce a monte della sintesi della citrullina: nel terreno minimo privo di aggiunta di amminoacidi l'enzima B non funziona e di conseguenza la via metabolica è bloccata al secondo passaggio; ma se a questo terreno minimo viene somministrata la citrullina che sta a valle del blocco metabolico, questo ceppo di mutanti riesce a crescere, perché evidentemente possiede un enzima C funzionale. Per la classe di mutanti (**classe 3**) che cresceva solo in presenza di arginina probabilmente avevano un enzima C non funzionale, per cui, aggiungendo sia ornitina che citrullina non riuscivano a superare il blocco metabolico. Con questi esperimenti l'ipotesi *un gene – un enzima* cominciò ad avere una valenza scientifica. Ovviamente gli enzimi sono proteine, ma non tutte le proteine sono enzimi, per cui il discorso va esteso a tutte le proteine: un gene codifica non un enzima, ma un polipeptide la cui funzione può essere enzimatica o strutturale. Alla luce di questi esperimenti possiamo affermare che **un gene codifica un polipeptide** e a seconda che il gene sia selvatico o mutato si possono avere comportamenti differenti: se un gene è mutato e la mutazione è **recessiva** possiamo immaginare che rispetto alla forma selvatica questo gene determini un funzionamento parziale del prodotto polipeptidico oppure un'assenza di funzionamento. Ma in un diploide, la presenza di un **allele selvatico** e di un **allele mutante recessivo** determinerà un fenotipo selvatico, perché ci saranno sia copie del polipeptide mutato sia copie del prodotto selvatico. Gli **alleli mutanti dominanti** non solo acquisiscono una funzione differente rispetto a quella degli alleli selvatici, ma inibiscono il corretto funzionamento del polipeptide selvatico e quindi, la presenza in eterozigosi di un **allele mutante dominante** determinerà la presenza (compresenza) all'interno della cellula di polipeptidi selvatici e di polipeptidi

mutanti, questi ultimi inibiscono la funzionalità dei polipeptidi selvatici e determinano di conseguenza la manifestazione del fenotipo mutante.

L'esistenza della complementazione ha consentito ai genetisti di utilizzare questo fenomeno per capire se le mutazioni sono alleliche o non; se sono mutazioni dello stesso gene o di geni differenti. Costruendo un **eterozigote** partendo da **linee pure** per queste mutazioni, se il suo fenotipo è **selvatico** deduciamo che i due ceppi che presentano fenotipo **mutante** sono mutanti in geni differenti; mentre se l'**eterozigote** continua a mostrare il fenotipo **mutante** deduciamo che le due mutazioni che stiamo analizzando sono mutanti nello **stesso gene**; ovvero possono essere **mutazioni differenti** ma nello stesso gene. Questo è definito **test di complementazione**. Questo test funziona **solo per mutazioni recessive**.

I caratteri a variazione continua

La selezione artificiale

Molti caratteri degli organismi viventi non possono essere descritti in classi fenotipiche discrete (come per i caratteri mendeliani, il colore dell'occhio di *Drosophila*, i geni legati al sesso) ma presentano una variabilità continua nelle popolazioni che va da un minimo fisiologico ad uno massimo fisiologico. Facciamo qualche esempio che riguarda la nostra specie. L'**altezza**: non possiamo descriverla fenotipicamente come due alternative possibili. Molto genericamente abbiamo l'idea di tre categorie fenotipiche (basso, media statura e alto), ma in queste categorie non c'è un'altezza precisa che possiamo riconoscere. Quindi, per stabilire un valore di riferimento, dovremmo stabilire l'altezza di tutte le persone prese in esame e riportare in grafico i valori ottenuti in modo tale da avere una distribuzione delle frequenze di tali misurazioni. Per la nostra specie rispetto al fenotipo altezza c'è un'altezza minima fisiologica al di sotto della quale si va nel **nanismo**, che è una forma patologica; c'è anche un'altezza massima fisiologica al di sopra della quale vi è il **gigantismo**, un'altra forma patologica: nell'analisi non vengono considerate le misure che sfociano nelle suddette patologie. Nei caratteri a variazione continua possiamo riscontrare tutte le variazioni fenotipiche possibili entro un minimo ed un massimo fisiologico. Un altro esempio, il **colore dei capelli**: quante gradazioni di colore dei capelli esistono? Tantissime. rispetto ad altre specie possiamo considerare, ad esempio, il numero di semi prodotto per pianta; il peso di ciascun seme, l'altezza della pianta. Negli animali da latte: il numero di litri di latte prodotti al giorno, il rapporto massa grassa massa magra per le specie di cui ci cibiamo; il potenziale riproduttivo (la fitness). I caratteri a variazione continua vengono anche chiamati **caratteri complessi** perché hanno un fenotipo che non dipende solo dal genotipo, ma dipende anche dall'ambiente in cui quel determinato genotipo si sviluppa.

I caratteri a variazione continua sono caratteri complessi

- Esperimenti di Johanssen sulla variabilità del peso dei semi di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*)

Linea pura 150 mg

Linea pura 750 mg

Variabilità ancora presente: componente ambientale

Johanssen è stato il primo a dimostrare sperimentalmente l'esistenza di una componente genetica e di una componente ambientale nella variabilità fenotipica dei caratteri a variazione continua. Questo scienziato scelse, come organismo modello, una pianta di fagiolo: notava che il peso del seme (del fagiolo) era

molto variabile. Cercò di selezionare delle linee pure di piante di fagiolo che avessero un fagiolo di peso più basso possibile (peso minimo del fagiolo 150mg), e linee pure di piante di fagiolo che avessero un fagiolo di peso più alto possibile (peso massimo 750mg), in modo tale che queste due linee di piante fossero genotipicamente omozigoti. Per creare queste linee pure, ovviamente Johannsen autofecondò le piante per molte generazioni e nonostante l'alto numero di incroci condotti, otteneva comunque all'interno delle linee pure variabilità fenotipica: non riusciva mai ad ottenere tutte piante che contenessero fagiolo di peso uguale, ma compariva sempre una variabilità compresa tra i valori di peso minimo e quello massimo; visto che dal punto di vista genotipico queste piante erano omozigoti, non si poteva attribuire questa variabilità fenotipica al genotipo. A questo punto la variabilità fenotipica descritta doveva essere attribuita ad una **componente ambientale**. A seconda della quantità di luce, umidità, quantità di sali presenti nel terreno, c'era un'influenza sul fenotipo finale indipendente dal genotipo, ma che comunque aveva un impatto sul genotipo.

La componente genetica della variabilità dei caratteri a variazione continua dipende dal contributo di numerosi geni

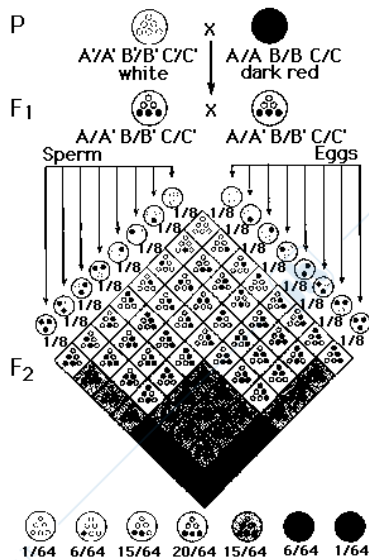
I genetisti all'inizio del 1900 cercarono di capire se, anche per i caratteri a variazione continua, ci si potesse in qualche modo riferire ad uno schema mendeliano. Un altro esperimento fondamentale è rappresentato dal lavoro di Nilsson-Ehle: la specie utilizzata in questo caso è il grano e il fenotipo analizzato in questo caso è il colore del chicco (fenotipo estremamente variabile che va da un bianco ad un rosso molto scuro e tra questi due estremi c'è una gradazione di fenotipi possibili: rosso meno chiaro, rosato).

► Esperimenti di Nilsson-Ehle sulla variabilità del colore dei chicchi di grano

P	Bianco x Rosso scuro
F1	Rosso intermedio
F2	7 classi fenotipiche 1: 6: 15: 20: 15: 6: 1

La prima operazione è stata l'autofecondazione per costruire delle linee pure con fenotipi estremi (bianco e rosso). Incrociando queste linee pure si ottenne una F1 costituita da piante i cui chicchi di grano avevano colore rosso intermedio. A questo punto le piante della F1 vennero incrociate e si costruì una F2: compaiono a questo punto tutti i fenotipi possibili che vanno dal bianco al rosso scuro, in particolare in questo tipo di esperimenti, Nilsson-Ehle riusciva a identificare **7 classi fenotipiche** differenti che comprendevano 5 classi fenotipiche tra i due fenotipi estremi (bianco e rosso scuro). Provò a contare quanti esemplari appartenessero ad ogni classe descritta e si ottenne la seguente proporzione (**1:6:15:20:15:6:1**). Una proporzione nuova. Il denominatore di questo rapporto è **64** (si ottiene sommando tutti i numeri del rapporto). Quindi **1/64** presentava fenotipo bianco; **6/64** fenotipo rosa pallido; **15/64** fenotipo rosa; **20/64** fenotipo rosso intermedio; **15/64** fenotipo rosso; **6/64** fenotipo rosso intenso; **1/64** fenotipo rosso scuro. (Ricordiamoci che questi calcoli escono fuori da linee pure). Pensando ad un rapporto mendeliano, il rapporto fenotipico in sessantaquattresimi ci riporta ad un incrocio di un **triibrido** (incrociando due triibridi otteniamo una progenie le cui classi fenotipiche sono 8, le cui frequenze sono espresse in /64). Già il fatto che la progenie dell'esperimento abbia delle frequenze esprimibili con denominatore 64 ci fa pensare alla progenie ottenuta da 2 triibridi e che quindi possa essere una modificazione del rapporto 27:9:9:3:9:3:3:1. Nel rapporto ottenuto nell'esperimento (**1:6:15:20:15:6:1**), 1/64 è rappresentato dalla classe meno abbondante (fenotipicamente bianca e genotipicamente omozigote recessiva per tutti e tre i caratteri di un triibrido, aabbcc), ma 1/64 è anche rappresentato dalla classe genotipicamente omozigote dominante per i tre caratteri di un triibrido (AABBCC) quindi, le altre classi fenotipiche comprese tra questi due valori descritti, differiscono tra loro per la presenza di un numero di alleli dominanti differenti all'interno del loro genotipo: la classe rosa pallida dovrebbe contenere nel genotipo un solo allele dominante (se i loci si chiamano A B e C, l'allele dominante potrebbe essere nel locus A, o nel locus B o nel locus C, il fenotipo non cambia, basta che almeno un allele sia dominante in uno di questi tre loci) e due alleli recessivi; la classe rosa

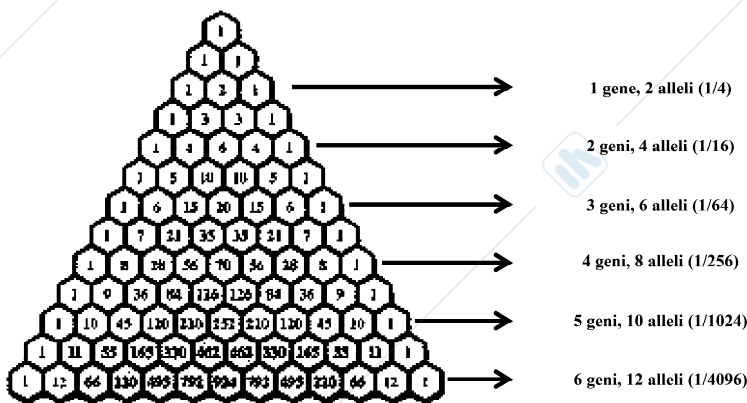
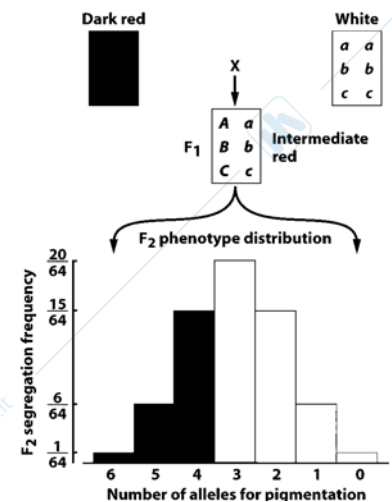
intenso dovrebbe avere due alleli dominanti e gli altri recessivi, e così via per le altre classi fenotipiche ottenute.



In figura abbiamo la rappresentazione col quadrato di Punnett dell'esperimento: ammettendo che i due parentali siano **omozigoti per forme alleliche differenti** (A'A' B'B' C'C') x (AA BB CC) dal loro incrocio si formeranno gli eterozigoti (A'A B'B C'C) di fenotipo rosso intermedio, e facendo lo schema di tutti gli incroci possibili dagli 8 tipi gametici otteniamo uno schema in cui ciascuno dei quadrati ha frequenza 1/64, perché (1/8 x 1/8 = 1/64). Il numero di progenie bianca avrà frequenza 1/64 perché sarà l'unica casella A'B'C', con le forme recessive degli alleli; stessa frequenza per la progenie rosso scuro che avrà un'unica

casella ABC, con le forme dominanti degli alleli. Le piante con un solo allele dominante e tutti gli altri recessivi hanno frequenza 6/64 (1/64 x 6). Le piante con due alleli dominanti avranno frequenza 15/64 (1/64 x 15). Le piante con tre alleli dominanti e 3 recessivi avranno frequenza 20/64 (1/64 x 20).

Questo comportamento si chiama **effetto genetico additivo**: stiamo ammettendo che in un certo fenotipo a variazione continua siano coinvolti più geni differenti, ciascuno dei quali contribuisce in ugual misura al fenotipo che osserviamo, in particolare, ogni forma allelica dominante determina un incremento di una stessa quantità del fenotipo che stiamo osservando. In questo caso stiamo prendendo in considerazione il fenotipo colore, la presenza di un allele dominante in più o in meno determinerà una quantità in più o in meno di pigmento indipendentemente dal gene in cui si trova questo allele; quindi è importante il numero di alleli dominanti, ma non la posizione di essi. Nel grafico abbiamo lungo le ascisse il numero di alleli che determinano la pigmentazione presenti in ciascuno dei genotipi della progenie (i loci sono 3) partendo quindi da un massimo di 6 alleli per il colore per arrivare a 0 alleli abbiamo una distribuzione delle frequenze fenotipiche che segue esattamente la curva a campana.



C'è un modo per capire rapidamente quante e quali sono le distribuzioni delle classi fenotipiche quando parliamo di geni con effetto additivo che possono essere più di tre? Ci viene in aiuto il triangolo di Tartaglia, che ci dà le informazioni sulla distribuzione delle frequenze fenotipiche della progenie di un incrocio tra due eterozigoti per tutti i geni coinvolti in quel carattere. Nella riga che contiene la sequenza (1 2 1) ci ritroviamo in una situazione di distribuzione fenotipica nel caso in cui il carattere in questione è determinato da un solo gene, perché avremmo una distribuzione (1/4, 1/2, 1/4). Nel caso in cui i

troviamo in una situazione di distribuzione fenotipica nel caso in cui il carattere in questione è determinato da un solo gene, perché avremmo una distribuzione (1/4, 1/2, 1/4). Nel caso in cui i

geni coinvolti fossero due (4 alleli) avremmo una progenie espressa in /16 (dall'incrocio tra due diibridi) e la distribuzione delle classi fenotipiche in **caso di effetto additivo** dei geni, sarebbe (1 4 6 4 1), cioè (1/16; 4/16; 6/16; 4/16; 1/16) con fenotipi estremi con fenotipi 1/16 ed 1/16. Se i geni coinvolti fossero 3 (6 alleli) avremmo un rapporto in /64 (1 6 15 20 15 6 1); se i geni fossero 4 (8 alleli) avremmo un rapporto in /256 (1 8 28 56 70 56 28 8 1) e così via.

Incrociamo due linee pure di tabacco con lunghezza della corolla

Esempio

Immaginiamo di incrociare due linee pure di tabacco che differiscono per la lunghezza della corolla, in particolare abbiamo una lunghezza minima della corolla di 41mm e una lunghezza massima della corolla di 93mm: questi valori rappresentano il minimo e il

41 mm x 93 mm

F1

67 mm

F2 totale 1000 piante di cui UNA con corolla di 41 mm

Quanti geni sono coinvolti in questo fenotipo?

Da questo incrocio otteniamo una F1 che presenta lunghezza della corolla di 67mm, e se incrociamo tra loro le piante della F1 otteniamo una F2 costituita da 1000 piante tra cui 1 sola ha lunghezza della corolla di 41mm. Possiamo da queste informazioni dedurre il

1/1000 si avvicina al rapporto 1/1024!!

numero di geni coinvolti nella lunghezza della corolla del tabacco? In questa F2 sono state misurate le piante che presentano un fenotipo estremo, quindi abbiamo una frequenza di queste piante (1/1000). Questo risultato non è un esatto rapporto fenotipico di progenie mendeliana, però somiglia molto ad 1 su 1024, è approssimabile a

Se fosse coinvolto 1 locus con 2 alleli, le classi con fenotipo estremo della F2 avrebbero una frequenza pari a $\frac{1}{4}$

Se i loci fossero 2, la frequenza sarebbe $\frac{1}{16}$

Se i loci fossero 3, la frequenza sarebbe $\frac{1}{64}$

Se i loci fossero 4, la frequenza sarebbe $\frac{1}{256}$

Se i loci fossero 5, la frequenza sarebbe 1/1024

questo rapporto, e quindi significa che almeno 5 geni sono coinvolti nella lunghezza della corolla. Possiamo stabilire ciascun allele dominante di quanti millimetri contribuisce alla lunghezza della corolla? Stabilito che i geni coinvolti in questo fenotipo sono almeno 5, dobbiamo stabilire qual è l'**intervallo di variabilità fenotipica** (perché non dobbiamo calcolare tutti i valori da 0 a 93, ma da 41 a 93): la pianta con genotipo omozigote recessivo avrà quindi lunghezza della corolla di 41mm; mentre la pianta con genotipo omozigote dominante avrà lunghezza della corolla 93mm: quindi, facendo la differenza tra la lunghezza massima e quella minima otteniamo l'intervallo di variabilità fenotipica di cui saranno responsabili gli alleli dominanti dei 5 loci. ($93 - 41 = 52\text{mm}$). Questo intervallo deve essere

distribuito tra i 10 alleli coinvolti nel fenotipo. Nella pianta con fenotipo massimo (93mm) abbiamo 10 alleli tutti nella forma dominante, quindi, questo intervallo lo dobbiamo dividere per i 10 alleli possibili dominanti che possono, all'interno di una pianta, una lunghezza massima. Quindi dividiamo l'intervallo di variabilità fenotipica per i 10 alleli coinvolti nel fenotipo ($52\text{mm}/10 = 5,2\text{mm}$): ciascun allele dominante darà un incremento di

La variabilità fenotipica osservata oscilla tra 41 mm e 93 mm ($93 - 41 = 52$ mm)

52 mm di variabilità ripartita tra 5 loci biallelici (quindi 10 alleli)

$52/10 = 5,2$ mm ciascun allele

5,2mm nella lunghezza della corolla rispetto al valore massimo e quello minimo. In riferimento a questo esercizio, se la pianta nel suo genotipo presenta 3 alleli dominanti, che lunghezza della corolla avrà? Ogni allele dominante dà un incremento di 5,2mm, per cui, partendo dal valore minimo 41mm aggiungiamo ad esso ($5,2\text{mm} \times 3 = 15,6\text{mm}$) per un totale di 56,6mm.

Per descrivere l'andamento dei caratteri a variazione continua è necessario avvalersi di una curva di distribuzione delle frequenze; quindi scegliere un campione rappresentativo nella popolazione.

Parametri per descrivere i caratteri a variazione continua

- **Media:** indica il centro della distribuzione delle frequenze; $\bar{X} = \Sigma X_i/n_i$
- **Moda:** indica il valore osservato con maggiore frequenza
- **Mediana:** indica il valore centrale della misurazione
- **Varianza:** misura il grado di dispersione dei valori intorno alla media; $s^2 = \Sigma (X_i - \bar{X})^2/(n - 1)$
- **Deviazione standard:** è la radice quadrata della varianza; $s = \sqrt{s^2}$

quindi ci dà un'idea dell'ampiezza della curva di distribuzione: quanto più si discostano dalla media maggiore è la varianza e più larga sarà la campana. Per misurare la varianza ci occorre il valore della media perché la varianza rappresenta la sommatoria dei quadrati delle differenze tra ogni singola misurazione e il valore medio delle misurazioni fratto n-1.

È proprio attraverso la misurazione della varianza che ci rendiamo conto di quanto sia variabile il fenotipo di un carattere complesso e poiché abbiamo affermato che nei caratteri a variazione continua c'è una componente genetica e una componente ambientale, la varianza fenotipica totale di un carattere a variazione continua, sarà data dalla somma di due differenti varianze, ovvero quella genetica e quella ambientale.

Nella **varianza fenotipica totale** per un carattere abbiamo due componenti: varianza genetica e varianza ambientale. La situazione si complica perché la **varianza genetica** è a sua volta scomponibile in tre tipi di varianza (sempre genetica): una è la **varianza genetica additiva**, una è la **varianza di dominanza** e una è la **varianza epistatica**. la **varianza genetica additiva** è quella dovuta all'effetto genetico additivo dei geni, è l'unica componente facilmente riconducibile allo schema mendeliano ed è la componente dei caratteri a variazione continua che più facilmente può essere studiata attraverso la genetica formale. Le altre due componenti, in particolare la **varianza epistatica**, è dovuta a tutte quelle interazioni tra geni che ci possono essere.

$$\text{Calcolo di } V_t = V_g + V_a$$

1) Calcolo della varianza totale (V_t)

Individuo	Genotipo	Ambiente	Lunghezza stelo (cm)
1	Arabico	Acido	16
2	Arabico	Basico	14
3	Baltico	Acido	12
4	Baltico	Basico	10

La **media** dei valori è $(16 + 14 + 12 + 10)/4 = 13$

La **varianza** è $[(16 - 13)^2 + (14 - 13)^2 + (12 - 13)^2 + (10 - 13)^2]/3 = 6,6 (V_t)$

arabico in ambiente acido e in ambiente basico sia il genotipo baltico in ambiente basico e in

Esistono dei parametri: il primo è la **media**, la media delle misurazioni e quindi il valore medio che corrisponde alla somma delle singole misurazioni fratto il numero delle misurazioni. La media non è un parametro molto significativo per l'andamento della curva; perché a tal proposito è necessario un altro parametro, la **varianza**. Essa misura la dispersione dei valori delle misurazioni intorno alla media, e

Varianza dei caratteri multifattoriali

$$V_t = V_g + V_a$$

- V_t (varianza totale)
- V_g (varianza genetica)
- V_a (varianza ambientale)

$$V_g = V_{ga} + V_d + V_i$$

- V_{ga} (varianza genetica additiva)
- V_d (varianza di dominanza)
- V_i (varianza epistatica)

È possibile discriminare tra la componente genetica e quella ambientale in un carattere a variazione continua? Certo. L'esempio proposto in figura riguarda la lunghezza dello stelo in piante di caffè. Abbiamo due genotipi differenti (genotipo arabico e genotipo baltico), e abbiamo due ambienti differenti (ambiente basico e ambiente acido). Per capire qual è la varianza fenotipica totale dobbiamo far crescere ciascuno dei due genotipi in ciascuno dei due ambienti: sia il genotipo

ambiente acido. Sono state effettuate 4 misurazioni per semplicità e ora possiamo calcolare la **varianza fenotipica**. Ci calcoliamo rapidamente la media (13), e poi la varianza (la sommatoria del quadrato della differenza tra ogni singola misurazione e la media delle misurazioni diviso il numero di misurazioni meno 1) ottenendo una **varianza fenotipica totale** di 6,6 Vt.

$$\text{Calcolo di } V_t = V_g + V_a \text{ (continua)}$$

2) Calcolo della varianza genetica (V_g)

Individuo	Genotipo	Ambiente	Lunghezza stelo (cm)
1	Arabico	Acido	16
2	Arabico	Acido	16
3	Baltico	Acido	12
4	Baltico	Acido	12

La media dei valori è $(16 + 16 + 12 + 12)/4 = 14$

La varianza è $[(16 - 14)^2 + (16 - 14)^2 + (12 - 14)^2 + (12 - 14)^2]/3 = 5,3$ (V_g)

Qual è la componente di varianza genetica e la componente di varianza ambientale? Per calcolare la componente genetica devo annullare quella ambientale e quindi le misurazioni fenotipiche dei due genotipi devo effettuarle in un unico ambiente, per esempio nell'ambiente acido. dopo aver effettuato le misurazioni viene calcolata la media e la varianza (5.3 V_g). Va effettuata la stessa operazione anche nell'altro ambiente. A questo punto è possibile calcolare la varian-

$$\text{Calcolo di } V_t = V_g + V_a \text{ (continua)}$$

3) Calcolo della varianza ambientale (V_a)

Individuo	Genotipo	Ambiente	Lunghezza stelo (cm)
1	Arabico	Acido	16
2	Arabico	Acido	16
3	Arabico	Basico	14
4	Arabico	Basico	14

La media dei valori è $(16 + 16 + 14 + 14)/4 = 15$

La varianza è $[(16 - 15)^2 + (16 - 15)^2 + (14 - 15)^2 + (14 - 15)^2]/3 = 1,3$ (V_a)

$$V_t = V_g + V_a = 5,3 + 1,3 = 6,6$$

è dovuta alla componente genetica. E rispetto a questo parametro possiamo fare una distinzione: l'ereditabilità si indica con la lettera H^2 ma può essere un **ereditabilità in senso lato** H^2 che è il rapporto tra la varianza genetica e la varianza totale di quel carattere; più frequentemente si utilizza l'**ereditabilità in senso stretto** h^2 che rappresenta il rapporto tra la varianza genetica additiva e la varianza fenotipica totale. Si utilizza più frequentemente la seconda perché lo studio della **componente genetica additiva** al

za ambientale per sottrazione dalla varianza totale.

Se invece volessimo calcolare **sperimentalmente** la varianza ambientale dovremmo annullare la componente genetica: prendere un solo genotipo per volta ed effettuare le misurazioni nell'ambiente acido e nell'ambiente basico e calcolare la varianza.

Possiamo utilizzare un parametro, l'**ereditabilità**, di un carattere a variazione continua, per indicare la proporzione di varianza fenotipica totale di quel carattere che

L'**ereditabilità** è la proporzione di variabilità fenotipica attribuibile alle differenze genetiche.

$$\text{Ereditabilità in senso lato } H^2 = V_g/V_t$$

$$\text{Ereditabilità in senso stretto } h^2 = V_{ga}/V_t$$

fenotipo di un carattere a variazione continua è l'approccio più semplice.

La selezione artificiale

$$M_p = \mu + h^2(M_{gs} - \mu)$$

M_p = media della progenie

μ = media della popolazione

h^2 = ereditabilità in senso stretto

M_{gs} = media dei genitori selezionati

$$M_p - \mu = h^2(M_{gs} - \mu) = \text{risposta alla selezione}$$

La selezione artificiale è una pratica che l'uomo utilizza per selezionare delle varietà attraverso incroci programmati. A livello della coltura e dell'allevamento vengono quindi fatti degli incroci programmati sulla base di conoscenze genetiche. In definitiva la **selezione artificiale** è quel processo che consente di selezionare o di spingere verso un certo fenotipo di interesse partendo da una popolazione in cui il carattere a

variazione continua ha una sua distribuzione di frequenze fenotipiche. Quello che ci interessa di generazione in generazione a livello di selezione artificiale è la risposta alla selezione, ovvero, capire di quanto di generazione in generazione ci si avvicina verso il fenotipo che si vuole raggiungere. La **risposta alla selezione** è uguale alla differenza tra la media della progenie ottenuta dopo la selezione e la media della generazione precedente. A sua volta, è uguale all'**ereditabilità in senso stretto** (quindi la componente genetica additiva) che moltiplica la differenza tra la media dei genitori che abbiamo selezionato e la media della popolazione all'interno della quale sono stati selezionati.

La selezione artificiale (continua)

La **risposta alla selezione** è la differenza tra la media della progenie e la media della popolazione sulla quale si sta facendo selezione: $R_s = M_p - \mu$. Misura il cambiamento di un carattere in una generazione.

La **selezione differenziale** è la differenza tra la media dei genitori selezionati e la media della popolazione: $S_d = M_{gs} - \mu$.

$$\text{Poiché } M_p - \mu = h^2(M_{gs} - \mu), R_s = h^2 S_d$$

lezione artificiale che spinga le spigole a raggiungere un accrescimento di 200g in un tempo minore rispetto ai classici 20 mesi. Il proprietario andrà a selezionare dei genitori per effettuare un incrocio programmato che non abbiano un peso corrispondente al peso medio, ma che abbiano raggiunto a 20 mesi un peso maggiore (esempio 250g).

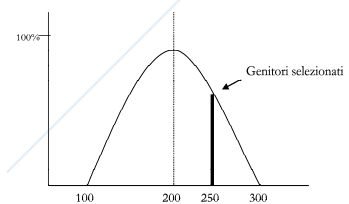
Selezionando genitori con un peso di 250g all'interno di una popolazione che ha un valore medio di 200g ed effettuando una serie di incroci programmati, la risposta alla selezione nella prima generazione sarà uguale all'**ereditabilità in senso stretto** del carattere che moltiplica la differenza tra la media dei genitori selezionati e la media della popolazione (in totale il calcolo dà come risultato 17g): quindi in prima generazione abbiamo avuto una risposta alla selezione di 17g, il che significa che in questa popolazione

Immaginiamo di avere a che fare con un allevamento di **spigole** la cui commercializzazione avvenga nel momento in cui ogni spigola raggiunge un peso di 200g. Questi 200g di peso vengono raggiunti in 20 mesi (l'accrescimento medio è di 10g al mese): in questo periodo queste bestiole devono essere nutrite e curate. Il proprietario di questo allevamento vuole ridurre i costi senza comprometterne la qualità facendo una se-

La selezione artificiale: un esempio

Il peso corporeo medio delle spigole alla vendita è circa 200 gr, raggiunto in circa 20 mesi. L'**accrescimento medio** è di 10 gr/mese.

Si intendono **selezionare** le spigole in modo da migliorarne il tasso di accrescimento e ridurre il tempo necessario a raggiungere i 200 gr di peso corporeo.



ottenuta da un incrocio controllato, a 20 mesi avremo un peso medio di 217g, quindi i 200g li raggiungeremo prima dei 20 mesi! Avendo ottenuto un miglioramento di 0,85g al mese raggiungeremo i 200g all'incirca in 18 mesi! Abbiamo ridotto di circa due mesi il raggiungimento del peso medio (il che incide sul risparmio nei costi di gestione dell'allevamento). In seconda generazione la risposta alla selezione sarà 0,3 che moltiplica (250-217) ovvero pari a 11g, peso medio di 228g e un miglioramento di 1,4g al mese rispetto all'inizio e quindi un raggiungimento di 200g in 17,5 mesi.

Si incrociano le spigole di peso medio 250 gr. Supponendo $h^2 = 0,3$, si otterrà:

- I generazione:** $R_s = 0,3 (250 - 200) = 17$ gr circa
 Peso medio della progenie = 217 gr
 Miglioramento = 0,85 gr/mese
 Raggiungimento dei 200 gr medi in circa 18 mesi
- II generazione:** $R_s = 0,3 (250 - 217) = 11$ gr circa
 Peso medio della progenie = 228 gr
 Miglioramento = 1,4 gr/mese
 Raggiungimento dei 200 gr medi in circa 17,5 mesi
- III generazione:** $R_s = 0,3 (250 - 228) = 7$ gr circa
 Peso medio della progenie = 235 gr
 Miglioramento = 1,7 gr/mese
 Raggiungimento dei 200 gr medi in circa 17 mesi
e così via

Limiti della selezione artificiale

Esperimento di Enfield su *Tribolium castaneum*

Generazione 0: peso medio pupe 2400 μg

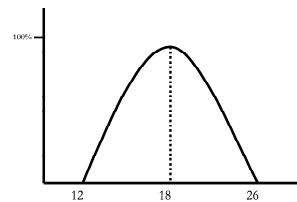
Generazione 125: peso medio pupe 5800 μg

Tra la generazione 40 e la 125 si osserva una riduzione progressiva della risposta alla selezione, dovuta ad una correlazione inversa tra fertilità e aumento delle dimensioni corporee.

Ci rendiamo conto che man mano che procedono le generazioni la risposta alla selezione si riduce via via, quindi non possiamo spingere la popolazione all'infinito verso un determinato carattere perché stiamo selezionando più geni responsabili di un unico fenotipo (stiamo mettendo in omozigosi troppi geni).

Studio dei caratteri a variazione continua

- Scelta di un campione rappresentativo di una popolazione.
- Misurazione del carattere in analisi.
- Rappresentazione grafica dei dati come distribuzione delle frequenze.



Distribuzione delle frequenze del numero di setole sul V sternite addominale nei maschi di un ceppo di *Drosophila melanogaster*.

LEZIONE 9 (31/03/2015)

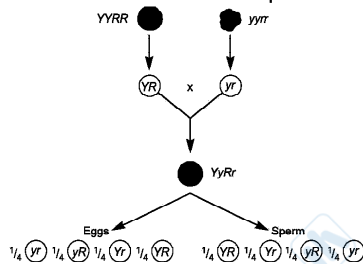
L'associazione genica

La ricombinazione e la mappatura dei geni

Fino ad ora abbiamo imparato dai principi di Mendel che gli alleli di geni differenti durante la meiosi assortiscono indipendentemente l'uno dall'altro e ciò determina un'enorme variabilità nella produzione dei gameti. Attraverso gli esperimenti di Morgan abbiamo dimostrato che i geni si trovano sui cromosomi perché seguono esattamente il comportamento dei geni in meiosi.

ASSORTIMENTO INDIPENDENTE

- ▶ Il principio di Mendel dell'assortimento indipendente
 - ▶ Gli alleli di geni differenti assortiscono in modo indipendente durante la meiosi
 - ▶ I geni si trovano sui cromosomi
 - ▶ I cromosomi assortiscono in modo indipendente durante la meiosi



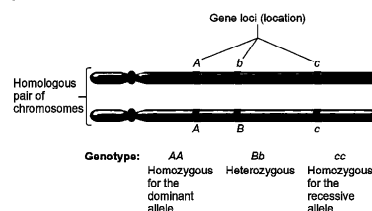
12,5%).

Ogni specie ha alcune migliaia di geni e per quanto il numero di cromosomi sia variabile da specie a specie, i cromosomi sono alcune decine; e poiché i geni si trovano sui cromosomi è implicito dedurre che su ogni cromosoma si trovi più di un gene. I geni che si trovano sullo stesso cromosoma **non assortiscono indipendentemente**, non seguono quindi il principio di segregazione mendeliano, ma vengono ad essere ereditati all'interno dei gameti nello stesso assetto in cui si trovano sui cromosomi dell'individuo che sta facendo meiosi. Nell'immagine abbiamo una coppia di cromosomi omologhi sui quali sono rappresentati 3 geni (A, B, C), il gene A è in omozigosi dominante (c'è un allele A su ciascuno dei due cromosomi), il gene C è in omozigosi recessiva (c'è un allele c su ciascuno dei due cromosomi), il gene B che si trova tra A e C è in eterozigosi (c'è un allele b su un cromosoma e un allele B sull'altro cromosoma).

Nell'immagine osserviamo una meiosi di un **diibrido** (che si ottiene dall'unione di due linee pure, una omozigote dominante e una omozigote recessiva per due geni) e notiamo che da questo diibrido possono venir fuori **4 tipi di gameti differenti** e quando i geni si trovano su cromosomi indipendenti questi 4 tipi di gameti sono **equiprobabili** o **equifrequenti**. Per il **triibrido** i tipi di gameti sono **8** e anche in questo caso se i geni sono indipendenti le **8 classi gametiche** sono equiprobabili (ciascuna delle classi gametiche del triibrido avrà frequenza 1/8 o

ASSOCIAZIONE GENICA

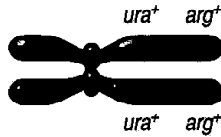
- ▶ Ogni specie ha migliaia di geni differenti
 - ▶ La maggior parte delle specie possiede qualche decina di cromosomi
 - ▶ Ciascun cromosoma deve contenere qualche centinaio di geni
 - ▶ I geni presenti su uno stesso cromosoma **NON** assortiscono in modo indipendente durante la meiosi!



ASSOCIAZIONE GENICA (*LINKAGE*)

La trasmissione di due o più caratteri può essere studiata effettuando incroci opportuni

- ▶ Il risultato di tali incroci dipende dalla associazione o dall'indipendenza dei geni che determinano i caratteri in esame



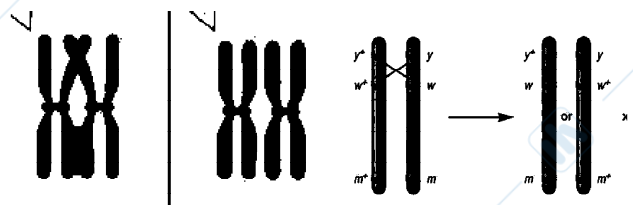
alleli recessivi.

In merito alla meiosi abbiamo sempre detto che il prima divisione meiotica i cromosomi si appaiano, formano le tetradi e può avvenire il **crossing-over**: è uno scambio fisico di pezzi di DNA tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi. Nell'immagine possiamo osservare come lo scambio porti ad uno spostamento fisico di un pezzo di cromosoma che fa parte della coppia ereditata dalla madre con il cromosoma che fa parte della coppia ereditata dal padre: un pezzettino del cromatidio materno è andato a finire sul cromatidio paterno e un pezzettino di cromatidio paterno è andato a finire su quello materno. Se posizioniamo dei geni su questi cromosomi ci rendiamo conto che il crossing-over è avvenuto nello spazio che si trova tra due geni consecutivi. E cosa accade il crossing-over tra due geni? Avviene la formazione di **configurazioni** genetiche diverse da quelle di partenza. Nell'esempio in figura abbiamo un tribrido per tre marcatori ($y^+ w^+ m^+$) su un omologo e la forma recessiva ($y w m$) sull'altro omologo. Viene schematizzato uno scambio tra y e w (nella regione compresa tra questi due marcatori). Se avviene uno scambio avremo un cromatidio che avrà $y^+ w m$; ed un cromatidio che avrà $y w^+ m^+$. Poiché questo evento avviene durante la meiosi dopo la replicazione dei cromosomi, ciascuno di questi cromosomi avrà un cromatidio fratello che non è stato coinvolto nel crossing-over, per cui ci saranno anche i cromatidi con l'assetto parentale ($y^+ w^+ m^+$) e ($y w m$). Il crossing-over genera quindi a livello meiotico delle combinazioni alleliche diverse da quelle di partenza: genera variabilità. In sintesi, il crossing-over sommato all'assortimento indipendente genera un'enorme tasso di variabilità meiotico.

Nell'immagine si può osservare la formazione delle tetradi, o **bivalente**, che si appaiano e si può notare il loro legame attraverso i centromeri alle fibre del fuso per poi essere indirizzati uno verso un polo e l'altro verso il polo opposto al primo.

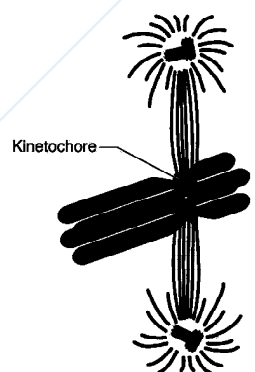
Alleli di geni differenti possono essere presenti sullo stesso cromosoma (associati)

- ▶ Il loro stato di associazione può essere alterato durante la meiosi
- ▶ I cromosomi omologhi possono scambiarsi dei pezzi
 - ▶ "Crossing over" (profase della meiosi I)



ASSOCIAZIONE GENICA (*LINKAGE*)

- ▶ I cromatidi fratelli di un cromosoma si appaiano con i cromatidi fratelli del cromosoma omologo
 - ▶ Due coppie di cromatidi fratelli formano un "bivalente"
 - ▶ Un cromatidio scambia dei pezzi con un cromatidio non fratello del cromosoma omologo
 - ▶ Questo scambio può alterare la configurazione degli alleli associati
 - ▶ Il crossing over può determinare la **ricombinazione genetica**



► Configurazione **cis** (o *coupling*)

► I gameti **AB** e **ab** sono

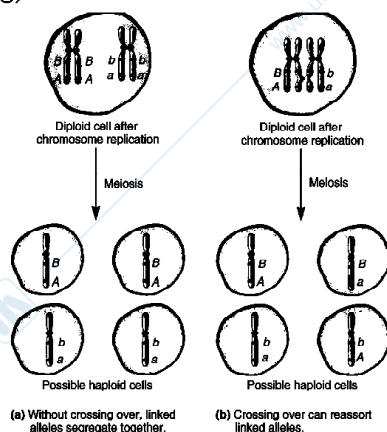
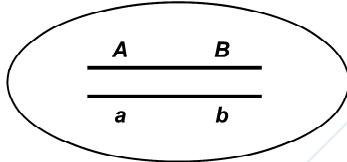
parentali

► “**Non-ricombinanti**”

► I gameti **Ab** e **aB** sono

non-parentali

► “**Ricombinanti**”



Consideriamo un **diibrido** come rappresentato in figura: su un cromosoma sono posizionati i due alleli dominanti (A, B) sul cromosoma omologo gli alleli recessivi (a, b). Questo tipo di configurazione genetica si chiama **associazione in cis**, oppure **coupling**, cioè in accoppiamento: i due alleli dominanti dei due geni differenti si trovano entrambi su un cromosoma e i due alleli recessivi si trovano sul cromosoma omologo. Dalla meiosi di un individuo ce presenti questi due

cromosomi omologhi descritti, quanti tipi di gameti possono essere prodotti? La risposta è sempre 4; il problema è che questi 4 tipi di gameti differenti **non saranno equiprobabili**, (sarebbero invece equiprobabili se i due geni si trovassero su cromosomi differenti) perché può avvenire il **crossing-over** e i quattro tipi di gameti che verranno fuori saranno (AB; ab; Ab; aB). I gameti che hanno lo stesso assetto dell'individuo di partenza (stessa configurazione) AB ed ab si chiamano gameti **parentali** o **gameti non ricombinanti**; mentre i gameti che vengono fuori dalla ricombinazione nella regione compresa tra A e B presentano un assetto diverso rispetto all'individuo di partenza (configurazione opposta) Ab ed aB si chiamano gameti **non-parentali** o **gameti ricombinanti**. Poiché abbiamo detto che il crossing-over è un fenomeno che può avvenire (potrebbe anche non avvenire), la probabilità di avere gameti parentali rispetto a gameti ricombinanti sarà maggiore (la **frequenza** di gameti parentali è maggiore di quella dei gameti ricombinanti). Ricordiamo che nella stessa meiosi in cui vengono prodotti gameti ricombinanti devono necessariamente essere prodotti anche i gameti parentali.

Se invece la posizione dei geni sui due cromosomi omologhi è come quella del diibrido rappresentato in figura (Ab//aB) questo tipo di configurazione genetica si chiama **associazione in trans**, oppure **repulsion**, cioè in repulsione: su un cromosoma c'è l'allele dominante di un gene e l'allele recessivo del gene associato; sul cromosoma omologo c'è l'allele recessivo del gene dominante sul cromosoma di prima e l'allele dominante del gene recessivo sul cromosoma di prima. Quindi avremo Ab su un cromosoma e aB sul cromosoma omologo. Quanti tipi di gameti può produrre questo diibrido? Sempre 4 tipi di gameti, ma poiché i geni sono **associati non saranno equiprobabili**. Quali saranno i gameti parentali di questo diibrido? Saranno Ab e aB e saranno anche i più frequenti; mentre se avviene ricombinazione (crossing-over) nella regione tra A e B si formeranno i gameti ricombinanti AB e ab, che saranno meno frequenti dei gameti parentali. Parlare di parentali e ricombinanti ha significato quando si fa riferimento alla **numerosità** della progenie perché i parentali saranno sempre i più abbondanti mentre i ricombinanti i meno abbondanti. Quali saranno gli individui parentali e quali i ricombinanti in una progenie? Dipende sempre dalla configurazione dell'individuo che ha fatto la meiosi. Nel nostro esempio la configurazione del diibrido è **trans** (Ab//aB) di conseguenza gli individui **parentali** ottenuti nella progenie rappresentati in maggior numero saranno quelli con fenotipo Ab e aB.

► Configurazione **trans** (o *repulsion*)

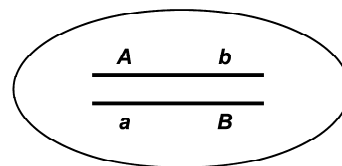
► I gameti **Ab** e **aB** sono **parentali**

► “**Non-ricombinanti**”

► I gameti **AB** e **ab** sono

non-parentali

► “**Ricombinanti**”

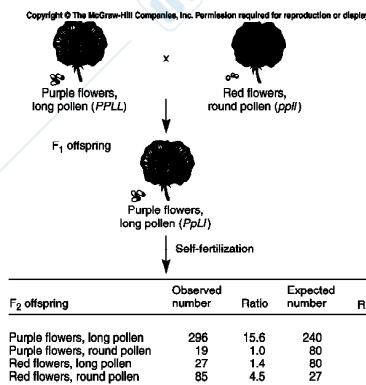


- ▶ *Lathyrus odoratus* (pisello dolce)
 - ▶ Colore del fiore
 - ▶ Porpora dominante su rosso
 - ▶ Forma del polline
 - ▶ Ovale dominante su tondo

Le prime osservazioni e la prima ipotesi sull'associazione genica furono fatte all'inizio del 1900 da **Bateson e Punnett** sul Pisello Dolce. Questi due genetisti si proposero di analizzare questi due fenotipi: il colore del fiore porpora intenso (dominante) e rosso (recessivo) e la forma del polline ovale (dominante) e tondo (recessivo).

BATESON & PUNNETT, 1905

- ▶ Porpora, ovale (*PPLL*) x rosso, tondo (*ppll*)
 - ▶ F₁ porpora, ovale (*PpLl*)
 - ▶ F₂ quattro fenotipi differenti
 - ▶ 296 porpora, ovale
 - ▶ 19 porpora, tondo
 - ▶ 27 rosso, ovale
 - ▶ 85 rosso, tondo
 - ▶ Il rapporto osservato è 15.6 : 1.0 : 1.4 : 4.5
 - ▶ Ben lontano dall'atteso 9 : 3 : 3 : 1

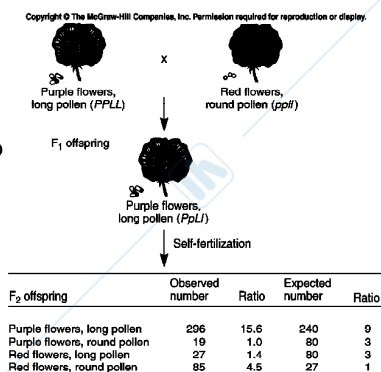


Utilizzarono il classico approccio mendeliano costruendosi delle linee pure dominanti per entrambi i caratteri (*PPLL*) e linee pure recessive per entrambi i caratteri (*ppll*); dove *PPLL* (porpora e polline ovale) e *ppll* (rosso e polline tondo). Incrociando tra loro le due linee pure si ottenne una F₁ diibrida (*PpLl*) fenotipicamente dominante per entrambi i caratteri (porpora e polline ovale). Autofecondando la F₁ (*PpLl* x *PpLl*) Bateson e Punnett ottennero risultati molto strani:

296 piante con fiori porpora e polline ovale (*P-L-*); 19 piante con fiori porpora e polline tondo (*P-l*); 27 piante con fiori rossi e polline ovale (*pL-*); 85 piante con fiori rossi e polline tondo (*ppl*). Se i due geni avessero un comportamento mendeliano indipendente il rapporto fenotipico di questa progenie dovrebbe essere (9:3:3:1) e cioè 9/16 *P-L-*; 3/16 *P-l*; 3/16 *pL-*; 1/16 *ppl*. Il rapporto ottenuto è ben lontano dal rapporto di un diibrido mendeliano, e applicando un test del chi-quadro il valore ottenuto ci spinge a rifiutare l'ipotesi di una segregazione indipendente: il chi-quadro ci dirà che gli scostamenti che stiamo osservando tra i numeri osservati e quelli attesi sono statisticamente significativi, non dovuti al caso; di conseguenza i risultati osservati non possono soddisfare l'ipotesi della segregazione indipendente. In questo modo Bateson e Punnett dimostrarono che questi due geni non segregano indipendentemente, ipotizzando che fossero posizionati sullo stesso cromosoma, ma non riuscirono a dimostrarlo: ricordiamoci che all'inizio del 1900 non ancora tutti gli scienziati credevano all'esistenza dei cromosomi, molti di essi ritenevano che le strutture che si riuscivano a visualizzare anche al microscopio ottico fossero degli artefatti delle tecniche utilizzate per la preparazione dei vetrini da visualizzare.

Bateson e Punnett prestarono attenzione all'abbondanza di alcune classi fenotipiche a discapito di altre classi e cioè, nella F₂ osservavano un maggior numero di classi che fenotipicamente somigliavano ai parentali, invece la classi che avevano un assetto diverso rispetto ai parentali erano meno abbondanti. A chiarire la situazione osservata dai due scienziati fu Morgan.

- ▶ Nella generazione F₂
 - ▶ I fenotipi **parentali** (porpora, ovale) sono **sovra-rappresentati**
 - ▶ I fenotipi **non-parentali** (tutti gli altri) sono **sotto-rappresentati**
- ▶ Questi due geni non assortiscono in modo indipendente
 - ▶ Sono quindi associati
 - ▶ La natura di questa associazione fisica non era chiara a Bateson e Punnett



Morgan ha dimostrato sperimentalmente che geni posizionati sullo stesso cromosoma sono fisicamente associati utilizzando *Drosophila* come organismo modello.

THOMAS HUNT MORGAN

▶ Thomas Hunt Morgan

- ▶ Ha dimostrato che i geni si trovano sui cromosomi
- ▶ Ha dimostrato che geni differenti sono fisicamente associati sullo stesso cromosoma



THOMAS HUNT MORGAN

▶ I caratteri analizzati da Morgan

- ▶ L'allele corpo giallo (y) è recessivo rispetto a corpo grigio (y^+)
- ▶ L'allele occhio bianco (w) è recessivo rispetto a occhio rosso (w^+)
- ▶ L'allele ala piccola (m) è recessivo rispetto ad ala normale (m^+)



Morgan analizzò tutti i caratteri X-linked in *Drosophila*, in particolare il gene **white** (w) responsabile del colore dell'occhio (w occhio bianco e w^+ occhio rosso); il gene **yellow** (y) responsabile del colore del corpo (y corpo giallo e y^+ corpo grigio); il gene **miniature** (m) che determina la **morfologia dell'ala** (m ala piccola ed m^+ ala normale).

Questi tutti e tre geni X-linked e si comportano tutti come **white**, già analizzato precedentemente.

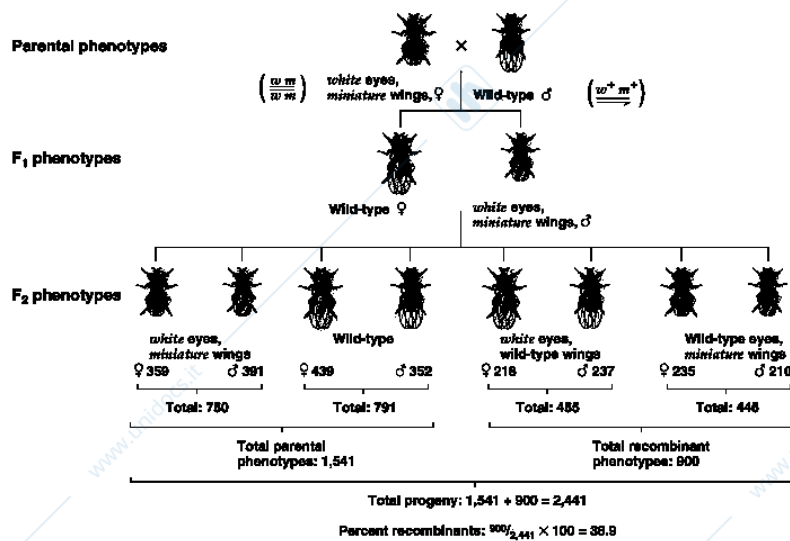
Effettuando un incrocio tra una femmina recessiva per il gene responsabile del colore dell'occhio e per il gene responsabile della morfologia dell'ala ($w m/w m$) ed un maschio selvatico ($w^+ m^+/Y$), dove Y è il cromosoma sessuale maschile e non il gene yellow! Nella F1 vennero fuori tutte le figlie femmine fenotipicamente selvatiche perché ereditano una delle due X dal padre, il quale ha i due alleli selvatici che sono dominanti e genotipicamente doppie eterozigoti perché una X la ereditano dal padre (responsabile del loro fenotipo) ed una X dalla madre omozigote recessiva, avranno genotipo ($w^+ m^+/w m$) con configurazione genetica in **cis**. I maschi ottenuti alla F1 avevano tutti occhio bianco e ali corte ($w m/Y$) perché ereditano l'unico cromosoma X dalla madre, ed erano quindi genotipicamente emizigoti.

- ▶ Il gene occhio bianco (w) si trova sul cromosoma X.
- ▶ Morgan (1911) incrociò una femmina occhio bianco e ali piccole ($w m/w m$) con un maschio selvatico ($w^+ m^+/Y$).
- ▶ Nella F1, tutti i maschi avevano occhio bianco e ali piccole e tutte le femmine erano selvatiche.
- ▶ Morgan concluse che durante la meiosi gli alleli del gene m (ali piccole) si comportano come quelli che determinano occhio bianco: anche il gene *miniature* si trova sul cromosoma X.

- ▶ L'incrocio tra gli individui della F1 è equivalente a un reincrocio per questi geni X-linked recessivi, in quanto i maschi della F1 sono emizigoti recessivi ($w m/Y$).
- ▶ Nella F2, i fenotipi più frequenti in entrambi i sessi sono quelli dei parentali dell'incrocio di partenza (occhio bianco ali piccole e occhio selvatico ali selvatiche).
- ▶ I fenotipi non-parentali hanno una frequenza di circa il 37% della progenie F2 (18,5% occhio bianco ali selvatiche e 18,5% occhio selvatico ali piccole).
- ▶ I fenotipi non-parentali sono il risultato di una ricombinazione tra i due geni associati.

Nella F2, così come ci aspettiamo dalle modalità di trasmissione dei caratteri legati al sesso, otteniamo tutte femmine genotipicamente eterozigoti e fenotipicamente dominanti per entrambi i caratteri, e maschi genotipicamente emizigoti ($w^+ m^+/Y$) e ($w m/Y$) e fenotipicamente con occhio bianco ed ali piccole e occhio selvatico e ali selvatiche. Venne fuori un rapporto sbilanciato tra le *Drosophila*

che avevano un fenotipo parentale (occhio bianco e ali corte; occhio selvatico e ali selvatiche) e quelle che avevano un fenotipo non-parentale (occhio bianco e ali selvatiche; occhio selvatico e ali corte): la frequenza del fenotipo parentale era del 63% e quella del non-parentale del 37% ovvero risultati non riconducibili ad un rapporto non di tipo mendeliano. La presenza nella F2 di fenotipi **non-parentali** deriva dalla **ricombinazione** tra i geni **white** e **miniature** nelle femmine della F1 che venivano incrociate con i maschi mutanti per entrambi i caratteri per generare la F2.



Nell'immagine vediamo schematizzato l'incrocio con i risultati numerici ottenuti. Otteniamo alla F2 359 femmine mutanti (occhio bianco e ali corte), 391 maschi mutanti (occhio bianco e ali corte) per un totale di 750 Drosophile recessive (mutanti) per entrambi i caratteri; poi 439 femmine selvatiche e 352 maschi selvatici per un totale di 791 Drosophile selvatiche (questi due gruppi di Drosophile, mutanti per i due caratteri e selvatiche per i due caratteri rappresentano la classe più abbondante della progenie e hanno genotipo parentale. Le altre

classi della progenie rappresentano i prodotti della ricombinazione e sono le meno abbondanti.

Morgan concluse che quanto più due alleli di geni associati sono vicini, tanto più tendono ad essere ereditati come un'unità e tanto meno assetti ricombinanti osserveremo nella progenie. Quindi, la probabilità con cui può avvenire la ricombinazione tra i geni associati dipende dalla distanza fisica tra i due geni in questione.

Morgan propose che:

Durante la meiosi gli alleli di alcuni geni assortiscono insieme, in quanto si trovano vicini sullo stesso cromosoma.

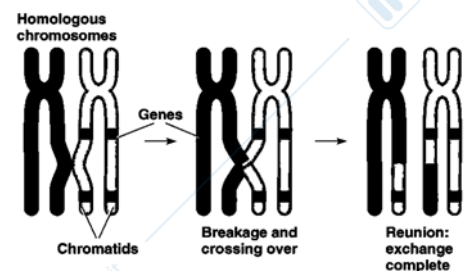
La comparsa di fenotipi non-parentali è dovuta dovuta alla ricombinazione tra i cromosomi X delle femmine della F1.

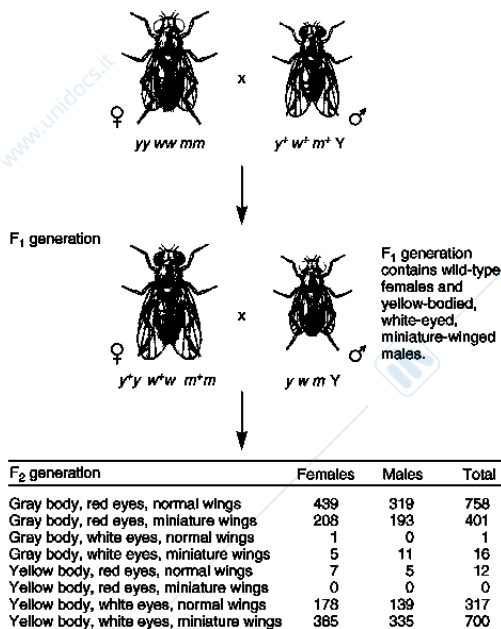
TERMINOLOGIA

- ▶ Un **chiasma** è il sito in cui avviene il crossing-over tra due cromosomi omologhi.
- ▶ Il **crossing-over** è lo scambio reciproco di pezzi di cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi che avviene attraverso rottura e riunione del DNA.
- ▶ Il crossing-over è l'evento che determina ricombinazione dei marcatori analizzati sia nei procarioti sia negli eucarioti.

Nell'immagine è possibile osservare la formazione di cromosomi ricombinanti attraverso la rottura e riunione di cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi; all'interno della tetrade ci sono due cromatidi non fratelli ricombinanti e due cromatidi non fratelli parentali.

In genetica spesso si utilizza il termine ricombinazione come sinonimo di crossing-over, ma in realtà la ricombinazione è la conseguenza di un avvenuto crossing-over.





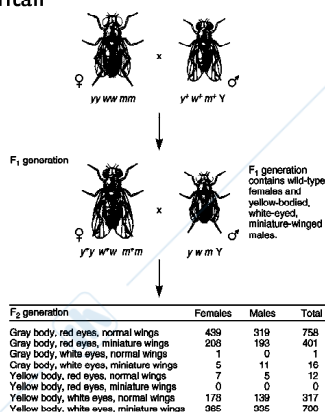
Successivamente, Morgan considerò tutti e tre i geni (w, y, m) per valutarne il comportamento. Si costruì delle linee pure per i tre caratteri, quindi delle femmine omozigoti recessive (yy ww mm) e maschi selvatici (y⁺ w⁺ m⁺/Y). Incrociando queste due linee pure nella F₁ venivano fuori delle femmine fenotipicamente selvatiche e genotipicamente eterozigoti (y⁺ y w⁺ w m⁺ m) e maschi fenotipicamente mutanti e genotipicamente emizigoti (y w m Y). Incrociando gli individui della F₁ effettuarono un reincrocio (perché incrociavano femmine eterozigoti con maschi emizigoti recessivi), e siccome le femmine sono tribridi ci aspettiamo alla F₂ 8 classi fenotipiche: se i tre geni fossero stati indipendenti ci saremmo aspettate queste otto classi rappresentate con la stessa frequenza, ma non è così.

Le otto classi fenotipiche osservate alla F₂ da Morgan erano così distribuite: 2 classi con la stessa frequenza (758 e 700) che corrispondevano ai genotipi parentali, gli altri assetti sono tutti ricombinanti! Tra i ricombinanti osserviamo 2 classi equifrequenti (400 e 317) e sono classi con fenotipo reciproco (corpo selvatico - occhio mutato - ali mutate) e (corpo mutato - occhio selvatico - ali selvatiche); poi abbiamo altre due classi equifrequenti (16 e 12) meno rappresentate e anch'esse reciproche; altre due classi (0 e 1) che sono anch'esse reciproche.

► Elevata proporzione di combinazioni parentali

► Presenza di combinazioni non parentali

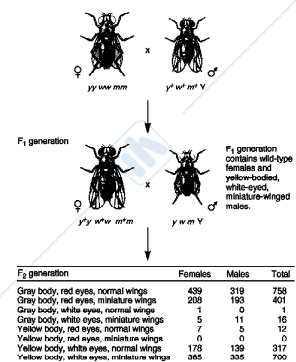
- 758 y⁺ w⁺ m⁺ ← Parentali
- 700 yy ww mm ← Parentali
- 401 y⁺ w⁺ mm
- 317 yy ww m⁺
- 16 y⁺ ww mm
- 12 yy w⁺ m⁺
- 1 y⁺ ww m⁺
- 0 yy w⁺ mm



Poiché stiamo parlando di tre marcatori (3 geni) abbiamo la possibilità che avvenga un crossing-over tra il primo marcatore ed il marcatore centrale, la probabilità che avvenga tra il marcatore centrale e l'ultimo marcatore (come singoli crossing-over), ma c'è anche la possibilità che in una meiosi

THOMAS HUNT MORGAN

- Generazione P: yy ww mm × y⁺ w⁺ m⁺ Y
- Generazione F₁: y⁺ y w⁺ w m⁺ m × y w m Y
- Generazione F₂
 - 758 y⁺ w⁺ m⁺
 - 700 yy ww mm
 - 401 y⁺ w⁺ mm
 - 317 yy ww m⁺
 - 16 y⁺ ww mm
 - 12 yy w⁺ m⁺
 - 1 y⁺ ww m⁺
 - 0 yy w⁺ mm



Come ci spieghiamo queste differenti frequenze? A coppie i livelli numerici sono simili tra loro e riscontriamo 4 livelli di frequenze: i parentali e ricombinanti con 3 rispettivi livelli di frequenza. Le classi di ricombinanti con frequenza 317 e 401 hanno subito ricombinazione con una **frequenza maggiore** rispetto a quelle classi di ricombinanti che sono frequenti 15 e 16.

► Conclusioni di Morgan

- I tre geni si trovano sul cromosoma X
 - Tendono ad essere trasmessi come un'unità
- Il crossing-over genera combinazioni alleliche non parentali
 - Scambio fisico di segmenti di cromosoma X
- La frequenza con cui accade il crossing-over dipende dalla distanza fisica tra i geni
 - Minore è la distanza fisica, minore è la frequenza di crossing-over

avvenga contemporaneamente il crossing-over sia nella prima regione (tra il primo marcatore e il marcatore centrale) sia nella seconda regione (tra il marcatore centrale e l'ultimo marcatore); ovviamente questo evento di **doppio crossing-over** è molto più raro rispetto al singolo crossing-over perché sono due probabilità che devono verificarsi contemporaneamente nella stessa meiosi (regola del prodotto). In questo modo ci spieghiamo la presenza di queste due classi meno abbondanti di tutte che sono frutto di doppio crossing-over.

► Conclusioni di Morgan

► Le frequenze di crossing-over tra geni associati riflettono le distanze tra questi geni

- 758 $y^+ w^+ m^-$ ← Parentale (no crossover)
- 700 $yywmm$ ← Parentale (no crossover)
- 401 $y^+ w^+ mm$ ← Crossover tra w e m
- 317 $yywmm^+$ ← Crossover tra w e m
- 16 $y^+ wmm$ ← Crossover tra y e w
- 12 $yyw^+ m^+$ ← Crossover tra y e w
- 1 $y^+ wmm^+$ ← Doppio crossover (y & w , w & m)
- 0 $yy w^+ mm$

meri ed i fenotipi riusciamo a capire non solo chi è parentale e chi ricombinante, non solo chi è singolo ricombinante e chi doppio ricombinante, ma anche in quale regione hanno ricombinato i singoli ricombinanti e quali sono i due geni più vicini e quelli più lontani perché i marcatori che ci daranno ricombinanti con maggiore frequenza sono più lontani tra loro, quelli con minore frequenza saranno dati da marcatori più vicini tra loro.

In figura abbiamo la schematizzazione di quanto detto: nel primo caso produzione di parentali (nel senso che non avviene il crossing-over); poi crossing-over tra w ed m , ricombinazione tra y e w e poi i doppi ricombinanti.

CREIGHTON & McCLINTOCK

► Dimostrarono che la ricombinazione è causata dal crossing-over (1931)

- Incroci condotti nel mais (*Zea mays*)
- Utilizzazione di cromosomi parentali con caratteristiche strutturali peculiari
 - I cromosomi omologhi possono essere distinti morfologicamente al microscopio.
 - La progenie ricombinante può essere messa in relazione con scambi fisici dei cromosomi visualizzabili al microscopio.

mente uno scambio fisico tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi è stata fornita da **Creighton** e **McClintock** i quali utilizzarono nel 1930 come specie modello **Zea Mays**. Oltre ad utilizzare dei marcatori genetici uno riguardante il colore del seme del mais (C) e l'altro riguardante il contenuto d'amido del seme del mais (Wx) impiegarono anche dei marcatori fisici presenti sullo stesso cromosoma su cui erano presenti questi due geni.

Questi **marcatori fisici** erano due peculiarità morfologiche del **cromosoma 9**, infatti gli

Negli individui $y^+ w^+ m$ (401) e in quelli $y w m^+$ (317) il crossing-over è avvenuto tra w ed m , perchè rispetto alla configurazione parentale, il marcatore m ha cambiato posizione (parentale $y^+ w^+ m^+$ e parentale $y w m$); negli individui $y^+ w m$ (16) e in quelli $y w^+ m^+$ (12) il crossing-over è avvenuto tra y ed m rispetto sempre alla configurazione dei parentali; negli individui $y^+ w m^+$ (1) ed in quelli $y w^+ m$ (0) è avvenuto un **doppio crossing-over**, uno scambio tra y e w ed uno scambio tra w ed m . Osservando i nu-

► No crossover (evento più probabile)

□ 758 $y^+ w^+ m^+$

□ 700 $yywmm$

► Crossover tra w e m

□ 401 $y^+ w^+ mm$

□ 317 $yywmm^+$

► Crossover tra y e w

□ 16 $y^+ wmm$

□ 12 $yyw^+ m^+$

► Doppio crossover (evento meno probabile)

□ 1 $y^+ wmm^+$

□ 0 $yy w^+ mm$

Morgan non dimostra che avviene uno scambio

fisico tra pezzi di cromosomi, ma ipotizza che i suoi risultati siano spiegabili dal crossing-over pur non fornendo alla comunità scientifica alcuna prova che ciò accada. La **dimostrazione** che il crossing-over è real-

CREIGHTON & McCLINTOCK

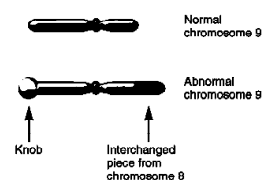
► Creighton e McClintock utilizzarono una versione "normale" e una "anormale" del cromosoma 9.

► La versione anormale presentava due aspetti visibili al microscopio

- Una piccola massa eterocromatica a una estremità che si colora intensamente (**knob**).

- Un pezzo addizionale all'estremità opposta

- Traslocazione di un pezzo del cromosoma 8



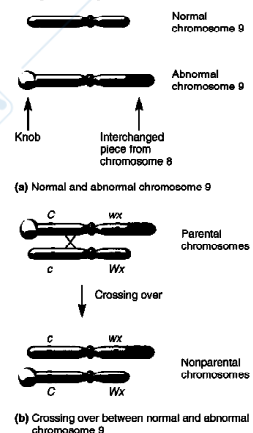
(a) Normal and abnormal chromosome 9

scienziati crearono un cromosoma 9 **aberrante** dal punto di vista citologico perché presentava all'estremità un rigonfiamento **eterocromatico (knob)** che è riconoscibile al microscopio e all'altra estremità del cromosoma era presente una **traslocazione** di un frammento del cromosoma 8: avevano ceppi eterozigoti di cromosoma 9, ovvero, un cromosoma 9 normale e un cromosoma 9 modificato.

Si vollero costruire una linea doppia eterozigote per il gene del colore del seme e per quello del contenuto di amido, quindi una linea **CcWXwx** in **trans**: su un cromosoma era presente l'allele **C** e l'allele **wx**; sull'altro cromosoma l'allele **c** e l'allele **WX**. Quindi, l'allele **C** e **wx** erano presenti sul cromosoma sul quale si trovavano i due marcatori citologici (traslocazione cromosoma 8 e rigonfiamento knob), l'altro cromosoma 9 era mitologicamente normale sul quale era presente l'allele **c** e l'allele **WX**.

► Creighton e McClintock studiarono due geni presenti alle estremità opposte del cromosoma 9.

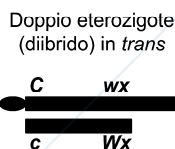
- Il gene **C** (seme colorato o bianco) posizionato vicino l'estremità knobbed
- Il gene **Wx** (endosperma amidaceo o ceroso) posizionato vicino la traslocazione.



► Incrocio

► Parentale A (colorato e amidaceo)

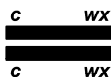
- Un cromosoma 9: marcatori citologici knob e traslocazione; marcatori genetici **C** e **wx**.



- Un cromosoma 9: citologicamente normale; marcatori genetici **c** e **WX**.

► Parentale B (bianco e ceroso)

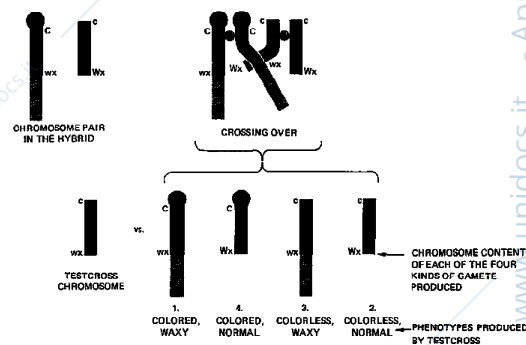
- Due cromosomi 9 citologicamente normali
- Genotipo **cc wxwx**



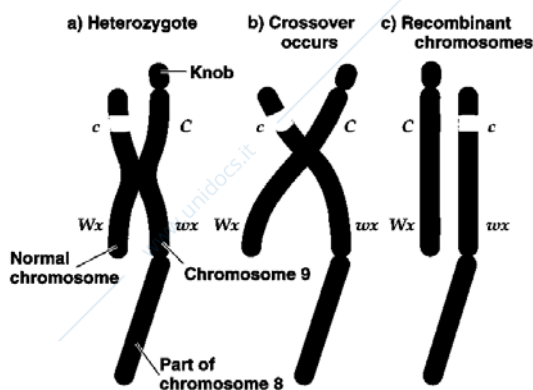
Se una linea del genere viene incrociata con l'omozigote recessivo, nella progenie osserveremo piante con quattro tipi fenotipici **C wx**; **c WX** (parentali), **C WX**; **c wx** (non-parentali): i primi due saranno più abbondanti rispetto ai ricombinanti.

Poiché sul cromosoma

- Il parentale **A** può produrre 4 tipi di gameti differenti
- Due non-ricombinanti (parentali)
- Due ricombinanti



9 che presenta gli alleli **C** e **wx** sono presenti anche i due marcatori citologici, se è vero che la ricombinazione dei geni è frutto del crossing-over ed esso rappresenta lo scambio fisico di pezzi di cromosomi, nella progenie ricombinante una volta effettuato un cariotipo bisognerà trovare una segregazione dei marcatori citologici; cioè si riscontrerà lo Knob nelle piante selvatiche per il colore del seme e per il contenuto d'amido ma non ci dovrà essere la traslocazione! Infatti la progenie ricombinante per il colore del seme e per il contenuto d'amido avrà la traslocazione e non più lo knob perché deve avvenire uno scambio anche dei marcatori citologici.

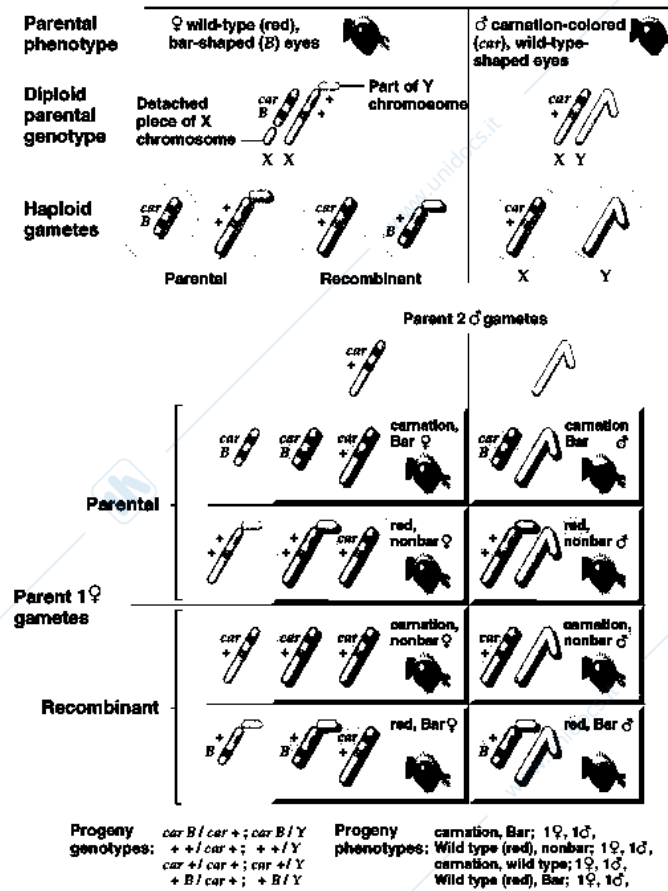


Qualche anno dopo **Stern** con i suoi esperimenti in *Drosophila* dimostrò la stessa cosa utilizzando marcatori differenti, cioè un marcatore dominante **Bar**, gene X-linked ed una mutazione del colore dell'occhio **car-nation**.

STERN (*Drosophila*)

- ▶ Poco tempo dopo la pubblicazione dei risultati di Creighton e McClintock, Stern pubblicò risultati identici condotti in *Drosophila*.
- ▶ Mutazione recessiva *carnation* (colore dell'occhio) e mutazione dominante *Bar* (forma dell'occhio). Entrambi i marcatori X-linked.
- ▶ La ricombinazione è la conseguenza dello scambio fisico di pezzi di cromosomi omologhi.

Mise questi due marcatori in eterozigosi in **trans** sul cromosoma X e utilizzò come marcatore citologico una traslocazione del cromosoma Y: la logica era la stessa di Creighton.



I risultati sono gli stessi osservati nell'esperimento di Creighton e McClintock.

LEZIONE 10 (10/04/2015)

Come già detto precedentemente, Morgan marcò e studiò 7 geni presenti sul cromosoma X di *Drosophila*, osservò dei rapporti di segregazione non mendeliana deducendo che questa alterazione fosse attribuita al fatto che questi geni, anziché trovarsi su cromosomi differenti erano posti sullo stesso cromosoma e necessariamente viaggiavano durante la meiosi in un assetto che rispettava la loro configurazione sul cromosoma di partenza. Nella progenie però si trovava degli assetti che non corrispondevano a quelli di partenza e bisognava spiegare da dove originassero poiché non erano generati dall'assortimento indipendente per cui Morgan ipotizzò che la ricombinazione fosse responsabile di questo fenomeno; infatti nella progenie gli assetti parentali erano sempre più abbondanti rispetto agli assetti ricombinanti in quanto il fenomeno della ricombinazione avviene con una certa frequenza. Morgan poi ipotizzò che questa frequenza di ricombinazione dipendesse dalla distanza fisica dei geni sul cromosoma: geni più vicini danno una minore percentuale di ricombinazione, geni più lontani una maggiore percentuale di ricombinazione. Ciò lo abbiamo notato negli incroci a due punti e in quelli a tre punti.

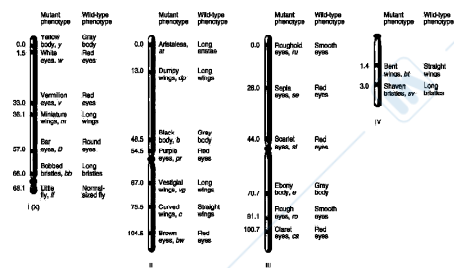
Sturtevant, allievo di Morgan, elaborò un metodo per quantificare la distanza dei marcatori presenti sullo stesso cromosoma, ma non utilizzando una distanza fisica era e propria bensì utilizzando la loro frequenza di ricombinazione che è in qualche modo collegata alla loro distanza fisica. Nell'immagine osserviamo una mappa genetica dei cromosomi di *Drosophila* sui quali sono posizionati i geni e quindi, fare l'analisi delle distanze di mappa dei marcatori consente di stabilire l'ordine con cui si trovano questi marcatori sul cromosoma. Per ottenere l'esatta localizzazione fisica dei marcatori sui cromosomi si utilizzano approcci differenti. Le **mappe genetiche** non sono mappe fisiche, ma delle **mappe statistiche** che ci consentono di posizionare i geni sui cromosomi, stabilirne l'ordine lineare e le percentuali di ricombinazione esistenti tra i geni, ma non rappresentano la reale distanza fisica.

MAPPE GENETICHE

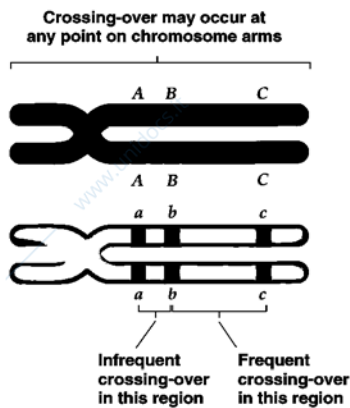
- ▶ La frequenza di ricombinazione tra due marcatori è correlata alla loro distanza
 - ▶ Se due geni sono molto vicini, la probabilità che tra essi accada crossing-over è bassa
 - ▶ Geni "strettamente associati"
 - ▶ Pochi ricombinanti
 - ▶ Maggiore è la distanza tra due geni, maggiore è la probabilità che tra essi accada un crossing-over
 - ▶ Maggior numero di ricombinanti

MAPPE GENETICHE

- ▶ Determinano l'ordine lineare dei geni associati sullo stesso cromosoma



Se due geni sono molto vicini (strettamente associati) la possibilità che si verifichi un crossing-over tra i due geni è **bassa** e quindi si osserverà una bassa percentuale di progenie ricombinante, mentre se i marcatori sono lontani la possibilità che si verifichi un crossing-over tra i due geni è **alta** e quindi si osserverà un'alta percentuale di progenie ricombinante.



Nell'immagine i marcatori A e B sono più vicini tra loro di quanto siano i marcatori B e C: lo spazio fisico esistente tra i marcatori A e B per la ricombinazione è minore dello spazio fisico esistente tra i marcatori B e C, di conseguenza la percentuale di ricombinanti che osserveremo tra i marcatori A e B sarà inferiore rispetto alla percentuale di ricombinanti che osserveremo tra i marcatori B e C.

Quando effettuiamo un incrocio tra una femmina di *Drosophila* eterozigote per due marcatori ed un maschio omozigote recessivo, la percentuale di progenie parentale è sempre **maggiore** rispetto alla percentuale di progenie ricombinante.

- ▶ s (allele recessivo, setole corte) s⁺ (allele dominante)
- ▶ e (allele recessivo, corpo nero) e⁺ (allele dominante)

▶ Incrocio

▶ s e s⁺ e⁺ X s e s e

▶ Progenie parentale

▶ 542 s e s e

▶ 537 s⁺ e⁺ s e

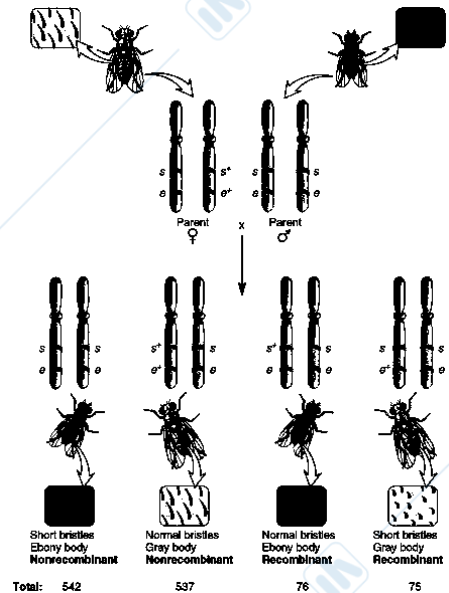
▶ Progenie ricombinante

▶ 76 s⁺ e s e

▶ 75 s e⁺ s e

Nell'immagine abbiamo due geni: **e** (ebany) che determina il colore del corpo (l'allele **e** è responsabile del colore del corpo nero; è recessivo rispetto all'allele selvatico **e**⁺); **s** che determina la lunghezza delle setole (l'allele **s** è responsabile del fenotipo setole corte; è recessivo rispetto all'allele selvatico **s**⁺).

Nell'incrocio i maschi **omozigote recessivo** avranno colore del corpo nero e setole corte (fenotipo mutato) e le femmine **eterozigoti** avranno colore del corpo selvatico (marrone) e setole selvatiche (lunghe). Un maschio quindi produce un solo tipo di gameti per entrambi i geni (**s e**); una femmina essendo eterozigote per i due geni (diibrido in cis) produce 4 tipi di gameti: due tipi parentali (**s⁺ e⁺**; **s e**) e due ricombinanti (non-parentali) (**s e⁺**; **s⁺ e**). Domanda: per quale motivo mettiamo le femmine di *Drosophila* in eterozigosi e mai il maschio? Perché nel maschio di *Drosophila* **non avviene il crossing-over!** Il motivo è ancora attualmente sconosciuto! Ritornando all'incrocio, alla F1 otteniamo una progenie che si distribuisce in 4 classi fenotipiche: una selvatica per entrambi i marcatori (**s e**), una classe mutata per entrambi i marcatori (**s⁺ e⁺**), due classi ricombinanti (**s e⁺**; **s⁺ e**); per giunta le prime due classi sono più abbondanti (542 e 537) mentre le altre due sono meno abbondanti (76 e 75). Ciò conferma le osservazioni fatte da Morgan. Possiamo anche dedurre la configurazione dei geni osservando la numerosità della progenie: le classi più numerose sono (**s e**) ed (**s⁺ e⁺**) di conseguenza i due marcatori sono associati in cis.



▶ La distanza genetica tra due geni si misura in **unità di mappa**

- ▶ Una unità di mappa equivale alla frequenza di ricombinazione dell'1%
- ▶ In onore di Morgan, l'unità di mappa viene anche detta **centiMorgan**

Sturtevant ha inventato un sistema per misurare la distanza genetica tra due marcatori attraverso un'unità di misura (**unità di mappa**) che, in onore del suo maestro Morgan, chiamò **centiMorgan (cM)**. Dire unità di mappa o centiMorgan è la stessa cosa. L'unità di mappa o centiMorgan misura la

percentuale di ricombinazione tra due marcatori. A livello di definizione possiamo dire che se due marcatori distano 1cM vuol dire che la percentuale di ricombinanti che osserveremo per quei due marcatori sarà dell'1%; se invece tra due marcatori abbiamo una distanza di mappa di 10cM vuol dire che la percentuale di ricombinanti per i due marcatori sarà del 10%.

La proposta di Sturtevant risale al 1911. Egli analizzò sei differenti mutazioni recessive tutte presenti sul cromosoma X di *Drosophila*.

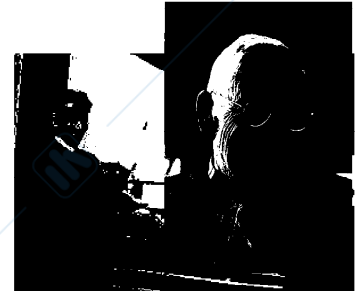
ALFRED STURTEVANT

▶ Alfred Sturtevant

- ▶ Costruì la prima mappa genetica nel 1911
- ▶ Studente nel laboratorio di Morgan

Analizzò l'ereditarietà di 6 mutazioni recessive X-linked di geni differenti

- ▶ *y* (corpo giallo)
- ▶ *w* (occhio bianco)
- ▶ *w-e* (occhio eosina)
- ▶ *v* (occhio vermiglio)
- ▶ *m* (ali piccole)
- ▶ *r* (ali abbozzate)



- ▶ Calcolo della distanza di mappa tra due geni:

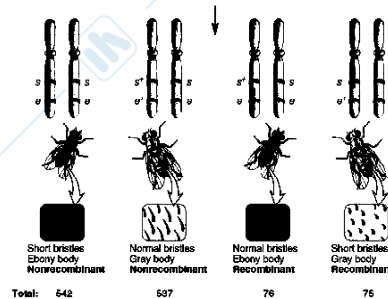
$$= (\text{Progenie ricombinante} / \text{progenie totale}) \times 100$$

$$= (76 + 75 / 542 + 537 + 76 + 75) \times 100$$

$$= (151 / 1230) \times 100$$

$$= 12,3 \text{ unità di mappa}$$

$$= 12,3 \text{ centiMorgans (cM)}$$



Sturtevant contò la progenie ricombinante ed espresse la percentuale sulla progenie totale, quindi, se abbiamo due marcatori,

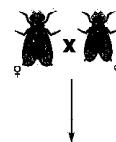
per calcolare la distanza di mappa tra di loro si effettua il rapporto tra il numero della progenie ricombinante che osserviamo fratto il numero totale della progenie e i moltiplica il risultato per 100: otteniamo così la distanza di mappa espressa in unità di mappa o cM.

Tutti gli esperimenti di Sturtevant essendo effettuati con marcatori presenti sul cromosoma X prevedevano l'incrocio tra femmine eterozigoti di *Drosophila* e maschi emizigoti recessivi. Nell'immagine osserviamo un incrocio effettuato da Sturtevant: si parte da una femmina eterozigote in cis per i geni *y* e *w* (colore del corpo e colore dell'occhio, $y^+ w^+ / y w$) e da un maschio emizigote recessivo ($y w / Y$).

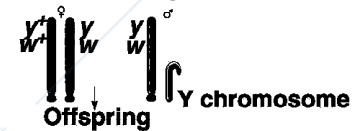
▶ L'ipotesi di Sturtevant

- ▶ La distanza genetica tra due geni può essere stimata sulla base della percentuale della progenie ricombinante
- ▶ Gli esperimenti di Sturtevant
- ▶ Vari incroci tra femmine eterozigoti per due geni e maschi recessivi

Experimental level



Conceptual level



Alleles Concerned	Number Recombinant/Total Number	Percent Recombinant Offspring
<i>y</i> and <i>w/w-e</i>	214/21,736	1.0
<i>y</i> and <i>v</i>	1,464/4,551	32.2
<i>y</i> and <i>r</i>	115/324	35.5
<i>y</i> and <i>m</i>	260/693	37.5
<i>w/w-e</i> and <i>v</i>	471/1,584	29.7
<i>w/w-e</i> and <i>r</i>	2,062/6,116	33.7
<i>w/w-e</i> and <i>m</i>	406/898	45.2
<i>v</i> and <i>r</i>	17/573	3.0
<i>v</i> and <i>m</i>	109/405	26.9

Si osserva la progenie F1 all'interno della quale si individuano le classi parentali e quelle ricombinanti. Nella tabella notiamo i numeri di ricombinanti osservati per una coppia di marcatori fratto la progenie totale: per la coppia di marcatori *y* e *w* il numero di ricombinanti osservati è 214 su 21736 il che significa che moltiplicando questo rapporto per 100 otteniamo una percentuale di progenie ricombinante pari all'1%, e cioè questi

due marcatori distano 1cM o 1 unità di mappa. Allo stesso modo per la coppia di marcatori *y* e *v* abbiamo 1464 ricombinanti su 4551, moltiplicando questo rapporto per 100 osserviamo una percentuale di progenie ricombinante pari al 32,2%: questo risultato ci suggerisce che *y* e *w* sono molto più vicini tra loro di quanto siano *y* e *v* pur trovandosi sullo stesso cromosoma.

▶ Interpretazione dei risultati

- ▶ Le distanze di mappa più piccole sono più accurate
 - ▶ *y* & *w* hanno una distanza di mappa di 1 cM
 - ▶ *v* & *r* hanno una distanza di mappa di 3 cM
 - ▶ *r* & *m* hanno una distanza di mappa di 23,9 cM
 - ▶ *w* & *v* hanno una distanza di mappa di 29,7 cM

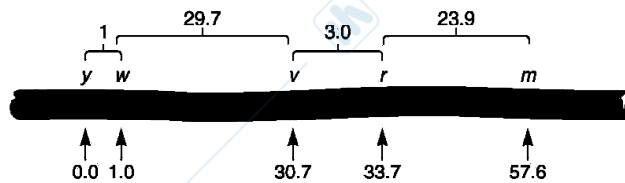
Incrociando a coppie tutti i marcatori a disposizione, Sturtevant ottenne queste percentuali di ricombinazione e sulla base di questi risultati po-

tette ricostruire una **mapa genetica** dei marcatori analizzati:

► Interpretazione dei risultati

► Ordine lineare dei geni

- v si trova tra w e r
 - w & r hanno una frequenza di ricombinazione del 33,7%
 - w & v hanno una frequenza di ricombinazione del 29,7%
 - v & r hanno una frequenza di ricombinazione del 3%
- etc.



più vicino e chi più lontano).

Se analizziamo tanti marcatori presenti sullo stesso cromosoma (considerando che su un cromosoma sono presenti un migliaio di geni circa) e mettendo in relazione la distanza di mappa e la percentuale di ricombinanti che osserviamo per i marcatori in questione ci rendiamo conto che per distanze di mappa piccole abbiamo una proporzionalità lineare tra la distanza di mappa e la percentuale di progenie ricombinante osservata: all'aumentare della distanza di mappa aumenta la percentuale di progenie ricombinante. Ben presto l'andamento della curva non è rettilineo, tende da un certo punto asintoticamente ad un valore e tale valore corrisponde al **50%**. osservando la curva facciamo alcune considerazioni e la prima riguarda la parte iniziale della curva: all'aumentare della distanza di mappa aumenta in eguale quantità la percentuale di ricombinanti ed è **vero per distanze di mappa fino a 10-15cM**. Per distanze di mappa **maggiori** la percentuale di ricombinanti non aumenta in eguale quantità rispetto all'aumentare della distanza di mappa: si nota un aumento della percentuale dei ricombinanti che risulta però inferiore rispetto all'incremento della distanza di mappa. Inoltre, da un certo valore della distanza di mappa la percentuale dei ricombinanti non aumenta più e questo valore (sia di distanza di mappa che di percentuale di ricombinanti) è il **50%**.

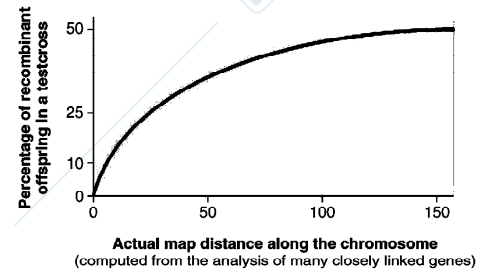
- La percentuale di ricombinanti non può mai superare il 50%
- Assortimento indipendente → uguale numero di parentali e ricombinanti (50% & 50%)
- 50% recombination
 - ✓ I due geni si trovano su cromosomi differenti
 - ✓ I due geni sono associati ma si comportano come se fossero indipendenti

indipendenti e li mettiamo in eterozigosi e li reincrociamo con un doppio omozigote recessivo si ottengono 4 classi fenotipiche nella progenie tutte e quattro equiprobabili (equiprobabili): di conseguenza stiamo affermando che la medesima situazione si può verificare per geni che sono associati sullo stesso cromosoma. Quando osserviamo una percentuale massima di ricombinanti (50%) ci possiamo trovare in due situazioni: i due geni che stiamo osservando sono posizionati su due cromosomi diversi per cui seguono una segregazione mendeliana; oppure i due geni sono associati sullo stesso cromosoma ma sono molto distanti tra loro (ad esempio un gene si trova ad un'estremità e l'altro all'estremità opposta del cromosoma) e quindi hanno una **distanza di mappa maggiore di 50cM**: non stiamo dicendo che due marcatori non possano avere una distanza genetica di 70cM oppure 80cM, ma stiamo affermando che per due marcato-

posizionò quindi la successione dei vari marcatori lungo il cromosoma (nel nostro caso il cromosoma X) sulla base delle distanze di mappa misurate (chi è

► Interpretazione dei risultati

- Man mano che la percentuale di ricombinazione si avvicina al 50%, questo valore diventa una misura meno accurata della distanza di mappa



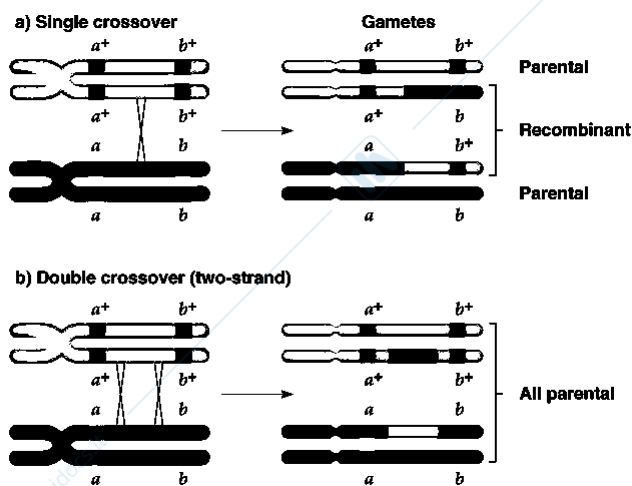
Se da un incrocio tra un doppio eterozigote ed un doppio omozigote recessivo si ottengono 4 classi fenotipiche nella progenie di cui la metà sono parentali e l'altra metà ricombinanti equivale a dire che le quattro classi sono equiprobabili. Quando abbiamo parlato degli incroci di Mendel abbiamo detto che se mettiamo due geni

ri che abbiano una distanza genetica di 70cM o 80cM osserveremo una frequenza di progenie ricombinante del 50%.

Se l'accuratezza della distanza di mappa diminuisce con l'aumentare della distanza tra i marcatori come facciamo a tracciarne una tra marcatori molto distanti? Si cercano dei marcatori intermedi e si calcola la distanza tra i primi due marcatori, poi tra il secondo e il terzo e così via fino all'ultimo marcatore; poi si sommano tutte le distanze di mappa tra i vari marcatori per ottenere la distanza tra il primo e l'ultimo. Abbiamo detto prima che all'aumentare della **distanza di mappa** aumenta anche la **distanza fisica**, ma un aumento della distanza fisica tra due marcatori indica un aumento della probabilità che tra quei due marcatori **avvenga crossing-over**; essendoci più spazio fisico aumenta anche la probabilità che tra quei due marcatori anziché avvenire un solo crossing-over possano accaderne **due** tra gli stessi due marcatori e questo genera (nel prodotto della meiosi) un assetto gametico parentale: pur essendo avvenuta la ricombinazione tra quei due marcatori non vediamo fenotipi ricombinanti ma parentali (se avvengono scambi di ordine pari tipo 2, 4, 6). Quindi maggiore è la distanza fisica tra due marcatori e maggiore è la probabilità che accadano eventi multipli di crossing-over.

DOPPI CROSSING-OVER

- ▶ Quando la distanza di mappa tra due geni è maggiore di 10 cM, la possibilità che accadano crossing-over multipli (di ordine pari) rende la frequenza di ricombinazione una sottostima della frequenza di crossing-over
- ▶ Si ricorre agli incroci a tre punti (utilizzazione di un marcatore intermedio)



Nell'immagine abbiamo una rappresentazione di due marcatori **a** e **b** in eterozigosi in cis e del risultato che si ottiene se durante la meiosi avviene **un singolo scambio**: si formano i 4 tipi di gameti (due parentali e due ricombinanti) dalla singola meiosi e sulla base del numero di meiosi in cui accade il crossing-over si osserverà sul totale i gameti una percentuale di gameti ricombinanti rispetto ai parentali. Se invece tra questi due marcatori avvengono **due scambi** l'assetto dei marcatori che si genera sarà di tipo parentale perché se avvengono due scambi tra il cromatidio che

porta $a^+ b^+$ e il cromatidio che porta $a b$, il prodotto della ricombinazione sarà: un cromatidio che porta $a^+ b^+$ (indipendentemente dal fatto che sia cambiata la configurazione dei marcatori compresi tra *a* e *b*) e un cromatidio che porta $a^+ b^+$ (indipendentemente dal fatto che la configurazione dei marcatori compresi tra *a* e *b* sia rimasta invariata) ed altri due cromatidi che portano $a^+ b^+$ e che non hanno ricombinato. Qual è la probabilità con cui possano accadere situazioni di questo tipo? Dipende dalla **distanza di mappa**. Osserviamolo numericamente: immaginiamo che i marcatori $a^+ b^+$ distino 10cM. Anche per distanze di mappa di 10cM o 15cM possiamo calcolare la probabilità di accadimento di due crossing-over e quindi la probabilità di osservare un assetto parentale a fronte di una ricombinazione. Ammettendo che la distanza di mappa tra $a^+ b^+$ sia di 10cM quale sarà la probabilità che tra $a^+ b^+$ avvenga un **doppio crossing-over**? La probabilità che avvenga un singolo crossing-over è del 10% di conseguenza la probabilità che ne avvengano due nella stessa regione sarà $10\% \times 10\%$, cioè la probabilità che due eventi separati debbano verificarsi contemporaneamente nella stessa meiosi (regola del prodotto): $10\% \times 10\%$ equivale a dire $0,1 \times 0,1$, ovvero 0,01 (1%); quindi se due marcatori distano 10cM vuol dire che la probabilità che avvengano due crossing-over è pari all'1%. Se invece i due marcatori $a^+ b^+$ hanno una distanza di mappa di 30cM, e quindi la probabilità di accadimento di un singolo crossing-over è del 30%; la probabilità di accadimento di due crossing-over (doppio crossing-over) sarà $30\% \times 30\%$,

cioè 0,3x0,3, ovvero 0,09 (9%): ci rendiamo quindi conto numericamente che all'aumentare della distanza di mappa aumenta la probabilità che possano verificarsi crossing-over di ordine pari che generino quindi la situazione fenotipica osservata prima (vediamo i risultati del doppio crossing-over accaduto nella regione compresa tra i due marcatori come se fosse progenie parentale).

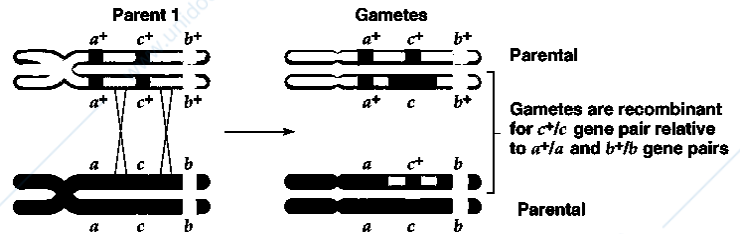
INCROCI A TRE PUNTI

- ▶ Un triplo eterozigote (triibrido) viene incrociato con un triplo omozigote recessivo

Conseguenze di un doppio crossing-over in un triplo eterozigote

più una frequenza equiprobabile come avviene nella segregazione indipendente, perché in queste otto classi possiamo ritrovare tutti i tipi di meiosi che possono avvenire nel genitore triibrido: può avvenire una meiosi in cui non vi sia scambio tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi (non avviene crossing-over) e i gameti prodotti saranno tutti parentali del tipo $a^+ c^+ b^+$ e $a c b$.

Può avvenire una meiosi in cui avvenga uno scambio tra il marcatore a ed il marcatore c e verranno fuori due tipi di gameti parentali che derivano dai cromatidi che non hanno scambiato pezzi di DNA ($a^+ c^+ b^+$ e $a c b$) e due gameti ricombinanti ($a^+ c b$ e $a c^+ b^+$). Può avvenire una meiosi in cui avvenga uno scambio tra il marcatore c e il marcatore b e verranno fuori due tipi di gameti parentali che derivano da cromatidi che non hanno scambiato pezzi di DNA ($a^+ c^+ b^+$ e $a c b$) e due gameti ricombinanti ($a^+ c^+ b$ e $a c b^+$). Può avvenire una meiosi in cui avvenga uno scambio tra il marcatore a e il marcatore c e contemporaneamente uno scambio tra il marcatore c e quello b: verranno fuori due tipi di gameti parentali che derivano da cromatidi che non hanno scambiato pezzi di DNA ($a^+ c^+ b^+$ e $a c b$) e due gameti doppi ricombinanti ($a^+ c b^+$ e $a c^+ b$), e quest'ultima classe di gameti si forma in misura minore ancora perché devono avvenire contemporaneamente due scambi che sono un evento ancora più raro rispetto al singolo ricombinante. Come facciamo a calcolare la distanza di mappa tra questi tre marcatori se stiamo facendo un



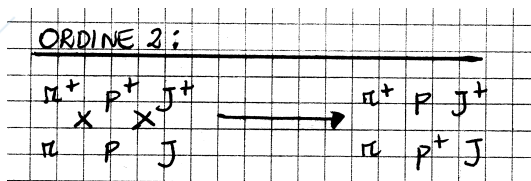
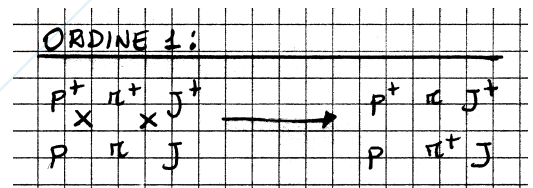
incrocio a tre punti?

Nell'immagine viene riportato un incrocio tra una pianta eterozigote in cis per tre marcatori che determinano rispettivamente il colore del frutto, la forma del frutto e la sugosità del frutto ed una pianta tripla omozigote recessiva per i tre caratteri. I caratteri dominanti sono p^+ (giallo), r^+ (allungato), j^+ (secco) e quelli recessivi sono p (porpora), r (rotondo), j (succoso). Quindi facendo questo reincremento otteniamo 8 classi fenotipiche nella progenie all'interno delle quali notiamo due classi più abbondanti (classi parentali); due classi meno abbondanti in assoluto (classi doppi ricombinanti); due classi (singoli ricombinanti in prima regione e due classi (singoli ricombinanti in seconda regione). Sulla base del fenotipo possiamo indicare il genotipo dei gameti prodotti dal triibrido. Guardando i numeri della progenie possiamo già capire se i geni sono associati o sono indi-

Testcross		Parent 1	Parent 2				
Phenotype		$p^+ r^+ j^+ / prj$ Yellow, elongated, dry (wild type)	prj / prj Purple, round, juicy	Class	Phenotype	Number	Genotype of gamete from heterozygous parent
Parental phenotypes	1	Wild type (yellow, elongated, dry)	179	$p^+ r^+ j^+$			
	2	purple, round, juicy	173	$p r j$			
Recombinant phenotypes	3	yellow, round, juicy	46	$p^+ r j$			
	4	purple, elongated, dry	52	$p r^+ j^+$			
	5	yellow, round, dry	22	$p^+ r j^+$			
	6	purple, elongated, juicy	22	$p r^+ j$			
	7	yellow, elongated, juicy	4	$p^+ r^+ j$			
	8	purple, round, dry	2	$p r j^+$			
					Total = 500		

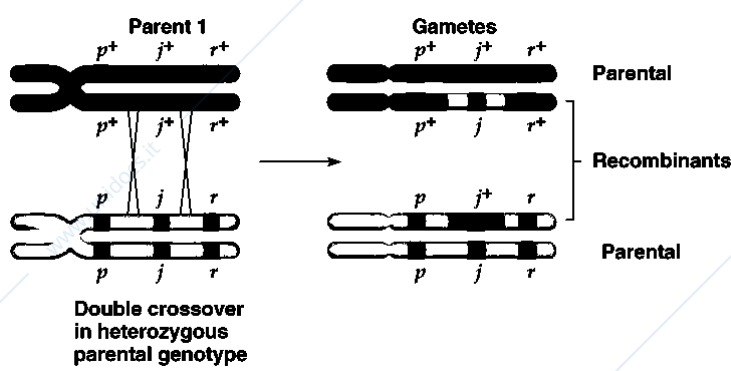
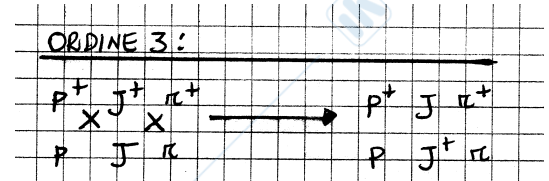
pendenti: in questo caso geni non possono essere indipendenti perché avremmo dovuto avere 8 classi fenotipiche egualmente rappresentate (equiprobabili) e invece ci troviamo con 4 frequenze diverse. Poi riusciamo anche a capire il tipo di configurazione dei tre geni semplicemente guardando la configurazione della progenie parentale: nel nostro caso la progenie parentale è $p^+ r^+ j^+$ (179) $p r j$ (173) per cui la configurazione del tribrido di partenza sarà in cis ($p^+ r^+ j^+ / p r j$). Dopo questa analisi ci dobbiamo chiedere inoltre: ma qual è l'ordine di questi tre geni lungo il cromosoma? Cioè, i tre geni sono posizionati in questo ordine sul cromosoma? Per capire quale dei tre sia il marcatore centrale bisogna confrontare gli assetti parentali (ottenuti nella progenie) con gli assetti doppi ricombinanti (meno abbondanti in assoluto): dobbiamo scriverci i tre ordini possibili dei tre geni e facendo avvenire un doppio crossing-over (uno in prima e uno in seconda regione) trovare l'ordine che ci dia esattamente la configurazione dei doppi ricombinanti osservati. Scriviamo i tre ordini possibili dei tre geni. Sapendo che i marcatori sono associati in cis dobbiamo sempre scrivere i tre dominanti su un cromosoma e i tre recessivi sull'altro. Primo ordine con r centrale; secondo ordine con p centrale; terzo ordine con j centrale.

Col primo ordine possibile, se avviene uno scambio in prima regione (tra p ed r) e uno scambi in seconda regione (tra r e j) vengono fuori gameti doppi ricombinanti $p^+ r j^+ / p r^+ j$.



Col secondo ordine possibile, se avviene uno scambio in prima regione (tra r e p) e uno scambio in seconda regione (tra p e j) vengono fuori gameti doppi ricombinanti $r^+ p j^+ / r p^+ j$.

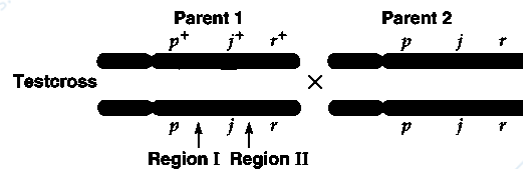
Col terzo ordine possibile, se avviene uno scambio in prima regione (tra p e j) e uno scambio in seconda regione (tra j ed r) vengono fuori gameti doppi ricombinanti $p^+ j r^+ / p j^+ r$.



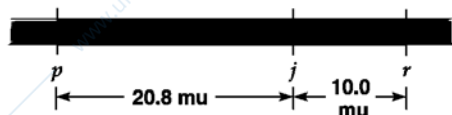
I nostri doppi ricombinanti osservati devono avere configurazione $p^+ r^+ j / p r j^+$: quali dei nostri tre ordini possibili ha dato come doppi ricombinanti questa configurazione? Il terzo ordine. Solo con il terzo ordine (dove j è il marcatore centrale) se avviene uno scambio in prima regione ed uno scambio in seconda regione i gameti doppi ricombinanti che si formeranno avranno la stessa configurazione dei doppi ricombinanti osservati nell'esercizio. In realtà

per individuare il marcatore centrale esiste una scorciatoia, ovvero si confrontano i parentali osservati con i doppi ricombinanti osservati e cercare il marcatore che nei doppi ricombinanti ha cambiato configurazione (posizione) rispetto all'assetto parentale: i parentali sono $p^+ r^+ j^+ / p r j$, i doppi ricombinanti sono $p^+ r^+ j / p r j^+$; il marcatore che ha cambiato configurazione nei doppi ricombinanti rispetto all'assetto parentale è j; di conseguenza deduciamo che j è il marcatore centrale.

Ora possiamo calcolare le distanze di mappa tra i geni: calcoliamo quindi la distanza di mappa tra p e j e la distanza di mappa tra j ed r; poi sommando le due distanze di mappa otterremo la distanza di mappa tra p ed r. All'interno della progenie bisogna considerare il numero di singoli ricombinanti in prima regione (tra p e j) e il numero di singoli ricombinanti in seconda regione (tra j ed r). I singoli ricombinanti in prima regione sono $p^+ r j$ e $p r^+ j^+$ (52 e 46). Non sono gli unici ricombinanti perché anche i doppi ricombinanti vengono fuori da uno scambio in prima regione (oltre che alla seconda regione), quindi nel calcolo della distanza di mappa tra i primi due marcatori dobbiamo considerarli. Distanza di mappa tra $pj = (52+46+4+2)/500 \times 100 = 20,8cM$. Singoli ricombinanti in seconda regione (tra j ed r) $p^+ r j^+$ e $p r^+ j$ (22 e 22). Distanza di mappa tra $jr = (22+22+4+2)/500 \times 100 = 10cM$.



Testercross progeny			
Class	Genotype of gamete from heterozygous parent	Number	Origin
1	$p^+ j^+ r^+$	179	Parents, no crossover
2	$p j r$	173	
3	$p^+ j r$	52	Recombinants, single crossover region I
4	$p j^+ r^+$	46	
5	$p^+ j^+ r^+$	22	Recombinants, single crossover region II
6	$p j$	22	
7	$p^+ j r^+$	4	Recombinants, double crossover
8	$p j^+ r$	2	
		Total = 500	



Quindi la distanza di mappa tra p ed r è $20,8cM + 10cM = 30,8cM$.

Partendo dalle distanze di mappa è possibile calcolare le frequenze fenotipiche della progenie ottenuta da un reincrocio di un diibrido e o triibrido con geni associati.

- ▶ Conoscendo le distanze di mappa tra tre marcatori, è possibile calcolare la probabilità di ottenere doppi ricombinanti
 - ▶ Si applica la regola del prodotto
- ▶ Spesso il numero di doppi ricombinanti osservati è minore di quelli attesi
 - ▶ **Interferenza positiva**

▶ **Interferenza**

- ▶ L'accadimento di un crossing-over in una regione diminuisce la probabilità che ne possa accadere un altro nelle vicinanze
- ▶ Interferenza = $1 - \text{coefficiente di coincidenza (C)}$
 - ▶ $C = \text{frequenza dei doppi ricombinanti osservati} / \text{frequenza dei doppi ricombinanti attesi}$

nanti osservati per i marcatori che si stanno osservando sarà inferiore rispetto al numero di doppi ricombinanti attesi sulla base della stima delle distanze di mappa tra i singoli marcatori e questo fenomeno viene chiamato **interferenza positiva**, e si calcola sottraendo ad 1 il **coefficiente di coincidenza**. Il coefficiente di coincidenza (**C**) è il rapporto tra la frequenza dei doppi ricombinanti osservati e i doppi ricombinanti attesi nella stima della distanza di mappa.

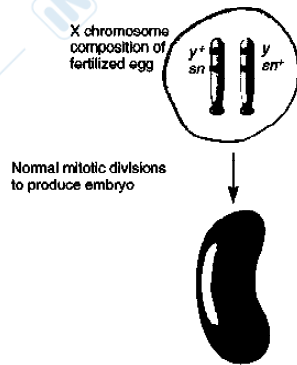
In alcuni rari casi il crossing-over può avvenire anche durante la **mitosi**: parliamo di crossing-over mitotico. Durante la mitosi i cromosomi omologhi non si appaiano, ma in alcuni rari casi può avvenire e in casi ancora più rari tra gli appaiamenti può avvenire il crossing-over tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi e dà origine alla **ricombinazione mitotica** e a livello fenotipico può dare origine ad una forma di mosaicismo molto particolare perché genera le cosiddette **macchie gemelle**.

CROSSING-OVER MITOTICO

- ▶ Generalmente, durante la mitosi NON avviene l'appaiamento dei cromosomi omologhi
- ▶ Generalmente durante la mitosi non avviene il crossing-over
 - ▶ In alcuni casi può avvenire crossing-over durante la mitosi
 - ▶ **Ricombinazione mitotica**

La ricombinazione mitotica genera quindi nuovi assetti genotipici che possono portare alla manifestazione di fenotipi diversi in determinate regioni rispetto al fenotipo circostante, perché può avvenire in specifici gruppi di cellule mentre nelle cellule circostanti non avviene; di conseguenza se quelle cellule daranno origine allo stesso tessuto

- ▶ $y^+y^+ sn sn \times y sn^+Y$
 - ▶ y corpo giallo
 - ▶ sn setole corte
- ▶ Zigote $y^+y sn^+sn$
 - ▶ L'adulto avrà colore del corpo e setole normali



▶ Ricombinazione mitotica

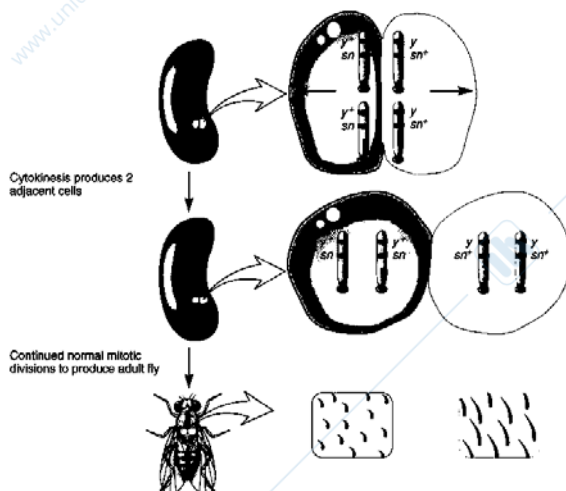
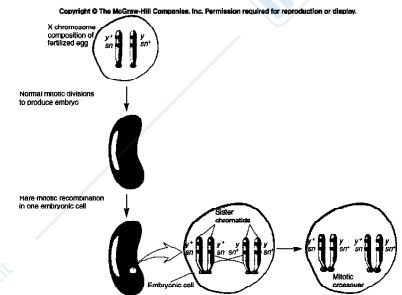
- ▶ Evento raro
- ▶ Produce cromosomi ricombinanti
 - ▶ Può generare una nuova combinazione di alleli
- ▶ In alcuni casi avviene durante le prime fasi dello sviluppo in una cellula che si sta dividendo
 - ▶ Produce tessuti a mosaico nell'adulto

allora quel tessuto manifesterà un fenotipo in una certa regione e un fenotipo differente nella regione adiacente.

Un esempio riguarda due marcatori di *Drosophila* **y** (corpo giallo) e **sn** (setole corte). Consideriamo un organismo che sia doppio eterozigote in trans ($y^+ sn/y sn^+$).

Questo doppio eterozigote presenterà colore del corpo e setole normali perché l'allele dominante maschera il recessivo (per entrambi i geni). In alcuni rari casi può avvenire uno scambio tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi durante la **mitosi** in un gruppetto di cellule durante lo sviluppo embrionale: immaginando che lo scambio avvenga tra il centromero e il marcatore **sn** si osserverà la formazione di una coppia di omologhi con questo assetto ($y^+ sn/y sn^+$) e una coppia di omologhi con questo assetto ($y^+ sn/y sn^+$).

- ▶ Se in una cellula durante lo sviluppo embrionale dello zigote $y^+y sn^+sn$ avviene ricombinazione mitotica
 - ▶ I cromosomi ricombinanti avranno una nuova combinazione allelica



Nel momento in cui avviene la separazione dei cromatidi che genereranno in posizioni adiacente delle macchie gemelle in un fondo di corpo normale per colore e lunghezza di setole, ci saranno delle zone che hanno colore del corpo normale e setole corte e colore del corpo mutato e setole lunghe e queste chiazze saranno tra loro adiacenti.

- ▶ Le due cellule figlie adiacenti **potranno** avere genotipi differenti
 - $y^+y^+ snsn$ & $yy sn^+sn^+$

$y^+y^+ snsn$ → corpo selvatico, ali mutate
 $yy sn^+sn^+$ → corpo giallo, ali normali

- ▶ “Macchie gemelle”

LEZIONE 11 (14/04/2015)Esercitazione in aula (Prof. Aceto)Esercizio 1

Incrociando due piante di *Pisum Sativum* si ottiene una progenie costituita da 53 piante con semi gialli e 47 con semi verdi. Quali sono i genotipi e i fenotipi delle due piante parentali sapendo che l'allele responsabile del fenotipo giallo è dominante su quello per il fenotipo verde?

ESERCIZIO 1			
Parentali:	Pianta 1 x Pianta 2		
	↓		
F ₁ :	53 piante a semi gialli 47 piante a semi verdi		
Allora:	Pianta 1 e Pianta 2 (Aa) (aa)		
	A a		
	a Aa aa	1/2 Aa	} rapporto 1:1
	a Aa aa	1/2 aa	

Svolgimento: osserviamo i numeri della progenie. Innanzitutto abbiamo in gioco un solo carattere (gene del colore del seme). In totale la progenie è costituita da 100 piante e rispetto ai numeri le due classi sono in un rapporto 1:1. Se volessimo fare una verifica statistica del rapporto dovremmo applicare il test del chi-quadro in cui gli osservati sono i valori ottenuti sperimentalmente e gli attesi devono essere 50 e 50. Un rapporto 1:1 con fenotipo dominante:fenotipo recessivo lo osserviamo in un incrocio tra un individuo eterozigote ed uno

omozigote recessivo; se invece l'incrocio fosse avvenuto tra due individui eterozigoti il rapporto sarebbe stato 3:1. Allora una genitore sarà fenotipicamente a fiori gialli e genotipicamente eterozigote (**Aa**) e l'altro genitore sarà fenotipicamente a fiori verdi e genotipicamente omozigote recessivo (**aa**). Il genitore eterozigote produce due tipi di gameti (A; a) in rapporto 50%:50%; il genitore omozigote recessivo produce un solo tipo di gamete (a) in rapporto 100%; di conseguenza il fenotipo della progenie F₁ rifletterà esattamente la meiosi dell'individuo eterozigote ed avremo allora il 50% di piante fenotipicamente a semi gialli e fenotipicamente eterozigoti (Aa) e il 50% di piante a semi verdi e fenotipicamente omozigoti recessivi (aa).

Esercizio 2

Incrociando due piante di *Pisum Sativum* si ottiene una progenie costituita da 20 piante alte con semi gialli; 21 piante alte con semi verdi; 22 piante basse con semi gialli e 24 piante basse con semi verdi. Quali sono i genotipi e i fenotipi delle piante parentali?

Svolgimento: adesso stiamo analizzando due caratteri (il colore del seme **A** e l'altezza della pianta **B**) ed osserviamo un rapporto in una progenie che è 1:1:1:1, cioè ciascuna di queste classi è rappresentata con la stessa frequenza, il che ci fa dedurre che si tratta di un reintroscio, per cui una delle due piante parentali è eterozigote per entrambi i geni che stiamo considerando l'altra pianta è omozigote recessiva: quindi una pianta sarà **AaBb** e l'altra sarà **aabb**.

La pianta omozigote recessiva produrrà un solo tipo di gamete (a; b) mentre la pianta doppia eterozigote produrrà 4 tipi di gameti (AB; ab; Ab; aB) prodotti con la stessa frequenza (ciascuno del 25%).

ESERCIZIO 2			
Parentali:	Pianta 1 x Pianta 2		
	↓		
F ₁ :	20 piante Alte a semi gialli 21 piante Alte a semi verdi 22 piante basse a semi gialli 24 piante basse a semi verdi		
	} Rapporto 1:1:1:1		
	4 Classi fenotipiche = 2 geni (diibrido)		
Allora:	Pianta 1 e Pianta 2 (AaBb) (aabb)		

Esercizio 3

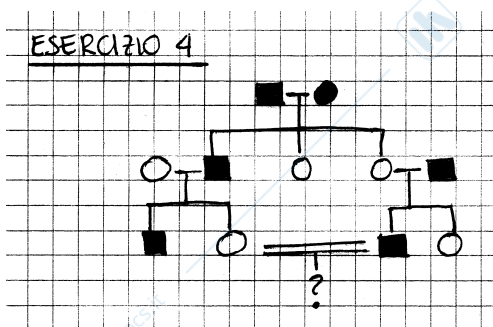
Incrociando due piante di *Pisum Sativum* si ottiene una progenie costituita da 31 piante alte con semi gialli; 12 piante alte con semi verdi; 29 piante basse con semi gialli; 9 piante basse con semi verdi. Quali sono i genotipi e i fenotipi delle piante parentali?

Svolgimento: Stiamo osservando nella progenie 4 classi fenotipiche non equiprocenti per cui non si tratta di un reincrocio tra un doppio eterozigote e un doppio omozigote recessivo; se avessimo effettuato un incrocio tra due doppi eterozigoti avremmo osservato nella progenie 4 classi fenotipiche in un rapporto 9:3:3:1. Nel nostro caso osserviamo un rapporto 3:1:3:1. Esaminiamo un carattere per volta (ad esempio per il carattere altezza B) che rapporto osserviamo: quante piante alte sono presenti nella progenie? $31+12=43$ piante alte. Quante piante basse? $29+9=38$ piante basse. Quindi il fenotipo Alto:Basso è in un rapporto 1:1. Allora un genitore sarà eterozigote per il gene dell'altezza (Bb) e l'altro omozigote recessivo (bb). Quante piante gialle abbiamo nella progenie? $31+29=60$ piante a semi gialli. Quante piante a semi verdi? $12+9=21$ piante a semi verdi. Quindi il fenotipo seme giallo:seme verde è in un rapporto 3:1. Allora entrambi i genitori saranno eterozigoti per il gene del colore (Aa).

ESERCIZIO 3			
Parentali :	Pianta 1	x	Pianta 2
	↓		
F1 :	31 piante Alte a semi gialli	}	Rapporto 3:1:3:1
	12 piante Alte a semi verdi		
	29 piante basse a semi gialli		
	9 piante basse a semi verdi		
Rapporto per il Carattere altezza (B) =			
	$(31+12) = 43$ alte	}	1:1
	$(29+9) = 38$ basse		
Rapporto per il Carattere Colore del seme (A) =			
	$(31+29) = 60$ gialli	}	3:1
	$(12+9) = 21$ verdi		
Allora :	Pianta 1	e	Pianta 2
	(Aa Bb)		(Aa bb)

Esercizio 4

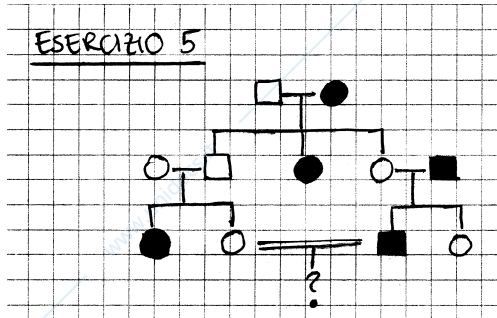
La manifestazione del carattere che studiamo in questa famiglia la indichiamo col simboletto pieno per cui gli individui che non manifestano il carattere sono indicati con un simboletto vuoto. Sulla base delle informazioni riguardanti la segregazione del carattere in questa famiglia siamo in grado di comprendere le modalità con cui il carattere viene trasmesso, ovvero stabilire se il carattere è dominante o recessivo e se è autosomico o X-linked. Procediamo con ordine: il carattere è dominante o recessivo? L'incrocio informativo è il primo: da due individui recessivi non possono nascere figli con fenotipo dominante; di conseguenza il carattere è dominante. Infatti dal primo incrocio otteniamo figli che manifestano il carattere e figli che non lo manifestano. domanda 2: è un carattere autosomico o potrebbe essere un carattere legato ai cromosomi sessuali? Il carattere è autosomico. Se fosse un carattere dominante presente sul cromosoma X dovremmo osservare tutte figlie femmine che manifestano il carattere perché il padre I-1, che presenta il carattere, dovrebbe avere genotipo ($X^A Y$) emizigote per l'allele dominante; di conseguenza darebbe a tutte le figlie il cromosoma X^A e tutte devono necessariamente manifestare il carattere. Quindi ora sappiamo che il carattere è **autosomico dominante**. Domanda 3: se gli individui III-2 e III-3 si incrociassero qual è la probabilità che abbiano un figlio che manifesti il carattere? Per rispondere dobbiamo attribuire i genotipi a tutti gli individui possibili dell'albero. Partiamo dall'alto: chiamiamo il gene A. In ciascuno dei due genitori sarà presente l'allele A perché entrambi manifestano il carattere e poiché dal loro incrocio nascono figli che manifestano il carattere e figli che non lo manifestano allora quelli che non lo manifestano devono essere genotipicamente omozigoti recessivi; di conseguenza i due genitori I-1 e I-2 devono avere genotipo Aa. L'individuo II-2 manifesta il carattere e siamo in grado di attribuirgli anche il genotipo perché sposa una donna II-1 che non manifesta il carattere (aa) e dal loro matrimonio nasce un figlio III-1 che manifesta il carattere (Aa) ed una figlia III-2 che non lo manifesta (aa), per questo motivo deve avere genotipo Aa. La femminuccia II-4 fenotipicamente non manifesta il carattere e geno-



tipicamente è (aa); sposa un individuo II-5 che manifesta il carattere: poiché dalla loro unione nasce anche una figlia III-4 che non manifesta il carattere, allora l'individuo II-5 deve avere genotipo Aa, perché se fosse stato AA avrebbe avuto tutti figli fenotipicamente A-. Quindi il figlio III-3 avrà genotipo Aa perché da un incrocio tra un individuo Aa ed uno aa non possono nascere figli con genotipo AA. Quindi abbiamo genotipi certi per gli individui III-2 e III-3. Da questo incrocio possono nascere sia figli che manifestano il carattere (Aa) sia figli che non lo manifestano (aa); la probabilità che manifesti il carattere è $\frac{1}{2}$ così come la probabilità che non lo manifesti perché da un incrocio Aaxaa si ottiene $\frac{1}{2}$ di probabilità di progenie Aa e $\frac{1}{2}$ aa.

Esercizio 5

L'incrocio informativo sul tipo di trasmissione del carattere è quello tra gli individui II-1 e II-2: se il carattere fosse dominante non potrebbero mai nascere figli che lo manifestino da due genitori



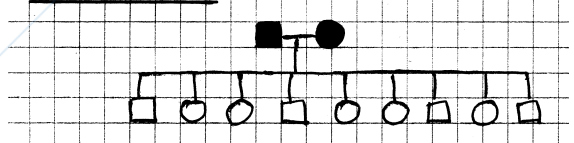
che non lo manifestano perché questi ultimi sarebbero genotipicamente recessivi! Di conseguenza il carattere segue una trasmissione recessiva. Il carattere è autosomico. Se fosse un carattere legato al cromosoma X la femmina III-1 dovrebbe essere genotipicamente X^aX^a : un cromosoma X^a verrebbe dato dal papà e un cromosoma X^a dalla madre; ma siccome il maschio non manifesta il carattere e genotipicamente è emizigote X^AY non può avere figlie fenotipicamente recessive nonostante la moglie II-1 possa portare l'allele su uno dei suoi cromosomi X; di conseguenza il carattere è recessivo autosomico. Gli individui che manifestano il carattere hanno tutti genotipo aa.

La femminuccia III-2 potrebbe avere genotipo Aa o genotipo AA, perché da due genitori Aa possono nascere sia figli genotipicamente AA, sia Aa, sia aa. Possiamo escludere che abbia genotipo aa semplicemente perché non manifesta il carattere; allora scartando $\frac{1}{4}$ di probabilità genotipica aa restano in ballo nel quadrato di Punnett tra due eterozigoti $\frac{1}{3}$ di probabilità genotipica AA e $\frac{2}{3}$ di probabilità genotipica Aa. La probabilità che nasca un figlio che manifesti il carattere dall'incrocio tra III-2 e III-3 è data da: $\frac{2}{3}$ di probabilità che l'individuo III-2 sia Aa x $\frac{1}{2}$ di probabilità che dia al figlio l'allele a x 1 di probabilità che l'individuo III-3 dia il suo unico allele a, e cioè $\frac{1}{3}$ di probabilità che il figlio sia genotipicamente aa.

Esercizio 6

Immaginiamo che dalla coppia in questione nascano tanti figli (sono conigli ☺), almeno un centinaio e che nessuno di questi figli manifesti il carattere che stiamo analizzando. Il fatto che il carattere sia recessivo non è compatibile con questa situazione perché il fatto che nessuno dei figli non manifesti il carattere (su una progenie così numerosa) cozza con i calcoli statistici: se i due genitori I-1 e I-2 fossero eterozigoti Aa, da un incrocio Aa x Aa abbiamo $\frac{3}{4}$ di probabilità che nascano figli fenotipicamente A-; e quindi su 100 figli statisticamente 75 dovrebbero manifestare il carattere, mentre $\frac{1}{4}$ di progenie non dovrebbe manifestarlo e cioè almeno 25 figli su 100! Su questi grandi numeri (centinaia) se non si verifica un comportamento mendeliano allora c'è qualcosa che non va (escludiamo scientificamente che il marito sia cornuto ☺). L'insegnante ci dice oltretutto che gli individui I-1 e I-2 sono linee pure che per definizione sono due linee omozigoti: quando due linee omozigoti con lo stesso fenotipo vengono incrociate, otteniamo una progenie in cui dovrebbe comparire sempre lo stesso fenotipo e genotipo dei genitori! In questo caso il fenotipo parentale non compare mai: potrebbe essere un esempio di complementazione. Se si trattasse di complementazione dovremmo ammettere che vi siano due geni indipendenti che però sono coinvolti entrambi nella manifestazione di un unico fenotipo (quello che osserviamo nei genitori). La **complementazione** è quindi l'interazione del prodotto di geni differenti per dare un unico fenotipo: chiamiamo i due geni **A** e **B**. I due genitori sono due

Esercizio 6



linee pure, ma per poter osservare nella progenie complementazione, dobbiamo assumere che uno dei genitori abbia genotipo **AAbb** e l'altro abbia genotipo **aaBB** (sono entrambe linee pure perché omozigoti per entrambi i geni, solo una è omozigote dominante per un gene e omozigote recessiva per l'altro e l'altra linea è reciproca). Dall'incrocio di queste due linee pure i figli saranno genotipicamente tutti doppi eterozigoti **AaBb**. Siccome abbiamo detto che la complementazione si verifica nel momento in cui due prodotti di geni differenti interagiscono per dare un unico fenotipo allora stiamo ammettendo che siano i prodotti del gene A e del gene B funzionali (dell'allele A e dell'allele B) entrambi presenti in tutta la progenie II. Se incrociassimo due individui della F1, tipo II-1 e II-2 che rapporto fenotipico ci aspetteremmo nella generazione successiva? Incroceremmo quindi **AaBb x AaBb**, ma fenotipicamente avremmo solo due espressioni, e cioè il simbolo pieno come i nonni I-1 e II-2 e il simbolo vuoto come i genitori e zii della generazione II. Il rapporto 9:3:3:1 descrive 4 classi fenotipiche possibili dall'incrocio di due diibridi, quindi osserveremmo un rapporto che è una modificazione del rapporto 9:3:3:1, ovvero un rapporto **9:7**, di cui 9/16 di individui con fenotipo dei genitori II-1 e II-2 e genotipo **A-B-**; e 7/16 di individui con fenotipo differente e con genotipi **A-bb** (3/16), **aaB-** (3/16), **aabb** (1/16).

Esercizio 7

Abbiamo una donna di gruppo sanguigno A che ha due figli, uno di gruppo 0 e l'altro di gruppo B; questi due figli li ha avuti in due matrimoni diversi, uno col padre P1 e uno col padre P2. P1 è di gruppo 0 e P2 è di gruppo AB. Sulla base di queste affermazioni sierologiche e sulla base della conoscenza del sistema ABO siamo in grado di attribuire la paternità a questi signori, ovvero di stabilire di chi è figlio F1 e di chi F2 rispetto ai due partner della donna? Gli individui di gruppo 0 hanno un genotipo specifico (I^0I^0) e sicuramente sia il figlio F1 che l'individuo P1 hanno questo genotipo. Gli individui di gruppo AB hanno genotipo eterozigote (I^AI^B) e quindi l'individuo P2 avrà questo genotipo. La madre fenotipicamente A avrà un allele I^A nel suo genotipo ma l'altro allele potrebbe essere I^A oppure I^0 , perché I^A è dominante su I^0 . Allo stesso modo gli individui di gruppo B possono avere genotipo (I^BI^0) oppure (I^BI^B). Che genotipo avrà quindi la madre? La madre ha genotipo (I^AI^0): se così non fosse non avrebbe potuto avere un figlio fenotipicamente 0 né l'altro fenotipicamente B. P1 di chi non può essere il padre? Di F2 perché P1 ha genotipo (I^0I^0) e la madre (I^AI^0), di conseguenza l'allele I^B non poteva venir fuori dal nulla; quindi potrebbe essere il padre di F1, ma non di F2. P2 potrebbe essere il padre di F1? No, perché ha genotipo (I^AI^B) e non ha alleli I^0 da dare al figlio; quindi F1 deve aver ereditato I^0 dalla mamma e I^0 dal papà; possiamo ammettere la compatibilità invece tra P2 ed F2. Ovviamente questa è un'analisi di **esclusione di paternità** e non di attribuzione di paternità; cioè escludiamo che P1 sia il padre di F2 e stiamo dicendo che P2 potrebbe essere il padre di F2, ma qualunque individuo di gruppo 0 potrebbe essere il padre di F1!

ESERCIZIO 7		
	Fenotipo	Genotipo
Madre	A	$I^A I^0$?
F1	0	$I^0 I^0$
F2	B	$I^B I^0$?
P1	0	$I^0 I^0$
P2	AB	$I^A I^B$
	$I^A > I^0$	
	$I^B > I^0$	

Esercizio 8

Il reincrocio di un tribrido ha prodotto la progenie elencata in figura. Dobbiamo dedurre dai dati forniti da questa progenie tutte le possibili informazioni riguardanti il tribrido. Stiamo quindi incrociando un tribrido con un triplo omozigote recessivo e quindi, stiamo osservando nella progenie i risultati delle meiosi che sono avvenute nel genitore tribrido, perché l'apporto gametico del genitore triplo omozigote recessivo è un unico tipo di gamete con i tre alleli recessivi (a, b, d). la prima cosa che possiamo stabilire è se questi tre geni che stiamo osservando sono associati o sono indipendenti. I numeri ci dicono che i geni sono associati: se i geni fossero stati indipendenti avremmo osservato nella progenie otto classi fenotipiche **equifrequenti** (frequenza di 1/8; frequenza del 12,5%). (Se invece di un reincrocio avessimo avuto un incrocio $AaBbDd \times AaBbDd$ avremmo osservato 8 classi fenotipiche nella progenie ma con frequenza 27:9:9:3:9:3:3:1 se i tre geni fossero indipendenti!) Nel nostro esercizio osserviamo due classi più abbondanti che sono ABd (135) e abD (137) che definiamo **classi parentali**; abbiamo quindi

ora capito la **configurazione** di questo tribrido: A e B sono associati in cis mentre D è associato

Esercizio 8

$AaBbDd \times aa bb dd$

PARENTALI	ABD	22	} frequenza 2
	a b d	20	
	Abd	135	} frequenza 1
	a b D	137	
DOPPI RICOMBINANTI	A b d	12	} frequenza 3
	a B D	13	
	TA b D	1	} frequenza 4
	a B d	2	

- 1) 3 Geni Associati
- 2) A e B in cis e D in trans
- 3) Stabiliamo il gene Centrale

$\begin{array}{ccc} A & B & d \\ \times & \times & \\ \hline d & b & D \end{array} \rightarrow \begin{array}{ccc} A & b & d \\ \hline a & B & D \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{doppi ricombinanti} \\ \text{(no)} \end{array} \right\}$

$\begin{array}{ccc} B & A & d \\ \times & \times & \\ \hline b & a & D \end{array} \rightarrow \begin{array}{ccc} B & a & d \\ \hline b & A & D \end{array} \left. \begin{array}{l} \text{doppi ricombinanti} \\ \text{osservati} \end{array} \right\}$
 Il gene centrale è A

$$\text{distanza BA} = \frac{(12+13+1+2)}{\text{TOTALE } 342} \times 100 = 8,19 \text{ cM}$$

$$\text{distanza AD} = \frac{(22+20+1+2)}{\text{TOTALE } 342} \times 100 = 13,16 \text{ cM}$$

$$\text{distanza BD} = (BA + AD) = 8,19 \text{ cM} + 13,16 \text{ cM} = 21,5 \text{ cM}$$

doppi ricombinanti, dividere il tutto per il totale della progenie e moltiplicare il risultato per 100 e otteniamo la distanza di mappa in cM. Per la **distanza di mappa tra A e D** dobbiamo considerare tutti i singoli ricombinanti in seconda regione, tutti i doppi ricombinanti, dividere il tutto per il totale della progenie e moltiplicare il risultato per 100 e otteniamo la distanza di mappa in cM. Per ottenere la **distanza di mappa tra B e D** sommiamo poi le due distanze di mappa intermedie ottenute.

Esercizio 9

Nell'immagine abbiamo schematizzato il reincrocio di un tribrido con un triplo omozigote recessivo e quelli ottenuti sono i dati osservati nella progenie. Dobbiamo dedurre tutte le informazioni possibili su questo tribrido in base ai dati che ci sono stati forniti. Innanzitutto dobbiamo ricordarci che se i 3 geni fossero indipendenti otterremmo 8 classi fenotipiche **equifrequenti** e queste non sono equifrequenti. Se i geni fossero tutti e tre associati ci aspetteremmo due classi molto più abbondanti di tutte, due classi molto meno abbondanti di tutte, due classi di ricombinanti in prima regione e due in seconda regione, quindi in sostanza osserveremmo **4 livelli di frequenza** ognuno rappresentato da due classi! In questo caso osserviamo nella progenie **2 livelli di frequenza**: un gruppo rappresentato da classi fenotipiche numericamente di frequenza (121; 120; 119; 120) ed un gruppo rappresentato da classi fenotipiche numericamente di frequenza (10; 8; 12; 9). Cosa significa osservare due livelli di frequenza? Siccome stiamo osservando una progenie con tre geni differenti, la loro configurazione potrebbe essere: tutti e tre associati oppure due associati e uno indipendente su un altro cromosoma. La prima ipotesi non è valida, in quanto se i tre geni fossero associati tutti e tre sullo stesso cromosoma avremmo osservato nel reincrocio con un triplo omozigote recessivo 4 livelli di frequenza; ma noi ne abbiamo osservati 2! Di conseguenza dobbiamo affermare che nel nostro esempio, due geni sono associati sullo stesso cromosoma e un gene è indipendente su un altro cromosoma. E come facciamo a capire quali geni sono associati e quale quello indipendente?

Consideriamo i geni due per volta in tutte le combinazioni possibili; consideriamo ad esempio solo i geni A e B: in tutta la progenie osservata abbiamo fenotipi AB, ab, Ab, aB. Quanti individui AB ci sono in questa progenie? 121+119. Quanti individui ab? 120+120. Quanti individui Ab? 10+12. Quanti individui aB? 8+9. su questi dati possiamo affermare che A e B sono associati in cis (guardando i parentali). Consideriamo i due geni B e D: quanti individui BD, bd, Bd, bD ci sono nella progenie? BD (121+8); bd (120+10); Bd (119+9); bD (120+12): le coppie hanno risultati troppo distanti tra loro (121+8); mentre nel caso delle coppie di geni associati AB abbiamo un livello simile (121+119). Se facciamo la prova con i geni AD osserveremo una situazione simile a quella osservata con la coppia BD. Quale sarà la **distanza di mappa tra A e B**? Numero di ricombinanti fratto la progenie totale per 100.

Esercizio 9

$AaBbDd \times aabbdd$

PARENTALI		RICOMBINANTI	
ABD	121	AbD	12
abD	119	ABd	10
aBd	120	abd	8
abd	120		

1) 2 geni sono associati e 1 indipendente!

2) Prioriamo a coppia:

Coppia AB:	
AB (121+119)	} sono associati
ab (120+120)	
Ab (10+12)	
aB (8+9)	

Coppia BD:	
BD (121+8)	} non sono associati
bd (120+10)	
Bd (119+9)	
bD (120+12)	

Coppia AD:	
AD (121+12)	} non sono associati
ad (120+9)	
Ad (119+10)	
aD (120+8)	

A e B sono associati in cis (guardando le classi parentali) - D è indipendente -

$$\frac{A \quad B}{a \quad b} ; \frac{D}{d}$$

$$\text{Distanza AB} = \frac{\text{Ricombinanti}}{\text{TOTALE}} \times 100 =$$

$$= \frac{(12+9+10+8)}{519} \times 100 = 7,51 \text{ cM}$$

LEZIONE 12 (17/04/2015)

Alterazioni della struttura e del numero dei cromosomi

Le mappe cromosomiche

Le alterazioni della struttura e del numero dei cromosomi possono essere utilizzate per posizionare (mappare) i geni sui cromosomi

- I cromosomi sono stati descritti per la prima volta da Strausberger nel 1875.
- Il termine "cromosoma" è stato utilizzato per la prima volta nel 1888 da Waldeyer per indicarne la marcata affinità per coloranti basici.
- Il conteggio del numero dei cromosomi può essere effettuato durante la metafase mitotica.
- Ogni cromosoma è costituito da una fibra di cromatina (1 molecola di DNA + proteine).

I cromosomi sono stati descritti per la prima volta verso la fine del 1800; il termine **cromosoma** si riferisce all'affinità del DNA ai coloranti basici essendo (il DNA) acido. I cromosomi possono essere osservati in maniera semplice al microscopio ottico durante un momento del ciclo cellulare, ovvero in metafase perché in questo momento i

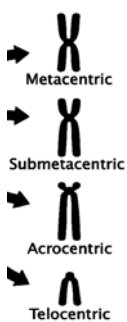
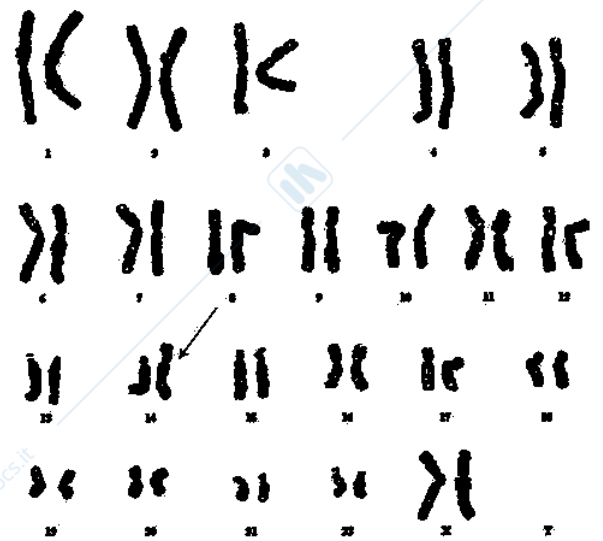
cromosomi sono nel loro maggiore stadio di spiralizzazione, la cromatina è nel suo massimo stato di compattazione perché un cromosoma non è costituito da una sola molecola di DNA ma è complessata a proteine di vario tipo che possono essere di tipo istonico e di tipo non istonico e attraverso l'interazione con queste proteine la molecola di DNA si avvolge attorno alle proteine istoniche e si compatta. È possibile osservare il **cariotipo** di un individuo compiendo delle semplici operazioni: a seconda del tessuto utilizzato e della specie in esame le tecniche per analizzare il cariotipo sono differenti.

Nell'immagine è schematizzata la tecnica per eseguire un **cariotipo** della nostra specie. Si effettua un prelievo di sangue, si centrifuga la provetta per separare la fase sierosa da quella cellulare, si preleva con una normale pipetta la fase cellulare che presenta i linfociti (nella nostra specie i globuli rossi sono anucleati per cui sono inutili per effettuare il cariotipo) e si mettono in coltura in modo tale che comincino a dividersi, dopo un certo tempo si somministra alla coltura un **veleno mitotico** (una sostanza che blocca la mitosi) e facendo trascorrere del tempo dall'aggiunta di questo veleno la maggior parte delle cellule presenti in coltura si troverà in **metafase**, blocchiamo così la mitosi quando i cromosomi sono facilmente visualizzabili. Dopo si prelevano queste cellule, si effettuano una serie di lavaggi e si sospendono in una soluzione ipotonica perché in questo modo le cellule si rigonfiano fino a scoppiare; poi si preleva questa soluzione con una pipetta e si lasciano cadere



delle gocce sul vetrino in modo che i cromosomi si dispongano non uno sopra l'altro ma in maniera contigua e si osserva il vetrino al microscopio. Si riescono a vedere anche senza colorazione, ma per facilitare la visualizzazione si effettuano anche delle colorazioni con coloranti basici.

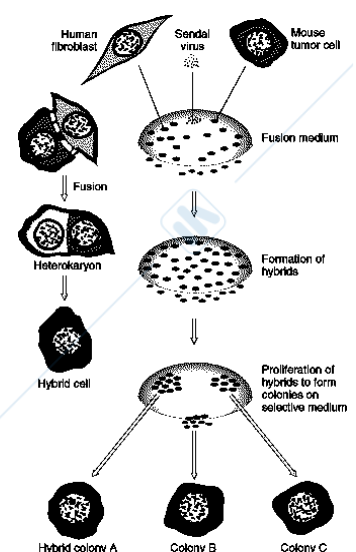
Un tempo le piastre metafisiche ottenute venivano fotografate, si ritagliavano dalle foto i singoli cromosomi e si effettuava la ricostruzione del cariotipo (a mano). Oggi questa operazione si effettua al computer mediante specifici programmi di elaborazione di immagini. Nell'immagine osserviamo un cariotipo femminile. Si utilizza oggi una tecnica avanzata di colorazione che consente di marcare ogni coppia di omologhi differenti con un colore differente. Si può utilizzare anche la tecnica del **bandeggio**, utilizzando una colorazione che consente di visualizzare sul cromosoma delle bande (strisce chiare e strisce scure): il colorante si lega maggiormente alle regioni eterocromatiche dei cromosomi, ovvero quelle più spiralizzate. Le regioni eterocromatiche possiedono meno geni rispetto a quelle eucromatiche e questi geni vengono trascritti con una minore frequenza rispetto ad altri. Ricordiamo che la regione maggiormente eterocromatica di un cromosoma è quella del **centromero**.



In base alla posizione del centromero i cromosomi possono essere classificati in **metacentrici** (quando il centromero divide il cromosoma in due bracci di uguale lunghezza); **submetacentrici** o **acrocentrici** (quando il centromero è spostato verso una delle due estremità); **telocentrici** (quando il centromero è posizionato ad una delle due estremità del cromosoma).

Quando abbiamo parlato della teoria cromosomica dell'ereditarietà abbiamo detto che Morgan è riuscito ad attribuire più geni ad uno stesso cromosoma ed è stato piuttosto facile in quanto i geni che studiò erano associati sul cromosoma X e quindi seguivano un particolare tipo di trasmissione. Ovviamente nelle specie che presentano sesso omogametico e sesso eterogametico esistono anche gli autosomi, i cui geni hanno una trasmissione autosomica (non seguono le regole della trasmissione sessuale), quindi non è facile capire su quale cromosoma sia posizionato un determinato gene.

Come si fa a stabilire su quale autosoma si trova un gene? Ci sono vari approcci: ci sono approcci formali che consentono di attribuire un determinato gene ad uno specifico autosoma. Il primo approccio utilizzato nella nostra specie consiste nella formazione degli **ibridi somatici cellulari**: fare degli ibridi somatici cellulari nella nostra specie consiste nel prelevare delle cellule umane (di solito fibroblasti) e delle cellule tumorali di topo perché queste ultime hanno la caratteristica di essere **immortali** (si replicano all'infinito, non smettono mai di replicarsi); a questo punto se ne promuove la **fusione**, cioè si mettono nella stessa coltura (capsula di Petri) in presenza del virus di **Sendai** che promuove la fusione delle membrane plasmatiche dei due tipi di cellule e la fusione delle membrane nucleari, si formerà una cellula ibrida che contiene un unico nucleo all'interno del quale ci sono i cromosomi di topo e i cromosomi umani. Queste linee ibride non riescono a conservare tutti i cromosomi umani, alcuni li perdono; quindi si creano nella piastra vari



cloni ibridi che hanno mantenuto un certo numero di cromosomi umani. L'esclusione di cromosomi umani è casuale, quindi ci saranno dei cloni ibridi che avranno mantenuto ad esempio i cromosomi 1, 5, 7 e 9; altri cloni che hanno mantenuto i cromosomi 2, 4, 6, 8, 12; altri cloni altri cromosomi e così via.

Hybrid cell lines	Human chromosomes present							Gene products expressed			
	1	2	3	4	5	6	7	A	B	C	D
23	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
34	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
41	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+

Essendo l'esclusione di tipo casuale è possibile che si formino ibridi che abbiano mantenuto gli stessi cromosomi umani.

Nell'immagine possiamo osservare un metodo per effettuare l'attribuzione di uno specifico gene umano ad uno specifico autosoma. Nella tabella è schematizzato il contenuto di cromosomi umani di tre linee ibride (linea 23, linea 34 e linea 41): la **linea 23** ha mantenuto i cromosomi umani 1, 2, 3 e 4; la **linea 34** ha mantenuto i cromosomi umani 1, 2, 5 e 6; la **linea 41** invece i cromosomi umani 1, 3, 5 e il 7. Nella parte destra della tabella abbiamo una serie di **prodotti genici** che sono stati testati in queste linee cellulari ibride: immaginiamo di avere questi quattro geni umani (A, B, C, D) per ciascuno dei quali conosciamo lo specifico prodotto genico (ancora meglio se il prodotto genico è un enzima per la sua attività specifica); nella linea 23 non abbiamo riscontrato l'attività enzimatica del prodotto del gene A, mentre abbiamo riscontrato quella del gene B, non abbiamo riscontrato quella del gene C e abbiamo riscontrato quella del gene D; nella linea 34 abbiamo riscontrato l'attività enzimatica del gene A e D e non quella dei geni B e C; nella linea 41 abbiamo l'attività di A, B e D e non quella di C. Guardando la tabella possiamo dire che l'enzima codificato dal gene C non è presente in nessuna delle tre linee ibride che stiamo osservando e non possiamo fare alcuna deduzione riguardante la posizione del gene C, dovremmo quindi andare ad analizzare altre linee ibride. Ovviamente sappiamo quali sono i cromosomi umani trattenuti dalle linee ibride perché ne facciamo il cariotipo e morfologicamente siamo in grado di riconoscere quali sono i cromosomi umani e quali quelli murini, e sappiamo riconoscere nell'ambito dei cromosomi umani quale è il cromosoma 1, quale il 2 e così via. Il prodotto del gene **A** nella **linea 23** non è presente; è presente invece sia nella linea 34 che nella linea 41: quali sono i cromosomi comuni alla linea 34 e alla linea 41? Il cromosoma 1 e il cromosoma 5 sono comuni, ma il cromosoma 1 è comune anche alla linea 23 e in questa linea non compare il prodotto del gene A, quindi sicuramente il gene **A** non è presente sul cromosoma 1 ma deve stare sul cromosoma 5. Facciamo un ragionamento analogo per il gene B. L'attività del prodotto del gene **B** la ritroviamo nella linea 23 e in quella 41: quali sono i cromosomi comuni alla linea 23 e alla linea 41? Il cromosoma 1 e quello 3, ma il cromosoma 1 è presente anche nella linea 34 dove non c'è l'attività del prodotto del gene B, di conseguenza il gene B deve essere localizzato sul cromosoma 3. Il gene **C** non possiamo attribuirlo a nessun cromosoma in esame. Il gene **D** è espresso in tutte e tre le linee cellulari e il cromosoma che è comune a tutte e tre le linee cellulari è il cromosoma 1, per cui il gene D si deve trovare sul cromosoma 1.

Aberrazioni cromosomiche

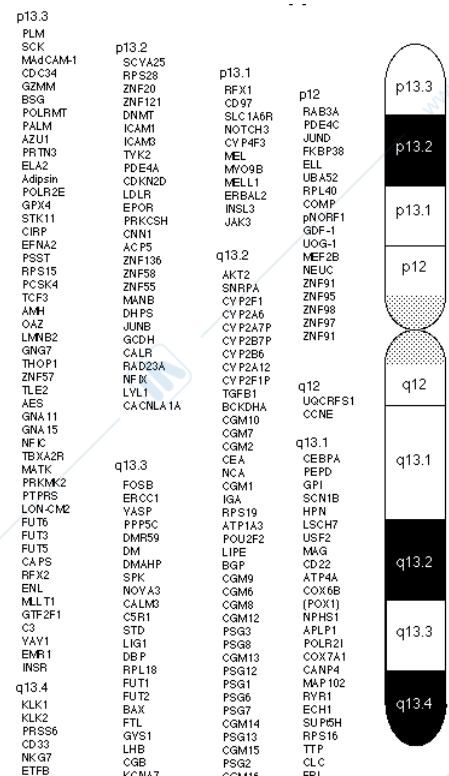
Il numero di cromosomi delle cellule **somatiche** ($2n$) e **gametiche** (n) di una specie è generalmente costante, grazie alla precisa ripartizione dei cromosomi durante le divisioni cellulari.

In alcuni casi possono verificarsi alterazioni della **struttura** o del **numero** dei cromosomi: **aberrazioni cromosomiche**

(mappa citogenetica) e la mappa statistica (mappa in cM).

Una volta attribuito un gene ad un cromosoma il passo successivo è capire in quale punto del cromosoma è posizionato il gene e anche se esiste una relazione tra la posizione del gene sul cromosoma e la mappatura genetica di quel determinato cromosoma; cioè fare un confronto tra la mappa fisica

Nell'immagine possiamo osservare la schematizzazione del cromosoma: il bandeggio del cromosoma è specie-specifico e riproducibile; per una certa specie se ripetiamo per cento volte un cariotipo con bandeggio otterremo per ogni cromosoma sempre lo stesso profilo, quindi non è una colorazione casuale ma dovuta a particolari caratteristiche del cromosoma; infatti i cromosomi vengono suddivisi in regioni e sottoregioni che hanno dei nomi e dei numeri ben precisi sulla base del bandeggio che si ottiene e rappresentano dei punti di riferimento per effettuare un'attribuzione sempre più certa della posizione di un determinato gene. Quindi, avendo a disposizione delle regioni sempre più piccole si può attribuire la posizione di un gene in una regione sempre più specifica. Il metodo molecolare più accurato per effettuare la localizzazione cromosomica è un'ibridazione **in situ**, cioè si deve avere a disposizione un pezzettino del gene che si vuole mappare, lo si deve complessare ad un colorante che emetta fluorescenza, si denatura ottenendo DNA a singolo filamento e si fa ibridare con il cariotipo anch'esso denaturato e così il pezzettino del gene reso fluorescente andrà a legarsi secondo il principio della complementarità delle basi nella regione specifica, ovvero quella contenuta nel gene d'interesse; osservando con microscopio a fluorescenza noteremo nei punti in cui è avvenuta l'ibridazione un segnale di fluorescenza e conoscendo il cromosoma in questione e la specifica regione del cromosoma possiamo attribuire con certezza e precisione la posizione del gene. Ovviamente non sempre si può utilizzare questo tipo di approccio perché bisogna conoscere la sequenza a valle del gene. Prima dell'avvento di queste tecnologie molecolari è stato comunque possibile mappare fisicamente i geni sui cromosomi utilizzando approcci che si basano tutti sul fatto che esistono delle alterazioni della struttura dei cromosomi. Esse comprendono alterazioni della **struttura cromosomica** e alterazioni del **numero cromosomico**. Le principali alterazioni della struttura dei cromosomi sono: la **delezione**, la **duplicazione**, l'**inversione** e la **traslocazione**.



La **delezione cromosomica** è la mancanza di un intero pezzo di cromosoma. Se immaginiamo che un cromosoma nella sua forma selvatica abbia una successione di geni (a b c d e f g h i) un cromosoma deleto potrebbe avere una successione genica (a b c g h i), gli manca il pezzo che contiene i geni (d e f). La **duplicazione** è il concetto opposto: su un cromosoma una certa regione è ripetuta due volte, facendo riferimento alla sequenza genica in alto potremmo avere una duplicazione della regione che contiene i geni (d e f). Un'**inversione** è una rotazione di 180° di un pezzo di cromosoma, non ci sono geni in più o in meno, cambia l'ordine dei geni: la regione invertita ha un ordine ruotato di 180° rispetto all'ordine normale (a b c f e d g h i). La **traslocazione** è uno scambio di pezzi di cromosomi tra cromosomi **non omologhi**,

► Consideriamo un cromosoma normale sul quale siano presenti i geni a b c d e f g h i

1. Delezione: manca una parte del cromosoma (a b c g h i)

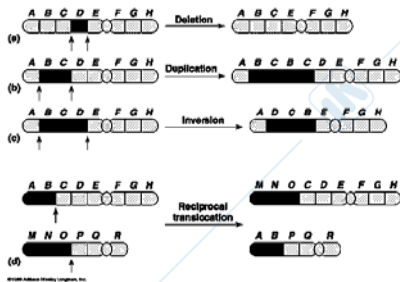
2. Duplicazione: una parte del cromosoma è ripetuta due volte (a b c d e f d e f g h i)

3. Inversione: una parte del cromosoma ha subito una rotazione di 180 gradi (a b c f e d g h i)

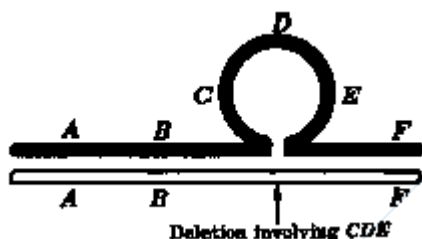
4. Traslocazione: una parte di un cromosoma si è spostata su un altro cromosoma non omologo

Se un cromosoma è a b c d e f g h i e l'altro è u v w x y z, la traslocazione (reciproca) potrebbe essere a b c d e f x y z and u v w g h i

quindi se consideriamo la sequenza in alto e quella di un altro cromosoma (u v w x y z) una traslocazione reciproca potrebbe generare un prodotto del tipo (a b c d e f x y z) su un cromosoma e (u v w g h i); si hanno quindi dei cromosomi che hanno una sequenza genica che non è quella canonica di quel determinato cromosoma, ma conterrà un pezzo di un altro cromosoma.



Le **delezioni cromosomiche** sono la mancanza di un pezzo grande di cromosoma contenente numerosi geni; quindi possiamo dire che in **omozigosi non sono vitali** perché mancando un intero pezzo contenente una serie di geni nel momento in cui manca lo stesso pezzo su tutti e due i cromosomi omologhi l'individuo (deleto in omozigosi per quel pezzo di cromosoma) non ha una serie di geni; e se ad un individuo manca una serie di geni è difficile che egli riesca a compiere il proprio sviluppo pre e post-embriale. Non osserviamo individui omozigoti per una delezione. In **eterozigosi sono generalmente vitali** perché il cromosoma omologo non deleto sopperisce con i suoi geni alla mancanza dei geni deleti sull'altro cromosoma. Se stiamo parlando di ceppi eterozigoti per una delezione cromosomica, nella regione non deleta del cromosoma non osserveremo **mai ricombinazione** perché non c'è una controparte sul cromosoma omologo con cui la regione possa ricombinare: la ricombinazione avviene dopo che i cromosomi duplicati si sono appaiati e l'appaiamento oltre ad essere un evento cruciale (altrimenti non avviene il crossing-over) deve avvenire in maniera precisa, si dice che i cromosomi si appaiano **punto a punto** altrimenti le ricombinazioni genererebbero degli assetti molto strani; quindi la regione deleta sull'altro cromosoma non si può appaiare punto a punto con nulla, di conseguenza non potrà mai ricombinare.



Quando una cella di un individuo con una delezione in eterozigosi fa la meiosi, nel momento in cui gli omologhi si devono appaiare come fanno ad appaiarsi dato che i cromosomi sono morfologicamente diversi? Si appaiano tranquillamente secondo uno schema preciso: il cromosoma non deleto forma **un'ansa** in corrispondenza della regione di delezione dell'altro cromosoma. Nell'immagine il cromosoma in bianco presenta la delezione della regione contenente i geni C, D ed E; nel momento in cui si appaia con l'omologo non deleto, quest'ultimo forma un'ansa in corrispondenza della regione contenente i suoi geni C, D ed E e si appaia quindi punto a punto con le regioni in comune al cromosoma omologo che gli consentono quindi creare l'appaiamento.

Nell'immagine notiamo una rappresentazione grafica della delezione (dove manca un pezzo), della duplicazione (dove compare due volte lo stesso pezzo), dell'inversione (il pezzo è ruotato), della traslocazione (dove c'è uno scambio di pezzi di cromosomi).

Delezione

- ▶ In omozigosi, la maggior parte delle delezioni sono letali (manca un intero tratto di cromosoma, contenente numerosi geni).
- ▶ In eterozigosi, una delezione viene anche definita in emizigosi (c'è una sola copia dei geni coinvolti nella delezione) e generalmente è vitale.
- ▶ Nella regione di un cromosoma che corrisponde alla delezione sul cromosoma omologo il *crossing-over* è assente (non c'è una controparte cromosomica con cui fare avvenire lo scambio).

Questo tipo di strutture si possono visualizzare molto facilmente in *Drosophila* perché essa ha una caratteristica a livello larvale. In *Drosophila* ci sono 4 coppie di cromosomi di cui una **coppia di cromosomi sessuali** (coppia 1 XX o XY), i cromosomi **2 e 3** che sono due cromosomi **meta-centrici** (autosomici belli grandi) e il cromosoma **4** che è piccolino (autosomico presenta pochi geni).

Alcune peculiarità di *Drosophila*

- ▶ Nei maschi non avviene il crossing over
- ▶ Nelle cellule della ghiandole salivari delle larve avviene replicazione del DNA non seguita da divisione cellulare
 - ▶ I filamenti cromosomici duplicati restano fisicamente associati e formano strutture cromosomiche giganti (**cromosomi politenici**).

Questo fenomeno consiste in una serie di duplicazioni del DNA che non sono seguite da divisione cellulare, ma i filamenti neosintetizzati restano tutti adiacenti l'uno all'altro e si formano queste strutture molto grosse (si arriva fino a 1024 molecole di DNA) che costituiscono i cosiddetti **cromosomi giganti** o **cromosomi politenici**. Non sono esclusivi delle ghiandole salivari di *Drosophila*, ma si trovano anche in specifici tessuti di altre specie. Grazie alla presenza di cromosomi politenici è facile individuare la presenza di aberrazioni cromosomiche, ottenere mappe fisiche dei geni ed effettuare esperimenti di ibridazione in situ, perché avendo a disposizione delle strutture così grosse è più semplice la visualizzazione.

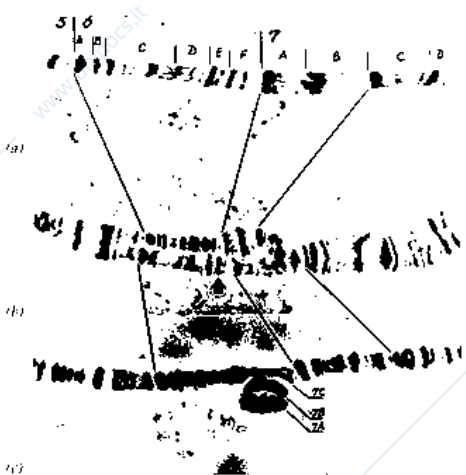


Figura 6.18 Cromosomi politenici che mostrano (a) la struttura normale delle regioni 6 e 7 nel mezzo del cromosoma X di *Drosophila*, (b) un eterozigote con una delezione della regione 6F-7C in uno dei cromosomi (freccia) e (c) un cromosoma X che mostra una duplicazione in tandem invertita della regione 6F-7C. In (b), le bande evidenti nelle regioni 7A e 7C sono presenti nel cromosoma superiore, ma assenti in quello inferiore, indicando che il cromosoma inferiore ha subito una delezione. In (c) le sequenze duplicate sono, da sinistra a destra, 7C, 7B, 7A, 7A, 7B, 7C.

Il genoma di *Drosophila*

- ▶ 3 assetti di autosomi
 - ▶ 2 e 3 – cromosomi grandi e metacentrici
 - ▶ 4 – cromosoma molto piccolo telocentrico
- ▶ Cromosomi X/Y (1)
 - ▶ X è un cromosoma grande e telocentrico

Ricordiamo inoltre che **nel maschio di *Drosophila* il crossing-over non avviene**. Un'altra caratteristica di *Drosophila* rende facile la mappatura dei geni e la visualizzazione delle aberrazioni cromosomiche: nelle cellule delle ghiandole salivari della larva si verifica un fenomeno chiamato **endoduplicazione**.

Cromosomi politenici

Sui cromosomi politenici è molto facile

- ▶ Identificare aberrazioni cromosomiche
- ▶ Ottenere la mappa fisica di geni
- ▶ Effettuare esperimenti di ibridazione

Nell'immagine osserviamo un particolare di cromosomi politenici (cromosoma X di *Drosophila*): in alto osserviamo il tratto selvatico del cromosoma (senza alcuna aberrazione cromosomica), nella parte centrale c'è una delezione in eterozigosi (si visualizza l'ansa durante l'appaiamento dei cromosomi omologhi); per lo stesso motivo, quando c'è una duplicazione in eterozigosi (su un cromosoma c'è una regione ripetuta due volte e sull'omologo c'è la sequenza normale) nel momento in cui essi si appaiano il loop (ansa) si formerà sul cromosoma duplicato (nell'immagine in basso).

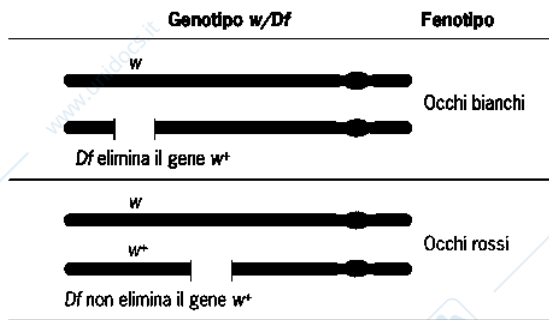


Figura 7.20 ▶ Principio della mappatura per delezione per localizzare un gene su un cromosoma di *Drosophila*. Come esempio viene utilizzato il gene *white* del cromosoma X, la cui mutazione recessiva *w* determina il colore bianco dell'occhio.

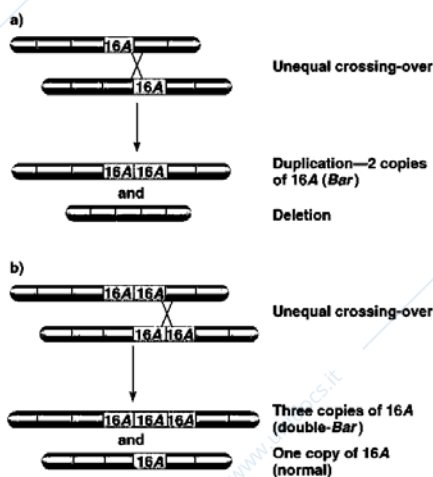
Utilizzando le aberrazioni cromosomiche è possibile fare una **mappatura fisica** precisa dei geni che si trovano su un determinato cromosoma; capire in quale regione del cromosoma si trova quel gene. L'esempio nell'immagine riguarda il cromosoma X perché il gene indicato è **white (w)**. Per fare una **mappatura per delezione** ci serve un ceppo che sia mutante in omozigosi, in questo caso per il gene *w* e differenti ceppi che siano deleti per il cromosoma X ma la delezione riguardi delle regioni differenti del cromosoma; per cui avremo un ceppo che presenterà la delezione in una posizione del cromosoma; un ceppo

due che presenta una delezione in un'altra posizione del cromosoma; un ceppo tre che presenta una delezione in un'altra posizione del cromosoma ed un ceppo quattro e così via. Quante più regioni delete abbiamo (quanti più ceppi con la delezione nel cromosoma X in posizioni differenti) e quanto più piccole sono queste delezioni allora tanto più accurata sarà la mappatura che riusciremo a fare. Il principio per fare una mappatura per delezione è quello di mettere in **eterozigosi** un cromosoma che viene dalla linea omozigote per la mutazione con un cromosoma delemo; quindi creare degli eterozigoti per la delezione e andare ad osservare il fenotipo di questi eterozigoti: se l'eterozigote che abbiamo creato presenta un fenotipo selvatico (per il colore dell'occhio in questo caso) allora la delezione che stiamo considerando non comprende il gene *white* in questo caso.

Se abbiamo quindi degli eterozigoti del tipo 2, 3, 4 e 5 in figura, il colore dell'occhio è selvatico perché la delezione è in una regione esterna al punto in cui si trova il gene *w*. Nel momento in cui ritroviamo un ceppo eterozigote per la delezione che presenta fenotipo occhio bianco (fenotipo mutato) allora il cromosoma delemo (utilizzato per creare questo eterozigote) manca di un pezzo di cromosoma nella regione che comprende il gene *w+*, quindi questo eterozigote ha l'allele *w* sul cromosoma che abbiamo preso dal ceppo omozigote per la mutazione e sull'altro cromosoma non ha nessun allele *w* perché quella regione è delemo, di conseguenza il fenotipo che si manifesta è mutato (si comporta come se fosse emizigote).

Eterozigoti w/Df	Delezione	Punti di rottura	Fenotipo
	Df(1)w ^{r1}	3A1; 3C2	Occhi bianchi
	Df(1)ct ⁷⁸	6F1-2; 7C1-2	Occhi rossi
	Df(1)w ^{r259-6}	10C1-2; 10E1-2	Occhi rossi
	Df(1)r ^{-75c}	14B13; 15A9	Occhi rossi
	Df(1)ma ⁸	19A1-2; 20A	Occhi rossi

Il colore dell'occhio mutante osservato con Df(1)w^{r1} indica che il gene *white* è compreso nella delezione tra i punti di rottura nelle bande 3A1 e 3C2 sul cromosoma X.



La **duplicazione** è una regione cromosomica presente due volte in successione che viene fuori dai **crossing-over ineguali**. Immaginiamo una coppia di omologhi che invece di appaiarsi punto a punto si appai in maniera leggermente storta: se avviene ricombinazione tra due cromosomi omologhi appaiati in maniera leggermente sfalsata si genera un cromosoma con due copie di una regione (nell'immagine la regione 16A di *Drosophila*) e un cromosoma delemo con nessuna copia della regione 16A. Se avvenisse un ulteriore crossing-over ineguale tra due cromosomi con la duplicazione si formerà una terza copia di quella regione ed è esattamente quello che accade quando osserviamo il **fenotipo Bar** in *Drosophila*, che è un fenotipo dominante del colore dell'occhio (omozigosi della regione 16A),

occhio più stretto; quando le duplicazioni della regione 16A sono **tre** allora si osserva sempre occhio a barra ma il fenotipo è più severo, cioè l'occhio è ancora più piccolo.

Nell'immagine osserviamo un confronto tra una mappa genetica ed una mappa fisica del cromosoma X politenico di *Drosophila* sul quale sono stati mappati una serie di geni; possiamo notare la distanza fisica tra i geni, mentre nella parte superiore

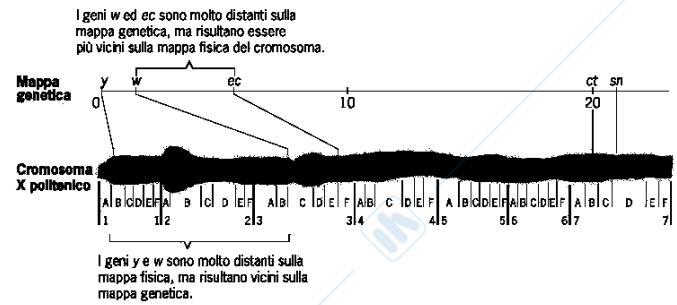


Figura 7.23 ► Estremità sinistra del cromosoma politenico X di *Drosophila* e porzione corrispondente sulla mappa genetica che mostra i geni per corpo giallo (*y*, yellow), occhi bianchi (*w*, white), occhi rugosi (*ec*, echinus), ali tagliate (*ct*, cut) e setole corte e ripiegate (*sn*, singed).

superiore dell'immagine notiamo la mappa genetica: notiamo che sicuramente l'ordine dei geni tra le due mappe è lo stesso e anche la posizione relativa dei geni, ma compaiono alcune discrepanze e cioè, geni che sulla mappa genetica appaiono lontani perché ricombinano tra di loro sulla mappa fisica sono piuttosto vicini. Questa discrepanza è conseguenza del fatto che la ricombinazione non avviene in maniera omogenea per tutte le regioni di un cromosoma, ma ci sono delle regioni che presentano un tasso di ricombinazione maggiore rispetto ad altre regioni per la loro costituzione in basi azotate o per la loro maggiore complessità; di conseguenza su una mappa genetica due marcatori possono apparirci più distanti di quanto siano nella realtà.

Inversioni

- Le inversioni possono essere classificate in:
 - **Pericentriche** - includono il centromero
 - **Paracentriche** - non includono il centromero

vertito) ma cambia l'ordine dei geni.

Le **inversioni** sono un'alterazione della struttura dei cromosomi che si genera perché un pezzo di cromosoma ruota di 180°, quindi non abbiamo aumento né diminuzione dell'informazione genetica (il contenuto genico è lo stesso rispetto ad un cromosoma non invertito)

Possono essere **pericentriche** o **paracentriche** a seconda che l'inversione coinvolga o meno il centromero. In presenza di un'inversione in eterozigosi l'appaiamento meiotico può avvenire?

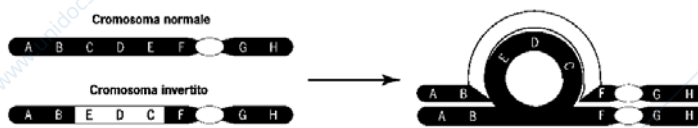
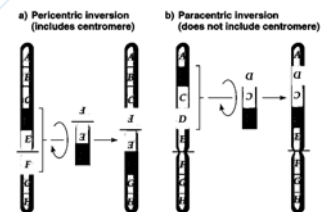


Figura 6.22 Appaiamento tra un cromosoma normale e l'omologo con un'inversione.

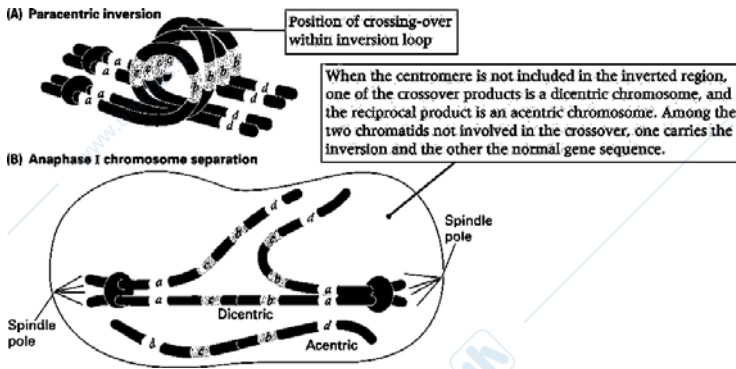
I cromosomi omologhi cercano in tutti i modi di appaiarsi nella metafase: uno dei cromosomi anziché fare un occhiello come precedentemente descritto, compie una sorta di **giro su se stesso**

in modo tale da appaiarsi con il cromosoma invertito così da avere la successione di geni che corrisponde al cromosoma con inversione, sia nel caso di una inversione pericentrica che paracentrica.

In questo modo i cromosomi si sono appaiati punto a punto quindi possono anche ricombinare per la regione invertita; ma se avviene ricombinazione per la regione con inversione cosa accade? Un macello! Infatti solitamente affermiamo che l'**inversione è un soppressore della ricombinazione**; ma non è vero perché la ricombinazione avviene, quello che non vediamo quando c'è un'inversione in eterozigosi seguita da ricombinazione, sono i **prodotti della ricombinazione**; in altre parole i gameti che si formano in seguito alla ricombinazione sono **gameti aberranti** e quindi non parteciperanno alla formazione della generazione successiva.

Inversione paracentrica

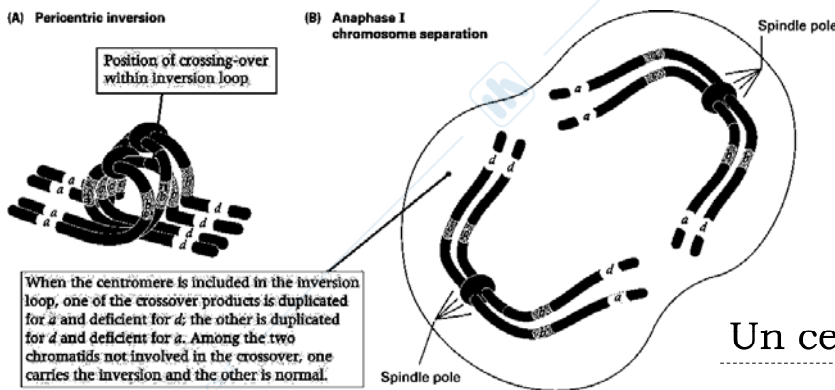
- Il crossing-over produce un cromosoma acentrico e uno dicentrico



Nell'immagine è descritta una **inversione paracentrica**, i cromosomi sono rappresentati dopo la duplicazione (ogni omologo è costituito da due cromatidi fratelli) avviene l'appaiamento e il cromosoma selvatico compie un giro su se stesso ed avviene il crossing-over (tra il cromatidio con inversione e quello senza inversione). I cromatidi non fratelli che non sono stati coinvolti

nello scambio saranno uno con l'ordine selvatico dei geni e l'altro con l'ordine invertito dei geni; i cromosomi che vengono fuori dalla ricombinazione tra il cromatidio invertito e quello non invertito saranno uno **acentrico** (privo di centromero) che non si attacca alle fibre del fuso l'altro sarà **dicentrico**, per cui i due centromeri si attaccheranno entrambi alle fibre del fuso (uno da un lato e uno dall'altro), in questo modo il cromosoma si spezza: sia i gameti che contengono il cromosoma spezzato sia quelli che contengono il cromosoma acentrico non daranno prodotti vitali; per questo motivo quando avviene un'inversione in eterozigosi osserveremo solo progenie parentale nonostante avvenga la ricombinazione.

In una **inversione pericentrica** se avviene ricombinazione si formeranno due gameti parentali (uno con inversione e uno non invertito) e due gameti ricombinanti che possiedono un'informazione genetica sbilanciata



Inversione pericentrica

- Il crossing-over determina duplicazioni e delezioni dell'informazione genetica

(due copie di un gene da una parte e geni mancanti dall'altra parte) e non contribuiranno alla formazione della generazione successiva.

Tramite l'utilizzo delle inversioni è possibile mappare i geni. Come si possono attribuire i geni agli autonomi di *Drosophila*? Con l'utilizzo di ceppi letali bilanciati. Un **ceppo letale bilanciato** di *Drosophila* è un ceppo letale bilanciato per 4 differenti mutazioni che in omozigosi sono **letali**, quindi quando osserviamo il fenotipo mutante di una di queste quattro mutazioni stiamo osservando un eterozigote (l'omozigote non campa); due di queste mutazioni si trovano sul **cromosoma 2**, altre due si trovano sul **cromosoma 3**: due sono mutazioni della forma dell'ala (**curly** e **dichaete**, una riguarda la forma delle setole (**stubble**) ed una riguarda il colore dell'occhio (**plum**). Curly e plum sono sul cromosoma 2 mentre dichaete e stubble sul cromosoma 3. se ci costruiamo un ceppo mutante per tutte e quattro le mutazioni allora il ceppo sarà eterozigote per tutte e quattro le mutazioni. Il ceppo mutante per le 4 mutazioni che ci costruiamo è un **eterozigote in trans**, quindi sul cromosoma 2 abbiamo curly e + (+ come forma selvatica dell'allele plum) e + (+ come forma selvatica dell'allele curly) e plum sull'omologo; sul cromosoma tre un omologo possiede

Un ceppo di *Drosophila* letale bilanciato

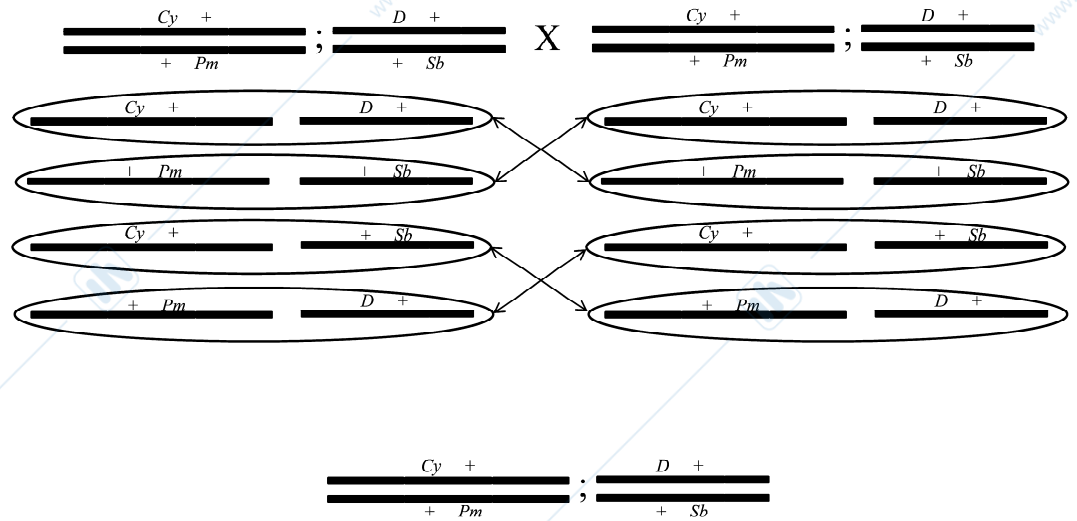
- ▶ Ceppo **Curly/Plum** (2); **Dichaete/Stubble** (3). Questo ceppo è eterozigote per le mutazioni dominanti *Cy*, *Pm*, *D* e *Sb* che sono letali in omozigosi. *Cy* (ala Curly) e *Pm* (colore dell'occhio Plum) si trovano sul cromosoma 2, mentre *D* (ala Dichaete) e *Sb* (setole Stubble) sul cromosoma 3.



- ▶ Tra i marcatori *Cy* e *Pm*, così come tra i marcatori *D* e *Sb*, non si formeranno ricombinanti perchè si trovano su regioni che contengono numerose inversioni cromosomiche in eterozigosi. *Cy/Pm D/Sb* è un **ceppo letale bilanciato**; l'incrocio tra due mosche di questo ceppo produrrà solo progenie eterozigote.

dichaete e + (+ come forma selvatica dell'allele stubble) e l'altro omologo + (+ come forma selvatica di dichaete) e stubble.

Mantenere un ceppo letale bilanciato è semplice perché una volta costruito un ceppo doppio eterozigote in trans, facendo incroci risulterà sempre progenie mutante perché su entrambi i cromosomi di questi ceppi letali bilanciati ci sono una serie di inver-

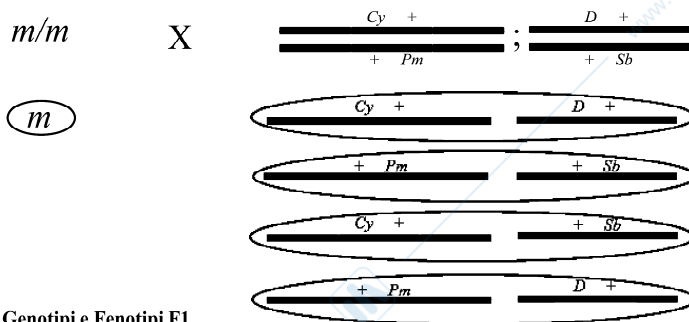


sioni in eterozigosi e quindi qualora avvenisse ricombinazione durante la meiosi, i gameti ricombinanti non saranno mai vitali, di conseguenza manteniamo sempre l'assetto bilanciato: manteniamo un ceppo letale bilanciato quindi effettuando incroci tra maschi e femmine letali bilanciati (femmina mutante per le 4 mutazioni e maschio mutante per le 4 mutazioni). Nell'immagine sono schematizzati i tipi di gameti vitali che possono essere prodotti dalla femmina e dal maschio. Nessuno è un gamete ricombinante, ma si possono formare 4 tipi di gameti differenti per l'assortimento indipendente dei cromosomi: questi 4 tipi di gameti prodotti dalla femmina e dal maschio non possono unirsi in tutte le combinazioni possibili o meglio, si possono unire in tutte le combinazioni possibili ma non viene fuori progenie se in una di queste combinazioni uno di questi quattro geni è in omozigosi, per cui le frecce indicano le uniche combinazioni vitali possibili ciascuna delle quali dà origine ad un quadruplo eterozigote in trans per ogni coppia di geni sul cromosoma 2 e sul cromosoma 3.

Mappatura tramite ceppi letali bilanciati

Immaginiamo di voler attribuire una mutazione autosomica recessiva **m** ad uno specifico cromosoma di *Drosophila*.

- Incrociamo una femmina omozigote per la mutazione **m/m** con un maschio letale bilanciato **Cy/Pm; D/Sb**;



Genotipi e Fenotipi F1

m/+ (selvatico)	Cy +/+ +; (Curly)	D +/+ + (Dichaete)
m/+ (selvatico)	+ Pm/+ +; (Plum)	+ Sb/+ + (Stubble)
m/+ (selvatico)	Cy +/+ +; (Curly)	+ Sb/+ + (Stubble)
m/+ (selvatico)	+ Pm/+ +; (Plum)	D +/+ + (Dichaete)

plum e stubble (che abbia solo fenotipo **m**) con un maschio **letale bilanciato** per le 4 mutazioni: i gameti prodotti dalla femmina saranno di un solo tipo (**m** e selvatici per dichaete, stubble, plum e curly); i gameti prodotti dal maschio saranno di quattro tipi come in figura. La progenie ottenuta dall'incrocio sarà fenotipicamente tutta **selvatica** per la mutazione **m** che stiamo studiando (perché i maschi letali bilanciati non sono mutati per **m**) mentre osserveremo diverse combinazioni

Immaginiamo di aver isolato un nuovo mutante di *Drosophila* (mutante recessivo) e lo chiamiamo **m**; se è recessivo allora il ceppo che manifesta la mutazione è omozigote (**m/m**); vogliamo capire su quale cromosoma si trova questa mutazione (avendo escluso i cromosomi sessuali). Utilizziamo quindi i ceppi letali bilanciati. Cominciamo effettuando un incrocio tra una femmina **omozigote recessiva** per la mutazione **m** e selvatica per curly, dichaete,

fenotipiche per curly e dichaete che riflettono i tipi gametici del maschio e quindi: 1/4 di progenie curly e dichaete; 1/4 plum e stubble; 1/4 curly e stubble ed 1/4 plum e dichaete.

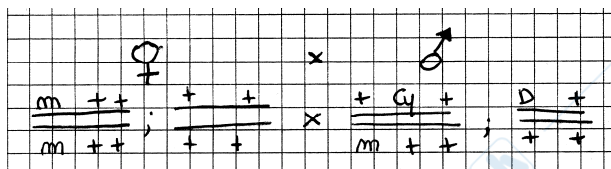
Effettuiamo un ulteriore incrocio tra una femmina mutante per la mutazione **m** che stiamo analizzando (omozigote recessiva per *m* e selvatica per gli altri 4 geni) e un maschio a caso ottenuti nella F1 dell'incrocio precedente: prendiamo in considerazione un maschio col primo fenotipo (curly e dichaete). A seconda della posizione del gene responsabile del fenotipo **m** otterremo risultati

Genotipi e Fenotipi F1		
<i>m</i> +/+ (selvatico)	<i>Cy</i> +/+ +; (Curly)	<i>D</i> +/+ + (Dichaete)
<i>m</i> +/+ (selvatico)	+ <i>Pm</i> /+ +; (Plum)	+ <i>Sb</i> /+ + (Stubble)
<i>m</i> +/+ (selvatico)	<i>Cy</i> +/+ +; (Curly)	+ <i>Sb</i> /+ + (Stubble)
<i>m</i> +/+ (selvatico)	+ <i>Pm</i> /+ +; (Plum)	<i>D</i> +/+ + (Dichaete)

Incrociamo una femmina *m/m* con un maschio della F1

- Femmina *m/m* (mutante) X Maschio *m*+/+ (selvatico) *Cy* +/+ +; (Curly) *D* +/+ + (Dichaete)
- Nessun individuo della F2 con fenotipo Curly ha la mutazione *m*: il gene *m* si trova sul cromosoma 2 (associato a *Cy*). Nel maschio di *Drosophila* non avviene il crossing over, quindi se l'allele *m* è sul cromosoma 2, nei maschi della F1 non può ricombinare con *Cy* (che si trova sul cromosoma 2). In questi maschi, l'allele *Cy* e l'allele dominante del gene *m* (+) trovano sullo stesso cromosoma (configurazione *cis*: + *Cy*/*m* +). Tali maschi produrranno solo gameti + *Cy* e *m* +. Una cellula uovo contenente l'allele *m*, fecondata da uno di questi gameti, non produrrà mai progenie fenotipicamente *Cy* e *m*.
 - Dato che il cromosoma 3 assortisce in modo indipendente dal cromosoma 2, la metà dei gameti maschili sarà *m D* e l'altra metà sarà *m* +, quindi la metà della progenie F2 fenotipicamente *m* sarà Dichaete e l'altra metà avrà ali selvatiche.
 - Nessun individuo della F2 con fenotipo Dichaete ha la mutazione *m*: il gene *m* si trova sul cromosoma 3 (per un ragionamento simile a quello precedente).
 - Il 50% degli individui della F2 con fenotipo *m* presenta fenotipo *Cy* e l'altro 50% fenotipo *D*: il gene *m* si trova sul cromosoma 4.

differenti nella progenie di questo ulteriore incrocio. Un primo risultato potrebbe essere che nessun individuo della F2 con fenotipo curly presenti la mutazione *m*: deduciamo che il gene **m** si trovi sul cromosoma 2 dove è presente l'allele curly.



Nell'immagine abbiamo il genotipo della femmina che si incrocia con il maschio della F1 precedente: in questa femmina osserviamo *m* insieme alla forma selvatica degli alleli per curly e stubble ed è selvatica anche per gli altri due geni plum e dichaete; nel

maschio F1 (ottenuto dall'unione tra il gamete maschile con mutazione curly e dichaete e il gamete femminile mutato per *m* e selvatico per gli altri due marcatori) osserviamo l'allele recessivo *m* in trans rispetto all'allele curly e poiché non avviene il crossing-over nel maschio di *Drosophila* non potrà mai avvenire ricombinazione tra curly ed *m* allora tutti gli individui della progenie di questo incrocio con fenotipo curly necessariamente presentano l'allele + per la mutazione *m*. Se il risultato osservato è l'assenza del fenotipo mutato *m* negli individui che presentano fenotipo curly deduciamo che la mutazione *m* si trovi sul cromosoma 2. Un altro risultato potrebbe essere l'assenza all'interno della progenie ottenuta di individui con fenotipo dichaete e fenotipo mutante *m* assieme. Deduciamo che *m* si trovi sul cromosoma 3 associato al gene dichaete e poiché nel maschio che stiamo utilizzando l'associazione è in trans e non avviene crossing-over non si possono ottenere ricombinanti; quindi nella progenie non osserveremo mai contemporaneamente nello stesso individuo il fenotipo dichaete e il fenotipo mutante per *m*. Se invece ci ritroviamo nella situazione in cui il 50% della progenie con fenotipo *m* manifesti anche il fenotipo curly e l'altro 50% è dichaete, deduciamo che *m* non si trova né sul cromosoma 2 né sul cromosoma 3; quindi si trova sul cromosoma 4 visto che non è legato al sesso.

Le **traslocazioni** sono degli scambi di pezzetti di cromosomi tra cromosomi **non omologhi**. Facciamo riferimento alle mutazioni bilanciate, con scambio reciproco. Anche nelle traslocazioni non c'è un'alterazione del contenuto genico, non ci sono geni in più o in meno, ma geni che hanno cambiato posizione sui cromosomi, quindi il problema si presenta nel momento dell'appaiamento degli omologhi in meiosi. In presenza di una **traslocazione**

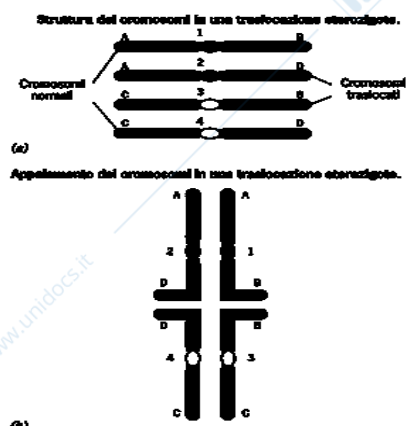


Figura 6.23 ► Struttura (a) e appaiamento (b) di una traslocazione reciproca tra cromosomi. In (b) l'appaiamento avviene durante le profasi della meiosi I, dopo che i cromosomi si sono duplicati.

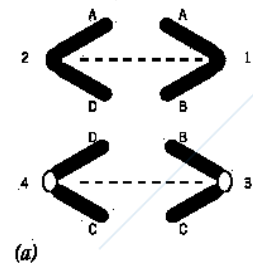
reciproca i cromosomi omologhi formano delle **strutture a quattro**, cioè tutti e 4 i cromosomi (i due omologhi non traslocati e i due omologhi traslocati) staranno in una struttura di appaiamento: i due non traslocati si appaieranno con la parte omologa non traslocata mentre i due traslocati tentano di appaiarsi sia col cromosoma non traslocato che con quello traslocato: queste strutture non comportano un dispendio energetico, ma possono segregare in tanti modi differenti (almeno 3) e a seconda del tipo di segregazione in prima divisione meiotica si avrà poi la formazione di particolari tipi di gameti.

In alto nell'immagine notiamo un primo tipo di segregazione (**segregazione adiacente I**). In questa struttura i 4 omologhi sono numerati in modo tale che possiamo seguirli nelle segregazioni: il cromosoma 1 non è traslocato, il 2 è traslocato, il 3 è traslocato e il 4 non è traslocato. Può accadere in questo tipo di segregazione che il cromosoma 1 e il cromosoma 3 vadano verso lo stesso polo e il cromosoma 2 e 4 vadano verso l'altro polo; i gameti che si formeranno a seguito di questo tipo di segregazione saranno

gameti aneuploidi, cioè gameti che hanno un'informazione genetica sbilanciata per contenuto genico ma che potrebbero generare progenie vitale. Un secondo tipo di segregazione (**segregazione adiacente II**) prevede la segregazione verso lo stesso polo del cromosoma 1 e del 2 e verso il polo opposto la segregazione del cromosoma 3 e 4: anche in questo caso il contenuto genico dei gameti sarà sbilanciato, quindi saranno gameti aneuploidi. Un terzo tipo di segregazione (**segregazione alternata**) prevede che i cromosomi 1 e 4 vadano verso un polo e i cromosomi 2 e 3 verso il polo opposto e i gameti che si formeranno saranno in parte di tipo **selvatico** e in parte **non selvatici** ma con un'informazione genetica bilanciata (non sono gameti aneuploidi). In caso di traslocazioni bilanciate quindi a seconda del tipo di segregazione che avviene in meiosi si possono avere gameti aneuploidi e gameti non aneuploidi.

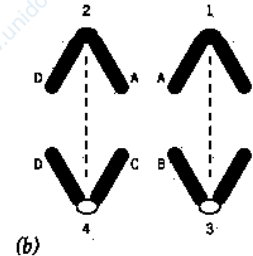
- **Aneuploidia** = assetto cromosomico non bilanciato
- **Monosomia** = mancanza di un cromosoma di una coppia
- **Polisomia** = presenza di un cromosoma in più
- Sono quasi sempre letali, tranne la trisomia 13, la trisomia 18, la trisomia 21 (sindrome di Down) e molte aneuploidie dei cromosomi sessuali
 - XXY (Klinefelter)
 - XO (Turner)
 - XXX
 - XYY

Segregazione adiacente I.



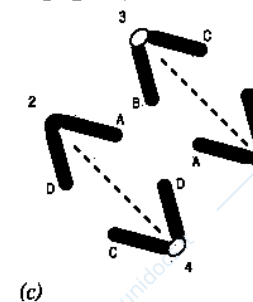
I centromeri 1 e 3 vanno verso un polo e i centromeri 2 e 4 vanno all'altro polo, producendo gameti aneuploidi.

Segregazione adiacente II.



I centromeri 1 e 2 vanno a un polo e i centromeri 3 e 4 all'altro, producendo gameti aneuploidi.

Segregazione alternata.



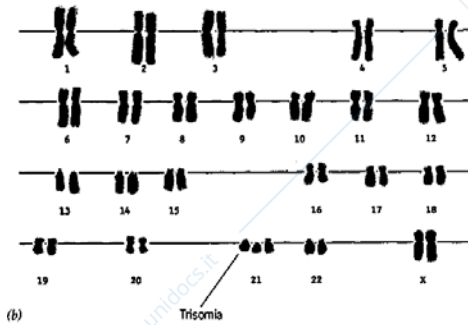
I centromeri 2 e 3 vanno verso un polo e i centromeri 1 e 4 vanno all'altro, producendo gameti euploidi.

Figura 6.24 ▶ Tipi di segregazione in una traslocazione eterozigote durante la meiosi. Per semplicità, è indicato solo un cromatidio fratello di ciascun cromosoma duplicato. (a) Una forma di segregazione adiacente, in cui i centromeri omologhi vanno ai poli opposti durante l'anafase. (b) Un'altra forma di segregazione adiacente, in cui i centromeri omologhi vanno verso lo stesso polo durante l'anafase. (c) Segregazione alternata, in cui i centromeri omologhi vanno verso poli opposti durante l'anafase.

Le aneuploidie

Un assetto cromosomico può essere alterato dal punto di vista **numerico** in questo ambito studiamo le alterazioni che riguardano singole coppie cromosomiche o l'intero assetto cromosomico. Le **aneuploidie** possiamo distinguerle in **monosomie** e **polisomie**. Per **monosomia** si intende quando per una coppia cromosomica è presente un solo cromosoma (manca il cromosoma omologo) mentre per **polisomia** si intende la situazione inversa e cioè quando per una coppia cromosomica si hanno tre cromosomi omologhi. Per la nostra specie le monosomie a livello autosomico non sono vitali, per i cro-

mosomi sessuali la monosomia del cromosoma X è compatibile con la vita ad esempio la **sindrome di Turner (X0)** anche se si riscontrano alterazioni a livello cognitivo, a livello motorio. Le polisemie autosomiche per la nostra specie compatibili con la vita sono poche: la trisomia del XIII, del XVIII e del XXI, la più famosa tra le trisomie (nota anche come **sindrome di Down**) e tutte e tre le trisomie determinano una serie di problemi durante lo sviluppo sia a livello cognitivo che motori e cardiocircolatori a seconda della severità. Anche nel caso dei cromosomi sessuali le trisomie sono compatibili con la vita sia per cariotipi XXY (**sindrome di Klinefelter**) che colpisce maschi, sia per cariotipi XXX e cariotipi XYY.



Nell'immagine osserviamo un cariotipo della trisomia del XXI dove compaiono tre cromosomi invece di due per la coppia XXI.

Le aneuploidie possono verificarsi per errori di segregazione cromosomica durante la meiosi in prima divisione meiotica o in seconda divisione meiotica.

Nella parte sinistra dell'immagine osserviamo una non-disgiunzione in prima divisione meiotica: una volta che i cromosomi omologhi si sono appaiati una coppia dovrebbe migrare verso un polo e l'altra verso il polo opposto e invece può accadere che le due coppie di omologhi vadano entrambe verso lo stesso polo e si generi una cellula di prima divisione meiotica che per quel cromosoma ha entrambe le coppie di omologhi mentre l'altra cellula originata dalla prima divisione meiotica non presenterà alcun cromosoma per quella coppia; dalla divisione di questa cellula priva del cromosoma della coppia in esame si origineranno in seconda divisione meiotica due

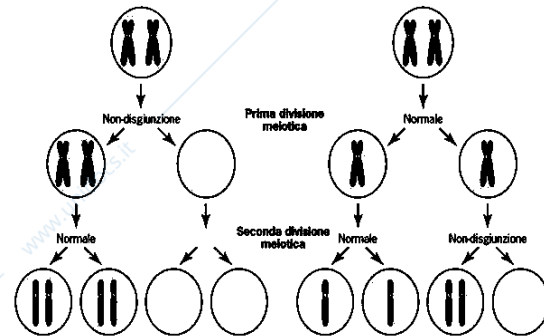


Figura 6.15 ► La non-disgiunzione meiotica e l'origine della sindrome di Down. La non-disgiunzione nella meiosi I non produce gameti normali. La non-disgiunzione nella meiosi II produce un gamete con due cromosomi fratelli identici, un gamete che manca del cromosoma 21 e due gameti normali.

cellule anch'esse prive del cromosoma mentre dalla divisione della cellula con entrambe le coppie di omologhi si genereranno due cellule di seconda divisione meiotica ognuna contenente due cromosomi omologhi invece di uno. Una cellula di questo tipo (con due cromosomi omologhi) fecondata da un gamete euploide (con il corretto assetto cromosomico) darà vita ad uno zigote **triploide**. La non-disgiunzione può avvenire anche in seconda divisione meiotica a fronte di una prima divisione meiotica corretta. Nella parte destra dell'immagine notiamo la coppia di cromatidi fratelli migrata verso lo stesso polo, di conseguenza si forma una cellula con un contenuto doppio per quel cromosoma e una cellula senza quel cromosoma; la fecondazione di uno di questi due gameti da parte di un gamete euploide genererà **trisomia** o **monosomia** per quella coppia cromosomica. Nelle femmine della nostra specie le meiosi cominciano prima della nascita e poi si bloccano alla nascita, poi con la maturità sessuale continua una meiosi al mese fino ad esaurimento scorte, ovvero le donne possiedono un bagaglio di gameti che ancora non hanno terminato la meiosi e man mano che l'età avanza invecchiano e maggiore sarà la probabilità che avvengano meiosi aberranti con produzione di gameti aberranti.

Nella tabella osserviamo un elenco di aneuploidie umane con la loro frequenza. Ad esempio per la sindrome di Down osserviamo una frequenza di 1/700, frequenza altissima rispetto a quella della sindrome di Patau. Molti maschi di **Klinefelter** scoprono di es-

► TABELLA 6.1 Aneuploidie risultanti da non-disgiunzioni nella specie umana				
Cariotipo	Formula cromosomica	Sindrome clinica	Frequenza alla nascita	Fenotipo
47, +21	2n + 1	Down	1/700	Mani tozze con solco palmare, bassa statura, iperflessibilità delle giunture, ritardo mentale, testa grande con viso tondo, bocca aperta con lingua grande, epicantero.
47, +13	2n + 1	Patau	1/20.000	Deficienza mentale e sordità, ridotte dimensioni dei muscoli, schisi del labbro e/o del palato, anomalie cardiache, protuberanza posteriore sul calcagno.
47, +18	2n + 1	Edward	1/8.000	Malformazioni congenite di molti organi, dimensioni minute, orecchie malformate, mandibola recessa, labbra e naso piccoli con una facies elfica, deficienza mentale, rene a ferro di cavallo o doppio rene, sterno corto, il 90% muore nei primi sei mesi dopo la nascita.
45, X	2n - 1	Turner	1/2.500 nate femmine	Femmine con sviluppo sessuale ritardato, di solito sterili, statura bassa, piega di pelle nella regione del collo, anomalie cardiovascolari, difficoltà nell'udito.
47, XXY	2n + 1	Klinefelter	1/500 nati maschi	Maschi subfertili con testicoli ridotti, ginecomastia, timbro di voce femminile, arti lunghi, ginocchia valghe.
48, XXXY	2n + 2			
49, XXXXY	2n + 3			
50, XXXXXY	2n + 4			
47, XXX	2n + 1	Triplo-X	1/700	Femmine solitamente con genitali normali e fertilità limitata, lieve ritardo mentale.

sere affetti dalla sindrome quando notano di avere problemi di sterilità, infatti si suggerisce di fare un cariotipo: ciò indica che questa sindrome può essere anche asintomatica.

Poliploidia

- Poliploidia: assetti cromosomici completi multipli
- L'assetto cromosomico di base di una specie è detto monoploide
- I poliploidi possono formarsi
 - in seguito a duplicazioni genomiche che precedono o seguono la fecondazione
 - in seguito alla formazione di gameti contenenti un numero cromosomico non ridotto (diploidi)
 - in seguito a mitosi abortive dette endoduplicazioni.

Quando parliamo di assetti poliploidi ci riferiamo ad un aumento del numero di tutti i cromosomi rispetto ad un determinato assetto cromosomico di base. Sono frequenti gli assetti **tetraploidi** ($4n =$ **doppio dell'assetto diploide**) che si possono generare da una duplicazione dell'intero genoma prima della fecondazione oppure da una meiosi di tipo aberrante e a seconda che gli assetti tetraploidi si originino dall'unione di due assetti diploidi della stessa specie o di specie differenti si parla di **autopoliploidia** (quando i due assetti sono della stessa specie) o di **alloploidia** (quando i due assetti sono di specie differenti).

La **poliploidia** è un fenomeno molto diffuso nel regno vegetale: quasi tutte le piante commestibili sono commestibili. In quel caso la poliploidia è venuta fuori per fenomeni di ibridazione indotti dall'uomo.

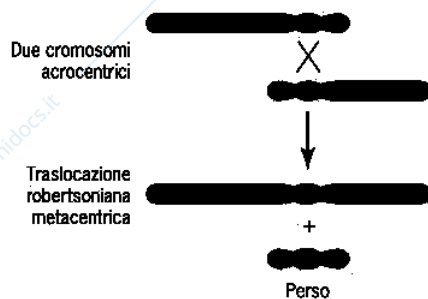
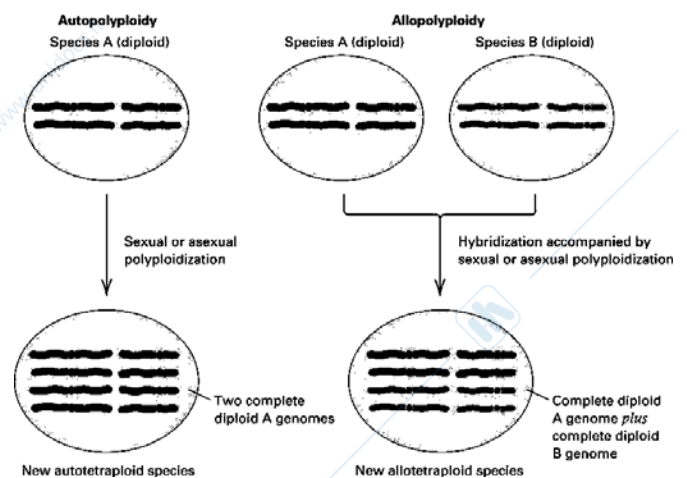


Figura 6.26 ► Formazione di una traslocazione metacentrica robertsoniana mediante lo scambio tra due cromosomi acrocentrici non omologhi.

Eventi più rari ma importanti dal punto di vista evolutivo sono le **fusioni cromosomiche** e le **fissioni cromosomiche**, cioè la possibilità di due cromosomi di unirsi e diventare un unico cromosoma o viceversa la possibilità di un cromosoma (di solito accade ai cromosomi grandi) di dividersi a livello del centromero e diventare due cromosomi differenti. Queste ultime vengono chiamate **mutazioni Robertsoniane**.

LEZIONE 13 (21/04/2015)

Mutazioni

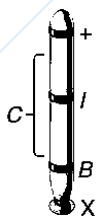
Nella lezione precedente abbiamo detto che le alterazioni della struttura dei cromosomi possono essere utilizzate per mappare i geni, sia attraverso lo studio delle delezioni, sia dei ceppi letali bilanciati di *Drosophila*. In generale una **mutazione** è un cambiamento della sequenza nucleotidica del DNA e gli effetti a livello fenotipico possono essere enormi o addirittura non visibili; possono essere talmente enormi da determinare **letalità**: esistono **mutazioni letali**, alterazioni della sequenza di un determinato gene, che determinano la letalità se presenti in omozigosi (quando sono recessive) o in eterozigosi (quando sono dominanti); se invece parliamo di geni legati al sesso (mutazione letale recessiva per un gene legato al cromosoma X) nelle femmine si manifesterà in omozigosi e nei maschi in emizigosi. Esiste un **tasso spontaneo** di mutazioni che rappresenta una fonte di variabilità: in natura vi sono degli agenti fisici (mutageni) che incrementano il tasso spontaneo di mutazioni.

Il test di Muller o test CIB

► Hermann Muller (1927)

- L'ipotesi:
 - L'esposizione ai raggi X aumenta il tasso di mutazione

Muller si costruì un **ceppo letale bilanciato** rispetto al cromosoma X di *Drosophila* (cromosoma 1). Il "cromosoma X particolare" di *Drosophila* utilizzato nel test di Muller (o test del CIB) presentava tre mutazioni (C; I; B): "**C**" rappresenta un'**inversione** della regione che comprende i marcatori "I" e "B". Perché Muller decise di mettere un'inversione sul cromosoma X particolare? Perché individui che presentano cromosomi con un'inversione in eterozigosi producono gameti con assetto ricombinante aneuploidi (non vitali); di conseguenza non si osserverà progenie ricombinante per i marcatori che si trovano nella regione dell'inversione in eterozigosi.



"I" (elle minuscolo) rappresenta una **mutazione letale recessiva**; le femmine omozigoti per la mutazione I non sono vitali; i maschi emizigoti per la mutazione I non sono vitali; le femmine eterozigoti per la mutazione I sono vitali. "**B**" rappresenta la **mutazione Bar**, una mutazione dominante utilizzata come marcatore fenotipico per capire quali femmine hanno ereditato il cromosoma **CIB**; essendo una mutazione dominante, le femmine

che presentano l'occhio a barra hanno il cromosoma CIB con la configurazione descritta perché i ricombinanti non si osservano.

Se incrociamo una femmina eterozigote CIB con un maschio selvatico quali tipi di gameti produrranno questi due individui? La femmina produrrà due tipi di gameti (uno contenente X e uno contenente X^{CIB} con una frequenza del 50%) e il maschio

Muller incentrò la sua ricerca nello studio degli effetti dei raggi X sul tasso di mutazione. Mise a punto il primo test di valutazione di un agente mutageno per quantificare proprio il potere mutageno dei raggi X in *Drosophila*.

► Hermann Muller (1927)

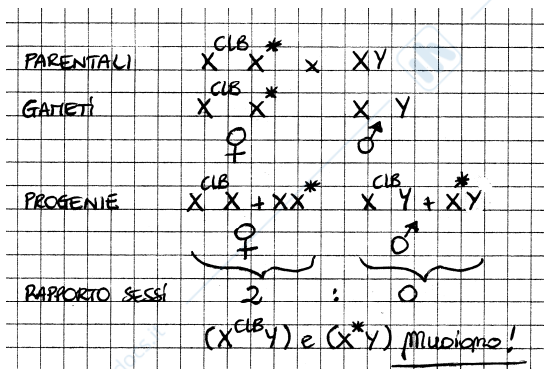
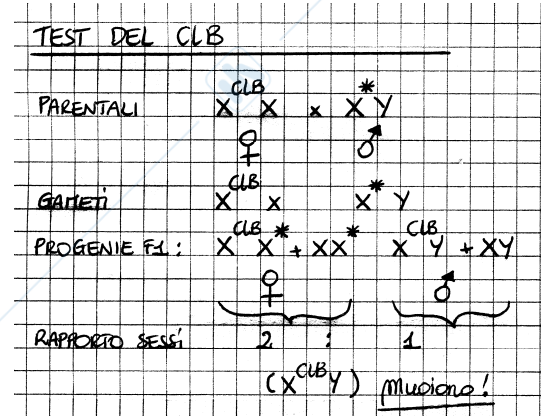
- Il materiale
 - Un ceppo di *D. melanogaster* con tre mutazioni sul cromosoma X
 - "ceppo CIB"
 - C: Ampia inversione che impedisce crossing over produttivi
 - I: allele letale recessivo
 - B: duplicazione cromosomica occhio Bar

INCROCIO TRA	♀ CIB E	♂ SELVATICO
PARENTALI	$X^{CIB} X$	$X Y$
GAMETI	$X^{CIB} X$	$X Y$
PROGENIE F1:	$X^{CIB} X + XX$	$X^{CIB} Y + XY$
RAPPORTO SESS	2	1
	$(X^{CIB} Y)$	Mutazione!

due tipi di gameti (uno contenente X e uno contenente Y con una frequenza del 50%). Nella progenie ottenuta da questo incrocio osserviamo il 50% di femmine con occhio Bar (hanno ereditato il cromosoma X^{CIB} dalla madre e il cromosoma X dal padre) e il 50% di femmine selvatiche (hanno ereditato il cromosoma X dalla madre e l'altro X dal padre); i maschi osservati sono per il 100% selvatici (hanno ereditato il cromosoma X dalla madre e il cromosoma Y dal padre); i maschi CIB muoiono perché sono emizigoti ($X^{CIB} Y$): da questo incrocio otteniamo una progenie con rapporto sessi sbilanciato (femmine:maschi 2:1).

Test del CIB

Muller prese dei maschi di *Drosophila* e li sottopose ai raggi X. Nell'immagine il maschio irradiato è indicato con un asterisco sul cromosoma X. Successivamente incrociò il maschio irradiato con una femmina CIB: la femmina produce il 50% di gameti con il cromosoma X selvatico e il 50% di gameti con il cromosoma X^{CIB} ; il maschio produce il 50% di gameti con il cromosoma X irradiato e il 50% di gameti con il cromosoma Y. Nella progenie ottenuta dall'incrocio Morgan osservò un rapporto sessi bilanciato (femmine:maschi 2:1), inoltre il 50% delle femmine presentava fenotipo Bar e il 50% fenotipo selvatico (tutte avevano ereditato dal padre il cromosoma X irradiato e il 50% di loro il cromosoma X selvatico dalla madre e l'altro 50% di loro il cromosoma X^{CIB} dalla madre); i maschi hanno ereditato dal padre il cromosoma Y, di conseguenza il 50% di essi riceve il cromosoma X^{CIB} dalla madre e quindi non sopravvivono, e il 50% il cromosoma X selvatico dalla madre.



L'esperimento continua incrociando le femmine CIB ottenute dall'incrocio precedente (prendiamo le femmine CIB perché C è l'inversione che impedirà di recuperare progenie ricombinante per questa regione) con i maschi selvatici. La femmina produce il 50% di gameti con il cromosoma X^{CIB} e il 50% di gameti con il cromosoma X irradiato; il maschio produce il 50% di gameti con il cromosoma selvatico e il 50% di gameti con il cromosoma Y. Nella progenie ottenuta dall'incrocio Morgan osservò

una progenie interamente femminile: il 50% era costituita da femmine con fenotipo occhio Bar (quindi avevano ereditato il cromosoma X^{CIB} dalla madre e il cromosoma X selvatico dal padre) e l'altro 50% da femmine fenotipicamente selvatiche (quindi avevano ereditato il cromosoma X irradiato dalla madre e il cromosoma X selvatico dal padre). Non si osserva progenie maschile: il 50% dei maschi muore perché riceve il cromosoma X^{CIB} dalla madre, mentre l'altro 50% di maschi riceve il cromosoma X irradiato dalla madre (evidentemente i raggi X hanno indotto sul cromosoma X delle mutazioni recessive che nei maschi si manifestano perché sono emizigoti, cioè non hanno l'altro cromosoma X con i geni non mutati). Di conseguenza, se non si ottiene progenie maschile da questo tipo di incroci deduciamo che i raggi X hanno indotto sul cromosoma X mutazioni letali.

I risultati

Muller allestì una serie di esperimenti per valutare il **tasso spontaneo** di mutazioni sul cromosoma X e lo mise a confronto con i risultati che otteneva sottoponendo le *Drosophile* a raggi X. Egli scoprì che il tasso spontaneo di mutazioni letali recessive sul cromosoma X di *Drosophila* si aggirava intorno allo 0,1% cioè, su mille esperimenti di controllo (incrocio tra femmina CIB e maschio selvatico non irradiato) in uno non recuperava progenie maschile perché era insorta una

mutazione letale sul cromosoma X del maschio. Effettuando incroci utilizzando però maschi irradiati con raggi X, Morgan notò che su mille campioni circa cento non presentavano progenie maschile, notò quindi un aumento significativo del tasso spontaneo di mutazione a seguito dell'esposizione ai raggi X, circa 100 volte in più.

► Hermann Muller (1927)

► Interpretazione dei risultati

- Nei maschi di controllo non irradiati sono avvenute pochissime mutazioni letali X-linked
 - Circa 1 su 1.000
- Nei maschi irradiati sono avvenute molte più mutazioni letali X-linked
 - Circa 100 volte di più
- I raggi X aumentano notevolmente il tasso di insorgenza di mutazioni letali recessive X-linked

La prima dimostrazione che ci viene fornita dal test del CIB è che i raggi X aumentano il tasso di mutazione in *Drosophila*, inoltre questo incremento è direttamente proporzionale alla dose di raggi X somministrata; quindi maggiore è la dose di raggi X somministrata al maschio

maggiore è l'incremento del tasso di mutazione osservato. Ovviamente nei maschi irradiati osserviamo le mutazioni che insorgono a livello della **linea germinale** e non a livello somatico (quindi mutazioni a livello dei loro spermatozoi).

Esperimento di Sia e Dawson

Gli esperimenti di **Sia e Dawson** (1931) in realtà sono una ripetizione degli esperimenti di Griffith; la differenza è che gli esperimenti di **Griffith** erano effettuati in vivo mentre questi sono stati effettuati in vitro. Parliamo quindi di ceppi batterici di *Streptococcus Pneumoniae* che nei topini di Griffith inducevano una polmonite molto grave che portava alla morte; questi ceppi presentano una capsula lipopolisaccaridica responsabile della virulenza. Poiché le colonie di questi ceppi di *Streptococcus Pneumoniae* sono lisce e lucide quando crescono su agar vengono chiamati ceppi **S**; ci sono altri ceppi di *Streptococcus*

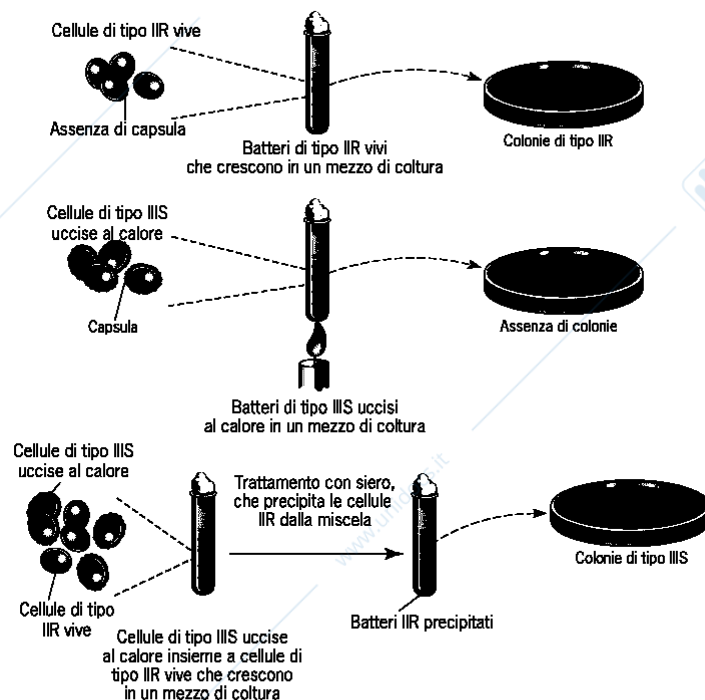


Figura 9.1 ► Dimostrazione di Sia e Dawson della trasformazione *in vitro* di *Streptococcus pneumoniae*.

che non sono virulenti e che mancano della capsula lipopolisaccaridica e vengono chiamati **R**: esistono ovviamente vari fenotipi di ceppi S e vari fenotipi di ceppi R. Se prendiamo cellule di un ceppo **R** di *Streptococcus* e le facciamo crescere in coltura liquida otteniamo cellule che, una volta pilastrate su terreno solido, formeranno colonie di tipo **R**; se prendiamo cellule di un ceppo virulento **S**, le facciamo crescere in coltura liquida e poi sottoponiamo la coltura ad una temperatura molto elevata, le cellule muoiono; poi piastrandolo il contenuto della coltura liquida su un terreno solido non osserviamo colonie (perché tutti i batteri sono morti). Se prendiamo invece cellule di un ceppo non virulento **R**, le mettiamo in coltura assieme a cellule di un ceppo virulento **S** precedentemente ucciso al calore, aggiungiamo alla soluzione un **siero** che ci fa precipitare le cellule del ceppo **R** (prive della capsula), preleviamo una parte della coltura e la piastriamo su terreno solido osserveremo delle colonie batteriche lisce **S**. Quindi cosa deve essere successo?

Ci deve essere stato un qualcosa che ha **“trasformato”** le cellule **R** non virulente in cellule virulente **S**, un qualcosa che ha dato loro l’informazione per poter sintetizzare la capsula; esiste quindi un **principio trasformante**. Molti scienziati negli anni 30-40 erano convinti che le molecole depositarie dell’informazione genetica fossero le proteine e non gli acidi nucleici. La prima dimostrazione che il principio trasformante fosse il DNA si è avuta molti anni dopo (1944) grazie agli esperimenti di Avery, MacLeod e McCarty.

Esperimento di Avery, MacLeod e McCarty

Avery, MacLeod e McCarty hanno ripetuto l’esperimento di Griffith in vitro ripetendo per tre volte il passaggio in cui viene mescolato il ceppo non virulento vivo con il ceppo virulento morto al calore. Nella prima coltura aggiungevano delle **proteasi**, enzimi che degradano le proteine, nella seconda coltura aggiungevano delle **RNasi**, enzimi che degradano l’RNA e nella terza coltura aggiungevano delle **DNAsi**, enzimi che degradano il DNA. Nella prima coltura dopo l’aggiunta di proteasi si osservava lo stesso risultato ottenuto dall’esperimento di Sia e Dawson, si sviluppavano colonie di tipo virulento **S**, quindi era avvenuta la trasformazione, di conseguenza possiamo concludere che il principio trasformante non è costituito da proteine perché la trasformazione è avvenuta anche in assenza di proteine. Nella seconda coltura dopo l’aggiunta di RNasi si osservava lo stesso risultato, di conseguenza il principio trasformante non è costituito da RNA. Nella terza coltura dopo l’aggiunta di DNAsi non si osservava alcuna colonia, ovvero non è avvenuta la trasformazione di alcuna cellula **R** in **S** perché è stato distrutto il principio trasformante, ovvero il DNA. Questa è stata la prima dimostrazione della natura del principio trasformante.

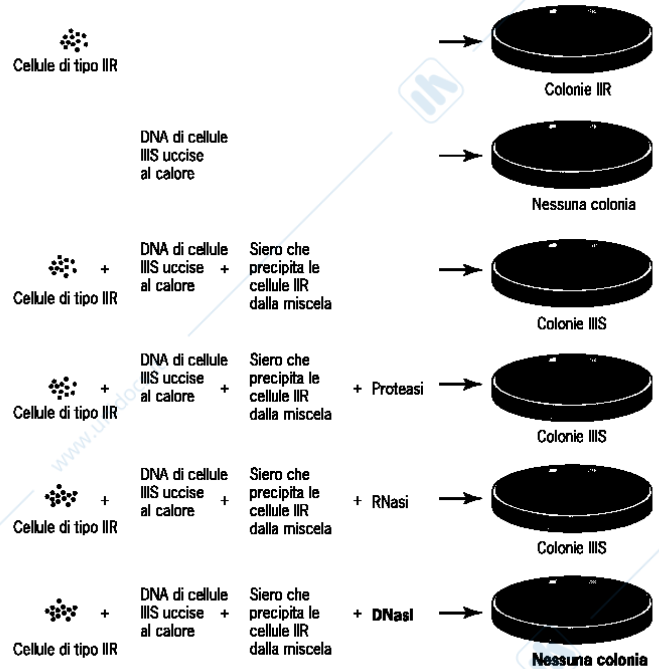


Figura 9.2 ► La prova di Avery, MacLeod e McCarty che il “principio trasformante” è il DNA.

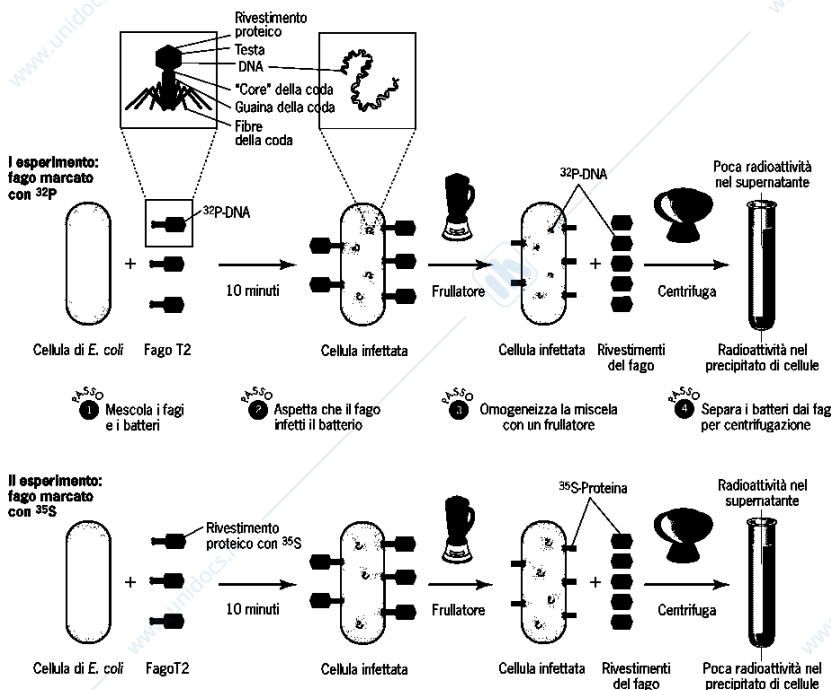
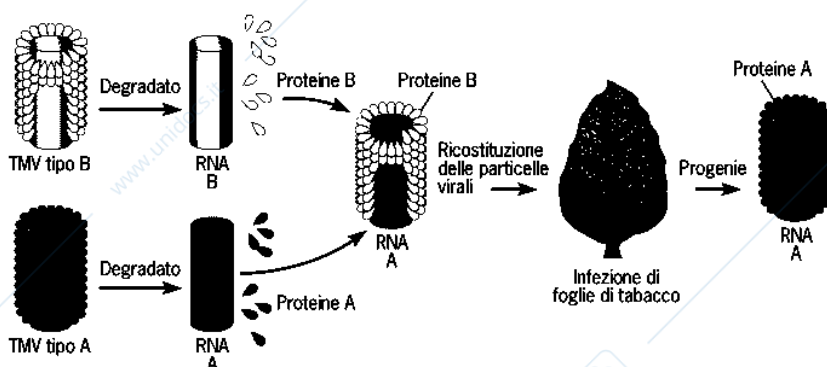


Figura 9.3 ► La dimostrazione di Hershey e Chase che l’informazione genetica del batteriofago T2 si trova nel suo DNA.

Esperimento di Hershey e Chase

I biochimici ancora ipotizzavano che le proteine fossero le molecole depositarie dell’informazione genetica e che l’evidenza dimostrata dall’esperimento di Avery et al. non fosse sufficientemente valida per assumere che il DNA fosse realmente il materiale ereditario. La prova definitiva che il DNA fosse il materiale ereditario si è avuta dagli esperimenti di Hershey e Chase. Essi utilizzarono un sistema fagico. I **batteriofagi** sono

virus che hanno una specificità d'ospite ristretta alle cellule procariotiche, ovvero virus dei batteri. Un batteriofago non è in grado di compiere il proprio ciclo vitale da solo, ma deve necessariamente infettare una cellula batterica. Un classico virus della serie T pari è il **fago T2**, costituito da una molecola di DNA posizionata all'interno di un involucro proteico, il **capside**, che è attaccato ad un filamento proteico che presenta delle zampette di natura proteica per aderire alla parete batterica; attraverso la **coda** inietta il proprio DNA all'interno del batterio. Il DNA del batteriofago una volta entrato nel batterio utilizza le polimerasi e i ribosomi del batterio per replicarsi e codificare per le poche proteine necessarie alla sintesi del capsid; una volta che si sono replicate le particelle fagiche viene lisa la cellula batterica e i fagi attaccheranno altri batteri per continuare il loro ciclo vitale: questo è definito **ciclo litico** di un batteriofago. Hershey e Chase pensarono di marcare in maniera differenziale le componenti del fago T2; in particolare effettuarono una serie di esperimenti marcando il DNA del fago ed una serie di esperimenti marcando le proteine utilizzando un isotopo radioattivo per seguirne il destino. Per marcare il DNA introdussero un isotopo radioattivo del fosforo (^{32}P) nel terreno di coltura in maniera tale che le colonie di fagi in crescita lo incorporassero. A questo punto gli scienziati allestirono l'infezione fagica mettendo a contatto i fagi replicati in terreno contenente l'isotopo radioattivo e colonie di *Escherichia Coli*; i fagi iniettavano il loro DNA radioattivo all'interno delle cellule batteriche; successivamente scuotevano la coltura in soluzione per assicurarsi che i capsidi vuoti dei fagi si staccassero dalle cellule batteriche; centrifugarono la coltura per far precipitare le cellule batteriche infettate e lasciare in sospensione i capsidi vuoti. Successivamente si misurarono la radioattività e notarono che essa compariva sul fondo della provetta centrifugata ovvero, nelle cellule batteriche precipitate: poiché era il DNA fagico ad essere stato marcato allora era il DNA ad essere entrato nelle cellule batteriche, se invece fosse stata la componente proteica del capsid allora avrebbero misurato la radioattività in sospensione perché il DNA non era entrato nelle cellule batteriche. Nell'altra serie di esperimenti gli scienziati marcarono la componente proteica del capsid fagico con ^{35}S perché lo zolfo è presente in tutti gli amminoacidi e di conseguenza questo isotopo consentì loro di effettuare una marcatura molto accurata e ripeterono tutti i passaggi effettuati prima: notarono che la radioattività misurata era presente in soluzione e non sul fondo della provetta e dedussero che la componente proteica fagica non era entrata all'interno delle cellule batteriche ma era rimasta in soluzione, quindi la **molecola depositaria dell'informazione ereditaria** doveva essere per forza il **DNA**.



Esperimento di Fraenkel-Conrat

In alcuni casi la molecola depositaria dell'informazione genetica è l'RNA. Una delle caratteristiche dei virus è che sono sempre costituiti da una molecola di acido nucleico e da un involucro proteico (capsid), ma alcuni virus presentano come acido nucleico il DNA ed altri l'RNA. Ovviamente serviva una dimostrazione che l'RNA fosse realmente la molecola depositaria dell'informazione genetica per i virus ad RNA. Per dimostrarlo fu utilizzato il virus del **mosaico del tabacco**, un virus ad RNA che infetta le foglie della pianta di tabacco determinando necrosi delle cellule infettate e di quelle circostanti. Di questo virus esiste un tipo **A** ed un tipo **B** che differiscono per alcune proteine che costituiscono il capsid. Questi esperimenti di **ricostituzione batterica** effettuati consistevano nel prendere virus del mosaico del tabacco di tipo A e di tipo B e denaturare la componente proteica del capsid così da separare le proteine dall'RNA. Successivamente si effettuava una **ricostituzione ibrida**, cioè veniva preso l'RNA di un ceppo e lo si faceva ricostituire utilizzando le proteine dell'altro ceppo: nell'immagine osserviamo l'RNA del ceppo A ricostituito con le proteine del ceppo B formando

la molecola depositaria dell'informazione genetica per i virus ad RNA. Per dimostrarlo fu utilizzato il virus del **mosaico del tabacco**, un virus ad RNA che infetta le foglie della pianta di tabacco determinando necrosi delle cellule infettate e di quelle circostanti. Di questo virus esiste un tipo **A** ed un tipo **B** che differiscono per alcune proteine che costituiscono il capsid. Questi esperimenti di **ricostituzione batterica** effettuati consistevano nel prendere virus del mosaico del tabacco di tipo A e di tipo B e denaturare la componente proteica del capsid così da separare le proteine dall'RNA. Successivamente si effettuava una **ricostituzione ibrida**, cioè veniva preso l'RNA di un ceppo e lo si faceva ricostituire utilizzando le proteine dell'altro ceppo: nell'immagine osserviamo l'RNA del ceppo A ricostituito con le proteine del ceppo B formando

un virus ibrido. A questo punto furono effettuati dei tagli sulla superficie delle foglie di tabacco per far avvenire l'infezione con questo virus ibrido; una volta che si formò il tessuto necrotico si recuperarono i virus presenti e si notò che erano tutti virus di tipo **A** sia per la componente di RNA che per la componente proteica; di conseguenza era stata la molecola di RNA responsabile della formazione delle proteine servite a creare il capsid per le nuove particelle virali formate dopo l'infezione. Quindi sia il DNA che l'RNA sono le molecole depositarie dell'informazione genetica.

Struttura degli acidi nucleici

Il DNA è costituito da nucleotidi e ogni nucleotide è costituito da un gruppo fosfato, uno zucchero e una base azotata. Le basi azotate sono di due tipi a seconda che siano a singolo o doppio anello (pirimidine e purine); il legame covalente si forma attraverso il gruppo fosfato e gli zuccheri (legame fosfodiesterico).

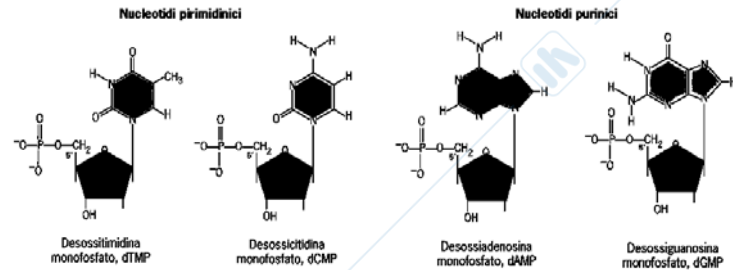
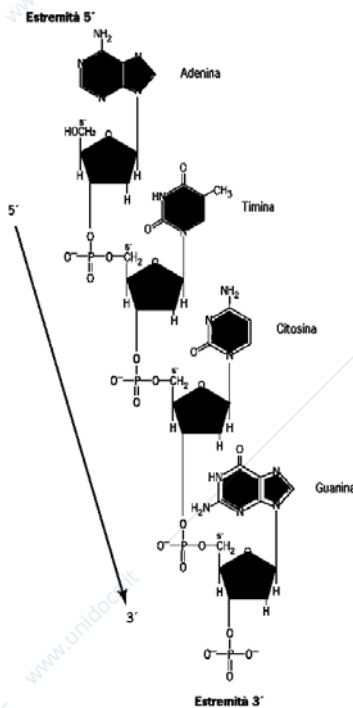
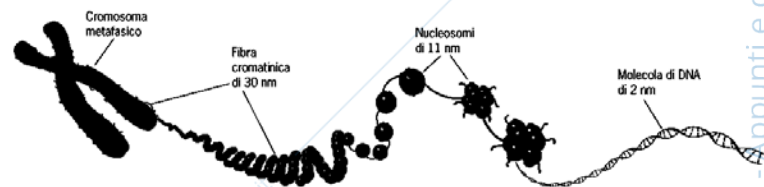


Figura 9.6 ▶ Struttura dei quattro desossiribonucleotidi comuni presenti nel DNA. Gli atomi di carbonio e di azoto negli anelli delle basi sono numerati da 1 a 6 nelle pirimidine e da 1 a 9 nelle purine. Gli atomi di carbonio negli zuccheri dei nucleotidi sono numerati da 1' a 5', per distinguerli da quelli delle basi.



Quando si scrive una sequenza di DNA la si orienta in direzione 5'-3', perché presenta ad un'estremità un gruppo fosfato libero (estremità 5') ed un gruppo OH libero all'estremità 3'. L'appaiamento delle basi avviene sempre tra **A-T** e **C-G** attraverso legami idrogeno, per cui basta poca energia per romperli e dissociare la doppia elica in singoli filamenti.

Un cromosoma è costituito da una molecola di



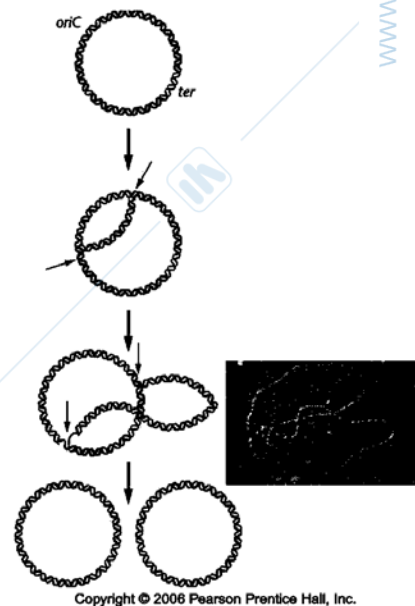
DNA complessata a proteine che formano strutture di entità sempre maggiore fino a costituire fibre addensate che si possono visualizzare durante la divisione cellulare in metafase.

La **replicazione del DNA** nei batteri che hanno cromosoma circolare avviene in maniera bidirezionale e parte in un punto specifico chiamato **origine di replicazione** e si forma una sorta di bolla che avanza in entrambe le direzioni; nei cromosomi lineari si ha lo svolgimento della doppia elica e ciascuno dei due filamenti funge da stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare.

Le DNA polimerasi

- ▶ Necessitano di uno stampo
- ▶ Necessitano di 4 dNTPs (e di ioni magnesio)
- ▶ Necessitano di un innesco (primer)
- ▶ Polimerizzano in direzione 5'-3'
- ▶ Hanno attività esonucleasica 3'-5'
 - ▶ Correzione di bozze per appaiamenti illegittimi
- ▶ Hanno attività esonucleasica 5'-3' (non tutte)

Gli enzimi che intervengono nella replicazione del DNA, le **DNA polimerasi**, catalizzano le reazioni di sintesi solo in



Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

direzione 5'-3', riescono cioè ad allungare la catena polinucleotidica solo se trovano un'estremità 3'OH a cui aggiungere il nucleotide successivo. Quindi sul filamento di DNA parentale che va in direzione 3'-5' la sintesi del neofilamento avviene in maniera continua, mentre sul filamento che va in direzione 5'-3' si osserva la sintesi di **inneschi di RNA**, i **frammenti di Okazaki**, che hanno la funzione di fornire un'estremità 3'OH alla DNA polimerasi che può allungare il filamento nascente, dopodichè i primer di RNA vengono rimossi e intervengono enzimi chiamati **DNA ligasi** che cominciano a "cucire" tra loro i vari frammenti neosintetizzati.

Affinchè avvenga la replicazione del DNA

- ▶ La doppia elica si deve svolgere
- ▶ Devono essere sintetizzati gli inneschi
- ▶ Devono essere copiati entrambi i filamenti (che sono antiparalleli...)
- ▶ Devono essere rimossi gli inneschi
- ▶ Devono essere "cuciti" i pezzi...
- ▶ Devono essere corretti gli eventuali **errori**

della doppia elica. Il **tasso di errore** della DNA polimerasi è di 1 su un milione di coppie di basi: il genoma umano è costituito da 3 miliardi di coppie di basi in forma aploide quindi ad ogni replicazione la DNA polimerasi dovrebbe commettere 3 mila errori!

Esistono dei sistemi presenti sia nei batteri che negli eucarioti che attuano un "controllo" dell'attività della DNA polimerasi e quindi riparano gli eventuali errori; in questo modo il **tasso di mutazione** risulta minore del **tasso di errore** della DNA polimerasi. Esistono quindi dei **meccanismi di riparazione** del DNA che abbassano il tasso di mutazione indotto a sua volta dal tasso di errore della DNA polimerasi.

Accuratezza del processo di replicazione

- ▶ Il genoma umano è costituito da circa 3 miliardi di coppie di basi
- ▶ Un tasso di errore di 1 su 1 milione di coppie di basi replicate genererebbe 3000 errori per ogni divisione cellulare
 - ▶ La variabilità generata è sottoposta al vaglio della selezione naturale, ma questo tasso sarebbe troppo elevato!
 - ▶ La replicazione del DNA deve essere molto accurata.

Esercizio 1

Immaginiamo di avere un triibrido, di sapere che i tre geni sono associati, che l'ordine dei geni è quello in figura, che il gene B rispetto a quello A e quello D si trova in configurazione trans e che la distanza di mappa tra il gene A e il gene B sia di 10cM e quella tra il gene B ed il gene D sia di 10 cM. Vogliamo fare una **previsione** delle classi gametiche che potrebbe produrre il triibrido in questione e anche della **frequenza** con cui ciascuna classe viene prodotta. Quanti tipi di gameti ci aspettiamo da questo triibrido? 8 tipi di gameti. Poiché conosciamo l'ordine dei geni e la configurazione del triibrido possiamo già dire che ci aspettiamo innanzitutto 8 classi non equifrequenti perché i geni sono associati e sappiamo già quali sono le classi più abbondanti e quelle meno abbondanti: le prime due nell'immagine sono le classi più abbondanti (AbD e aBd) in

ESERCIZIO 1	
$\begin{array}{ccc} A & b & D \\ a & B & d \end{array}$	$\begin{array}{l} AB = 10cM \\ BD = 10cM \end{array}$
	Classi gametiche e frequenze?
49,5%	A b D] PARENTALI
49,5%	a B d] PARENTALI
4,5%	A B d] SRTI
4,5%	a b D] SRTI
4,5%	A b d] SRTII
4,5%	a B D] SRTII
0,5%	A B D] D.L.
0,5%	a b d] D.L.
$f_{AbD} = (10\%)(10\%) = 1\%$	
$f_{aBd} = 10\% - 1\% = 9\%$	
$f_{SRTI} = 10\% - 1\% = 9\%$	
$f_{SRTII} = 10\% - 1\% = 9\%$	
$f_{D.L.} = 100\% - 1\% - 9\% - 9\% = 81\%$	

quanto sono le classi **parentali**, cioè riflettono la configurazione del tribrido di partenza. Le classi gametiche meno abbondanti saranno le ultime due in figura (ABD e abd) in quanto sono le classi **doppi ricombinanti** rispetto al tribrido di partenza. Le altre 4 classi gametiche in figura rappresentano le 4 classi di **singoli ricombinanti**, che possiamo distinguere in singoli ricombinanti in **prima regione** (ABd e abD) e singoli ricombinanti in **seconda regione** (aBD e Abd). Come facciamo a calcolare la frequenza con cui vengono prodotte queste 8 classi gametiche? Partendo dalla distanza di mappa: dire che la distanza di mappa tra A e B è di 10 cM significa dire che è possibile osservare il 10% di ricombinanti nella regione tra A e B, di conseguenza conosciamo la frequenza con cui avviene il crossing-over in questa regione; e poiché abbiamo la distanza di mappa anche tra i geni B e D allora conosciamo anche la frequenza con cui si osservano i ricombinanti nella regione D e B e la frequenza quindi con cui avviene il crossing-over in quest'altra regione. Per calcolare le frequenze delle classi gametiche partiamo dalla classe dei **doppi ricombinanti**. Abbiamo quindi detto che i doppi ricombinanti si ottengono perché in una stessa meiosi avviene un crossing-over in prima regione e uno in seconda regione **contemporaneamente**, due eventi tra loro indipendenti che devono verificarsi contemporaneamente nella stessa meiosi e di ciascuno di questi due eventi (frequenza del crossing-over in prima regione e frequenza del crossing-over in seconda regione) conosciamo la probabilità di accadimento che è 10% in prima regione e 10% in seconda regione; quindi per calcolare la frequenza dei doppi ricombinanti applichiamo la regola del prodotto: moltiplichiamo quindi $10\% \times 10\% = 1\%$. La probabilità che vengano prodotti gameti doppi ricombinanti è 1%, quindi ciascuna classe di gameti doppi ricombinanti ha probabilità di essere prodotta di 0,5%. La probabilità che vengano prodotti le classi gametiche singoli ricombinanti in prima regione è $10\% - 1\%$, perché dal 10% dobbiamo escludere la probabilità di accadimento di produzione dei doppi ricombinanti, perché i doppi ricombinanti presentano anche il crossing-over in prima regione: quindi i singoli ricombinanti in prima regione avranno frequenza 9%. Le singole classi di singoli ricombinanti in prima regione avranno frequenza del 4,5%. Stesso discorso per i singoli ricombinanti in seconda regione: $10\% - 1\% = 9\%$; le singole classi di singoli ricombinanti in seconda regione avranno frequenza del 4,5%. Per ottenere la frequenza dei parentali a questo punto ci basta sottrarre dal 100% delle classi gametiche la frequenza di produzione delle classi doppi ricombinanti, singoli ricombinanti in prima regione, singoli ricombinanti in seconda regione: $100\% - 1\% - 9\% - 9\% = 81\%$; di conseguenza le singole classi di gameti parentali hanno frequenza del 40,5% ciascuna.

Esercizio 2

Nell'immagine abbiamo un individuo che presenta due geni associati (A e B) in configurazione trans e la distanza di mappa tra i due geni è di 70cM. Quali saranno i tipi di gameti che può produrre questo diibrido e le loro relative frequenze. Le classi gametiche che produce questo diibrido sono 4 (Ab; aB; AB; ab); considerando la configurazione del diibrido le classi gametiche parentali sono le prime due e le classi ricombinanti le ultime due. Calcoliamo ora la frequenza con cui vengono prodotte queste 4 classi gametiche. Cosa significa che la distanza di mappa tra A e B è di 70cM? Significa che i due marcatori sono molto lontani e dato l'alto valore della distanza di mappa, dalla meiosi saranno prodotte il 50% di classi gametiche parentali e il 50% di classi gametiche ricombinanti, di conseguenza ciascuna classe gametica ha frequenza del 25%, cioè questo è uno di quei casi in cui i marcatori che si trovano sullo stesso cromosoma (sono fisicamente associati) ma si comportano come se fossero indipendenti; perché dire che le 4 classi gametiche hanno il 25% di frequenza significa dire che sono 4 classi equipresenti e hanno una probabilità di formazione identica a quella che si osserva in un diibrido on due geni indipendenti. Quindi, pur essendo due geni fisicamente associati si comportano come se fossero indipendenti perché sono troppo lontani. Come abbiamo saputo che la distanza di mappa tra i due marcatori è di 70cM? Abbiamo utilizzato dei marcatori intermedi che tra loro hanno distanze di mappa minori e le abbiamo sommate per ottenere quella tra il primo marcatore e quello di interesse.

ESERCIZIO 2	
$\frac{A}{a} \frac{b}{B}$	AB = 70 cM
	Classi gametiche e frequenze?
25%	A b } PARENTALI
25%	a B } PARENTALI
25%	AB } RICOMBINANTI
25%	a b } RICOMBINANTI
	70 cM > 50 cM = 50%

IL TEST DI MULLER DEL CIB (Dispensa Prof. Aceto)

H. J. Muller fu il primo genetista ad elaborare un metodo per analizzare gli effetti dei raggi X sul tasso di mutazioni spontanee in *Drosophila*. Ovviamente, come "controllo" gli era necessario conoscere la frequenza della mutazioni spontanee in *Drosophila*.

Muller riuscì ad ottenere, effettuando vari tipi di incroci, un ceppo di *Drosophila* **CIB**, costituito da sole femmine.

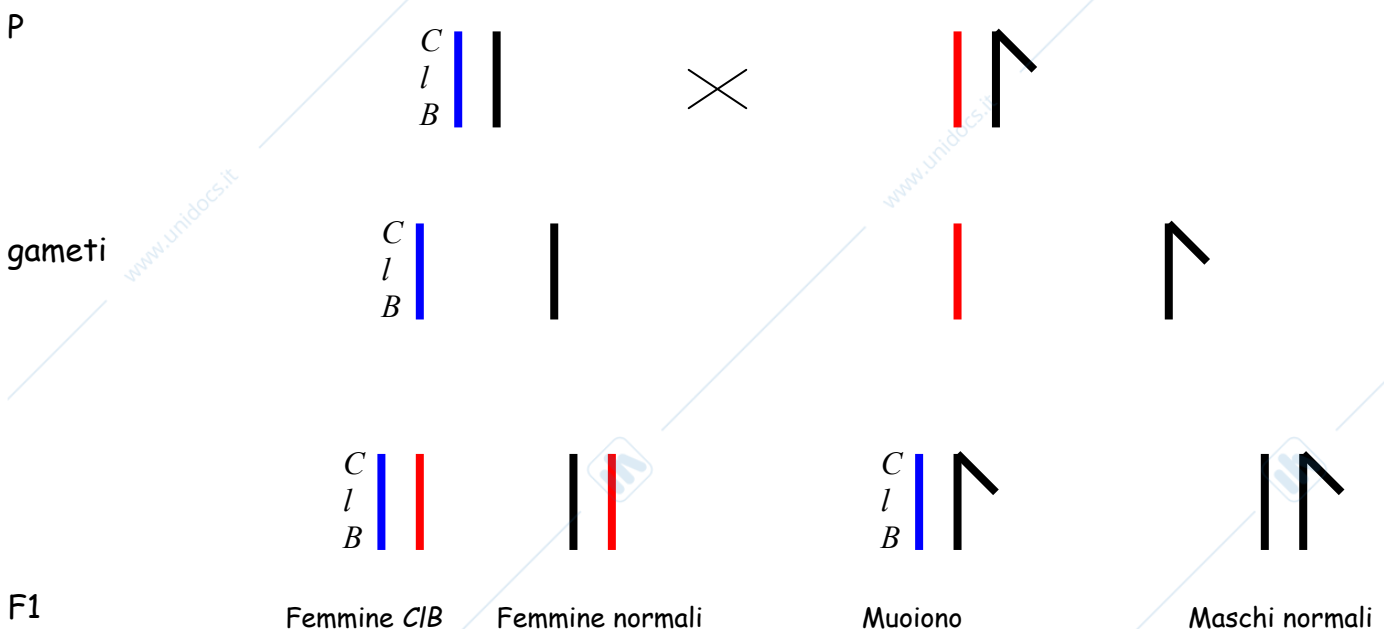
Una femmina CIB contiene in uno dei suoi cromosomi X una **inversione C**, un gene **letale recessivo I** ed un gene **dominante Bar** (occhio di dimensioni ridotte).

Analizziamo il significato di queste tre mutazioni.

L'inversione **C** impedisce che si formino zigoti vitali ricombinanti per questa regione. Gli zigoti che si originano dalla fecondazione di una cellula uovo contenente cromosomi deleti o duplicati, frutto della ricombinazione nella regione dell'inversione C, non riescono a portare a termine lo sviluppo. Ciò significa che i geni **I** e **B** sono ereditati come un'unità.

Il gene **B** ha la funzione di far riconoscere rapidamente i moscerini eterozigoti CIB (perché le femmine con occhio Bar hanno un solo cromosoma CIB, in quanto il gene **I** è letale in omozigosi).

Se una femmina CIB è incrociata con un maschio normale si ottiene il seguente risultato:

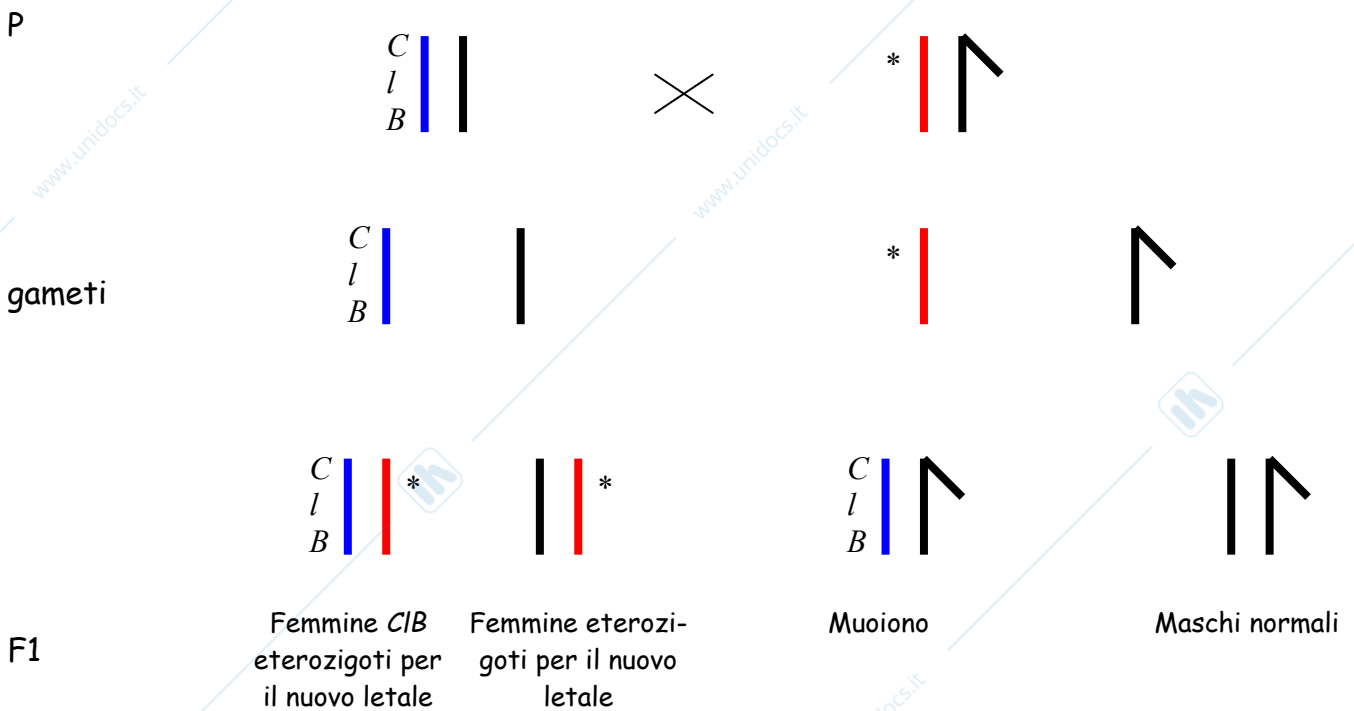


Il rapporto sessi osservato nella progenie di questo incrocio è 2 (femmine) : 1 (maschi).

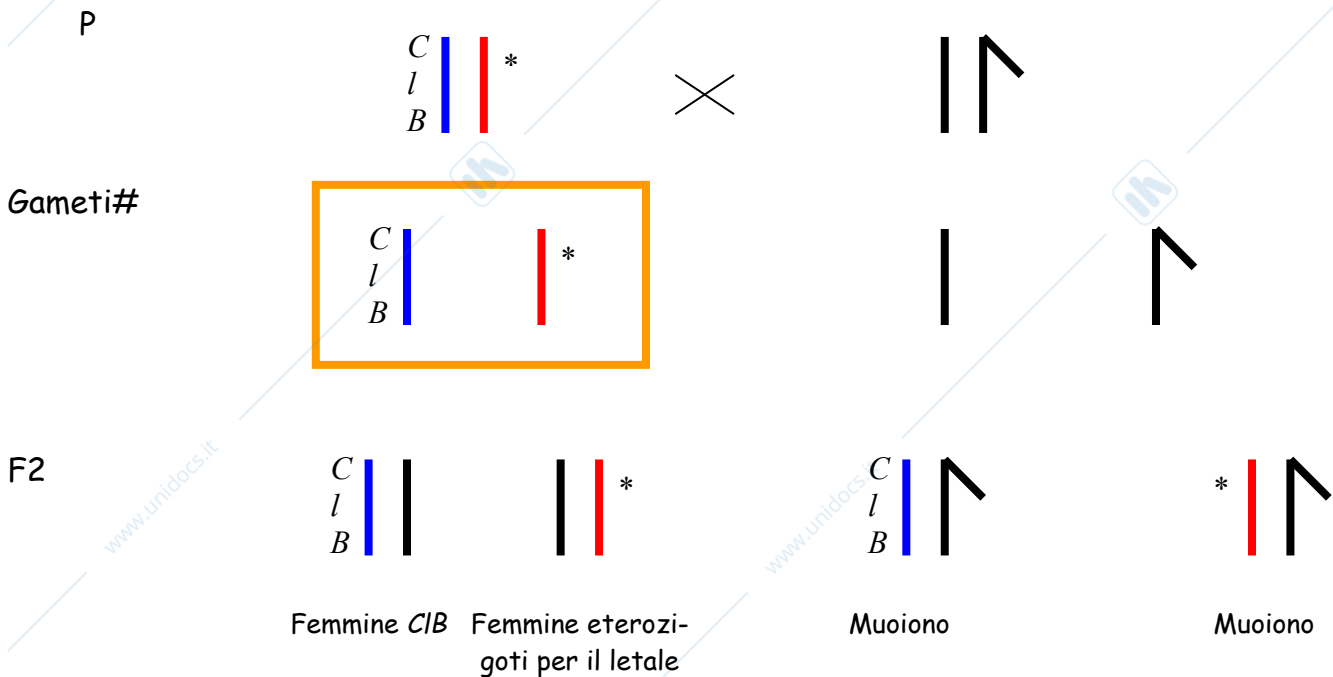
Il test del CIB permette di misurare il tasso di mutazioni letali che si generano sul cromosoma X contenuto negli spermatozoi.

ATTENZIONE: IL TASSO DI MUTAZIONI MISURATO NON E' RIFERITO AD UN SINGOLO LOCUS, MA A TUTTI I LOCI DEL CROMOSOMA X CHE POSSONO MUTARE IN UNA FORMA LETALE!!!!

Muller irradiò con raggi X maschi di *Drosophila* appartenenti ad un ceppo selvatico e li incrociò con femmine CIB. Indichiamo il cromosoma X irradiato con un asterisco.



A questo punto, Muller incrociò le femmine CIB della F1 con i maschi normali, allestendo incroci separati e non di massa.



i gameti ricombinanti della femmina non li consideriamo perché essi danno origine a progenie non vitale.

QUINDI, SE SUL CROMOSOMA X DEL MASCHIO IRRADIATO SI GENERA UNA MUTAZIONE LETALE, NELLA F2 NON SI OSSERVERANNO MASCHI.

Quando Muller utilizzava maschi non irradiati in incroci di questo tipo, circa 1 incrocio su 1000 generava una F2 priva di maschi. Ciò significa che la probabilità di accadimento di una mutazione letale spontanea sul cromosoma X è 0,1% circa.

Utilizzando, invece, 1000 maschi irradiati con 4000 r-unità di raggi X in 1000 singoli incroci, otteneva circa 100 F2 (10%) prive di maschi. Questa dose di raggi X, dunque, aumentava di circa 100 volte il tasso di mutazione spontanea.

LEZIONE 14 (24/04/2015)

Accuratezza del processo di replicazione

Precedentemente abbiamo parlato di un test di mutagenesi, il test del CIB, il primo messo a punto da Muller per valutare gli effetti di un agente fisico sul tasso spontaneo di mutazione; il test si riferiva a mutazioni letali recessive che possono insorgere sul cromosoma X di *Drosophila*. Abbiamo detto che la replicazione del DNA è un meccanismo che si svolge con una grande accuratezza altrimenti non sarebbe assicurata la fedeltà di trasmissione dell'informazione ereditaria da una cellula alle sue cellule figlie e nel caso delle linee germinali da una generazione a quella successiva.

- ▶ Il genoma umano è costituito da circa 3 miliardi di coppie di basi
- ▶ Un tasso di errore di 1 su 1 milione di coppie di basi replicate genererebbe 3000 errori per ogni divisione cellulare
 - ▶ La variabilità generata è sottoposta al vaglio della selezione naturale, ma questo tasso sarebbe troppo elevato!
 - ▶ La replicazione del DNA deve essere molto accurata.

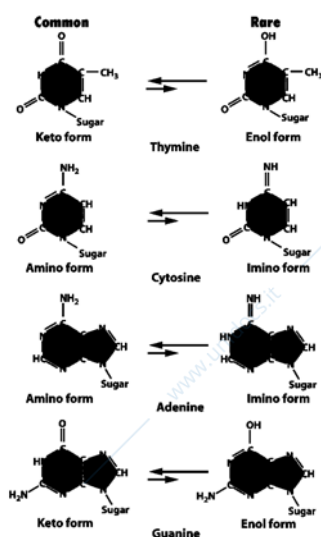
Mutazioni spontanee e indotte

I meccanismi di riparazione delle mutazioni

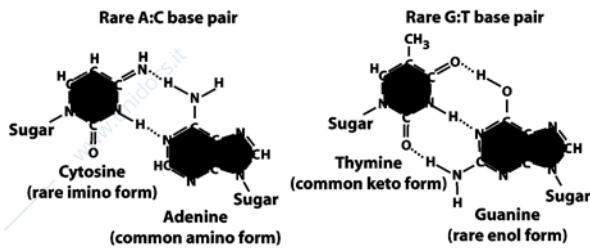
Un altro fenomeno responsabile della **variabilità genetica** degli organismi è la **mutazione**, il cambiamento delle basi del DNA. Le mutazioni e gli effetti delle mutazioni sono sottoposti al vaglio della selezione naturale che stabilirà se i cambiamenti possono andare avanti nel corso delle generazioni oppure sono dannosi da non poter aver seguito (come le mutazioni letali). Il tasso spontaneo di mutazione dipende da una serie di caratteristiche intrinseche al DNA stesso, cioè è la stessa natura del DNA che determina l'insorgenza di questi cambiamenti per due fondamentali aspetti: un primo aspetto sono gli **errori** che di tanto in tanto compie la DNA polimerasi, ma se il tasso di mutazione osservato dipendesse esclusivamente dal tasso di errore della DNA polimerasi si osserverebbe un tasso di mutazione spontanea molto più elevato rispetto a quello che realmente si registra, quindi possiamo immaginare che esistano all'interno delle cellule dei **meccanismi di riparazione** degli eventuali errori compiuti dalla DNA polimerasi; un secondo aspetto che determina l'insorgenza di mutazioni spontanee è rappresentato da una caratteristica propria delle **basi azotate**.

zione naturale che stabilirà se i cambiamenti possono andare avanti nel corso delle generazioni oppure sono dannosi da non poter aver seguito (come le mutazioni letali). Il tasso spontaneo di mutazione dipende da una serie di caratteristiche intrinseche al DNA stesso, cioè è la stessa natura del DNA che determina l'insorgenza di questi cambiamenti per due fondamentali aspetti: un primo aspetto sono gli **errori** che di tanto in tanto compie la DNA polimerasi, ma se il tasso di mutazione osservato dipendesse esclusivamente dal tasso di errore della DNA polimerasi si osserverebbe un tasso di mutazione spontanea molto più elevato rispetto a quello che realmente si registra, quindi possiamo immaginare che esistano all'interno delle cellule dei **meccanismi di riparazione** degli eventuali errori compiuti dalla DNA polimerasi; un secondo aspetto che determina l'insorgenza di mutazioni spontanee è rappresentato da una caratteristica propria delle **basi azotate**.

La tautomeria delle basi azotate



Le basi azotate, infatti, possono esistere in due forme tautomeriche differenti, una più stabile (**forma chetonica**) e una meno stabile (**forma enolica**) nel caso della **timina** e della **guanina**. La forma comune più stabile è quella che la base azotata adotta nella maggior parte dei casi e per la maggior parte del tempo, mentre la forma meno stabile è quella che adotta raramente e quindi anche per minor tempo. La **citrosina** e l'**adenina** presentano una forma più stabile detta **forma amminica** e una meno stabile detta **forma imminica**.



Hydrogen-bonded A:C and G:T base pairs that form when cytosine and guanine are in their rare imino and enol tautomeric forms.

Figure 13-14a Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

Nelle loro forme tautomeriche rare le basi azotate non hanno l'appaiamento canonico, quindi se durante la replicazione del DNA si viene a creare un cambiamento di stato tautomerico di una delle basi si possono creare degli appaiamenti non canonici, definiti **appaiamenti illegittimi**. Nell'immagine la **citosa** nella sua forma rara anziché appaiarsi con la guanina si appaia con l'adenina formando due ponti idrogeno;

quindi se durante la replicazione del DNA una citosina del filamento stampo passa nella sua forma tautomerica rara, la DNA polimerasi inserirà sul filamento nascente un'adenina: non è un errore della DNA polimerasi, ma è l'appaiamento non canonico che si viene a creare perché la citosina è nella sua forma rara e non riesce ad appaiarsi con la guanina. Nella parte destra dell'immagine è schematizzato un appaiamento non canonico che si viene a creare tra la forma rara della **guanina** e la timina. A seconda dei passaggi tautomerici che si possono avere nelle basi azotate possono insorgere **errori** durante la replicazione del DNA.

Mechanism by which tautomeric shifts in the bases in DNA cause mutations.

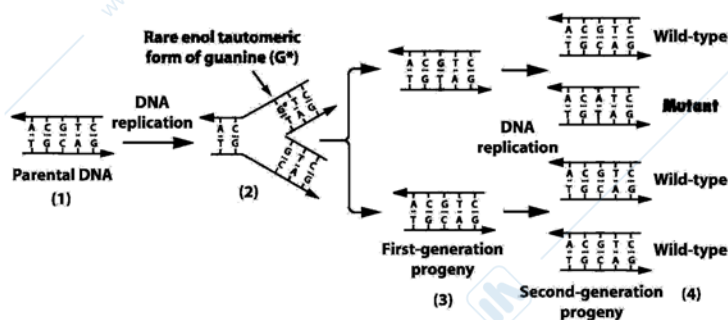


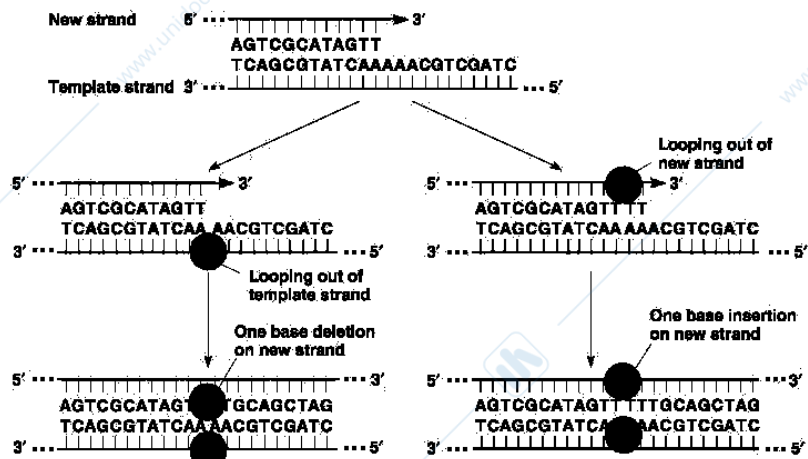
Figure 13-14b Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

nel filamento in basso non accade nulla durante la replicazione per cui da questo si origina una doppia elica parentale da cui a sua volta si origineranno poi due doppie eliche identiche a quella parentale. Immaginiamo che durante la replicazione della molecola parentale (1) sul filamento superiore la base azotata **G** passi per un attimo nella sua forma tautomerica rara (forma enolica) e che quindi sia ora complementare non più alla **C** ma alla **T**: si viene a creare una doppia elica con appaiamento illegittimo, e quando la guanina tornerà nella sua forma stabile si creerà una distorsione della doppia elica perché **G** e **T** non si appaiano tra loro (3.1). Questa molecola in sé non è ancora un mutante ma presenta per adesso solo una distorsione, ma nel momento in cui la molecola andrà a replicarsi, dal filamento contenente la **G** ritornata alla sua forma stabile si formerà un neofilamento contenente la **C** con cui farà legame idrogeno e nel complesso ricostituiranno la molecola di DNA parentale (4.1); dal filamento contenente la **T** (3.1) invece si formerà un neofilamento contenente **A** con cui farà legame idrogeno e nel complesso andranno a costituire una **molecola mutante** di DNA rispetto a quella parentale. Questa descritta è una possibile origine di mutazione dovuta a cambiamenti tautomerici delle basi azotate che avvengono durante i meccanismi di replicazione del DNA. Questo tipo di mutazione ha portato ad un cambiamento di una posizione nella sequenza nucleotidica.

Mutazioni causate da anse: inserzioni e delezioni

Sono possibili altri tipi di mutazioni che non determinano il cambiamento di una posizione, ma l'aggiunta o la perdita di una coppia di basi nella sequenza del DNA. Nell'immagine è mostrato un esempio di inserzione e delezione di una base durante la replicazione del DNA. Questo meccanismo delle DNA polimerasi è definito **slippage** e avviene soprattutto in quelle regioni del DNA che presentano ripetizioni, cioè sono costituite da una sola base azotata ripetuta. Nel momento in cui avviene la replicazione del DNA, nei tratti che sono costruiti da ripetizioni può

succedere due eventi. Nella parte alta dell'immagine possiamo osservare una ripetizione di AAAAA sul filamento il direzione 3'-5', nel momento in cui la doppia elica si separa può accadere che nel filamento stampo (molecola in alto a sinistra) in tale regione si venga a formare una piccola **ansa** (loop) che comprende un nucleotide, una A anziché stare dritta sulla sequenza del filamento forma una piccola gobba e non risulta visibile alla DNA polimerasi, la quale vedrà solo la A precedente e quella successiva ad essa, per questo motivo



aggiungerà una T sul neofilamento in corrispondenza della A precedente al loop ed un'altra T in corrispondenza della A successiva al loop. Dopo la replicazione (molecola in basso a sinistra) su un filamento compariranno quattro T e sul complementare cinque A di cui una è quella nel loop; nel momento in cui questa nuova doppia elica si replicherà avrà origine una nuova doppia elica contenente quattro appaiamenti AT e non più cinque, si **perde** una coppia di basi. Ritornando alla molecola di partenza in alto nell'immagine, nel momento in cui essa comincia la replicazione può avvenire un altro fenomeno: il loop può formarsi sul neofilamento crescente in corrispondenza della regione ripetuta anziché sul filamento stampo; ovvero mentre la DNA polimerasi allunga il filamento di neosintesi, i legami idrogeno tra le basi complementari non si formano immediatamente, per cui la base che non si appaia perfettamente può estroflettersi dalla neosequenza (molecola in alto a destra) e la DNA polimerasi rilegge per la seconda volta la stessa A sul filamento stampo e attacca al neofilamento un'ulteriore T, si originerà una molecola di DNA costituita da un filamento contenente sei T e un filamento contenente 5 A (molecola in basso a destra). Nel momento in cui la molecola in basso a destra si replica, la sintesi del filamento complementare a quello contenente le 5 A darà origine ad una molecola di DNA selvatica, mentre la sintesi del filamento complementare a quello contenente le sei T darà origine ad una molecola di DNA mutata. Quindi per via dello **slippage** si possono originare delle **delezioni** di coppie di basi se il fenomeno avviene sul filamento stampo, oppure delle **inserzioni** se avviene sul filamento di neosintesi.

Mutazioni puntiformi

► Sostituzioni di basi

► Transizioni

- Pirimidina → Pirimidina
 - e.g., C → T
- Purina → Purina
 - e.g., A → G

► Transversioni

- Purina → Pirimidina e viceversa
 - e.g., A → C
- Sono più rare delle transizioni

purina.

Mutazioni puntiformi

Le mutazioni puntiformi riguardano uno o pochi nucleotidi della sequenza del DNA e vanno distinte dalle mutazioni cromosomiche che riguardano invece ampie regioni di DNA. Le mutazioni puntiformi possono essere classificate in due gruppi che sono le **sostituzioni di coppie di basi** (quelle che si generano spontaneamente a causa della tautomeria delle basi azotate) e le **inserzioni e delezioni di coppie di basi**. Le sostituzioni di coppie di basi possono essere suddivise in **transizioni** e **transversioni**; nelle transizioni la sostituzione avviene tra nucleotidi della stessa classe, ovvero una purina viene sostituita con un'altra purina oppure una pirimidina viene sostituita con un'altra pirimidina; nelle transversioni la sostituzione avviene tra una purina ed una pirimidina oppure tra una pirimidina ed una

- ▶ Le mutazioni somatiche **non** sono trasmesse alla progenie
- ▶ Le mutazioni della linea germinale sono trasmesse alla progenie

Mutazioni somatiche e germinali

Le mutazioni possono avvenire in tutte le cellule e a seconda che avvengano nelle cellule del soma o in quelle della linea germinale, vengono definite **mutazioni somatiche** e **mutazioni germinali**.

mutazioni somatiche e **mutazioni germinali**. Ovviamente l'interesse di un genetista non è esattamente focalizzato sulle mutazioni somatiche perché esse manifesteranno il fenotipo solo nell'individuo in cui si verificano, ma si interesserà maggiormente delle mutazioni germinali, perché solamente queste ultime possono essere trasmesse alla progenie, cioè diventano ereditarie e rappresentano un **significato evolutivo** perché saranno sottoposte al vaglio della selezione naturale per stabilire se possono avere un futuro oppure in caso contrario si interromperà la loro trasmissione.

Tasso di mutazione e retromutazione

Non è possibile attribuire un unico e preciso valore al tasso spontaneo di mutazione perché varia a seconda degli organismi che consideriamo, ad esempio per i procarioti il

tasso spontaneo di mutazione è molto più alto di quello degli eucarioti, e nell'ambito di questi due grandi gruppi, a seconda della sottospecie a cui facciamo riferimento il tasso medio di mutazione spontaneo può essere molto variabile. In linea generale varia comunque da un valore alto di 10^{-5} a valori minori di 10^{-9} . Una **retromutazione** è una seconda mutazione che avviene **esattamente** nel punto in cui è avvenuta la prima mutazione e che riporta la sequenza del DNA alla sua forma originaria: ovviamente il **tasso di retromutazione** è molto più basso del tasso di mutazione. Non si tratta di un evento impossibile ma solo molto raro. C'è però da dire che la **delezione** è una mutazione che non può assolutamente revertire al genotipo selvatico, in particolare la **delezione cromosomica**, perché dovrebbe avvenire una **inserzione** dello stesso pezzo di DNA mancante esattamente in quel punto di rottura che ha generato la delezione e nello stesso orientamento, ed è impossibile. Una retromutazione di una sostituzione di coppie di basi può tranquillamente accadere. Solitamente il **tasso di retromutazione** corrisponde al tasso di mutazione per il tasso di mutazione, si raddoppia quindi l'ordine di grandezza dell'esponente negativo, perché devono avvenire due eventi: prima la mutazione e poi la nuova mutazione nello stesso punto che ripristina il genotipo selvatico.

Tasso di mutazione e retromutazione

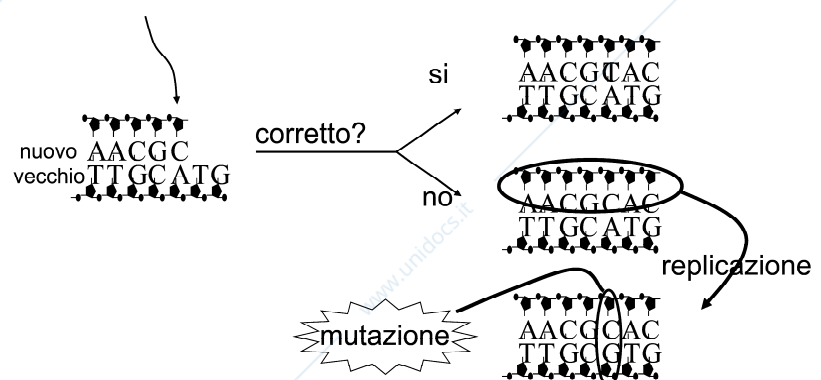
- ▶ Il numero di nuove mutazioni per gene per generazione è variabile (da $1/10^{-5}$ a $1/10^{-9}$)

Mutazioni spontanee

Se tutte le mutazioni che avvengono per errori della DNA polimerasi o per la tautomeria delle basi restassero all'interno di un genoma, si osserverebbe un tasso di mutazione molto più elevato rispetto a quello che realmente si osserva. Esistono quindi dei meccanismi cellulari che riconoscono gli errori e qualora possono li

- Cambiamento o perdita di basi
- Errori di replicazione

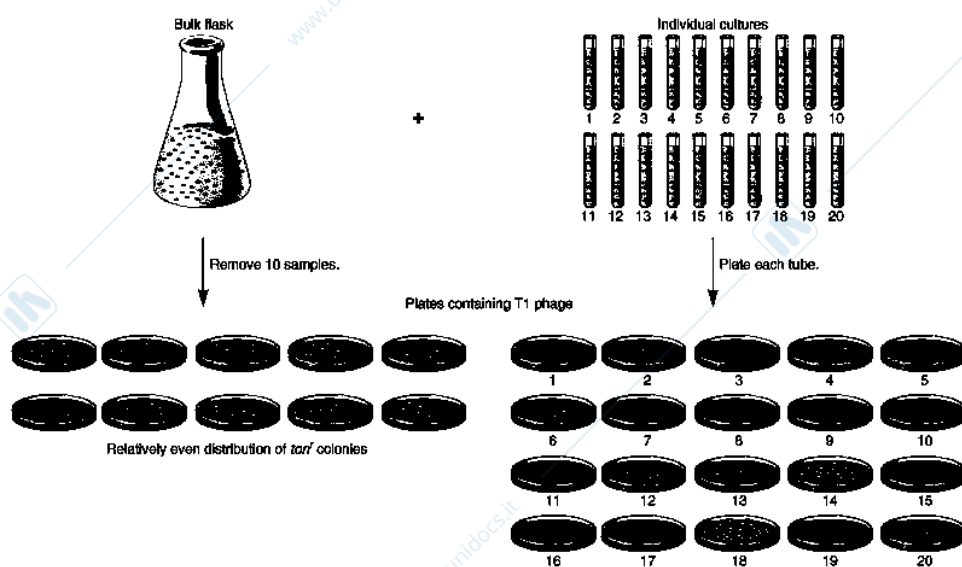
Probabilmente superano 50.000/cellula/giorno



correggono. Generalmente a seconda del tipo di correzione, riportano la situazione a quella originaria (alcuni tipi di meccanismi di riparazione). Altri tipi di meccanismi di riparazione, qualora individuano un appaiamento illegittimo lo eliminano e inseriscono una coppia di nucleotidi qualsiasi correttamente appaiata, lo scopo è di eliminare le distorsioni della doppia elica e riparare in qualche modo l'appaiamento illegittimo non curandosi del fatto di ripristinare o meno la sequenza originaria. Se come nell'immagine abbiamo una base che per un qualsiasi motivo (errore della DNA polimerasi o tautomeria) genera un appaiamento illegittimo, nel momento in cui viene corretto si ripristina la sequenza originaria del DNA, se invece non viene corretto, nel momento in cui avviene la replicazione si originerà una doppia elica mutata a partire dal filamento stampo con l'errore (nell'immagine il filamento contenente la C al posto della T) e una doppia elica selvatica a partire dal filamento stampo corretto. Quando si iniziarono a studiare le mutazioni c'erano due correnti di pensiero; una delle due riteneva che a seconda dell'ambiente in cui si trova un organismo possono insorgere determinate mutazioni piuttosto che altre. Questo tipo di visione viene definito **adattativo**, cioè, in presenza di antibiotico ampicillina ad esempio, un batterio muta e diventa resistente all'antibiotico: in realtà non è così, perché le mutazioni non sono adattative ma avvengono indipendentemente dall'agente selettivo che ci consente di visualizzarle. È stata dimostrata l'insorgenza di mutazioni di tipo **preadattativo** attraverso due test. Uno di questi è il test di fluttuazione e l'altro è il test di piastramento in replica.

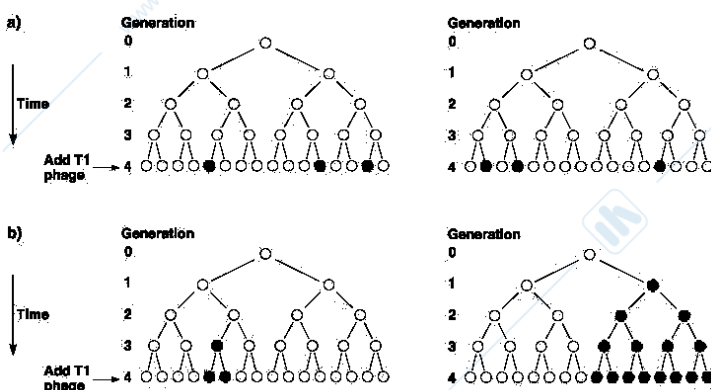
Il test di fluttuazione e la natura pre-adattativa delle mutazioni

Luria e Delbrück utilizzarono come sistema un ceppo di **Escherichia Coli** sensibile all'infezione del **fago T1**, suddivisero la coltura, una parte di essa la lasciarono in una beuta (**coltura massiva**) e l'altra parte la suddivisero in venti piccole colture da due mL ciascuna (**colture in provette singole**). L'obiettivo era quello di



mettere sia la coltura massiva, sia le venti colture in provetta a crescere in un opportuno terreno liquido per lo stesso numero di generazioni. Successivamente gli scienziati utilizzarono delle capsule Petri contenenti terreno di coltura solido (agar aggiunto al terreno di coltura) per piastrare un'uguale quantità di batteri prelevati dalla coltura massiva (dalla beuta), circa dieci piastre; poi piastrarono successivamente un'uguale quantità di batteri da ciascuna singola provetta su una corrispondente capsula Petri (dalla provetta 1 prelevarono un'aliquota e la piastrarono sulla capsula 1 e così via per le altre 19) per un totale di 20 capsule. Dopo la piastratura aggiunsero a tutte le capsule (sia le 10 derivanti dalla soluzione in beuta, sia le altre 20 derivanti dalle provette) uno stesso titolo (stessa quantità) di fago T1; incubarono il tutto a 37°C per una notte. Il giorno seguente osservarono che sia nelle capsule contenenti le aliquote della coltura massiva, sia in quelle contenenti la coltura in provetta singola erano presenti colonie batteriche, cioè gruppi di batteri che erano **resistenti** al fago T1, ovvero erano dei mutanti rispetto al ceppo originario che era sensibile all'infezione del fago. Osservarono colonie sia nelle capsule provenienti dalla coltura massiva sia in quelle provenienti dalla coltura in provetta singola. Quando andarono a **contare il numero di colonie resistenti** e fecero la media ottennero lo stesso valore medio, cioè il numero medio di colonie resistenti al fago T1 che venivano fuori dalla coltura massiva e il numero medio di colonie resistenti che veniva fuori dalla coltura in provetta singola era all'incirca identico; cioè che variava tra i due gruppi di esperimenti era la **deviazione standard**, cioè lo sco-

stamento rispetto alla media del numero di colonie osservate. Nelle colonie ottenute dalla **coltura massiva** si osservava uno scostamento dalla media molto basso perché su ogni piastra era presente lo stesso numero di colonie; nelle colonie ottenute dalla **coltura in provette singole** la **fluttuazione** era molto alta, pur avendo lo stesso numero medio c'era una grossa variabilità tra le 20 piastre analizzate: su alcune non c'erano colonie batteriche (nessun mutante resistente al fago T1), su alcune c'erano tantissime colonie batteriche (tanti mutanti resistenti al fago T1), su altre c'erano un numero variabile di colonie batteriche. Questo risultato dimostra la natura pre-adattativa delle mutazioni perché se fosse stata la presenza del fago T1 a determinare l'insorgenza della mutazione "resistenza al fago T1" gli scienziati avrebbero dovuto osservare la stessa distribuzione sia nelle piastre provenienti dalla coltura massiva sia in quelle provenienti dalle 20 colture singole in provetta perché il fago è stato aggiunto nello stesso momento in tutte le capsule; di conseguenza non è il fago T1 a determinare la resistenza nelle cellule batteriche nei suoi confronti, ma la mutazione deve essere insorta precedentemente dal contatto e indipendentemente nella colonia massiva e nelle singole colture; il fago T1 è solo il mezzo che ha consentito di evidenziare la resistenza ovvero l'agente selettivo. Questa visione ci spiega il motivo per il quale nelle piastre provenienti dalla coltura massiva si evidenzia una fluttuazione molto bassa e nelle piastre provenienti dalle singole colture si osserva una fluttuazione molto alta. Nelle piastre provenienti dalla coltura massiva si osservava una bassa fluttuazione perché le cellule batteriche sono state tenute tutte insieme nella beuta per cui a generazioni variabili sono insorte mutazioni all'interno dei batteri: se infatti insorge una mutazione in un batterio allora tutta la sua progenie sarà mutante e se non insorge tutta la progenie resta selvatica. Nelle piastre provenienti dalle singole colture la fluttuazione era maggiore perché avendo fatto una separazione a monte, ogni singola provetta è diventata una coltura indipendente dalle altre, di conseguenza in una singola coltura potrebbe non essere avvenuta alcuna mutazione e piastando non si è osservata alcuna colonia ed in un'altra coltura si sono osservate poche cellule resistenti al fago, indice che in una generazione di crescita della coltura è insorta la mutazione "resistenza al fago T1". Nel momento in cui si osservavano poche colonie batteriche resistenti si è dedotto che la mutazione fosse avvenuta nelle ultime generazioni di crescita. Nelle piastre in cui si osservavano tante colonie batteriche resistenti al fago T1 è stato dedotto che la mutazione fosse insorta molto precocemente in una delle generazioni iniziali e si sia propagata a quasi tutta la progenie. Questo test dimostra che non è l'antibiotico che determina la mutazione responsabile della resistenza all'antibiotico, ma la mutazione insorge nei ceppi batterici indipendentemente dal fatto che sia presente o meno l'antibiotico; ma se noi prendiamo tanti antibiotici selezioneremo nel nostro organismo i ceppi resistenti a quell'antibiotico e prenderanno il sopravvento diffondendosi nella popolazione generando il problema della resistenza agli antibiotici, che oggi è diffuso a causa dell'abuso del mezzo selettivo.

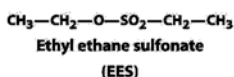
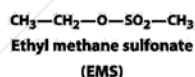
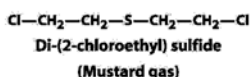
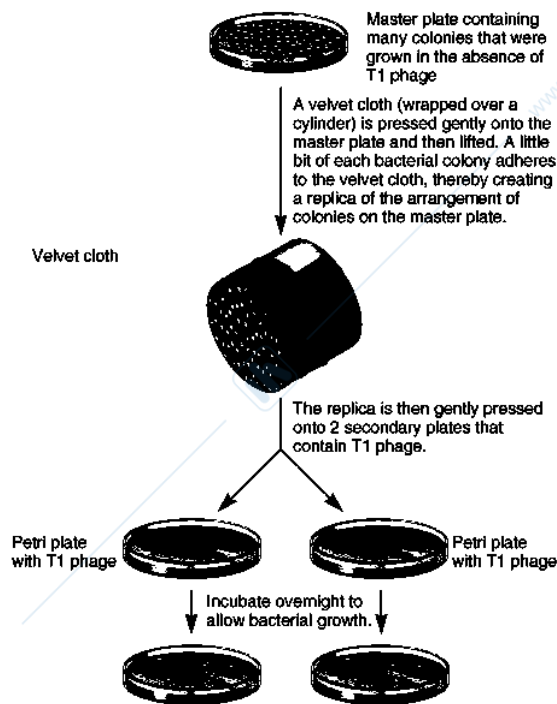


Nella parte superiore dell'immagine è schematizzato ciò che dovrebbe accadere se fosse il fago T1 a determinare la mutazione: se aggiungiamo il fago alla quarta generazione, sia nella coltura massiva che in ciascuna delle singole colture dovrebbe insorgere lo stesso numero di mutanti, perché aggiungiamo lo stesso titolo di fago e dovremmo osservare la stessa distribuzione di fagi T1 sulle differenti piastre. Nella parte inferiore dell'immagine è schematizzato ciò

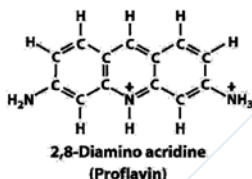
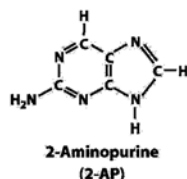
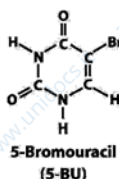
che realmente accade: nonostante si aggiunga il fago T1 alla quarta generazione la mutazione è insorta molto prima del contatto tra fago e coltura, indipendentemente; i batteri non sanno che ad una certa generazione gli viene somministrato il fago!

Il test di piastramento in replica (Lederberg)

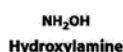
Questo test dimostra la stessa teoria del test di fluttuazione. Partendo da una coltura di cellule di Escherichia Coli sensibili all'infezione del fago T1 e facendole crescere su una piastra su un terreno solido, utilizziamo un disco ricoperto da un tampone di velluto sterile e lo poggiamo sulla piastra dopo averla orientata (con dei segni asimmetrici per riconoscere esattamente la posizione del tampone rispetto alla piastra). Prendiamo altre quattro piastre prive di batteri, le orientiamo e poggiamo su ognuna di esse il tampone di velluto (che prima è stato posto sulla piastra con coltura batterica) nella stessa posizione in cui era stato posto sulla coltura di partenza: facciamo questa operazione perché poggiando il tampone di velluto sulla piastra madre alcune cellule restano attaccate al tampone e poggiandolo poi su una piastra vuota queste cellule si attaccheranno al terreno solido esattamente nella posizione corrispondente a quella della colonia sulla piastra iniziale. Sulle quattro piastre, oltre al terreno di coltura abbiamo aggiunto anche il fago T1; effettuiamo il piastramento e mettiamo a crescere. Dopo la crescita su tutte le piastre è presente un uguale numero di colonie nella stessa posizione che corrisponde a quella di una colonia della piastra iniziale: i batteri resistenti erano già presenti nella coltura iniziale e noi li abbiamo solo trasferiti in replica sulle quattro piastre contenenti l'agente selettivo. Se fosse stato l'agente selettivo a indurre la mutazione allora avremmo osservato una posizione variabile delle colonie perché in un caso l'avrebbe indotta in una colonia, in un altro caso in un'altra colonia e così via; invece nelle quattro repliche (quattro piastre) osserviamo sempre la stessa posizione delle colonie mutanti. Anche questo approccio dimostra la natura **pre-adattativa** delle mutazioni: non è l'agente selettivo a determinare la mutazione, esso serve solo ad evidenziarla.



(a) Alkylating agents



(b) Base analogs



(c) Acridines

(d) Deaminating agent

(e) Hydroxylating agent

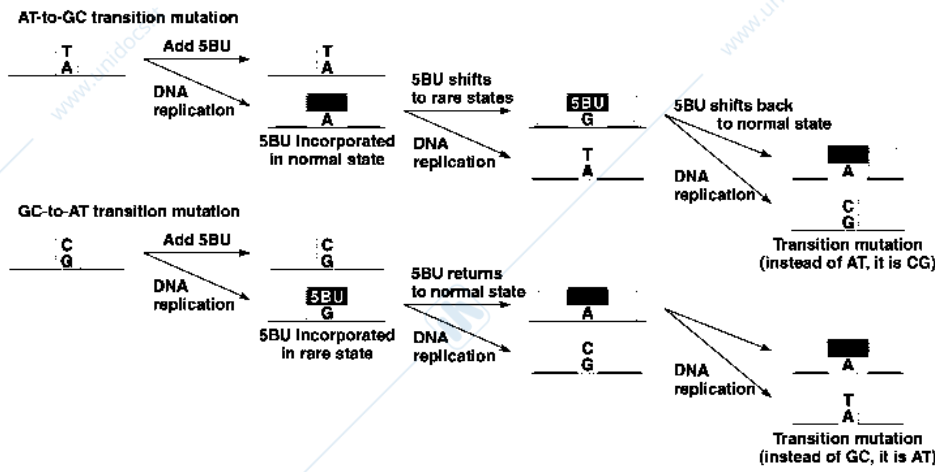
Figure 13-16 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

Principali mutageni chimici

Esistono una serie di sostanze chimiche e di agenti fisici che per le loro caratteristiche sono in grado di aumentare il valore del tasso rispetto al tasso di mutazione spontanea; ma non aumentano mai un particolare tipo di mutazioni perché si riferiscono sempre al tasso mutazionale generale del genoma, tutto il DNA aumenta il suo tasso di mutazione: non aumenta il tasso di mutazione di uno specifico gene ma quello di tutto il genoma. Nella tabella sono elencati i principali tipi di mutageni

chimici, in alto notiamo gli **agenti alchilanti** tra cui il gas mostarda, l'etil metan sulfonato, l'etil etan sulfonato; un'altra classe di mutageni chimici è costituita dagli **analoghi di base** tra cui il 5-bromo-uracile e 2-amminopurina; poi ci sono le **acridine** tra cui la proflavina; gli **agenti deaminanti** tra cui l'acido nitroso; gli **agenti idrossilanti** tra cui l'idrossilammina. Ciascuna classe di mutageni chimici è in grado di aumentare il tasso di mutazione spontaneo agendo in maniera specifica.

c) Mutagenic action of 5BU



Il 5-bromo-uracile

Il 5-bromo-uracile è il più famoso mutageno chimico che viene utilizzato per dimostrare l'insorgenza delle mutazioni. In genere c'è sempre una relazione dose-effetto tra i mutageni e l'effetto mutageno che hanno: maggiore è la quantità di mutageno somministrata e maggiore sarà l'incremento del tasso mutazionale fino a rag-

giungere un valore soglia oltre il quale si osserverebbe uno squilibrio talmente grande nella costituzione di un genoma che non avrebbe più senso. Il 5-bromo-uracile riesce a far finta di essere una base azotata, cioè riesce ad ingannare la DNA polimerasi che la scambia per una base azotata e la incorpora nella sequenza del filamento neosintetizzato se è presente nell'ambiente in cui la DNA polimerasi sta catalizzando. Anche il 5-bromo-uracile esiste in due forme tautomeriche, una chetonica più stabile e una enolica meno stabile e rara. Nella sua forma chetonica si appaia con l'adenina mentre nella sua forma enolica si appaia con la guanina. Nella parte superiore dell'immagine osserviamo una posizione TA che fa parte di una doppia elica di DNA che fa parte di una cellula a cui è stato somministrato il 5-bromo-uracile, il DNA si sta replicando quindi i due filamenti si separano; il filamento che contiene T riceverà una A sul filamento di neosintesi complementare e ricostituiranno il DNA selvatico; il filamento che contiene la A può ricevere il 5-bromo-uracile nella sua forma chetonica sul filamento di neosintesi complementare: nel momento in cui questa nuova doppia elica si replica il filamento stampo con la A genererà una molecola di DNA selvatica, invece il filamento contenente il 5-bromo-uracile genererà una molecola di DNA mutante qualora passasse dalla sua forma chetonica a quella enolica instabile rara perché diventerebbe complementare alla G e non più alla A. Nella parte inferiore dell'immagine possiamo osservare cosa accade quando viene incorporato il 5-bromo-uracile nella sua forma enolica instabile. Nella sua forma instabile il 5-bromo-uracile può essere messo solo di fronte alla G, quindi immaginando un appaiamento GC tra due filamenti che devono replicarsi verrà inserito il 5-bromo-uracile in forma enolica sul filamento di neosintesi complementare a quello parentale che contiene G generando una molecola di DNA contenente G-5BU; quando questa molecola si replicherà il filamento contenente G originerà una molecola di DNA selvatica mentre se sul filamento che contiene 5BU questo passa nella sua forma chetonica stabile questo filamento genererà una molecola di DNA mutata rispetto a quella selvatica. Abbiamo quindi osservato come un analogo di base può incrementare il tasso di mutazione spontanea.

Un agente deaminante: l'acido nitroso

L'acido nitroso trasforma l'adenina in ipoxantina, la quale si appaia con la citosina; quindi nella posizione in cui un'adenina viene deaminata dall'acido nitroso l'ipoxantina che si genera si appaierà con la citosina. La citosina ad opera dell'acido nitroso viene trasformata in uracile che è complementare all'adenina. La guanina deaminata diventa xantina che si appaia con la citosina per cui in questo caso non si genereranno mutazioni.

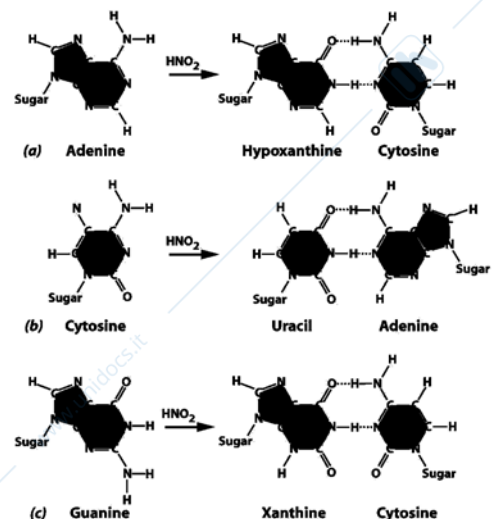
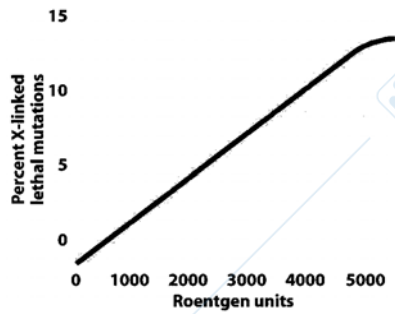
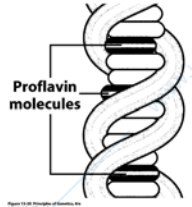


Figure 13-19 Principles of Genetics, 4/e © 2006 John Wiley & Sons

Un agente intercalante: la proflavina

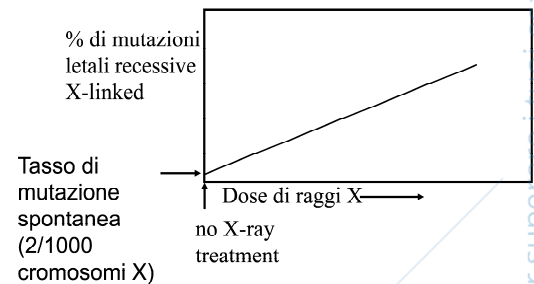
Tra le acridine troviamo la **proflavina**, un agente mutageno che si intercala tra due coppie di basi successive del DNA e a seconda della quantità somministrata avremo un effetto più o meno evidente. Nel momento in cui avviene la replicazione si genererà un tipo di mutazione che non è una sostituzione di coppie di basi, ma un'**inserzione** o una **delezione**.



Mutageni fisici: i raggi UV e i raggi X

Tra gli agenti mutageni fisici ricordiamo i **raggi X** e i **raggi UV**. Questi ultimi sono dei potenti mutageni che agiscono sul DNA. L'incremento del tasso di mutazione dovuto ai raggi X in *Drosophila* alla dose di 4000 **roentgen** è di circa 100 volte e più o meno si ha lo stesso tipo di incremento di tasso mutazionale anche nell'uomo:

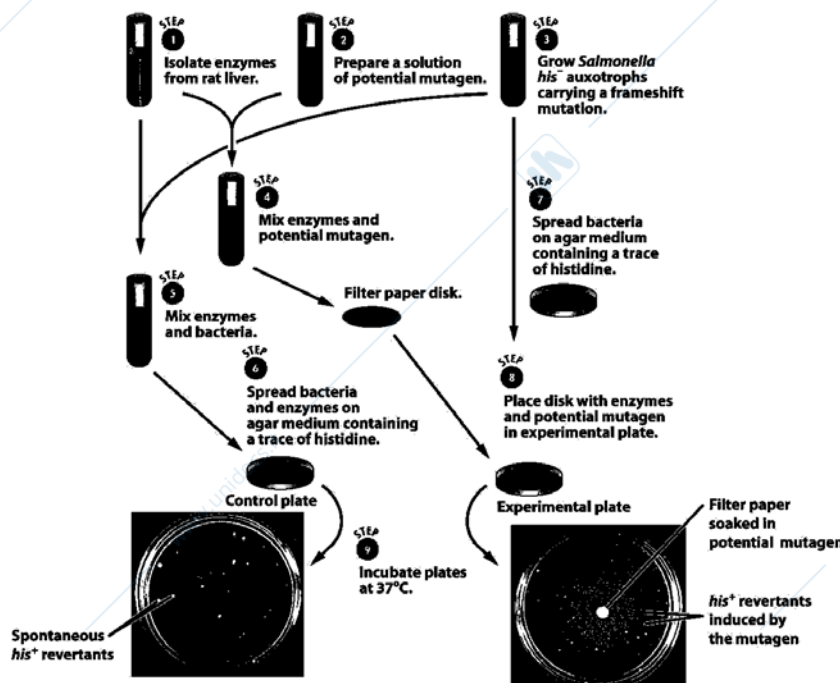
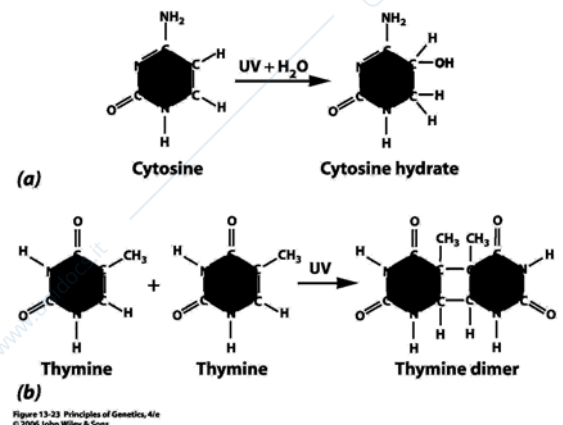
partendo dal fatto che il tasso mutazionale incrementato osservato da Muller era di circa 1-2 su 1000 cromosomi X (su 1000 incroci fatti) corrisponde ad un tasso di circa 2×10^{-6} geni per generazione; nel genoma umano sono presenti 25000 geni quindi un tasso mutazionale di 2×10^{-6} significa l'insorgenza di 0,05 mutazioni per ogni generazione.



I mutageni incrementano notevolmente il tasso di mutazione spontanea

Effetti mutageni dei raggi UV

I **raggi UV** sono degli agenti mutageni perché inducono la formazione dei dimeri di timina, cioè creano dei legami covalenti tra due timine e la presenza di questi **dimeri di timina** nella sequenza di DNA è un disturbo molto forte per la stabilità della doppia elica.



Test di mutagenesi: il test di Ames

Oltre al test proposto da Muller per un agente fisico esistono anche una serie di test per valutare se una certa sostanza (un agente chimico) sia un mutageno oppure no. Uno dei test più semplici e allo stesso tempo più famoso per valutare gli effetti mutageni di una sostanza è il **test di Ames** che viene condotto utilizzando un ceppo di *Salmonella*, un batterio auxotrofo per l'istidina (**his⁻**), cioè non cresce in un terreno privo di istidina; si uti-

lizza la sostanza di cui vogliamo testare il potere mutageno e infine un estratto di enzimi epatici di ratto. Si utilizza questo estratto di enzimi epatici perché hanno la funzione di detossificare, cioè trasformare le sostanze potenzialmente dannose in sostanze che non lo sono. Se vogliamo quindi capire se una certa sostanza chimica X possa avere un effetto mutageno o non mutageno su un sistema di mammiferi non possiamo utilizzare un sistema batterico; mettendo questo potenziale mutageno invece in presenza di enzimi estratti dal fegato di un mammifero riusciamo a creare una situazione simile a quella in cui si verificherebbe quando esso si verrebbe a trovare nei dotti epatici. Come per tutti gli esperimenti c'è bisogno di fare un controllo: in questo caso il controllo è costituito da un ceppo di **Salmonella His⁻** e gli enzimi di ratto piastrato su un terreno solido privo di istidina, quindi il ceppo non deve crescere: osserviamo un certo numero di cellule che crescono non elevato che corrisponde al **tasso di retromutazione**. In parallelo mescoliamo la sostanza di cui vogliamo testare il potere mutageno con l'estratto di enzimi epatici di ratto e immergiamo un disco di carta assorbente in questa miscela ottenuta. Contemporaneamente prepariamo un'altra piastra Petri con un terreno privo di istidina sulla quale piastriamo il ceppo di **Salmonella His⁻**, poggiamo il dischetto imbevuto di mutageno ed enzimi di ratto e mettiamo la coltura a crescere. Se il giorno seguente intorno al dischetto si sono formate tante colonie che non necessitano di istidina e che quindi sono mutate rispetto al ceppo iniziale, deduciamo che la sostanza che abbiamo testato è un mutageno.

IL TEST DI FLUTTUAZIONE (Dispensa Prof. Aceto)

Quando una popolazione di cellule del batterio *Escherichia coli* viene esposta all'infezione del fago T1, si evidenzia una piccola parte della popolazione resistente all'infezione fagica e questa caratteristica viene trasmessa alla progenie..

S. Luria e M. Delbrück si proposero di stabilire se tale resistenza, chiamata *Ton^R* (*T one Resistance*, resistenza al fago T1), fosse dovuta all'insorgenza di mutazioni spontanee o a un adattamento fisiologico che insorgeva a bassa frequenza nella popolazione batterica. In pratica, si proposero di stabilire se la resistenza al fago T1 fosse **adattativa** o **pre-adattativa**.

Partendo da un unico ceppo di *E. coli* sensibile a T1, Luria e Delbrück inocularono **20 provette** (ciascuna contenente 0,2 mL di terreno liquido) e **una grande beuta** (10 mL di terreno liquido) con cellule di *E. coli* e le lasciarono crescere in assenza del fago T1, nelle stesse condizioni e lo stesso numero di generazioni, fino a raggiungere la densità di 10^8 cellule/mL.

Il contenuto di ogni provetta (0,2 mL) venne piastrato su terreno solido e dalla coltura nella beuta vennero prelevati 10 campioni di 0,2 mL (contenenti un numero di cellule batteriche pari a quello delle provette) e piastrati separatamente su terreno solido. **A tutte le piastre venne aggiunto lo stesso titolo di fagi T1.**

I risultati dell'esperimento sono riportati nella seguente tabella

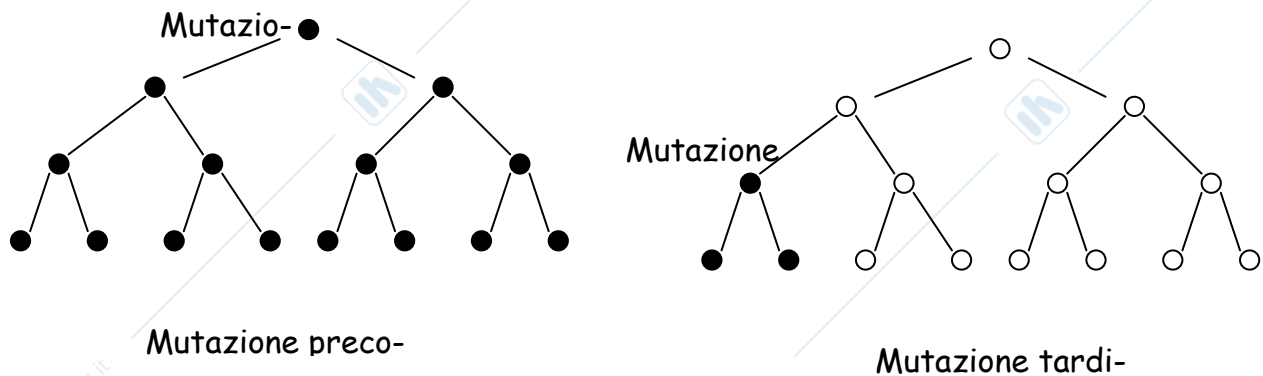
COLTURE SINGOLE		COLTURA MASSIVA	
NUMERO DELLE COLTURE	NUMERO DELLE COLONIE Ton^R	NUMERO DELLE COLTURE	NUMERO DELLE COLONIE Ton^R
1	1	1	14
2	0		
3	3	2	15
4	0		
5	0	3	13
6	5		
7	0	4	21
8	5		
9	0	5	15
10	6		
11	107	6	14
12	0		
13	0	7	26
14	0		
15	1	8	16
16	0		
17	0	9	20
18	64		
19	0	10	13
20	35		
	Media 11,3		Media 16,7
	Varianza 694		Varianza 15
	Varianza/Media 61		Varianza/Media 0,9

Sebbene i valori medi di colonie Ton^R siano simili, esiste un'importante differenza tra i due tipi di piastramento: la coltura massiva non mostra una grande variabilità nei singoli piastramenti (il rapporto tra varianza e media è circa 1), mentre le singole colture presentano **fluttuazioni** molto ampie intorno alla media dei valori individuali, cosicché il rapporto tra varianza e media è 61.

Se la resistenza al fago T1 fosse causata da un adattamento fisiologico, in entrambi i gruppi di piastre sarebbero attese fluttuazioni piccole e della stessa ampiezza.

LA SPIEGAZIONE PIU' PLAUSIBILE DI QUESTO RISULTATO ERA CHE NELLE COLTURE DA 0,2 mL SI FOSSERO VERIFICATE MUTAZIONI CASUALI IN MOMENTI DIVERSI.

Le mutazioni avvenute precocemente davano origine ad un numero maggiore di colonie resistenti, mentre quelle avvenute più tardivamente davano origine ad un numero minore di colonie resistenti. Se le mutazioni non erano avvenute affatto, nessuna colonia resistente cresceva sulle piastre.



Le piastre derivanti dalla coltura unica erano **OMOGENEE** rispetto al numero di colonie resistenti, perché la suddivisione in aliquote avveniva dopo la crescita (e quindi dopo l'insorgenza delle eventuali mutazioni). Le cellule mutanti erano uniformemente distribuite in tutte le aliquote di 0,2 mL.

Luria e Delbrück utilizzarono i dati derivanti dal test di fluttuazione per determinare la frequenza di mutazione spontanea (a) per cellula per generazione. Poiché per passare da un numero iniziale di batteri N_0 ad un numero finale N sono necessarie $N - N_0$ generazioni cellulari, si deduce che il numero medio di mutazioni avvenute in ogni singola coltura del test di fluttuazione, dove $N \gg N_0$, è pari ad aN . Dato che ci si aspetta che queste mutazioni si distribuiscano a caso nelle c colture, segue dalla legge di Poisson* che il numero di colture p_0 in cui non è avvenuta alcuna mutazione (cioè non è comparso sulla piastra nessun mutante Ton^R) è

$$p_0 = e^{-aN}$$

cioè

$$a = (-\ln p_0)/N$$

L'analisi dei dati delle singole colture rivela che in 11 delle 20 colture non si sono trovati batteri mutanti Ton^R , cioè in queste colture non è avvenuta nessuna mutazione $Ton^S \rightarrow Ton^R$. Quindi, $p_0 = 11/20 = 0,55$ e dato che $N = 0,2 \times 10^8$, segue che $a = (-\ln 0,55)/0,2 \times 10^8 = 3 \times 10^{-8}$ mutazioni per cellula per generazione.

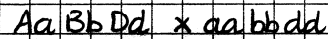
* La legge di Poisson è una distribuzione statistica secondo la quale $p_r = (x^r/r!)e^{-x}$

LEZIONE 15 (28/04/2015)

Esercitazione in aula (Prof. Gaudio)

ESERCIZIO 1

Reincrocio di un triibrido:



Classi fenotipiche ottenute nella progenie:

ABD	1000
abd	1000
ABd	100
abD	100
A b D	100
a B d	100
a B D	1000
A b d	1000

TOTALE 4400

Abbiamo 2 classi di frequenza (1000) e (100) quindi abbiamo capito che 2 geni sono associati e uno è indipendente. Consideriamo 2 geni per volta:

AB (1000 + 100)	} Stessa frequenza non sono associati.
ab (1000 + 100)	
Ab (100 + 1000)	
aB (1000 + 100)	

BD (1000 + 100)	} 2 Classi di frequenza sono associati
bd (1000 + 100)	
Bd (100 + 100)	
bD (100 + 100)	

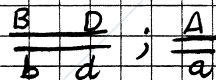
Guardando i parentali BD notiamo che la configurazione dei geni è in CIS.

Quindi calcoliamo la distanza di mappa.

Tra B e D:

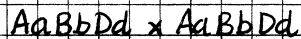
$$BD = \frac{\text{Ricombinanti}}{\text{Totale}} \times 100 = \frac{(400)}{4400} \times 100 = 9 \text{ cM}$$

Mappa:



ESERCIZIO 2

Incrocio di un triibrido:



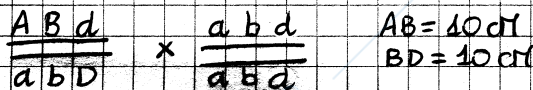
Classi fenotipiche ottenute nella Progenie:

ABD	27
ABd	9
AbD	9
Abd	3
aBD	9
aBd	3
abD	3
abd	1

TOTALE 64

I 3 geni segregano in maniera indipendente, in quanto le classi fenotipiche osservate rispettano il rapporto Mendeliano di un incrocio di un triibrido:

$$27:9:9:3:9:3:3:1 / 64$$

ESERCIZIO 3

Qual è la probabilità che venga prodotto un gamete ABD?

La variabilità gametica dipende solo dal Triibrido, quindi le classi saranno:

ABd] PARENTALI
abd	
AbD] RI
aBd	
ABD] RII
abd	
Abd] D.R.
aBD	

Conoscendo la configurazione del triibrido calcoliamo la frequenza dei doppi ricombinanti:

$$f.D.R. = (10\%) \cdot (10\%) = 1\%$$

Poiché il gamete ABD è singolo ricombinante in prima regione calcoliamo la sua frequenza:

$$f. RI = (10\%) - (1\%) = 9\%$$

Poiché RI sono 2 gameti diversi la frequenza di ABD è $= (9\%) / 2 = 4,5\%$

LEZIONE 16 (05/05/2015)**Meccanismi di riparazione del DNA**

Il DNA ha una sua capacità intrinseca di mutare ma la cellula possiede dei meccanismi che tendono a riparare quanto più possibile gli errori commessi durante la replicazione, altrimenti il tasso mutazionale spontaneo sarebbe molto più alto di quello che si osserva. I **meccanismi di riparazione** entrano in gioco quando sia nei procarioti che negli eucarioti avviene un errore, ovvero l'incorporazione all'interno del DNA di un nucleotide "sbagliato", cioè un nucleotide che non dovrebbe essere in quel posto; ad esempio un nucleotide appaiato male (un appaiamento illegittimo) oppure un'inserzione o una delezione; oppure quando nel DNA si creano delle strutture anomale dovute alla formazione di legami covalenti tra due pirimidine successive (dimeri di timine).

Tasso di mutazione osservato sperimentalmente in *E. coli*:

1 mutazione/10¹⁰ basi polimerizzate

Tasso atteso di errore delle DNA polimerasi di *E. coli* (sulla base delle proprietà fisico-chimiche delle basi):

1 mutazione/10⁵ basi polimerizzate

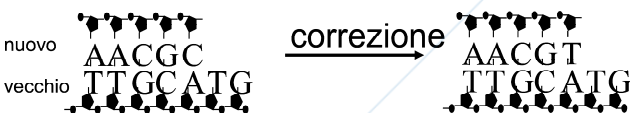
Tasso osservato di errore delle DNA polimerasi di *E. coli*:

1 mutazione/10⁷ basi polimerizzate

tanea delle basi azotate ci rendiamo conto che c'è una discrepanza, perché quest'ultimo è di circa 1 su 10⁵ basi polimerizzate, quindi molto più alto di quello osservato, così come se osserviamo in vitro il tasso di mutazione della DNA polimerasi di *Escherichia Coli* notiamo che ha un valore di 1 su 10⁷ basi polimerizzate.

Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare l'esistenza di meccanismi di riparazione di questi cambiamenti che avvengono spontaneamente. Ovviamente i sistemi di riparazione entrano in ballo quando insorgono mutazioni spontanee e anche quando insorgono mutazioni indotte, funzionano a fronte di ogni tipo di mutazione.

Attività di **correzione di bozze (proofreading)** della DNA polimerasi



La DNA polimerasi ha 3 attività:

- Può aggiungere una base all'estremità 3'-OH
 - complementare allo stampo
- Può rimuovere una base dall'estremità 3'-OH

Normalmente, il tasso di aggiunta >> tasso di rimozione

- Può rimuovere una base dall'estremità 5'

Meccanismi di riparazione del DNA

- 1. I procarioti e gli eucarioti posseggono sistemi enzimatici di riparazione del DNA.
- I sistemi di riparazione sono raggruppati sulla base del meccanismo utilizzato per la riparazione.
 - Alcuni correggono l'errore in modo diretto
 - Altri eliminano le basi errate e poi riparano il "buco"

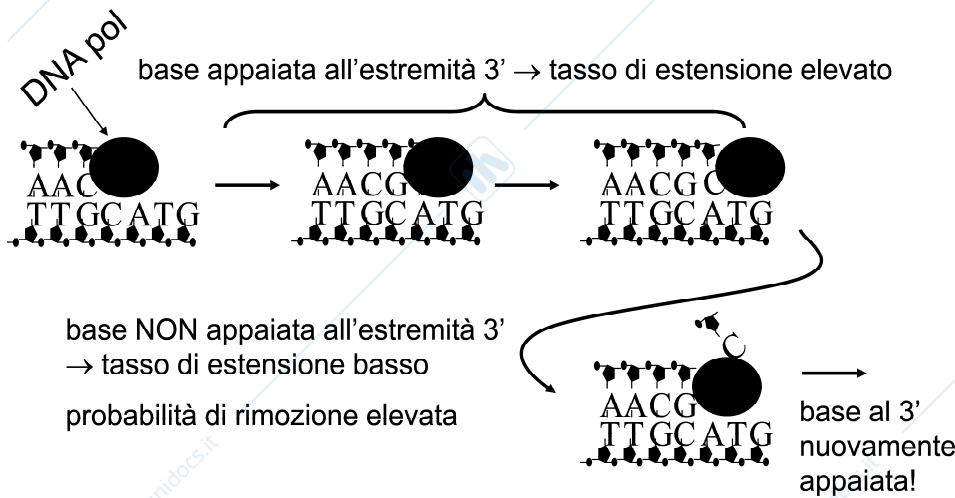
In *Escherichia Coli* il **tasso di mutazione** sperimentalmente osservato è di una mutazione ogni 10¹⁰ basi polimerizzate, quindi un tasso piuttosto basso; ma se confrontiamo questo tasso di mutazione con il **tasso di sostituzione spontanea**

Conclusioni:

- Le DNA polimerasi posseggono una attività di "**correzione di bozze**" (*proofreading*).
- Esistono anche altri sistemi di riparazione degli errori.

Un primo meccanismo di riparazione fondamentale perché corregge quasi tutti gli errori di polimerizzazione è il **meccanismo di correzione di bozze**, che è una proprietà anch'essa intrinseca della DNA polimerasi. La DNA polimerasi è capace quindi di essere fedele allo stampo che legge e qualora commettesse un errore (e ne commette) è in grado di percepire l'errore commesso e di correggerlo.

Oltre ad avere la capacità di allungamento del filamento a partire dal 3'OH aggiungendo nucleotidi, la DNA polimerasi ha attività di **rimozione** di basi azotate all'estremità 3'OH e anche all'estremità 5'; ovviamente l'attività predominante della polimerasi è quella di polimerizzazione, ovvero aggiungere nucleotidi.



Correzione di bozze

Se la base che viene introdotta sul neofilamento in crescita non è complementare allo stampo, quindi c'è un errore, diventa predominante l'attività di **rimozione** (da parte della DNA polimerasi) all'estremità 3' e quindi l'enzima rimuove il nucleotide errato che esso stesso ha aggiunto e a quel punto può aggiungere quello giusto. L'attività di **proofreading** o **correzione di bozze** riesce a correggere

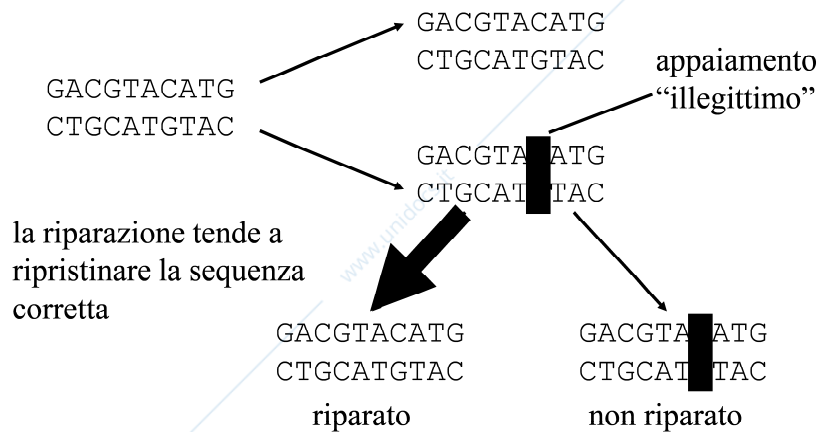
L'attività *proofreading* corregge circa il 99% degli errori di incorporazione!

all'incirca il 99% degli errori di incorporazione dei nucleotidi che avvengono durante la polimerizzazione.

Riparazione degli appaiamenti illegittimi

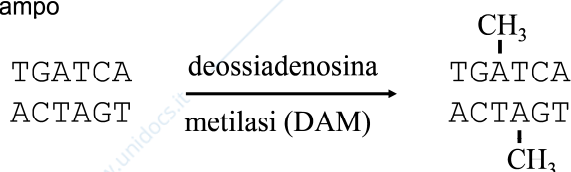
Molti degli errori vengono corretti però ci sono errori che sfuggono all'attività proofreading. Esistono ulteriori meccanismi di riparazione. Uno di questi è il **mismatch repair** (riparazione dell'appaiamento illegittimo), che interviene dopo la replicazione del DNA.

L'attività *proofreading* corregge molti errori, ma alcuni sfuggono; come vengono individuati e riparati?



Meglio compreso nei batteri

1. Identifica gli appaiamenti illegittimi nel DNA
proteina mutS di *E. coli*
2. Riconosce il filamento stampo
utilizza lo stato di metilazione del DNA per identificare il filamento stampo



3. Corregge l'altro filamento (NEOSINTETIZZATO)

Mismatch repair

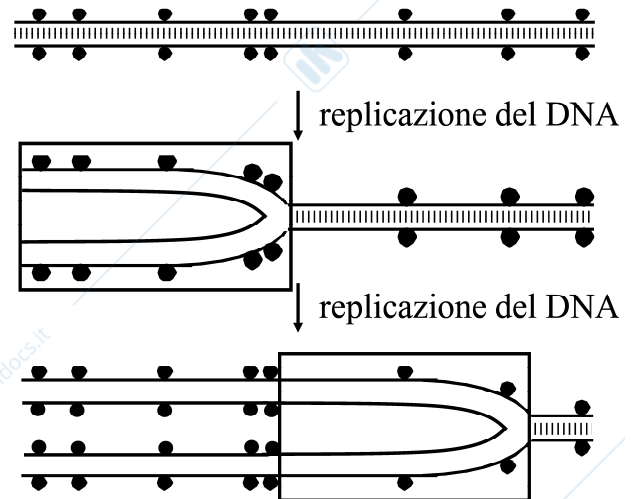
Il sistema batterico è semplice e complesso allo stesso tempo. Esiste una proteina chiamata **mutS** in *Escherichia coli* che riconosce gli appaiamenti illegittimi, ma per effettuare una reale correzione e tornare alla sequenza selvatica del DNA c'è bisogno nell'appaiamento illegittimo di capire qual è il nucleotide errato inserito perchè **mutS** riconosce l'appaiamento illegittimo ma non discrimina il filamento da

correggere, quindi è necessaria un'ulteriore proteina capace di riconoscere il filamento stampo (filamento originario) e distinguerlo dal filamento neosintetizzato sulla base dei livelli di **metilazione** differente tra i due filamenti. Il filamento parentale possiede alcune basi che sono metilate e che ancora non sono state metilate nel filamento neosintetizzato; quindi esiste una proteina capace sui livelli di metilazione di riconoscere quale dei due filamenti è quello vecchio e quale quello neosintetizzato trasferendo poi questa informazione ad un'altra proteina che correggerà il filamento neosintetizzato per ripristinare la sequenza originaria di DNA.

Nell'immagine vediamo una doppia elica di DNA prima della replicazione, i cerchi sui due filamenti rappresentano dei gruppi di metilazione di alcune basi; nel momento in cui la doppia elica si replica il filamento neosintetizzato inizialmente non è metilato, di conseguenza si riesce a distinguere tra i due filamenti qual è il vecchio e quale il nuovo sulla base dei livelli di metilazione e anche al procedere della metilazione del filamento di neosintesi ci saranno sempre delle regioni che non sono ancora metilate, c'è un momento breve in cui i due filamenti di DNA hanno livelli di metilazione differenti, cioè quello neosintetizzato non è ancora metilato.

il filamento stampo transientemente emimetilato può essere distinto da quello neosintetizzato

il filamento stampo transientemente emimetilato può essere distinto da quello neosintetizzato

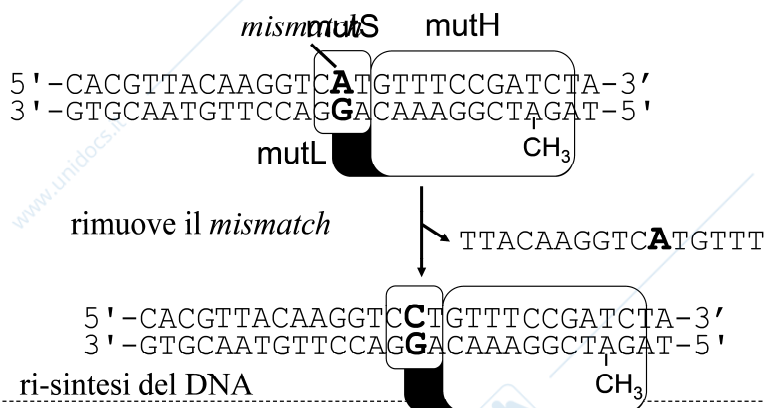


La proteina **mutS** riconosce l'appaiamento illegittimo

La proteina **mutH** riconosce il filamento parentale

La proteina **mutL** promuove l'attività di mutH (taglio nel filamento neosintetizzato)

La proteina **mutH** riconosce il filamento parentale sulla base dei livelli di metilazione, poi interviene la proteina **mutL** che aiuta **mutH** a correggere il filamento neosintetizzato. Nell'immagine notiamo un ipotetico appaiamento illegittimo che viene riconosciuto da **mutS**, poi **mutH** subentra e discrimina tra il filamento metilato e quello non metilato, comprende che la correzione deve avvenire su quello non metilato e quindi la **A** è il nucleotide sbagliato nell'appaiamento



AG; se non avessimo potuto fare alcuna distinzione tra i due filamenti il sistema non avrebbe mai capito cosa correggere in questo appaiamento illegittimo. A questo punto entra in gioco **mutL** che fa rimuovere un tratto di filamento neosintetizzato che contiene l'appaiamento illegittimo, così può avvenire una nuova sintesi di quel tratto in maniera corretta mettendo di fronte la **G** la **C**.

Riparazione dei danni indotti da UV

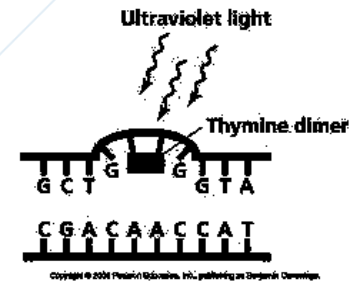
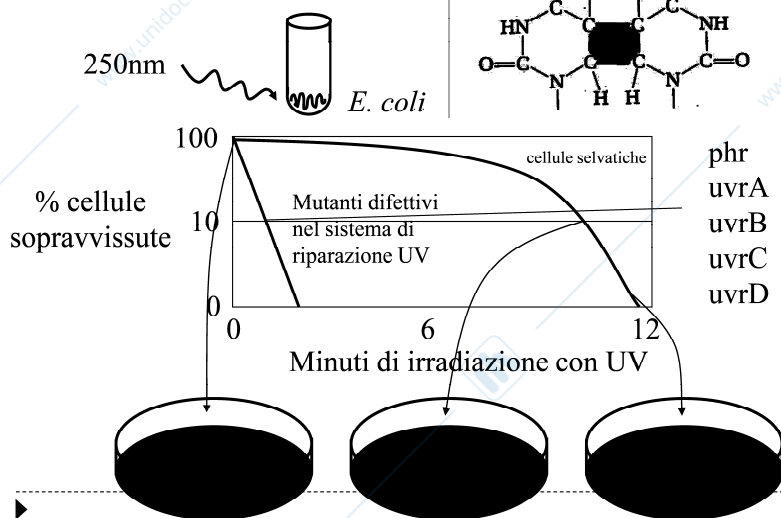
Luce-dipendenti e luce-indipendenti

mento che contiene il dimero di timina non riesce ad appaiarsi in maniera stabile con il filamento complementare, si viene a creare una distorsione in quel punto e la molecola di DNA è fortemente instabile.

Bisogna correggere quindi queste distorsioni generate dai dimeri di pirimidina a loro volta indotti dai raggi UV.

I raggi ultravioletti sono potenti mutageni in quanto inducono la formazione di **legami covalenti tra due pirimidine consecutive**, i più frequenti sono i dimeri di timina, che creano una distorsione della doppia elica: il fila-

Quali sono i geni coinvolti?



Riparazione del danno al DNA indotto da raggi UV

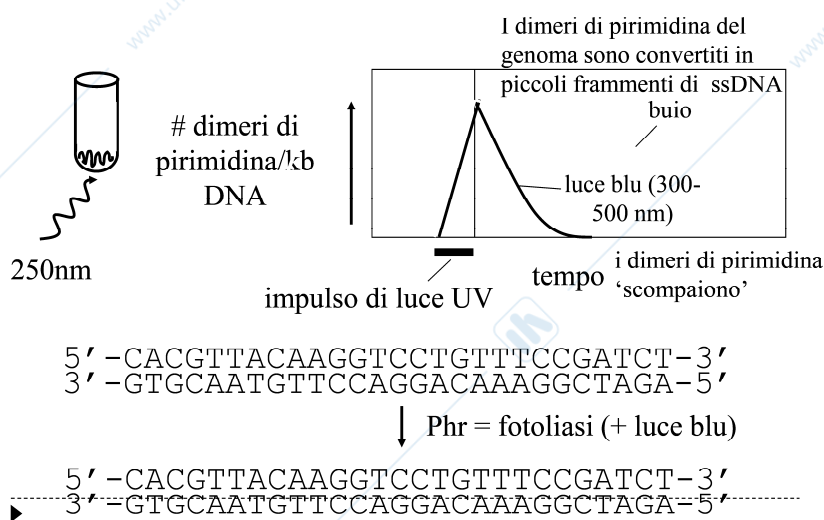
Facendo riferimento ad un sistema batterico, se somministriamo ad una coltura di Escherichia Coli una luce ultravioletta per un certo periodo di tempo e andiamo ad osservare il numero di cellule selvatiche di Escherichia Coli che sopravvivono ci rendiamo conto che con il procedere del tempo di esposizione ai raggi ul-

travioletti diminuisce il numero di cellule selvatiche vitali che recuperiamo dalla coltura. Esiste quindi una proporzionalità anche se non lineare tra i minuti di esposizione ai raggi UV e il numero di cellule selvatiche che sopravvivono in una data coltura; abbiamo un decremento di cellule selvatiche vive e troviamo anche un altro tipo di cellule che diminuirà molto più rapidamente la vitalità, cioè dopo poco tempo di irradiazione saranno tutte morte, non si recupera nessuna cellula vitale. Queste cellule che hanno un comportamento diverso da quelle selvatiche sono in realtà **cellule mutanti** per un sistema di riparazione che specificamente ripara i danni indotti dai raggi ultravioletti; le **cellule selvatiche** continuano a mantenere una certa vitalità anche dopo un periodo lungo di esposizione ai raggi UV perché nel loro genoma hanno geni funzionanti che codificano per prodotti che riescono a correggere gli errori che vengono indotti dalla somministrazione dei raggi UV; le cellule mutanti per questi livelli di riparazione avranno un decremento di vitalità molto più rapido (nel grafico si osserva un picco verso il basso in poco tempo). I **geni coinvolti** nella riparazione dei danni causati dalla luce ultravioletta sono numerosi e appartengono a due grossi gruppi: un gruppo di geni che effettua una riparazione in presenza di luce (riparazione **luce-dipendente**) e un gruppo di geni che invece funziona indipendentemente dalla presenza di un certo tipo di luce (riparazione **luce-indipendente**).

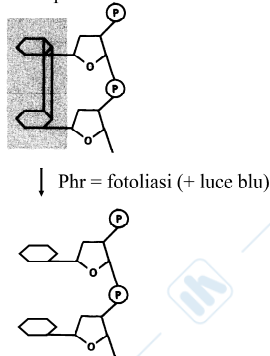
Ammettendo che l'**impulso di luce UV** ad una coltura di Escherichia Coli sia di 250nm, se andiamo a contare i dimeri di timina che si sono formati ogni 1000 basi notiamo un incremento notevole durante l'impulso; nel momento in cui si arresta l'impulso e andiamo nel tempo a seguire il numero di dimeri di timina, notiamo una diminuzione progressiva se conserviamo la

coltura al buio: al buio i dimeri di timina vengono scissi come dei singoli frammenti e vengono riparati. Se invece eseguiamo le stesse operazioni in presenza di **luce blu**, cioè luce con una lunghezza d'onda compresa tra i 300nm e i 500nm notiamo la formazione di dimeri di timina al momento dell'impulso, ma una volta sospeso l'impulso abbiamo un decremento molto più netto e totale del numero dei dimeri di timina, cioè scompaiono, vengono corretti completamente. La prima osservazione che possiamo fare è che esistono dei sistemi di riparazione ai danni indotti dai raggi UV, al buio questi meccanismi di riparazione hanno una certa efficienza, alla luce blu sono molto più efficaci.

2 meccanismi di riparazione del danno indotto da UV: dipendente dalla luce e non dipendente dalla luce



Meccanismo luce-dipendente di riparazione del danno da UV



Meccanismo luce-dipendente di riparazione del danno da UV

Il meccanismo di riparazione del danno da UV del tipo **luce-dipendente** prevede l'intervento di un enzima chiamato **fotoliasi** prodotto dal gene **phr**. Nell'immagine è rappresentato un dimerico di pirimidina: in presenza di luce blu i due legami covalenti vengono distrutti dalla fotoliasi e viene ripristinata la sequenza corretta; scompare il dimerico di timina senza bisogno di effettuare alcun taglio o escissione.

Meccanismo luce-indipendente di riparazione del danno da UV

Il meccanismo luce-indipendente è piuttosto complesso e prevede l'intervento di una serie di geni i cui prodotti fanno tutti parte della via che determina la correzione del dimerico di pirimidina. L'enzima **uvrA** riconosce la presenza del dimerico di pirimidina sul DNA e si lega in corrispondenza ma richiamando a sé anche **uvrC** e **uvrB**, costituendo un complesso. Avviene quindi un

Meccanismo luce-indipendente



Meccanismo luce-indipendente



Questo meccanismo di riparazione interviene anche per correggere le alchilazioni indotte da alcuni mutageni chimici (e.g. EMS, MMS, etc.)

taglio a livello di uno dei due filamenti per rimuovere il filamento sul quale c'è il dimerico di pirimidina.

A questo punto interviene **uvrD** che rimuove il pezzo tagliato e la DNA polimerasi comincia la sintesi della regione che prima era danneggiata. Il meccanismo è profondamente diverso da quello luce-dipendente: in quel caso osserviamo solo il taglio dei legami covalenti che si sono formati tra le due

pirimidine successive senza tagliare il DNA e risintetizzare il filamento; in questo caso abbiamo un meccanismo che ricorda molto il **mismatch repair**, cioè abbiamo il taglio non solo del dimero di pirimidina ma dell'intera regione che comprende il dimero di pirimidina (il taglio avviene a monte e a valle) e il buco che si viene a creare viene riempito dalla DNA polimerasi che ripristina la sequenza corretta. Questi geni **uvr** (A, B, C e D) sono i geni coinvolti nella riparazione di danni al DNA indotti da **agenti alchilanti**.

I geni *mut* si trovano anche nell'uomo.... mutazioni dei geni *mut* sono associate al cancro al colon.

Lo xeroderma pigmentoso è determinato dal cattivo funzionamento del sistema di riparazione dei danni indotti da UV... mutazioni di geni simili a *uvrA-D* (non è chiaro se nell'uomo ci sia il corrispettivo della fotoliasi).

C, e D) nell'uomo, quindi di riparazione ai danni indotti dalla luce UV luce-indipendenti; non è chiaro se esista nell'uomo anche una **fotoliasi**; e i geni *uvr* nell'uomo se sono mutati si hanno delle patologie come lo **xeroderma pigmentoso**, patologia ereditaria che rende impossibile l'esposizione alla luce perché si ha un incremento elevatissimo dell'insorgenza di cancro alla pelle.

I meccanismi di riparazione del DNA sono conservati

I geni che sono coinvolti nel **mismatch repair** (i geni *mut*) sono presenti nell'uomo e mutazioni dei geni *mut* sono correlate all'insorgenza del cancro al colon; esiste un sistema omologo anche dei geni **uvr** (A, B,

La ricombinazione del DNA

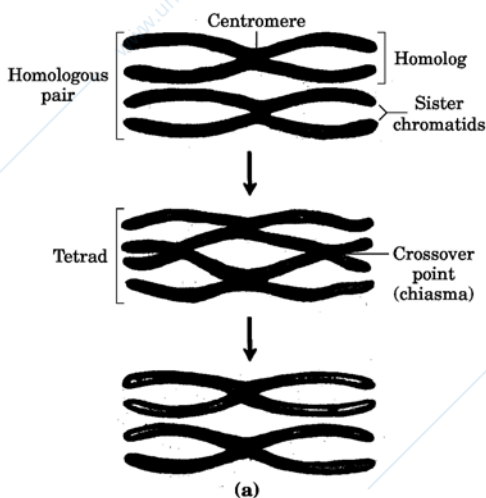
I meccanismi molecolari

Nell'immagine osserviamo ciò che avviene durante la ricombinazione: ammettendo che siano due cromosomi costituiti da alleli tutti dominanti su uno e tutti recessivi sull'altro, in seguito a ricombinazione si crea un riarrangiamento e quindi una parte di alleli saranno dominanti su un cromosoma e recessivi sull'altro e viceversa.

ABCDEFGHIJKLMNOpqrstuvwxyz
 abcdefghijklmnopqrstuvwxyz



ABCDEFghijklmnoPQRSTUVWXYZ
 abcdefgHIJKLMNopqrstuvwxyz



Possiamo osservare nella foto lo scambio fisico di pezzi di DNA tra cromatidi non fratelli di cromosomi omologhi. Abbiamo quindi catalogato tutti i fenomeni che generano **variabilità**: primo tra tutti è l'assortimento indipendente dei geni; il crossing-over come ulteriore variabilità; la mutazione. Questi tre eventi sono fondamentali per l'evoluzione perché creano combinazioni differenti di alleli che determineranno differenti manifestazioni fenotipiche, sempre interagendo con un certo ambiente.

Ricombinazione meiotica e mitotica

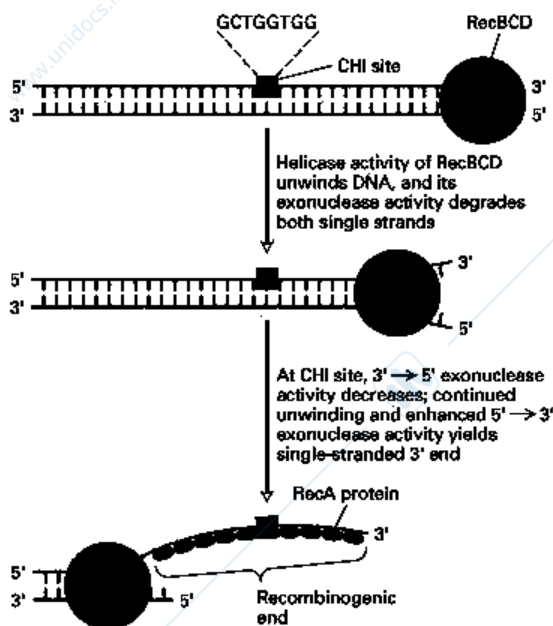
Il crossing-over non è un evento esclusivamente meiotico ma esiste anche un crossing-over mitotico di cui abbiamo già detto che è un evento estremamente raro. Sia negli eucarioti che nei procarioti la ricombinazione avviene grazie alla rottura e

- La ricombinazione può avvenire sia durante la meiosi sia durante la mitosi (rara)
- Solo la ricombinazione meiotica è importante per il riassortimento dei geni
- La ricombinazione mitotica può essere importante per la riparazione di mutazioni in uno dei cromatidi fratelli di una coppia

riunione dei filamenti di DNA e lo abbiamo dimostrato con gli esperimenti di McClintock e Stern; avviene con gli stessi meccanismi. In particolare la **ricombinazione** avviene attraverso la formazione di strutture che prendono il nome di **strutture di Holliday**.

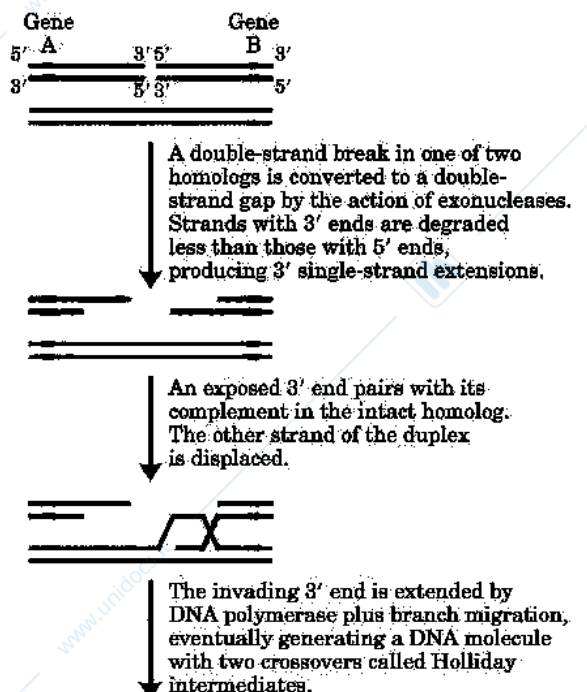
Il modello di Holliday

Questo modello prevede l'iniziale rottura a doppio filamento in una delle due molecole di DNA che sono coinvolte nello scambio, l'invasione da parte del filamento tagliato verso l'altra molecola di DNA, lo spiazzamento di uno dei due filamenti che vengono invasi e la formazione di una struttura a croce che poi a seconda di come viene risolta (tagliata) darà la formazione di ricombinanti o meno.



Modello di rottura a doppio filamento

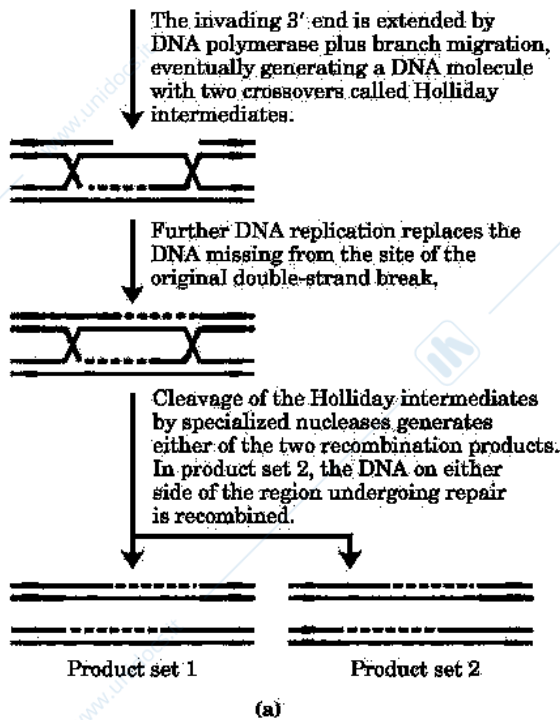
Nell'immagine abbiamo due filamenti di una doppia elica (i due in alto) e due filamenti di una doppia elica (i due sottostanti): queste due doppie eliche rappresentano i cromatidi non fratelli dei cromosomi omologhi. In uno dei due cromatidi avviene il taglio a doppio filamento (molecola in alto), a questo punto delle **esonucleasi** (enzimi che degradano i nucleotidi) agiscono su entrambi i filamenti che sono stati tagliati (nella molecola in alto) e si formano dei filamenti che protrudono rispetto al filamento complementare. Uno dei due filamenti che protrude invade la doppia elica complementare (immagine in basso) spiazzando il filamento che normalmente è appaiato, e questo filamento spiazzato se ne va nella parte mancante della molecola su cui è avvenuto il taglio.



- I due cromosomi omologhi duplicati si allineano
- Uno scambio di filamenti determina la formazione di un intermedio con filamenti incrociati
- Questa struttura incrociata può muoversi lungo il cromosoma
- La struttura incrociata viene risolta attraverso una rottura e riunione

Inizio della ricombinazione ad opera dell'enzima RecBCD

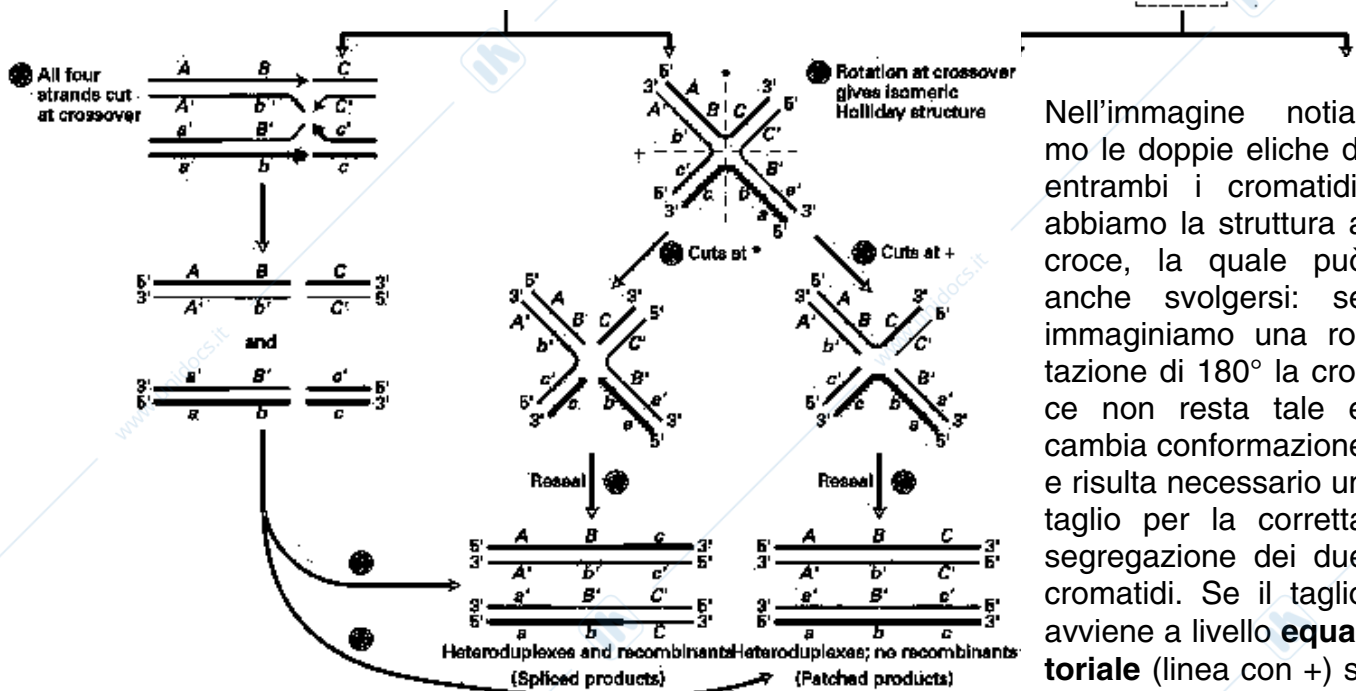
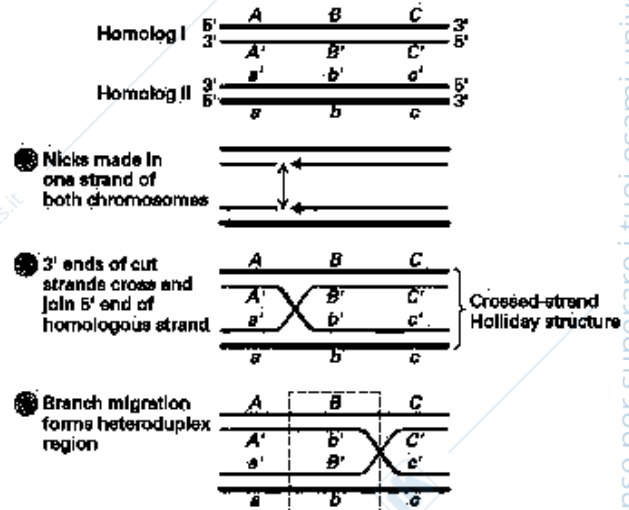
Sia nei procaroti che negli eucarioti si parte da un taglio al doppio filamento del DNA, a livello di questo taglio il complesso delle **proteine RecBCD** si lega e comincia a muoversi lungo la molecola di DNA fino ad individuare un punto che si chiama **punto Chi** dove avviene un altro taglio ed entra in ballo un'altra proteina Rec (la proteina **RecA**) che si lega al singolo filamento, nel frattempo le altre proteine Rec si disassemblano allontanandosi. Il filamento di DNA legato alla proteina RecA invade la doppia elica omologa e si forma una struttura detta **D-loop**, un'ansa che porterà alla formazione dell'intermedio di **Holliday**.



Abbiamo ora delle molecole di DNA con delle buche e molecole di DNA con dei filamenti spiazzati: entrano in ballo delle DNA polimerasi che utilizzando come stampo i filamenti non tagliati sintetizzeranno il filamento complementare da una parte e dall'altra fino a formare la struttura di **Holliday** a croce. Questa struttura di Holliday consiste in due molecole di DNA (due doppie eliche di DNA) che però hanno uno dei due filamenti ciascuno incrociati l'uno rispetto all'altro, sono aggrovigliati tra loro.

Per arrivare alla struttura di **Holliday** si parte quindi da un taglio di una doppia elica, inva-

sione dell'altra doppia elica, spiazzamento di uno dei due filamenti della doppia elica invasa, sintesi ad opera della DNA polimerasi utilizzando come stampo il filamento spiazzato e quello non spiazzato.



Nell'immagine notiamo le doppie eliche di entrambi i cromatidi, abbiamo la struttura a croce, la quale può anche svolgersi: se immaginiamo una rotazione di 180° la croce non resta tale e cambia conformazione e risulta necessario un taglio per la corretta segregazione dei due cromatidi. Se il taglio avviene a livello **equatoriale** (linea con +) si osserveranno dei

cromatidi che avranno un riarrangiamento (A B c su una doppia elica ed a b C su una doppia elica) rispetto alla configurazione iniziale (A B C su una doppia elica ed a b c su una doppia elica), saranno quindi ricombinanti. Se il taglio avviene a livello **verticale** (linea con *) si formerà un assetto non ricombinante, (quindi avremo A B C su un cromatidio e a b c sull'altro cromatidio) fermo restando che abbiamo appaiamenti illegittimi che devono essere corretti.

ESERCIZIO (Dispensa Prof. Aceto)

Stiamo analizzando le modalità di segregazione di tre geni in *Drosophila*, *A B* e *D*. Incrociamo una femmina e un maschio, entrambi con fenotipo dominante per i tre geni, e otteniamo la seguente progenie:

Femmine	<i>A B D</i>	750
	<i>A B d</i>	250
Maschi	<i>A B D</i>	37
	<i>a b d</i>	12
	<i>A B d</i>	13
	<i>a b D</i>	38
	<i>A b d</i>	112
	<i>a B D</i>	337
	<i>A b D</i>	338
	<i>a B d</i>	113

Cosa possiamo dedurre sulle modalità di segregazione di questi geni? Sono geni autosomici o X-linked? Quali sono i genotipi dei parentali? Se i geni sono associati, quali sono le distanze di mappa?

SOLUZIONE

La prima cosa che deve essere notata è la differenza della distribuzione fenotipica nella progenie maschile e femminile. Le femmine sono tutte fenotipicamente *A B* e, rispetto al gene *D*, 3/4 hanno fenotipo dominante e 1/4 recessivo. I maschi sono suddivisi in otto classi fenotipiche differenti. E' evidente che i geni *A* e *B* sono X-linked e la progenie femminile è fenotipicamente dominante perché ha ereditato il cromosoma X dal padre (X^{AB}). Il gene *D*, invece, presenta un tipico rapporto di segregazione mendeliana 3 : 1 (750 : 250). Possiamo quindi affermare che tale gene è autosomico e che entrambi i parentali sono eterozigoti per il locus *D*.

Analizziamo ora la progenie maschile. Poiché il gene *D* è autosomico e i parentali sono entrambi eterozigoti, anche la progenie maschile deve presentare la tipica segregazione mendeliana in un rapporto fenotipico 3 : 1. Verifichiamolo:

Fenotipo	<i>D</i>	37 + 38 + 337 + 338	= 750
Fenotipo	<i>d</i>	12 + 13 + 112 + 113	= 250

Effettivamente, il rapporto riscontrato anche nella progenie maschile rispetto al gene *D* è 3 : 1. Siamo in perfetto accordo con l'ipotesi fatta di localizzazione di questo gene su un autosoma.

Rispetto ai geni A e B, nella progenie maschile osserviamo quattro fenotipi:

A B (37 + 13)	=	50
a b (12 + 38)	=	50
A b (112 + 338)	=	450
a B (113 + 337)	=	450

I due geni sono associati perché due classi sono più numerose (parentali) e due meno numerose (ricombinanti). Del resto, dire che sono due geni X-linked equivale a dire che sono associati. Le due classi parentali sono A b e a B, mentre le classi A B e a b si sono originate da un crossing over tra A e B. La femmina parentale, quindi è eterozigote in *trans* per i due geni.

In pratica, il genotipo dei parentali è:

femmina $X^{Ab}X^{aB}; Dd$ x $X^{AB}Y; Dd$ maschio

Quanto distano i geni A e B?

La distanza di mappa tra due geni si calcola sommando il numero di ricombinanti, dividendolo per il totale e moltiplicando per 100.

$$AB = (50 + 50)/1000 = 0,1 \times 100 = 10 \text{ cM (centiMorgan)}$$

ESERCIZIO

Un maschio di *Drosophila* con occhi rossi e ali vestigiali è stato incrociato con una femmina con occhi bianchi e ali lunghe. Nella F1, tutta con ali lunghe, le femmine presentavano occhi rossi e i maschi occhi bianchi. Incrociando i maschi e le femmine della F1 si ottenne la seguente F2:

femmine:	370	occhi rossi-ali lunghe
		occhi bianchi-ali lunghe
		occhi rossi-ali vestigiali
		occhi bianchi-ali vestigiali
maschi:	374	occhi rossi-ali lunghe
	369	occhi bianchi-ali lunghe
	128	occhi rossi-ali vestigiali
		occhi bianchi-ali vestigiali

- a) Quali sono le modalità di ereditarietà dei caratteri colore dell'occhio e tipo di ali? (cioè sono caratteri autosomici o legati ai cromosomi sessuali? Qual è il fenotipo dominante e quale quello recessivo?)

b) Quali sono i genotipi dei moscerini parentali, della F1 e della F2?

RISPOSTA

Il fenotipo della F1 lascia ipotizzare la risposta al quesito a). Infatti, poiché tutta la F1 presenta ali lunghe, si può ipotizzare che questo carattere sia dominante rispetto al fenotipo ali vestigiali. Inoltre, poiché non appare una segregazione del carattere in base al sesso della progenie, si può ipotizzare che la sua trasmissione avvenga attraverso autosomi. Analizziamo ora il comportamento del colore dell'occhio. La F1 presenta una netta distinzione tra il fenotipo delle femmine (tutte con occhi rossi, fenotipo paterno) e quello dei maschi (tutti con occhi bianchi, fenotipo materno). Si può ipotizzare una trasmissione del carattere colore dell'occhio attraverso il cromosoma X e che il colore rosso sia dominante sul colore bianco, in quanto le femmine della F1, che presentano sia l'allele che determina l'occhio rosso (ereditato dal padre), sia quello che determina l'occhio bianco (ereditato dalla madre) hanno gli occhi rossi.

Schematizziamo la nostra ipotesi, utilizzando una corretta simbologia genetica:

Allele dominante vg^+ (autosomico) = ali lunghe
stigiali

allele recessivo vg = ali ve-

Allele dominante w^+ (X-linked, X^{w^+}) = occhi rossi
chi bianchi

allele recessivo w (X^w) = oc-

P
 $X^{w^+}X^w; vg^+vg^+$

maschio occhi rossi-ali vestigiali $X^{w^+}Y; vg\ vg$

x

femmina occhi bianchi-ali lunghe

Gameti $X^{w^+} vg$ (50%) e $Y vg$ (50%)

solo $X^w vg^+$

F1
femmine occhi rossi-ali lunghe

maschi occhi bianchi-ali lunghe

$X^{w^+}X^w; vg^+vg$

$X^wY; vg^+vg$

Gameti

$X^{w^+} vg^+$	(25%)
$X^{w^+} vg$	(25%)
$X^w vg^+$	(25%)
$X^w vg$	(25%)

$X^w vg^+$	(25%)
$X^w vg$	(25%)
$Y vg^+$	(25%)
$Y vg$	(25%)

Sulla base di questa ipotesi, i genotipi e i fenotipi della F2 dovrebbero essere facilmente ricavabili. Ad ogni modo, se si incontrasse qualche difficoltà, si può sempre ricorrere alla costruzione di un quadrato di Punnett!

	$X^w vg^+ (1/4)$	$X^w vg (1/4)$	$Y vg^+ (1/4)$	$Y vg (1/4)$
$X^{w+} vg^+ (1/4)$	$X^{w+} X^w vg^+ vg^+$ (1/16) femmine occhi rossi-ali lunghe	$X^{w+} X^w vg^+ vg$ (1/16) femmine occhi rossi-ali lunghe	$X^{w+} Y vg^+ vg^+$ (1/16) maschi occhi ros- si-ali lunghe	$X^{w+} Y vg^+ vg$ (1/16) maschi occhi ros- si-ali lunghe
$X^{w+} vg (1/4)$	$X^{w+} X^w vg^+ vg$ (1/16) femmine occhi rossi-ali lunghe	$X^{w+} X^w vg vg$ (1/16) femmine occhi rossi-ali vestigiali	$X^{w+} Y vg^+ vg$ (1/16) maschi occhi ros- si-ali lunghe	$X^{w+} Y vg vg$ (1/16) maschi occhi ros- si-ali vestigiali
$X^w vg^+ (1/4)$	$X^w X^w vg^+ vg^+$ (1/16) femmine occhi bianchi-ali lunghe	$X^w X^w vg^+ vg$ (1/16) femmine occhi bianchi-ali lunghe	$X^w Y vg^+ vg^+$ (1/16) maschi occhi bianchi-ali lunghe	$X^w Y vg^+ vg$ (1/16) maschi occhi bianchi-ali lunghe
$X^w vg (1/4)$	$X^w X^w vg^+ vg$ (1/16) femmine occhi bianchi-ali lunghe	$X^w X^w vg vg$ (1/16) femmine occhi bianchi-ali vesti- giali	$X^w Y vg^+ vg$ (1/16) maschi occhi bianchi-ali lunghe	$X^w Y vg vg$ (1/16) maschi occhi bianchi-ali vesti- giali

e, raggruppando i fenotipi, è attesa una F2 così costituita:

femmine: occhi rossi-ali lunghe $1/16 + 1/16 + 1/16 = 3/16$ della progenie totale, $3/8$ delle femmine
 occhi bianchi-ali lunghe $1/16 + 1/16 + 1/16 = 3/16$ della progenie totale, $3/8$ delle femmine
 occhi rossi-ali vestigiali $1/16$ della progenie totale, $1/8$ delle femmine
 occhi bianchi-ali vestigiali $1/16$ della progenie totale, $1/8$ delle femmine

maschi: occhi rossi-ali lunghe $1/16 + 1/16 + 1/16 = 3/16$ della progenie totale, $3/8$ dei maschi
 occhi bianchi-ali lunghe $1/16 + 1/16 + 1/16 = 3/16$ della progenie totale, $3/8$ dei maschi
 occhi rossi-ali vestigiali $1/16$ della progenie totale, $1/8$ dei maschi
 occhi bianchi-ali vestigiali $1/16$ della progenie totale, $1/8$ dei maschi

Cioè

$1/2$ delle femmine con occhi rossi; $1/2$ con occhi bianchi
 $1/2$ dei maschi con occhi rossi; $1/2$ con occhi bianchi

$3/4$ ($6/8$) delle femmine con ali lunghe; $1/4$ ($2/8$) con ali vestigiali
 $3/4$ ($6/8$) delle maschi con ali lunghe; $1/4$ ($2/8$) con ali vestigiali

Cioè il carattere colore degli occhi dovrebbe presentare una tipica segregazione da locus X-linked, mentre il carattere tipo di ali dovrebbe presentare una tipica segregazione mendeliana autosomica.

I DATI OTTENUTI NELLA F2 SONO IN ACCORDO CON QUESTA IPOTESI?

Calcoliamo i valori attesi per ciascuna classe fenotipica della F2 sulla base dell'ipotesi fatta. Il numero di femmine della F2 è 1009, quello di maschi è 998; i valori attesi sono quindi

femmine: occhi rossi-ali lunghe $3/8 \times 1009 = 378,375$
 occhi bianchi-ali lunghe $3/8 \times 1009 = 378,375$
 occhi rossi-ali vestigiali $1/8 \times 1009 = 126,125$
 occhi bianchi-ali vestigiali $1/8 \times 1009 = 126,125$

maschi: occhi rossi-ali lunghe $3/8 \times 998 = 374,250$
 occhi bianchi-ali lunghe $3/8 \times 998 = 374,250$
 occhi rossi-ali vestigiali $1/8 \times 998 = 124,750$
 occhi bianchi-ali vestigiali $1/8 \times 998 = 124,750$

Per verificare la validità statistica dell'ipotesi fatta è necessario calcolare con quale probabilità gli scostamenti tra i valori osservati e quelli attesi sono dovuti al caso. E' necessario applicare il Test del "chi quadro".

$$\chi^2 = \sum (O - A)^2 / A$$

in cui O si riferisce ai valori osservati, A a quelli attesi.

	Osservati	Fenotipo	Attesi
femmine:	370	occhi rossi-ali lunghe	378,375
	383	occhi bianchi-ali lunghe	378,375
	124	occhi rossi-ali vestigiali	126,125
	132	occhi bianchi-ali vestigiali	126,125
maschi:	374	occhi rossi-ali lunghe	374,250
	369	occhi bianchi-ali lunghe	374,250
	128	occhi rossi-ali vestigiali	124,750
	127	occhi bianchi-ali vestigiali	124,750

Quindi, per le femmine:

$$\chi^2 = (370 - 378,375)^2 / 378,375 + (383 - 378,375)^2 / 378,375 + (124 - 126,125)^2 / 126,125 + (132 - 126,125)^2 / 126,125 = 0,552$$

per i maschi:

$$\chi^2 = (374 - 374,250)^2 / 374,250 + (369 - 374,250)^2 / 374,250 + (128 - 124,750)^2 / 124,750 + (127 - 124,750)^2 / 124,750 = 0,217$$

In entrambi i casi i gradi di libertà sono 3 e, in entrambi i casi, la probabilità che gli scostamenti osservati siano dovuti al caso è maggiore di 0,1 (10%). Ciò significa che gli scostamenti osservati rispetto ai valori attesi sono dovuti al caso.

LEZIONE 17 (08/05/2015)

La ricombinazione nei batteri

La ricombinazione nei batteri

Le cellule batteriche presentano come materiale ereditario un unico cromosoma circolare che non è avvolto in una membrana nucleare ma è libero nel citoplasma. Possiamo trovare all'interno dei batteri anche degli elementi di DNA circolare extracromosomici, ovvero delle strutture aggiuntive che contengono informazione genetica e che sono dotate di una loro indipendenza dal punto di vista della replicazione e sono sempre circolari, che fanno parte della grande famiglia dei **plasmidi**. Questi plasmidi non sono essenziali per la sopravvivenza del batterio nonostante contengano una serie di geni molto importanti, ad esempio i fattori di fertilità che conferiscono spesso resistenza agli antibiotici. Esistono plasmidi a basso numero di copie e plasmidi ad alto numero di copie.

► TABELLA 8.1

Distinzione tra i tre processi parasessuali nei batteri

Processo di ricombinazione	Criteri	
	Contatto cellulare richiesto?	Sensibile alla DNasi?
Trasformazione	no	sì
Coniugazione	sì	no
Trasduzione	no	no

Trasferimento di materiale genetico tra batteri

Una grossa differenza tra procarioti ed eucarioti riguarda la modalità di riproduzione. Gli eucarioti si riproducono sostanzialmente per riproduzione sessuale, seppur con cicli vita-

li molto differenti tra loro; i procarioti non si riproducono per via sessuale ma utilizzano altri meccanismi. Alla base della riproduzione c'è sempre la replicazione del DNA, evento semiconservativo anche nei procarioti, ed essendo il cromosoma circolare questo evento parte in uno specifico punto (**origine di replicazione**), prosegue in maniera bidirezionale a differenza di quanto accade sui cromosomi lineari delle cellule eucariotiche; progressivamente la replicazione che avviene in entrambe le direzioni giunge poi ad un sito di terminazione della replicazione con la produzione da una molecola di DNA circolare di partenza di due molecole di DNA circolari frutto della replicazione del DNA, e che tra loro dovrebbero essere identiche. Le cellule che vengono prodotte dalla riproduzione di un batterio sono **cloni**, cioè identiche alla cellula di partenza; ovviamente possono intervenire delle mutazioni anche nei procarioti per generare variabilità all'interno della sequenza genotipica. Il fatto che le cellule procariotiche siano **aploidi** perché contengono un solo cromosoma significa che non possono esistere normalmente in uno stato di **eterozigosi**, quindi se interviene una mutazione che determina la perdita di funzionalità di un gene, cioè un gene non è più in grado di produrre un prodotto funzionale, non vi è alcun allele che può mascherare l'eventuale effetto di questa mutazione, quindi all'insorgere di una mutazione **perdita di funzione** il batterio perde quella funzione senza la possibilità di avere una controparte dominante che mascheri la presenza di una mutazione recessiva. Inoltre è impossibile studiare la genetica dei batteri utilizzando lo stesso approccio scelto per gli eucarioti, perché i batteri non fanno riproduzione sessuale quindi è impossibile schematizzare degli incroci come si è soliti effettuare per gli eucarioti; ma si possono effettuare altri tipi di esperimenti che sfruttano delle caratteristiche dello scambio di materiale genetico dei batteri. I meccanismi di riproduzione dei batteri sono di tipo **parasessuale** e sono la **trasformazione**, la **coniugazione** e la **trasduzione**; ciascuno di questi meccanismi ha come effetto finale la capacità di trasferimento di informazione genetica da un **batterio donatore** ad un **batterio ricevente**, quindi il trasferi-

mento è **unidirezionale** perché non c'è mai uno scambio reciproco tra due batteri, ma lo scambio avviene solo in una direzione. Questi tre meccanismi sono profondamente diversi.

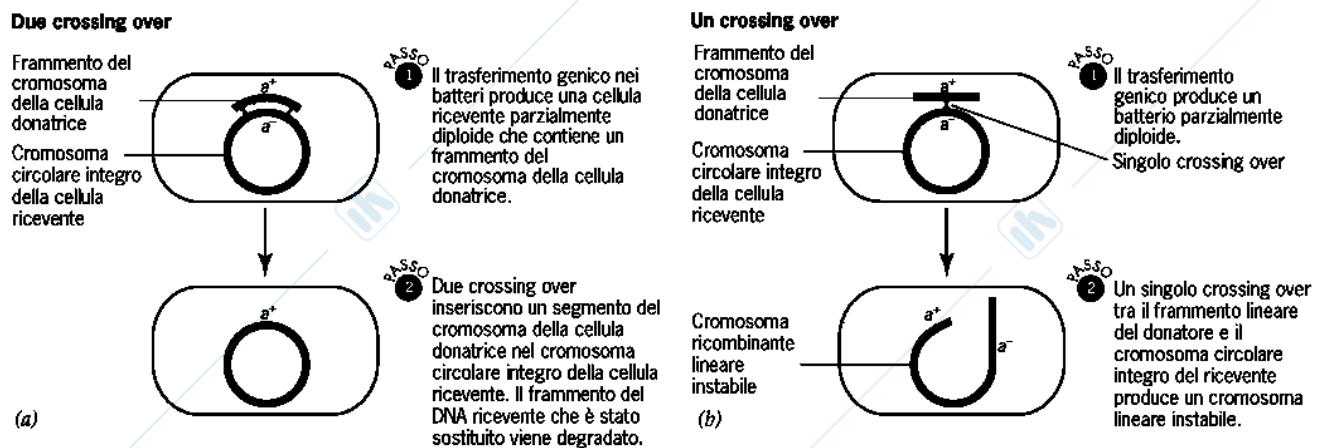


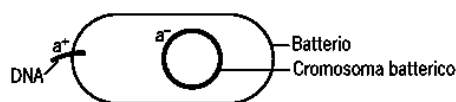
Figura 8.15 ► Ricombinazione nei batteri. I processi parasessuali che si verificano nei batteri producono diploidi parziali contenenti frammenti lineari del cromosoma della cellula donatrice e cromosomi circolari integri della cellula ricevente. (a) Per mantenere l'integrità dei cromosomi circolari, si devono verificare crossing over in coppie, che determinano l'inserzione di segmenti dei cromosomi dei donatori nei cromosomi delle cellule riceventi. (b) Il verificarsi di un singolo crossing over tra un frammento del cromosoma donatore e il cromosoma circolare ricevente determina la distruzione della struttura circolare, producendo una molecola lineare di DNA incapace di replicarsi, che viene successivamente degradata.

Una volta trasferito il materiale genetico unidirezionalmente, i meccanismi molecolari attraverso cui il DNA ricombina col genoma del batterio ricevente sono gli stessi che si osservano negli eucarioti ed avvengono ugualmente in tutti e tre i meccanismi parasessuali. Poiché il cromosoma batterico è **circolare**, quando parliamo di eventi di ricombinazione nei batteri dobbiamo riferirci ad eventi di **scambio pari**. Nell'immagine osserviamo un DNA circolare che corrisponde al cromosoma del batterio ricevente ed un frammento lineare di DNA che contiene un gene omologo ad uno che si trova sul cromosoma principale del batterio, immaginiamo che questo frammento di DNA sia entrato nella cellula batterica per uno qualsiasi dei meccanismi parasessuali e che deve quindi ricombinare col cromosoma batterico: se avvenisse un solo scambio (un solo crossing-over o evento di ricombinazione) il cromosoma batterico si aprirebbe e resterebbe lineare; se invece avvengono due scambi (due crossing-over o eventi di ricombinazione) il cromosoma batterico si richiude e continua ad essere circolare. Quindi quando abbiamo a che fare con una molecola di DNA circolare e una molecola di DNA lineare che devono ricombinare, perché la ricombinazione abbia un destino fruttuoso e non porti alla linearizzazione del cromosoma batterico, gli eventi di ricombinazione devono essere sempre di ordine pari, quindi almeno 2. Quando parliamo di batteri implicitamente parliamo di due tipi di **terreni di coltura**: liquidi e solidi. Nei **terreni liquidi** le cellule crescono rendendo il mezzo torbido, mentre nei **terreni solidi** le cellule possono crescere a confluenza (strato fitto di cellule che forma una patina sulla piastra) o possono crescere in singole colonie (quando la coltura è ben diluita). Per quanto riguarda il **fenotipo batterico** facciamo una distinzione tra ceppi **prototrofi** che sono in grado di crescere su un **terreno minimo**, cioè un terreno che contiene solo fonti energetiche essenziali per la crescita di un batterio (carbonio, azoto, sali e glucosio) e ceppi **auxotrofi** che invece non sono in grado di crescere su terreno minimo, ma necessitano di specifiche aggiunte nutrizionali. In genere il **ceppo selvatico** si indica con (+) mentre il **ceppo mutante** con (-) ed entrambi questi simboli vanno posizionati accanto al nome abbreviato del gene in questione, e a differenza della terminologia usata fino ad ora, i geni batterici si indicano con tre lettere in corsivo; quando ci riferiamo ad un fenotipo fagico non si utilizza il corsivo e la prima delle tre lettere utilizzate per indicare il fenotipo è una lettera maiuscola: se diciamo che un ceppo batterico è *leu*⁺ intendiamo che questo ceppo è prototrofo, cioè riesce a crescere anche in un terreno al quale non è stata aggiunta la leucina; mentre un ceppo *leu*⁻ è auxotrofo, non riesce a crescere in un terreno minimo.

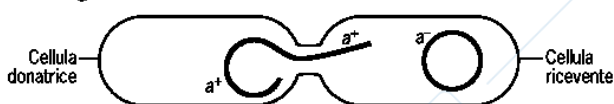
Trasferimento di geni tra batteri

Immaginiamo di avere due ceppi batterici differenti con due differenti richieste nutrizionali, ad esempio un ceppo 1 che per crescere necessita dell'aggiunta nel terreno minimo della biotina e della metionina, mentre non necessita dell'aggiunta di fenilalanina e di treonina; un ceppo 2 con fenotipo opposto, che non necessita dell'aggiunta al terreno minimo di biotina e metionina ma necessita invece di fenilalanina e di treonina; quindi il genotipo del **ceppo 1** sarà (*bio- met- phe+ thr+*), il genotipo del **ceppo 2** (*bio+ met+ phe- thr-*). Ciascuno dei due ceppi se viene piastrato su un terreno minimo non cresce perché entrambi hanno delle specifiche carenze nutrizionali. Mescolando però questi due ceppi batterici, tenendoli in un'unica coltura liquida per un certo periodo di tempo e piastrandoli poi in un terreno solido minimo (senza alcuna aggiunta nutrizionale) si osserva la crescita di colonie, quindi deve avvenire uno scambio tra i due ceppi che porti alla formazione di un **ceppo selvatico** per tutti e quattro i caratteri in esame (*bio+ met+ phe+ thr+*). Questo tipo di osservazione ha indiziato che effettivamente nei batteri esistono meccanismi di trasferimento di informazione genetica. Nei batteri si parla di **trasferimento orizzontale**, un trasferimento di informazione tra due batteri della stessa specie o tra batteri di specie differenti e si differenzia dal **trasferimento verticale**, che va da due genitori alla progenie.

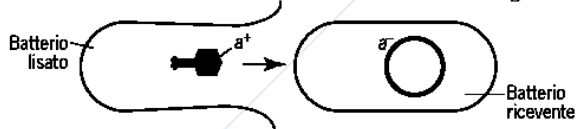
Trasformazione: assorbimento di DNA libero.



Coniugazione: trasferimento diretto di DNA da un batterio a un altro.



Trasduzione: trasferimento di DNA batterico attraverso un batteriofago.



mediati da particelle virali che entrano nella cellula ricevente e che provengono da una cellula donatrice che per qualche motivo si è lisata e ha frammentato il suo cromosoma.

Il tubo a U di Davis

In passato lo strumento che ha consentito di discriminare tra i tre fenomeni parasessuali quale fosse quello responsabile del trasferimento dell'informazione genetica tra un ceppo batterico donatore e uno ricevente è stato il **tubo a U di Davis**. È un tubo di vetro a forma di U da un lato tappato con batuffolo di cotone e dall'altro lato tappato con uno stantuffo che consente l'immissione di aria o la suzione di aria; tra i due bracci della U viene posto un filtro i cui pori hanno un diametro tale da non consentire il passaggio delle cellule batteriche ma solo delle molecole di DNA eventualmente presenti in uno dei due bracci del tubo e di particelle virali. Se da un lato del tubo a U mettiamo il **ceppo 1** (*bio- met- phe+ thr+*) e dall'altro lato del tubo mettiamo il **ceppo 2** (*bio+ met+ phe- thr-*) con filtro che separa i due baccini, se piastriamo su un terreno minimo senza

Meccanismi di trasferimento del DNA

La **coniugazione** è un meccanismo di trasferimento di materiale genetico parasessuale che avviene solo se tra la cellula donatrice e quella ricevente si instaura un **contatto fisico**, le cellule devono essere vicine tra loro, questa caratteristica è tipica della coniugazione. Nella **trasduzione** il trasferimento di materiale genetico da un ceppo donatore ad uno ricevente viene mediato da un **virus**, o meglio dalla classe di virus che attacca specificamente le cellule batteriche, cioè i **batteriofagi** o semplicemente **fagi**. Nella **trasformazione** invece il trasferimento dell'informazione genetica avviene attraverso il **DNA nudo**, cioè frammenti di DNA non avvolti a molecole proteiche, non

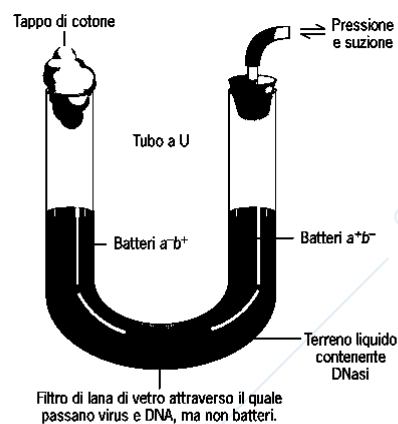


Figura 8.17 ► L'esperimento del tubo a U con i batteri. Questo tubo viene usato per determinare se sia richiesto o meno il contatto cellulare affinché si verifichi ricombinazione. Batteri di genotipo differente sono posti nei due bracci del tubo, separati da un filtro di lana di vetro per prevenire contatti tra loro. Se avviene ricombinazione, non può essere stata mediata da coniugazione.

alcuna aggiunta nutrizionale un'aliquota proveniente da un braccio o dall'altro del tubo a U di Davis e non osserviamo nessuna colonia crescere, sulla base del risultato ottenuto precedentemente mescolando i due ceppi possiamo dedurre che affinché avvenga questo trasferimento è necessario il contatto tra i due ceppi batterici, perché la differenza rispetto alla situazione precedente è che in questo secondo caso i due ceppi li abbiamo tenuti separati dal filtro mentre prima potevano essere a contatto tra di loro: il trasferimento era avvenuto nel primo caso per **coniugazione**.

La coniugazione

Non tutte le cellule batteriche sono in grado di promuovere la **coniugazione**, ma solo determinati tipi di cellule che costituiscono circa il 5%. Questi ceppi devono avere la capacità di creare un contatto tra le due cellule, il ceppo donatore deve essere in grado di promuovere la formazione del tubo di coniugazione, il **pilo sessuale** attraverso il quale può passare il DNA dal donatore al ricevente. La caratteristica della coniugazione è che alla fine del processo di coniugazione la cellula ricevente è diventata in grado di promuovere la coniugazione; quindi se indichiamo con (+) la caratteristica del donatore di promuovere la coniugazione e con (-) la caratteristica del ricevente, dopo la coniugazione la cellula ricevente è diventata (+) capace di promuovere il trasferimento di DNA. Cosa conferisce ad una cellula batterica donatrice la capacità di promuovere la coniugazione? La presenza di un **fattore di fertilità** all'interno della cellula donatrice, ovvero un plasmide extracromosomico circolare sul quale si trovano tutti i geni necessari a promuovere la coniugazione: le cellule donatrici nella coniugazione si chiamano **cellule F⁺** perché hanno un fattore F, mentre le cellule riceventi si chiamano **cellule F⁻** perché non possiedono il plasmide, ma dopo la coniugazione acquisiscono anch'esse il fattore F e diventano **cellule F⁺**, potenzialmente in grado di promuovere la coniugazione. I geni che rendono possibile la coniugazione che si trovano sul fattore F sono numerosi; il fattore F oltre ad avere i geni che codificano per la formazione del pilo sessuale possiede l'**origine del trasferimento** da non confondere con l'origine di replicazione: un fattore F, essendo un plasmide ha una sua origine di replicazione (è in grado di replicarsi) e possiede anche un'origine di trasferimento, cioè un punto ben preciso dal quale comincia il trasferimento del DNA nella cellula ricevente. Il primo passo affinché possa avvenire la coniugazione è la formazione del pilo sessuale, dopo il contatto tra le due cellule si osserva anche un accorciamento del pilo perché le due cellule si avvicinano tra di loro e solo allora comincia il trasferimento del DNA.

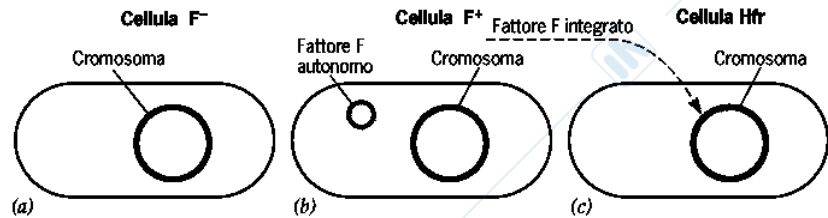


Figura 8.22 ► Il fattore F in *E. coli*: cellule F⁻, F⁺ e Hfr. (a) Una cellula F⁻ non ha il fattore F. (b) Una cellula F⁺ ha un fattore F che si replica in modo indipendente dal cromosoma. (c) Una cellula Hfr contiene un fattore F integrato – cioè inserito covalentemente – nel cromosoma.

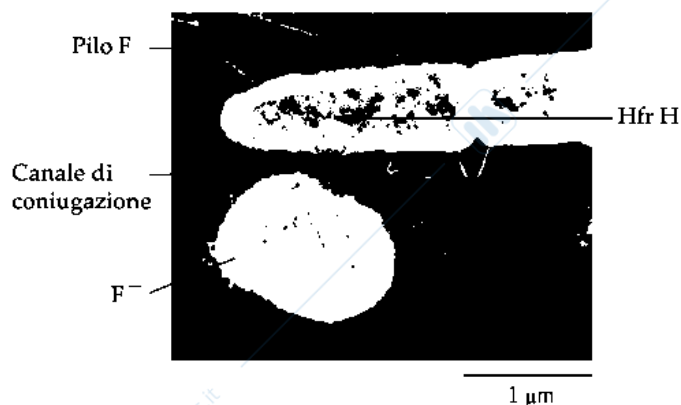


Figura 8.21 Coniugazione in *E. coli*. Una delle prime fotografie al microscopio elettronico di Thomas F. Anderson, che mostra la coniugazione tra una cellula Hfr H e una cellula F⁻. La cellula donatrice e quella ricevente sono in stretta giustapposizione durante la coniugazione. Si noti il canale, o ponte di coniugazione, che è stato stirato durante la preparazione per il microscopio.

La coniugazione F⁺ x F⁻

Nell'immagine è indicato il fattore F (plasmide) e il cromosoma del batterio: deve formarsi il tubo di coniugazione tra le due cellule attraverso cui può passare il DNA. A livello dell'**origine del trasferimento** del fattore F avviene un taglio a singolo filamento, cioè dei due filamenti di DNA che costituiscono il fattore F uno dei due a livello dell'origine di trasferimento subisce un taglio ed interviene un

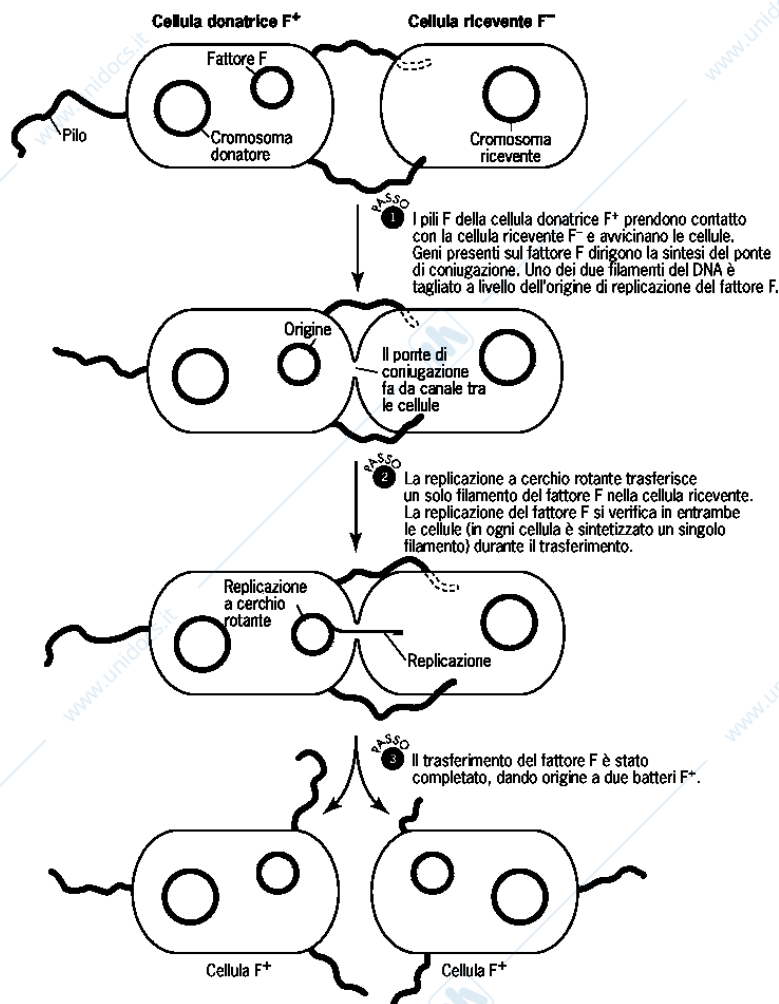


Figura 8.24 ► Coniugazione tra una cellula F⁺ e una F⁻. Il fattore F della cellula donatrice è replicato durante il trasferimento dalla cellula F⁺ a quella F⁻. Quando il processo è completo, ciascuna cellula ha una copia del fattore F.

geni del genoma batterico (DNA genomico e non plasmidico) dobbiamo immaginare qualcosa di più complesso.

Il **fattore F** più che essere un plasmide è in realtà un **episoma**, ovvero un plasmide che può trovarsi in forma circolare con la sua origine di replicazione oppure si può integrare all'interno del cromosoma principale del batterio: in questo secondo caso, il ceppo batterico che presenta un fattore F integrato nel cromosoma principale si chiama **ceppo Hfr**, cioè un ceppo ad alta frequenza di ricombinazione. questo è l'unico ceppo batterico che tramite coniugazione può trasferire informazioni del cromosoma batterico da un ceppo donatore ad un ceppo ricevente.

Ovviamente un ceppo Hfr si origina da un ceppo F⁺ all'interno del quale è avvenuta ricombinazione tra una particolare regione del fattore F e un sito presente sul cromosoma di Escherichia Coli: il sito del cromosoma batterico che ha una parte omologa sul fattore F si chiama **IS** (sequenza di inserzione). La ricombinazione in questo caso avviene tra due molecole circolari, quindi immaginare che le due molecole

complesso multiproteico che promuove lo svolgimento progressivo del singolo filamento dopo la formazione del nick; inoltre il complesso multiproteico dirige il singolo filamento attraverso il tubo di coniugazione verso la cellula ricevente.

Avremo quindi un singolo filamento nella cellula donatrice e un singolo filamento nella cellula ricevente; entrambi questi singoli filamenti fungeranno da stampo per la sintesi di un filamento complementare, cosicché a coniugazione avvenuta avremo una cellula F⁺ che ha ancora il suo fattore F ed una cellula che prima era F⁻ e che poi è diventata anch'essa F⁺: questo si chiama **meccanismo a cerchio rotante**.

La coniugazione: ceppi Hfr

Abbiamo parlato del trasferimento delle informazioni che sono portate dal plasmide di una cellula donatrice ad una ricevente che non possiede il plasmide (dal fattore F), ma per avere una coniugazione che determini il trasferimento di

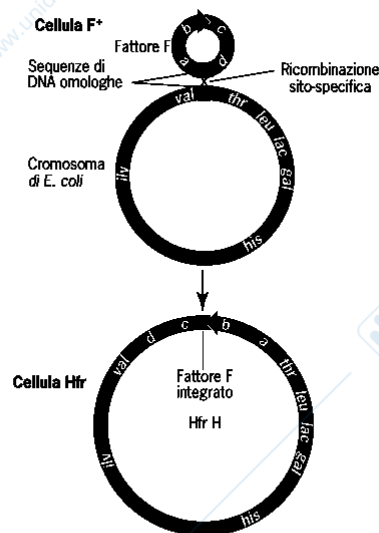


Figura 8.23 ► La formazione di una cellula Hfr mediante integrazione di un fattore F autonomo. Il fattore F è covalentemente inserito nel cromosoma mediante ricombinazione sito-specifica tra sequenze omologhe di DNA nel fattore F e nel cromosoma.



diventino un'unica molecola circolare deve prevedere un singolo scambio: non abbiamo più una molecola lineare e una circolare; se abbiamo un singolo scambio tra due molecole circolari, da due cerchietti si forma un unico cerchio; ed è quello che avviene quando il fattore F si integra nel cromosoma di Escherichia Coli. Il cromosoma di Escherichia Coli ha diverse regioni IS in vari punti, quindi a seconda del punto in cui si inserisce il fattore F si avrà la formazione di particolari ceppi Hfr: avremo il ceppo Hfr che ha inserito il fattore F in prossimità dei geni *leu* e *lac*; un ceppo che ha inserito il fattore F in prossimità dei geni *his*; e così via.

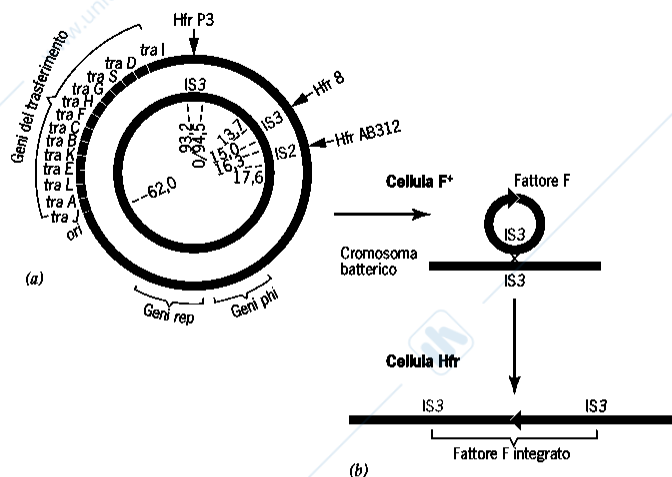


Figura 8.30 ► Gli elementi IS mediano l'integrazione del fattore F. (a) Una mappa abbreviata della struttura del fattore F nel ceppo di *E. coli* K12, con le distanze date in chilobasi (1.000 paia di nucleotidi). Oltre alle posizioni di tre elementi IS, sono indicate le localizzazioni dei geni richiesti per il trasferimento coniugativo (geni *tra*), per la replicazione (geni *rep*) e per l'inibizione della crescita fagica (geni *phi*). Le frecce indicano lo specifico elemento IS che media l'integrazione del fattore F durante la formazione dei ceppi Hfr indicati. (b) La ricombinazione tra gli elementi IS inserisce il fattore F nel cromosoma batterico, producendo un Hfr.

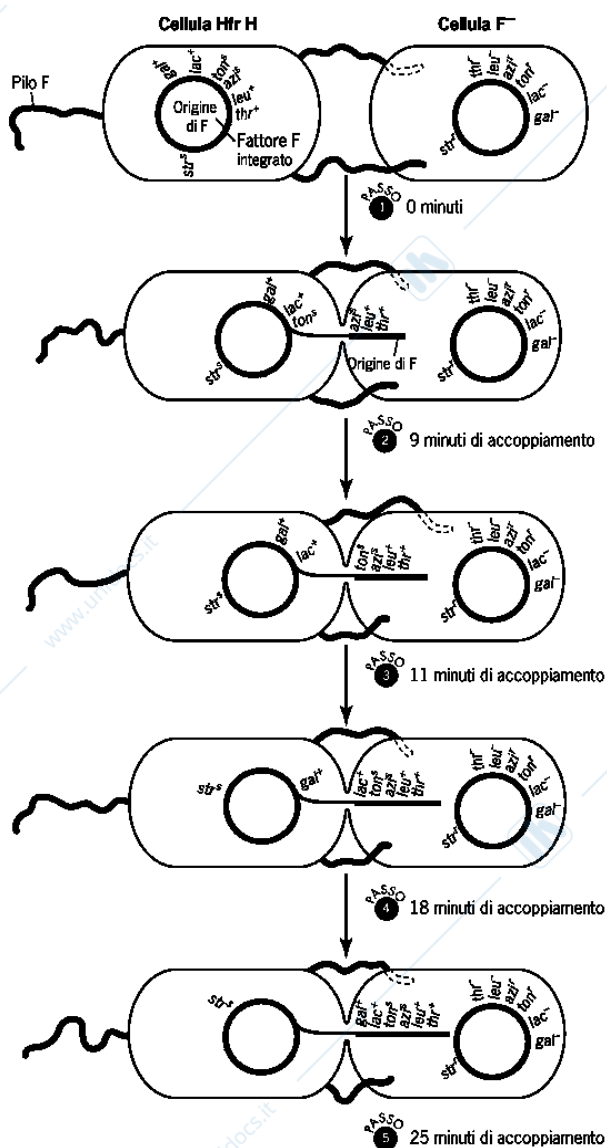


Figura 8.26 ► Interpretazione dei risultati dell'esperimento di coniugazione interrotta effettuato da Wollman e Jacob. Si verifica un trasferimento lineare di geni dalla cellula donatrice (Hfr H) alla cellula ricevente (F⁻). Il trasferimento inizia a livello dell'origine di replicazione nel fattore integrato F e procede mediante la replicazione a cerchio rotante. Il cromosoma si replica durante il trasferimento così che sia la cellula Hfr sia la cellula F⁻ alla fine hanno una copia del DNA trasferito.

Il fattore F anche se è integrato nel cromosoma batterico e quindi si replicherà ogni volta che si replica il cromosoma batterico, comunque continua ad essere fattore F, e cioè continua ad avere i geni che consentono la formazione del **pilo** e il sito di **origine di trasferimento**; quindi riesce a funzionare come fattore di fertilità anche se inserito nel cromosoma batterico: promuove la formazione del pilo sessuale, il taglio a singolo filamento a livello dell'origine di trasferimento e il trasferimento a circolo rotante. Essendo il cromosoma batterico molto più grande del fattore F, affinché possa essere trasferito tutto per intero dobbiamo immaginare una coniugazione di lunga durata; ma è impossibile che la coniugazione duri tutto il tempo necessario per il trasferimento dell'intero cromosoma batterico, quindi la coniugazione attraverso ceppi Hfr porta al trasferimento di **parti del cromosoma batterico** che saranno tanto più lunghe quanto più tempo dura la coniugazione. Nell'immagine notiamo il ceppo Hfr che presenta il fattore F integrato nel cromosoma principale in prossimità del gene *thr*⁺ e *str*^s (il ceppo Hfr presenta questi geni selvatici) e il ceppo ricevente F⁻ che è *thr*⁻ e *str*^r (il ceppo F⁻ presenta questi geni mutati). A livello del sito di **origine di trasferimento** avviene il taglio a singolo filamento dopo la formazione del pilo sessuale e il trasferimento parte della regione di DNA che **non comprende** il fattore F, cioè va nella direzione opposta ad esso: se avvenisse il trasferimento di tutto il cromosoma il fattore F sarebbe l'ultimo ad essere trasferito. In questo caso dopo il taglio a singolo filamento osserviamo lo svolgi-

mento della doppia elica e il singolo filamento passa attraverso il pilo sessuale, il primo gene che passa è il gene più vicino all'origine di trasferimento che in questo caso è *thr*⁺ e se immaginiamo che il trasferimento si interrompa dopo 9 minuti, saranno trasferiti nella cellula ricevente solo i geni *thr*⁺ *leu*⁺ *azi*^s. In questo caso se il filamento trasferito ricombina con il cromosoma della cellula ricevente, quest'ultima diventa prototrofa per i tre geni trasferiti; ma resta comunque una cellula F⁻ perché la coniugazione si è interrotta e non è stato trasferito il fattore F; ricordiamo che in questo caso devono avvenire due scambi perché stanno ricombinando una molecola circolare ed una lineare. Se immaginiamo invece un tempo di coniugazione maggiore di 25 minuti allora saranno trasferiti tutti i geni presenti sul cromosoma del batterio Hfr.

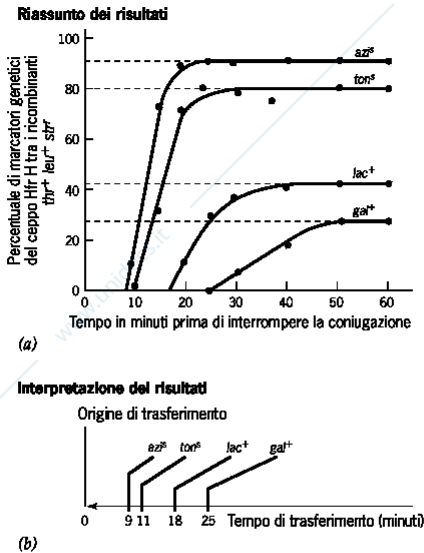


Figura 8.25 ► Coniugazione interrotta di Wollman e Jacob. (a) Le frequenze degli alleli del donatore non selezionati presenti nei ricombinanti *thr*⁺ *leu*⁺ *azi*^s *str*^r sono indicate in funzione del tempo al quale è stata interrotta la coniugazione. (b) Interpretazione dei risultati basata sul trasferimento lineare dei geni dalla cellula Hfr a quella F⁻. Il trasferimento è iniziato all'origine del fattore F e il tempo al quale il gene viene trasferito alla cellula ricevente dipende dalla distanza dal fattore F.

La coniugazione: Mappatura temporale

Quando parliamo di mappatura dei geni batterici non si tratta mai di capire se i geni sono associati o meno perché essendo il cromosoma batterico unico e circolare allora tutti i geni batterici devono essere associati, perché sono tutti sull'unico cromosoma. Quello che ci interessa invece è stabilire l'ordine dei geni batterici e attraverso la coniugazione è possibile stabilire l'ordine dei geni; la particolarità sta nel fatto che si tratta di una **mappatura temporale**; cioè si stabilisce il tempo necessario durante una coniugazione affinché venga trasferito un marcatore e quello successivo ad esso, così da stabilire in base all'ordine di trasferimento quale sia la successione dei geni sul cromosoma. Anziché fare un singolo esperimento di coniugazione, sono necessari diversi e bisogna fare le **coniugazioni interrotte**, cioè a tempi progressivi si preleva un'aliquota di cellule che si sono messe in coniugazione, si interrompono manualmente i pili sessuali e si osservano i fenotipi

delle cellule batteriche che si sono trasformate. I ceppi Hfr sono di tipi diverso tra loro a seconda di dove si sia inserito il fattore F, quindi se abbiamo a disposizione una serie di ceppi Hfr che hanno il fattore F integrato in punti differenti e per ciascuno di questi ceppi facciamo delle coniugazioni interrotte e mettiamo insieme i risultati ottenuti allora riusciamo a ricostruire l'intera mappa temporale di un batterio.

Fattori F' e seduzione: i diploidi parziali

Il fattore F così come può entrare all'interno del cromosoma principale di un batterio per ricombinazione con una delle sequenze IS che si trovano lungo il cromosoma allo stesso modo può uscire per uno stesso evento di ricombinazione. Può uscire come fattore F e quindi il ceppo Hfr diventa un ceppo F⁺ oppure l'escissione del fattore F può non essere precisa cioè può portarsi dietro un pezzetto di cromosoma batterico e quindi dei geni batterici pur mantenendo la sua capacità di formare il pilo di coniugazione, di promuovere il trasferimento a circolo rotante. Questi fattori F che si escindono e si portano dietro geni del cromosoma principale batterico

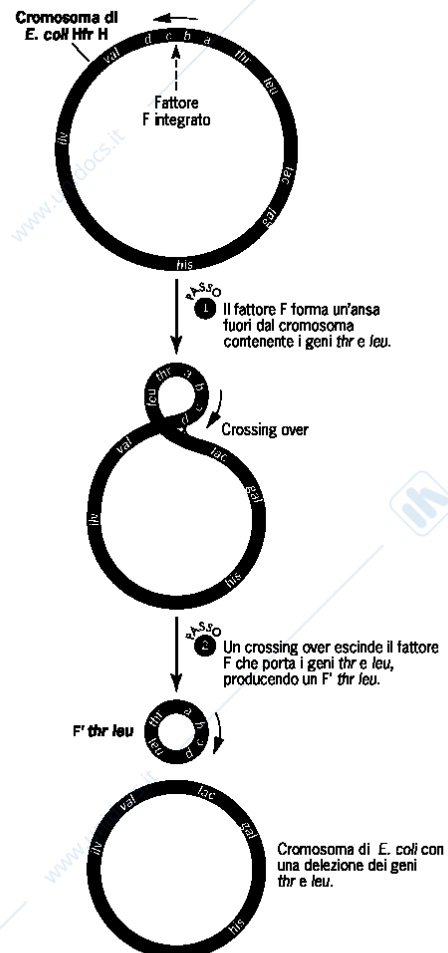
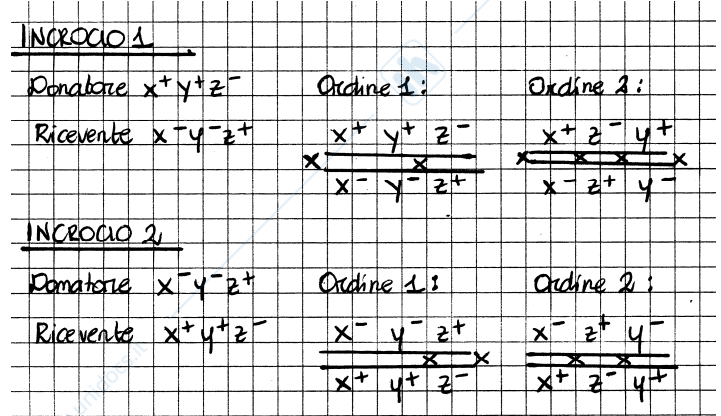


Figura 8.31 ► Formazione di un fattore F'. L'escissione anomala del fattore F dal cromosoma Hfr produce un F' che trasporta i geni *thr* e *leu* di E. coli - indicato con F' *thr leu*.

vengono chiamati **fattori F'** e se un fattore del genere riesce a promuovere la coniugazione con un ceppo ricevente e si riesce a trasferire in un ceppo ricevente, quest'ultimo rispetto al pezzetto di DNA del cromosoma batterico presente nel fattore F' sarà **diploide**, perché si troverà con un fattore F circolare più un pezzo di cromosoma batterico e questo pezzetto sarà omologo ad un tratto del suo cromosoma principale: questo processo prende il nome di **seduzione** e il ceppo ricevente sarà un **diploide parziale**. I diploidi parziali ci consentono di comprendere l'ordine dei geni su un cromosoma batterico e lo studio di meccanismi ripartivi.

Abbiamo tre marcatori (x, y, z) e vogliamo capire qual è il loro ordine. Nell'**incrocio 1** immaginiamo di avere un ceppo donatore F' in cui abbiamo $x^+ y^+ z^-$ di cui non sappiamo l'ordine (x, y sono selvatici e z mutato); il ceppo ricevente presenta un genotipo opposto $x^- y^- z^+$. Immaginiamo che avvenga una seduzione e di voler analizzare il numero di batteri che sono diventati selvatici per tutti e tre i marcatori, che siano quindi $x^+ y^+ z^+$ per un fenomeno di ricombinazione tra il DNA ricevuto dal ceppo donatore e il DNA del ceppo ricevente. Rispetto a due ordini possibili di geni stabiliamo quanti scambi sarebbero necessari per ottenere il ceppo ricombinante. Se immaginiamo che il gene centrale sia y dovremmo immaginare per la formazione del ceppo ricombinante 2 scambi possibili uno a monte di x e l'altro a valle di y perché il tratto che comprende x^+ e y^+ sostituisca il tratto contenente $x^- y^-$ del ricevente. Se invece l'ordine fosse con z centrale dovremmo avere 4 scambi, uno a monte di x, uno tra x e z, uno tra z ed y ed uno a valle di y per avere la configurazione del ceppo ricombinante: ovviamente quanti più scambi devono avvenire tanto più raro è l'evento. Andiamo ad osservare il numero reale di batteri $x^+ y^+ z^+$ che recuperiamo e confrontiamolo col risultato dell'incrocio 2. L'**incrocio 2** ha un donatore che è $x^- y^- z^+$ ed un ricevente che è $x^+ y^+ z^-$, avviene la seduzione ed andiamo a contare il numero di colonie $x^+ y^+ z^+$ che recuperiamo per ricombinazione. Se il marcatore centrale fosse y dovremmo immaginare due scambi, se fosse z allora dovremmo immaginare due scambi; quindi a seconda del risultato che osserviamo tra i due incroci possiamo dedurre quale sia l'ordine dei geni; cioè se otteniamo in entrambi gli esperimenti lo stesso numero di colonie $x^+ y^+ z^+$ significa che in entrambi i casi abbiamo avuto bisogno dello stesso numero di scambi per ottenere quel risultato e quindi due scambi per il marcatore centrale y nel primo incrocio, due scambi per il marcatore centrale y nel secondo incrocio mi fanno capire che y sia realmente il marcatore centrale. Se invece nell'incrocio due avessimo ottenuto un numero di colonie $x^+ y^+ z^+$ molto maggiore rispetto a quelle osservate nell'incrocio 1, allora nell'incrocio 2 ho avuto bisogno di un numero di scambi minore rispetto al numero di scambi necessari nell'incrocio 1; deduco quindi che l'ordine corretto in questo caso sia con z centrale. Confrontando quindi i risultati che si ottengono da differenti seduzioni considerando ceppi con genotipi opposti che siano una volta donatori ed un'altra riceventi riusciamo, confrontando il numero di colonie selvatiche che si recuperano per i tre marcatori, a capire e stabilire l'ordine corretto dei geni.



L'incrocio 2 ha un donatore che è $x^- y^- z^+$ ed un ricevente che è $x^+ y^+ z^-$, avviene la seduzione ed andiamo a contare il numero di colonie $x^+ y^+ z^+$ che recuperiamo per ricombinazione. Se il marcatore centrale fosse y dovremmo immaginare due scambi, se fosse z allora dovremmo immaginare due scambi; quindi a seconda del risultato che osserviamo tra i due incroci possiamo dedurre quale sia l'ordine dei geni; cioè se otteniamo in entrambi gli esperimenti lo stesso numero di colonie $x^+ y^+ z^+$ significa che in entrambi i casi abbiamo avuto bisogno dello stesso numero di scambi per ottenere quel risultato e quindi due scambi per il marcatore centrale y nel primo incrocio, due scambi per il marcatore centrale y nel secondo incrocio mi fanno capire che y sia realmente il marcatore centrale. Se invece nell'incrocio due avessimo ottenuto un numero di colonie $x^+ y^+ z^+$ molto maggiore rispetto a quelle osservate nell'incrocio 1, allora nell'incrocio 2 ho avuto bisogno di un numero di scambi minore rispetto al numero di scambi necessari nell'incrocio 1; deduco quindi che l'ordine corretto in questo caso sia con z centrale. Confrontando quindi i risultati che si ottengono da differenti seduzioni considerando ceppi con genotipi opposti che siano una volta donatori ed un'altra riceventi riusciamo, confrontando il numero di colonie selvatiche che si recuperano per i tre marcatori, a capire e stabilire l'ordine corretto dei geni.

La trasformazione

È il trasferimento di DNA **nudo** all'interno di un batterio ricevente, nudo perché il donatore è stato lisato e il DNA frammentato. Se facciamo un esperimento di trasformazione in un tubo ad U di Davis in questo caso prelevando un'aliquota dai due bracci osserveremo delle colonie selvatiche che cresceranno su terreno minimo, ma non crescerebbero se al terreno di coltura avremmo aggiunto delle DNAsi che degradano il DNA nudo non protetto da proteine: in questo caso siamo certi che sia avvenuta trasformazione. La **trasformazione** è stata osservata per la prima volta nel 1928 da Griffith anche se non era stata ancora dimostrata la natura del principio trasforman-

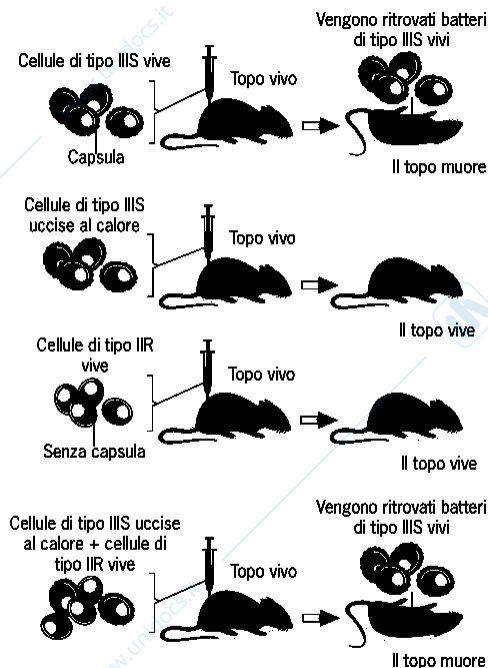


Figura 8.19 ► La scoperta di Griffith della trasformazione in *Streptococcus pneumoniae*.

te; Griffith osservò l'esistenza di un principio trasformante facendo esperimenti con *Streptococcus pneumoniae* e il topolino. Questo batterio può essere virulento o meno a seconda della presenza di un rivestimento sulla sua parete batterica che gli conferisce virulenza che si manifesta nella morte del topolino nel quale viene iniettato. L'esperimento iniziale prevedeva che l'iniezione delle cellule virulente all'interno del topolino determinavano la morte; l'iniezione di quelle virulente uccise al calore non determinavano la morte del topolino; l'iniezione di cellule non virulente non determinavano la morte; l'iniezione di una miscela di cellule vive non virulente e cellule virulente uccise al calore determinavano la morte del topolino. Perché fosse stabilito che il principio trasformante è il DNA ci sono voluti prima gli esperimenti di Sia e Dawson e quelli successivi.

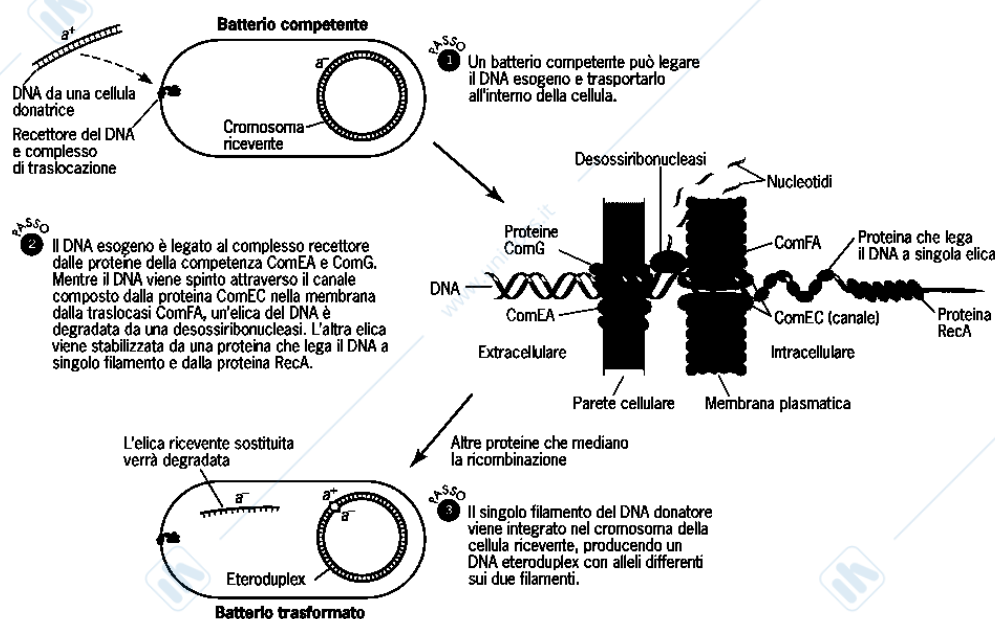
Come avviene la trasformazione?

Esistono due tipi differenti di trasformazione: quella **naturale** che avviene nei ceppi batterici esistenti in natura e una **artificiale** che avviene dopo che si sono applicate

delle procedure per rendere i batteri in grado di assumere il DNA nudo (renderli **competenti**) e quest'ultima è una delle pratiche di laboratorio più comuni. Solo le cellule definite **competenti** sono in grado di fare la trasformazione, cellule che possiedono una serie di geni che codificano per una serie di proteine che sono deputate alla competenza e che quindi consentono di creare una sorta di poro sulla parete cellulare attraverso il quale può passare il DNA nudo dall'ambiente extracellulare

all'interno della cellula. Il **complesso** che media questo trasferimento è costituito da molte proteine. Il DNA presente nell'ambiente extracellulare è a doppio filamento, ma nel momento in cui passa attraverso il poro sulla parete cellulare del batterio competente diventa a singolo filamento,

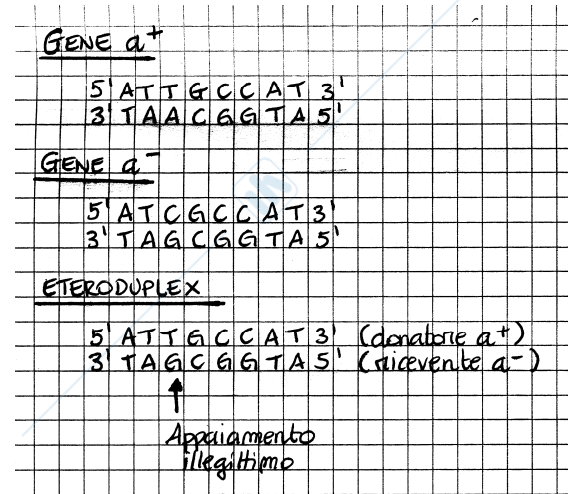
viene quindi svolto: il filamento che resta fuori viene degradato e l'energia ricavata dalla sua degradazione viene impiegata per il trasporto dell'altro filamento dentro la cellula. Man mano che il singolo filamento di DNA entra nella cellula ricevente viene complessato ad una proteina **RecA**. Immaginiamo sempre che la cellula donatrice abbia un certo genotipo diverso dalla cellula ricevente per un marcatore, nell'immagine il filamento di DNA a singolo filamento che è entrato nella cellula ricevente presenta il marcatore **a⁺** e la cellula ricevente per lo stesso marcatore è **a⁻**, avviene ricombinazione tra i due filamenti attraverso due scambi, quindi il singolo filamento ha spiazzato uno dei due filamenti della doppia elica del genoma batterico e



quindi si osserva una doppia elica di DNA batterico che per il tratto del gene **a** possiede un filamento che proviene da un gene **a⁺** e un filamento che proviene da un gene **a⁻**: significa che in questo tratto ci sarà una regione in cui comparirà almeno un appaiamento illegittimo che determina una distorsione della doppia elica.

Chiariamo questo concetto:

un gene è una successione di nucleotidi, lo scriviamo in una doppia elica costituiti da due filamenti antiparalleli e complementari. Immaginiamo che le sequenze del gene **a⁺** e del gene **a⁻** siano quelle in figura; **a⁻** è una forma allelica di **a⁺**, quindi stiamo parlando dello stesso gene quindi le due sequenze si devono somigliare ma devono anche essere diverse tra loro altrimenti non sarebbero forme alleliche dello stesso gene: le due sequenze alleliche presentano una diversa coppia di base in terza posizione. Il ricevente è **a⁻** mentre il donatore è **a⁺**, entra uno dei due filamenti del donatore nella cellula e per ricombinazione spiazza uno dei due filamenti del ricevente e si formerà una doppia elica complementare che porta un filamento contenente la sequenza **a⁺** del donatore e un filamento contenente la sequenza **a⁻** del ricevente e in particolar modo si osserverà un appaiamento illegittimo in terza posizione, perché il filamento proveniente dal donatore ha una sequenza nucleotidica e il filamento del ricevente una diversa sequenza nucleotidica. Poiché stiamo parlando di forme alleliche dello stesso gene quasi tutte le basi sono correttamente appaiate, ma nei punti in cui i due alleli sono differenti nella sequenza nucleotidica si formeranno appaiamenti illegittimi. La molecola di DNA ricombinante con un appaiamento illegittimo prende il nome di **eteroduplex**.



Il destino dell'eteroduplex

A questo punto la cellula batterica che sta facendo trasformazione può subire due destini differenti: la cellula può attivare un meccanismo di riparazione per correggere l'appaiamento illegittimo e a seconda del tipo di meccanismo la riparazione può avvenire verso **a⁺** o verso **a⁻**. Se la cellula ripara verso **a⁻** le due cellule figlie saranno entrambe **a⁻** perché la replicazione è semiconservativa. Se invece la riparazione avviene verso **a⁺** le due cellule figlie frutto di replicazione avranno entrambe il gene **a⁺** e quindi osserviamo una trasformazione dalla prima generazione. L'appaiamento illegittimo potrebbe anche non essere riparato! Se non viene riparato l'appaiamento illegittimo e la cellula batterica si replica le due cellule figlie saranno una **a⁺** e una **a⁻**, perché la replicazione del DNA è semiconservativa e quindi ciascuno dei due filamenti fungerà da stampo per la sintesi del filamento complementare, il filamento **a⁺** promuoverà la sintesi di un complementare **a⁺**, il filamento **a⁻** promuoverà la sintesi di un complementare **a⁻**. Quindi il **destino** di una cellula che subisce **trasformazione** dipende da diversi fattori.

Mappatura per trasformazione

La trasformazione così come la coniugazione e la traduzione ci consente di mappare i geni batterici; in particolare con la trasformazione possiamo capire se due geni batterici sono vicini tra loro o meno. Poiché il DNA che entra nella cellula ricevente per trasformazione è un frammento perché deriva da una cellula donatrice lisata che ha frammentato il DNA, se due marcatori erano lontani sono andati a finire su due frammenti differenti, se invece erano vicini sono andati a finire sullo stesso frammento. Immaginiamo di avere un ceppo donatore che sia **a⁺ b⁺** e che il ceppo ricevente sia **a⁻ b⁻**, sia avvenuta trasformazione e andiamo ad analizzare i risultati: possiamo avere trasformanti per **a** ma non per **b** (il ricevente è diventato **a⁺** ma è rimasto **b⁻**); trasformanti per **b** ma non per **a** (situazione reciproca alla prima); si possono avere **cotrasformanti** (il ricevente è trasformato per entrambi i marcatori) e non trasformanti. Per capire se **a** e **b** sono strettamente associati dobbiamo confrontare la frequenza dei singoli trasformanti e dei doppi tra-

sformanti perché se **a** e **b** sono andati a finire sullo stesso frammento di DNA per avere i singoli trasformanti per **a** ci vorranno due scambi (uno a monte di **a** e uno a valle di **a**), per avere i singoli trasformanti per **b** ci vorranno due scambi (uno a monte di **b** e uno a valle di **b**), per avere i cotrasformanti ci vorranno due scambi (uno a monte di **a** e uno a valle di **b**) se sono sullo stesso frammento; quindi la probabilità di osservare singoli trasformanti per **a**, singoli trasformanti per **b** o cotrasformanti sarà più o meno la stessa. Se invece recuperiamo un numero di cotrasformanti molto più basso rispetto ai singoli trasformanti vuol dire che **a** e **b** sono andati a finire (quando si è frammentato il DNA del ceppo donatore) in due frammenti di DNA differenti e quindi nella trasformazione per osservare i singoli trasformanti per **a** saranno avvenuti due scambi, per i singoli trasformanti per **b** sempre due scambi, per i cotrasformanti invece saranno avvenuti 4 scambi (uno a monte di **a** e uno a valle di **a** sul frammento su cui si trova **a**; uno a monte di **b** e a valle di **b** sul frammento su cui si trova **b**); questo è un evento molto più raro, di conseguenza se recuperiamo meno cotrasformanti nella progenie rispetto ai singoli trasformanti possiamo dedurre che **a** e **b** sulla mappa del batterio donatore si trovano lontani.



Figura 8.18 Fenotipi delle colonie dei due ceppi di *Streptococcus pneumoniae* studiati da Griffith nel 1928.

LEZIONE 18 (12/05/2015)

La ricombinazione nei batteri e nei batteriofagi

La caratteristica della **trasduzione** è il passaggio di DNA da un batterio donatore ad un ricevente mediato da un batteriofago specifico per le cellule batteriche. Un batteriofago è una particella virale specifica per i batteri ed ha una struttura molto semplice come tutti i virus: una molecola di materiale ereditario (DNA o RNA lineare o circolare) rivestita da un involucro proteico. I fagi a seconda del ciclo vitale che riescono a compiere nel momento in cui infettano una cellula batterica vengono distinti in due grossi gruppi: fagi con **ciclo litico** e fagi con **ciclo lisogenico**. Parliamo quindi di trasduzione generalizzata e trasduzione specializzata.

I batteriofagi

Nell'immagine è rappresentato un **batteriofago T4** e un **batteriofago lambda**; sono due fagi con un ciclo differente: il batteriofago T4 è un fago virulento e, come tutti i fagi della serie T pari, ha un ciclo litico; mentre il batteriofago lambda è un fago temperato con ciclo lisogenico. Il **fago T4** presenta una molecola di DNA è impacchettata all'interno di un involucro proteico, poi compare una coda di natura proteica da cui partono delle fibre che prendono contatto con la parete batterica.

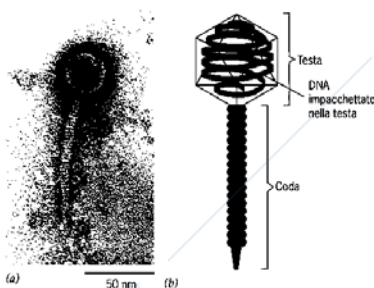


Figura 8.4 Fotografia al microscopio elettronico (a) e disegno (b) che mostrano la struttura del batteriofago λ .

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

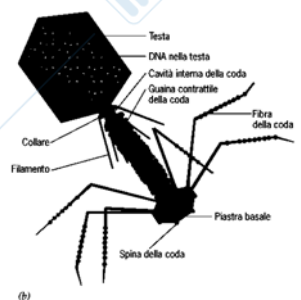
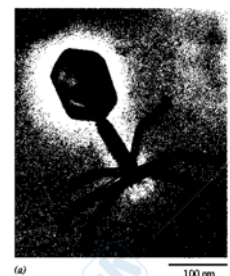


Figura 8.1 \bullet Batteriofago T4. Fotografia al microscopio elettronico (a) e disegno (b) che mostrano la struttura del batteriofago T4.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

Il **fago lambda** presenta una struttura più semplice in cui la molecola di DNA impacchettata nell'involucro proteico è unita ad una coda che manca di fibre. In entrambi i casi i

fagi sono in grado di iniettare il proprio DNA all'interno della cellula batterica e questo vuol dire far avvenire un'**infezione fagica** (solo il DNA entra nel batterio, la componente proteica resta fuori).

Il ciclo litico del batteriofago T4

Il ciclo comincia con l'infezione fagica, quindi il batteriofago prende contatto con la parete batterica, inietta il suo DNA all'interno della cellula batterica. A questo punto il fago è in grado di utilizzare il macchinario metabolico della cellula batterica per replicarsi dopodichè avviene l'assemblaggio delle particelle fagiche all'interno del batterio. A questo punto la cellula batterica viene lisata e ciascuno dei fagi che viene liberato nell'ambiente extracellulare può andare ad infettare nuovamente un'altra cellula batterica.

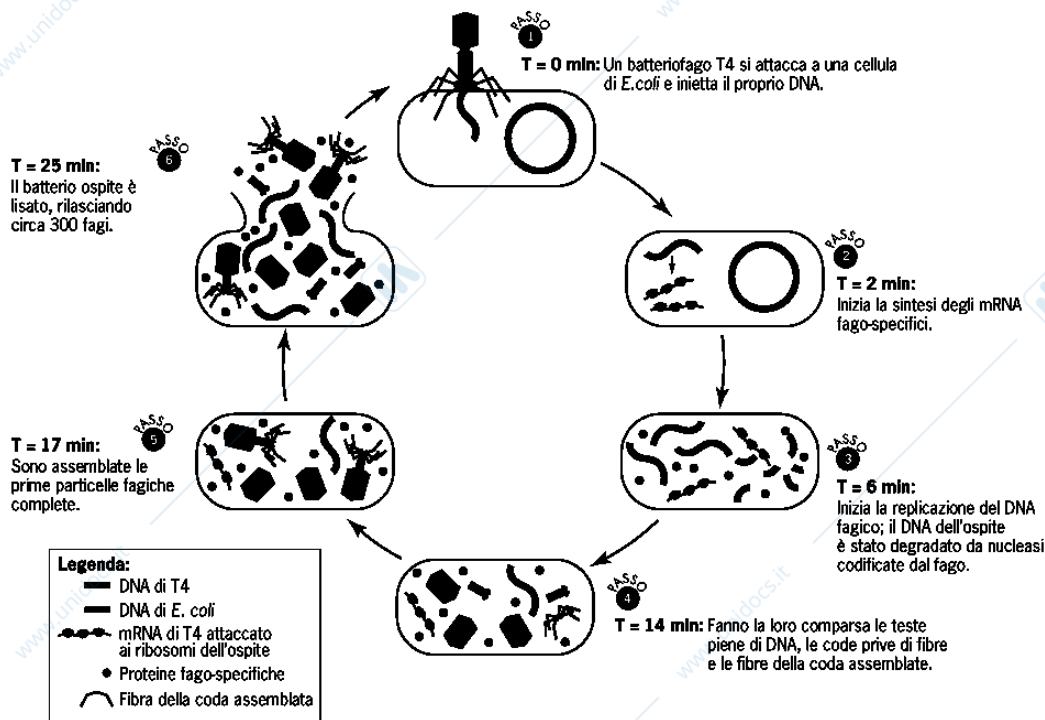


Figura 8.3 ► Il ciclo vitale del batteriofago T4.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
 Edises

Il ciclo lisogenico del fago lambda

Il ciclo comincia anche in questo caso con l'infezione fagica; in questo caso però dopo l'ingresso del DNA all'interno del batterio avviene **ricombinazione** a monte e a valle del cromosoma fagico che portano all'integrazione del pezzo di DNA fagico all'interno del cromosoma batterico; si creerà quindi una nuova molecola di DNA costituita da tutto il cromosoma batterico più il genoma fagico, questo DNA fagico integrato prende il nome di profago. Il **profago** è quindi l'integrazione del DNA fagico nel cromosoma batterico. Una volta integrato, vengono espressi solo alcuni geni fagici, quindi il batterio non si accorge di avere un fago integrato nel suo cromosoma, si replica ed originerà una popolazione di cellule batteriche che possiedono tutte il profago integrato. Può succedere che improvvisamente a causa di qualche stimolo esterno il profago si può escindere dal cromosoma batterico per ricombinazione, si posiziona come un plasmide nel citoplasma batterico e la cellula batterica entra in un ciclo litico e accade esattamente lo stesso processo che avviene per il ciclo del fago T4; il fago utilizza il macchinario metabolico del batterio per replicarsi, codifica i geni per le proteine del capsido, viene impacchettato, la cellula batterica si lisa e vengono poi infettate altre cellule batteriche che si trovano nelle vicinanze. La differenza tra il ciclo litico e il ciclo lisogenico consiste nel fatto che i fagi temperati, a differenza dei fagi virulenti, riescono ad integrare il proprio DNA all'interno del cromosoma della cellula che viene infettata e possono rimanere silenti per un numero di generazioni molto lunghe fino a quando avviene l'escissione del profago ed entrano in un ciclo litico. Un **ciclo litico** si conclude in meno di mezz'ora. Ricordiamo inoltre che il fago lambda presenta nel suo involucro proteico una molecola di DNA lineare che una volta iniettata nel batterio circolarizza, quindi per integrarsi nel cromosoma batterico richiede un solo scambio in una specifica regione.

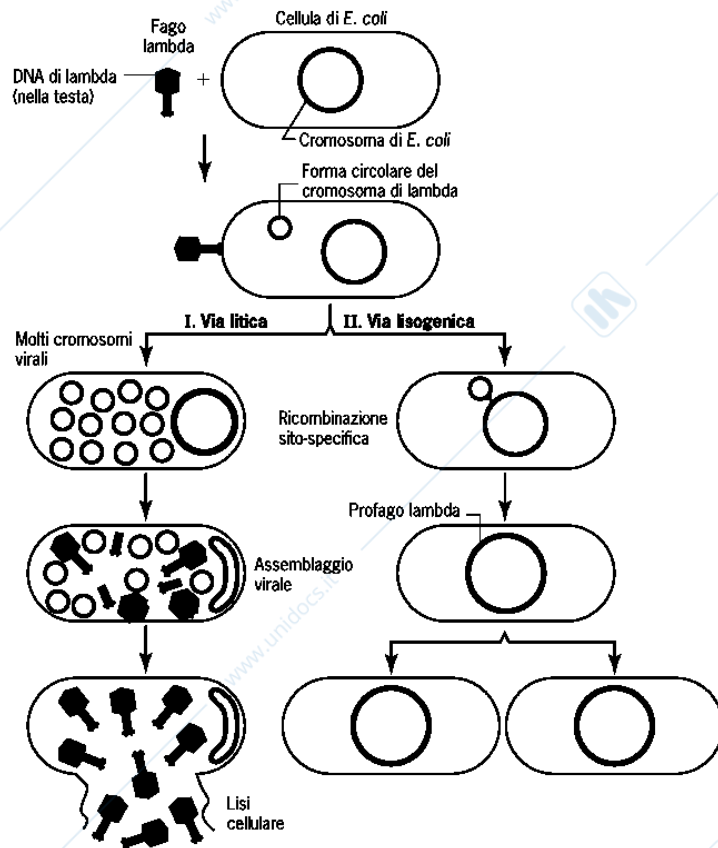


Figura 8.5 ► I due cicli vitali del batteriofago lambda. I due stati intracellulari del batteriofago lambda: la crescita litica e la lisogenia.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES

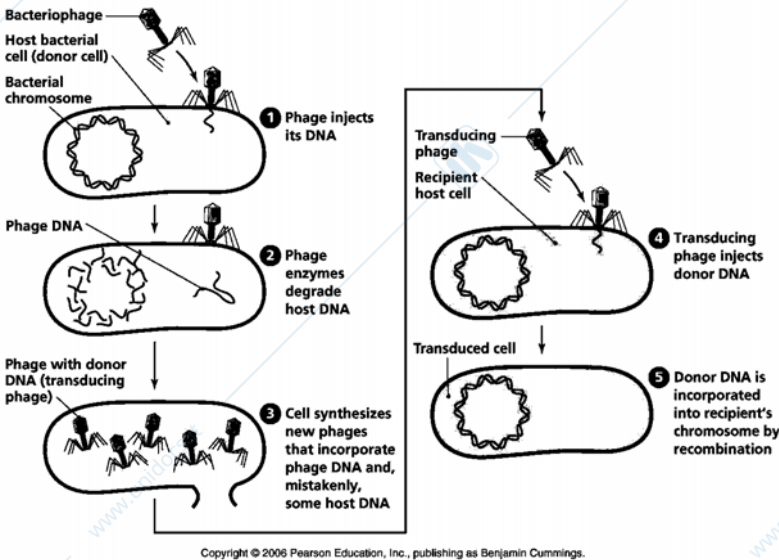
La scoperta della trasduzione

La trasduzione è stata scoperta mescolando ceppi batterici di *Salmonella Typhimurium* con fenotipi differenti (ceppo LA22 e LA2); il **ceppo LA22** ($\text{phe}^- \text{trp}^- \text{met}^+ \text{his}^+$) e il **ceppo LA2** ($\text{phe}^+ \text{trp}^+ \text{met}^- \text{his}^-$). Nessuno dei due ceppi è in grado di crescere su un terreno minimo, entrambi sono auxotrofi; mescolandoli assieme e piastrandoli su un terreno minimo si osservava la crescita di un certo numero di colonie: c'è stato quindi un trasferimento di informazione genetica da un ceppo all'altro. Ripetendo l'esperimento in un **tubo a U di Davis** mettendo da un lato il ceppo LA22 e dall'altro lato il ceppo LA2, se si prelevava un'aliquota di batteri dal braccio contenente il ceppo LA2 e la si piastrava su un terreno minimo non si osservava crescita; se invece veniva prelevata un'aliquota di batteri dal braccio contenente il ceppo LA22 e la si piastrava su terreno minimo si osservava crescita di colonie batteriche: si poteva immaginare che per un motivo sconosciuto ci fosse stata una lisi delle cellule LA2 e che il DNA nudo fosse passato attraverso il filtro da un braccio all'altro del tubo a U. Per verificare l'ipotesi veniva aggiunta al terreno di coltura la DNasi: se si trattava di **trasformazione** in presenza di DNasi non si sarebbe osservata la crescita di colonie neppure dal lato del tubo contenente il ceppo LA22. Anche dopo l'aggiunta di DNasi si continuavano ad osservare colonie batteriche dopo la piastratura di un'aliquota proveniente dal braccio del ceppo LA22; quindi si ipotizzò che ci fosse qualcosa che passasse da un braccio all'altro attraverso il filtro ma che non fosse **DNA nudo**, ma DNA protetto da un involucro proteico e quindi particelle virali (particelle fagiche) che passavano dal lato del tubo contenente il ceppo LA2 al lato del tubo contenente il ceppo LA22. A questo punto si pensò che nel ceppo

LA2 ci fosse un profago (un cromosoma fagico integrato) e che nel tubo a U si attivasse un **ciclo litico** con conseguente formazione di particelle virali che passavano dall'altro lato del tubo per infettare le cellule del ceppo LA22 e trasferire l'informazione genetica proveniente dal ceppo LA2, ovvero l'informazione $phe^+ trp^+$.

La trasduzione generalizzata

È il trasferimento di DNA da un batterio donatore ad uno ricevente mediato da un **fago virulento**, cioè che ha un **ciclo litico**: solo con la trasduzione generalizzata può essere trasferita una parte qualunque del cromosoma batterico donatore al cromosoma batterico ricevente. Il **ciclo litico** consta dell'infezione da parte del fago nei confronti del batterio; una volta entrato il fago si replica e prima di cominciare ad impacchettarsi attiva una serie di processi all'interno del batterio che portano alla frammentazione del cromosoma batterico; può accadere



che un certo numero di particelle fagiche sbagliano ad impacchettare il DNA, anziché impacchettare il proprio genoma se ci sono dei frammenti di cromosoma batterico delle stesse dimensioni del cromosoma fagico possono impacchettare un frammento batterico. Nell'immagine osserviamo una serie di particelle fagiche che contengono DNA fagico mentre una di esse ha impacchettato un frammento di DNA batterico: questo fago è in grado di infettare cellule batteriche iniettando all'interno di queste non il DNA fagico (perché non lo contiene più) ma il frammento di cromosoma batterico. Quando parliamo di trasduzione generalizzata può essere impacchettato nel capside fagico un qualsiasi frammento del cromosoma batterico, quindi può essere trasferita una qualunque regione del donatore ad un batterio ricevente per mezzo di un fago.

La trasduzione specializzata

Gli esempi di trasduzione specializzata sono riferiti al fago **lambda**, un **fago temperato** che circolarizza il suo DNA all'interno del batterio ospite: è presente una molecola di DNA virale circolare e il cromosoma batterico circolare. Esistono sia sul cromosoma fagico che su quello batterico dei siti che si chiamano **att**: sul cromosoma fagico abbiamo **attP**, su quello batterico **attB**. Queste regioni sono omologhe, sono costituite da due ripetizioni e grazie ad esse può avvenire ricombinazione che porta all'integrazione del cromosoma fagico in quello batterico. Il sito **attB** su Escherichia Coli si trova compreso tra due geni che sono **gal** e **bio**; quindi il profago lambda si troverà integrato tra gal e bio; tra gal e il profago e tra bio e il profago ci sono due siti **attP**.

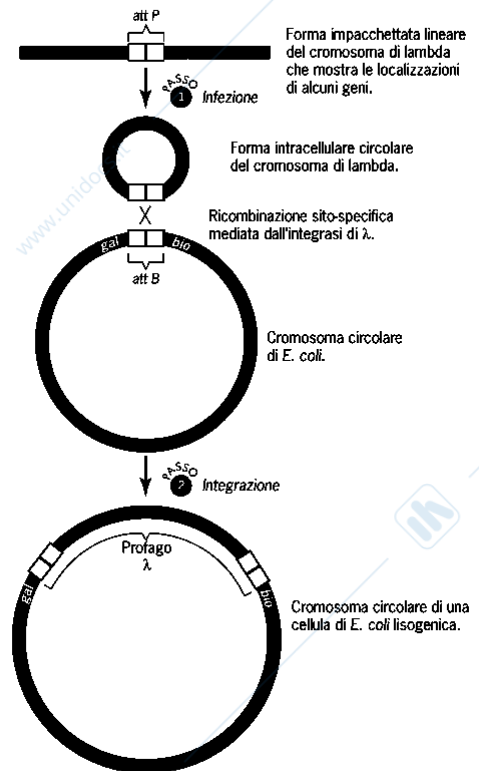


Figura 8.6 ► Integrazione della molecola di DNA di λ nel cromosoma di *E. coli*.

Nel momento in cui viene promossa l'escissione del profago dal cromosoma batterico viene attivato il ciclo litico. Normalmente nella maggioranza dei casi avviene un'escissione perfetta, si forma un'ansa che porta vicini i siti **att** che fiancheggiano il profago; avviene nuovamente uno scambio tra questi siti e il risultato sarà un profago lambda nuovamente circolare e il cromosoma batterico identico a prima dell'inserzione del profago. Può avvenire anche un'escissione imperfetta, ovvero l'ansa che viene a formarsi non mette in perfetta corrispondenza le regioni **att**, avviene una ricombinazione non omologa che porta all'escissione

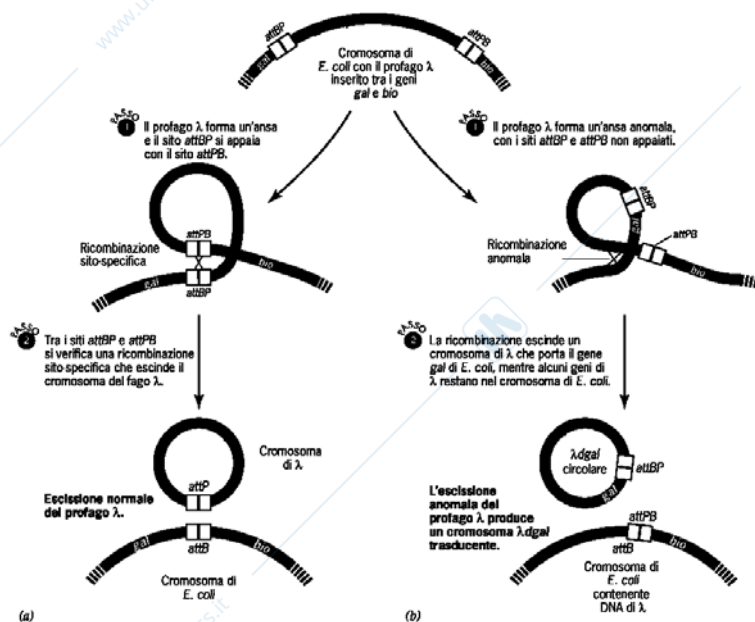
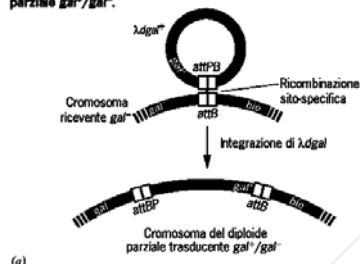


Figura 8.28 ► Escissione del batteriofago lambda. Confronto tra (a) la normale escissione del profago lambda e (b) l'escissione anomala, che produce cromosomi ricombinanti trasducenti λ gal.

L'integrazione di λ gal⁺ nel sito attB produce un diploide parziale gal⁺/gal⁻.



Un doppio crossing over inserisce l'allele gal⁺ di λ gal⁺ nel cromosoma ospite.

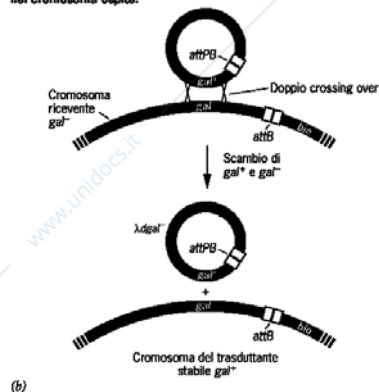


Figura 8.29 ► Ricombinazione tra cellule riceventi gal⁻ e fagi λ gal⁺. (a) L'integrazione di λ gal⁺ nel sito attB produce un diploide parziale instabile gal⁺/gal⁻. (b) Un doppio crossing over trasferisce l'allele gal⁺ da λ gal⁺ al cromosoma.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

di una molecola di DNA fagico circolare e alla formazione di un cromosoma batterico entrambi particolari perché il profago che si è escisso male lascia un tratto del suo genoma all'interno del cromosoma batterico e si è portato via un tratto del genoma batterico (o gal oppure bio); le particelle fagiche che si otterranno dall'impacchettamento di questo genoma fagico particolare saranno difettive perché mancano di un tratto di cromosoma fagico e si chiameranno o λ gal (se sono difettive e si sono portate via gal) o λ dbio (se sono difettive e si sono portate via bio). Questo fago lambda difettivo può andare ad impacchettarsi e infettare un batterio il quale potrà andare incontro a **trasduzione specializzata**, perché potrà riguardare solo l'acquisizione dell'informazione relativa al gene gal o al gene bio, non un qualunque gene del cromosoma batterico come avviene nella trasduzione generalizzata.

Una volta che un fago difettivo λ gal o λ dbio infettano un batterio possono verificarsi due situazioni: in un **primo caso** il cromosoma di λ gal circolarizzato nel batterio ricevente ricombina attraverso i siti **att** con il cromosoma batterico integrandosi come profago, e creando un **diploide parziale** per il gene gal: nel caso in cui quindi, il batterio sia gal⁻ e il fago sarà λ gal, quando

quest'ultimo si sarà integrato nel cromosoma batterico si avrà una situazione di diploidia perché sarà presente sia il gene gal⁻ che il gene gal⁺. Questa situazione determina la formazione di un **trasducente instabile** perché nel momento in cui il profago si attiverà e comincerà il ciclo litico con conseguente lisi della cellula batterica. In un **secondo caso** può accadere che il cromosoma fagico non si integra il quello batterico, ma il gene gal⁺ presente nel cromosoma fagico cir-

colare ricombina con il gene *gal*- presente nel cromosoma batterico effettuando due scambi, non si ha l'integrazione della particella fagica ma la ricombinazione per *gal* e il batterio ricevente diventa *gal*+ ed è in grado di trasmettere questa informazione alla progenie di generazione in generazione ed è questo l'evento che viene chiamato **trasduzione specializzata**, che però è sempre a carico delle regioni genomiche del cromosoma batterico che fiancheggiano il punto di inserzione del profago.

La mappatura per trasduzione

Dobbiamo sempre fare riferimento ad una trasduzione generalizzata, perché in quella specializzata viene portata via solo la regione adiacente ai punti di inserzione del profago all'interno del cromosoma batterico. Nell'esempio stiamo considerando tre marcatori (*thr*, *leu1* e *leu2*), *leu1* e *leu2* sono due possibili mutazioni del gene *leu*, che se mutato determina la necessità di aggiunta di leucina al terreno di coltura; quindi ceppi *leu1*⁻ o *leu2*⁻ sono incapaci di crescere se nel terreno di coltura non è stata aggiunta leucina; i ceppi *thr* sono incapaci di crescere in assenza di treonina. Abbiamo due incroci batterici; nel primo incrocio il ceppo donatore è *thr*⁺ *leu1*⁻ *leu2*⁺; il ceppo ricevente è *thr*⁻ *leu1*⁺ *leu2*⁻; nel secondo incrocio abbiamo un ceppo donatore *thr*⁺ *leu1*⁺ *leu2*⁻ e un ceppo ricevente *thr*⁻ *leu1*⁻ *leu2*⁺. Immaginiamo di aver fatto quindi un esperimento di **trasduzione generalizzata** utilizzando questi ceppi elencati: il primo tipo di selezione va effettuato su un terreno contenente treonina in modo tale che siamo sicuri che crescono sia le cellule *thr*⁺ che le cellule *thr*; ma non contenente leucina; quindi su questo terreno selettivo cresceranno solo i batteri trasduttori che sono diventati *leu1*⁺ e *leu2*⁺ perché anche se è mutato uno solo dei due marcatori *leu* c'è bisogno di aggiungere leucina affinché crescano. Una volta selezionati i batteri *leu*⁺ dobbiamo capire

quanti di essi sono *thr*⁺ e quanti *thr*⁻: contiamo tutte le cellule che sono cresciute in presenza di treonina ma senza leucina e per piastramento in replica li passiamo su un terreno privo di treonina a questo punto su questo terreno cresceranno solo i batteri *thr*⁺; per sottrazione ci calcoliamo quanti sono i batteri *thr*⁻. Dall'incrocio 1 otteniamo 350 colonie *thr*⁺ e 349 colonie *thr*⁻ quindi lo stesso numero e sono tutte *leu*⁺; dall'incrocio 2 otteniamo 60 colonie *thr*⁺ e 300 colonie *thr*⁻ quindi un rapporto sbilanciato. Sulla base di questi valori siamo in grado di stabilire quale sia il marcatore centrale: gli ordini possibili sono due e rispettivamente *thr leu1 leu2* oppure *thr leu2 leu1*. Nell'**incrocio 1** il ceppo donatore è *thr*⁺ *leu1*⁻ *leu2*⁺ e il ricevente ha genotipo reciproco; abbiamo ottenuto il 50% di colonie *thr*⁺ *leu1*⁺ *leu2*⁺ e il 50% di colonie *thr*⁻ *leu1*⁺ *leu2*⁺; rispetto ai **due ordini** ipotizzati costruiamo lo schema con **leu1 centrale** e notiamo che per ottenere il genotipo ricombinante (+ + +) sono necessari 4 scambi: uno a monte di *thr*⁺, uno tra *thr*⁺ e *leu1*⁻, uno tra *leu1*⁻ e *leu2*⁺ ed uno a valle di *leu2*⁺; se costruiamo lo schema con **leu2 centrale** notiamo che per ottenere il genotipo ricombinante sono necessari 2 scambi: uno a monte di *thr*⁺ e uno a valle di *leu2*⁺. Nell'**incrocio 2** il ceppo donatore è *thr*⁺ *leu1*⁺ *leu2*⁻ e il ricevente ha genotipo reciproco; abbiamo ottenuto il 17% di colonie *thr*⁺ *leu1*⁺ *leu2*⁺ e l'83% di colonie *thr*⁻ *leu1*⁺ *leu2*⁺; rispetto ai **due ordini** ipotizzati costruiamo lo schema con **leu1 centrale** e notiamo che per ottenere il genotipo ricombinante (+ + +) sono necessari 2 scambi: uno a monte di *thr*⁺ ed uno tra *leu1*⁺ e *leu2*⁻; se costruiamo lo schema con **leu2 centrale** notiamo che per ottenere il genotipo ricombinante sono necessari 4 scambi: uno a monte di *thr*⁺, uno tra *thr*⁺ e *leu2*⁻ uno tra *leu2*⁻ e *leu1*⁺ ed uno a valle di *leu1*⁺. Dall'analisi dei risultati di questi due tipi di incroci capiamo che

MAPPATURA PER TRASDUZIONE	
INCROCIO 1:	donatore <i>thr</i> ⁺ <i>leu1</i> ⁻ <i>leu2</i> ⁺ ricevente <i>thr</i> ⁻ <i>leu1</i> ⁺ <i>leu2</i> ⁻
RISULTATI:	350 <i>thr</i> ⁺ (50%) 349 <i>thr</i> ⁻ (50%)
INCROCIO 2:	donatore <i>thr</i> ⁺ <i>leu1</i> ⁺ <i>leu2</i> ⁻ ricevente <i>thr</i> ⁻ <i>leu1</i> ⁻ <i>leu2</i> ⁺
RISULTATI:	60 <i>thr</i> ⁺ (17%) 300 <i>thr</i> ⁻ (83%)
INCROCIO 1: Marcatori centrali ipotetica	
<i>thr</i> ⁺ <i>leu1</i> ⁻ <i>leu2</i> ⁺	} 4 scambi per avere +++
<i>thr</i> ⁻ <i>leu1</i> ⁺ <i>leu2</i> ⁻	
<i>thr</i> ⁺ <i>leu2</i> ⁺ <i>leu1</i> ⁻	} 2 scambi per avere +++
<i>thr</i> ⁻ <i>leu2</i> ⁻ <i>leu1</i> ⁺	
INCROCIO 2: Marcatori centrali ipotetica	
<i>thr</i> ⁺ <i>leu1</i> ⁺ <i>leu2</i> ⁻	} 2 scambi per avere +++
<i>thr</i> ⁻ <i>leu1</i> ⁻ <i>leu2</i> ⁺	
<i>thr</i> ⁺ <i>leu2</i> ⁻ <i>leu1</i> ⁺	} 4 scambi per avere +++
<i>thr</i> ⁻ <i>leu2</i> ⁺ <i>leu1</i> ⁻	
Ordine giusto dei marcatori:	
<i>thr</i> - <i>leu2</i> - <i>leu1</i>	

l'ordine giusto dei marcatori è con *leu2* centrale perché nel secondo incrocio per ottenere il ricombinante + + + sono necessari 4 scambi e la frequenza è altrettanto bassa (17%) rispetto ai 2 scambi se fosse *leu1* centrale.

I fenotipi fagici

Un fenotipo fagico è possibile discriminarlo solamente effettuando un'infezione di un fago in un ceppo batterico. Un fenotipo fagico di semplice visualizzazione è la **morfologia della placca di lisi**: la placca di lisi è il risultato dell'infezione fagica su un ceppo batterico che cresce in un terreno solido e può essere grande o piccola, torbida o chiara, con margini netti e definiti o frastagliati. Un secondo fenotipo fagico è la **specificità d'ospite** perché esistono alcuni fagi mutanti che non sono in grado di infettare tutti i ceppi batterici, cioè sono specifici per un certo ceppo batterico. Un altro fenotipo fagico è la **sensibilità alla temperatura** (alcuni ceppi fagici non riescono a compiere il loro ciclo vitale al di sotto o al di sopra di una certa temperatura).



Figura 8.7 ► Morfologia delle placche del batteriofago T4. (a) Placche di lisi formate da un ceppo selvatico di T4 (r^+) e da mutanti a lisi rapida (r) su uno strato confluyente di cellule di *E. coli* di ceppo B. (b) Singole placche r^+ e r^- mostrate a più alto ingrandimento.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

La morfologia di placca

Immaginiamo di avere una piastra contenente terreno al quale è stato addizionato agar e di aver piastrato tante cellule batteriche che dopo una notte di crescita a 37°C hanno creato uno strato di cellule a confluenza (un tappeto batterico), allestiamo un'infezione fagica facendo cadere delle gocce di una soluzione contenente dei batteriofagi su questa

piastra: in alcune cellule entrerà un fago e in corrispondenza di queste si innescherà un ciclo litico rapidamente (se il batteriofago è a ciclo litico), le cellule verranno lisate e le particelle fagiche che usciranno da esse infetteranno le cellule circostanti che in breve tempo saranno anch'esse lisate e continuerà il ciclo; e in corrispondenza delle cellule lisate osserveremo dei buchi, ovvero delle **placche di lisi**. Nell'immagine osserviamo due tipi diversi di placche di lisi, r^+ ed r^- : in questo caso è stata fatta un'infezione con un fago T4 a **lisi rapida** (r) e un fago T4 **selvatico** (r^+). Le placche selvatiche sono più piccole ed hanno i contorni frastagliati rispetto alle placche a lisi rapida che sono più grandi ed hanno i contorni più netti.

La specificità d'ospite

Nell'immagine osserviamo il risultato di un'infezione utilizzando dei fagi T2 **selvatici** (h^+) e fagi T2 **mutanti** (h); questa mutazione determina **specificità d'ospite**, ovvero i fagi mutanti h sono in grado di infettare solo un ceppo di Escherichia Coli di tipo **B** e non sono in grado di infettare un altro ceppo di Escherichia Coli di tipo **B/2**. Se facciamo crescere a confluenza su questa piastra una miscela di cellule di Escherichia Coli che comprendono sia il ceppo B che quello B/2 e poi facciamo un'infezione fagica sia con ceppi T2 h^+ (che infettano sia il ceppo Coli B che il ceppo Coli B/2) sia ceppi T2 h (che infettano solo il ceppo Coli B), osserveremo dopo una notte di crescita la formazione di placche di lisi e potremo distinguere quelle che si sono originate dall'infezione dei fagi h^+ e quelle che si sono originate dall'infezione dei fagi h : le placche di lisi originate dai fagi h^+ saranno chiare perché i fagi selvatici infettano sia Coli B sia Coli B/2; quelle originate dai mutanti h saranno torbide perché all'interno ci sarà qualche cellula Coli B/2 che non è stata infettata dal batteriofago mutante h . Quindi a seconda delle placche di lisi (chiare o torbide) riusciamo a discriminare il fenotipo fagico **specificità d'ospite**.



Figura 8.8 ► Morfologia delle placche del batteriofago T2. Placche generate dall'infezione mista con fagi T2 selvatici (h^+) e fagi mutanti per spettro d'ospite (h) su uno strato misto di cellule di *E. coli* B e B/2.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

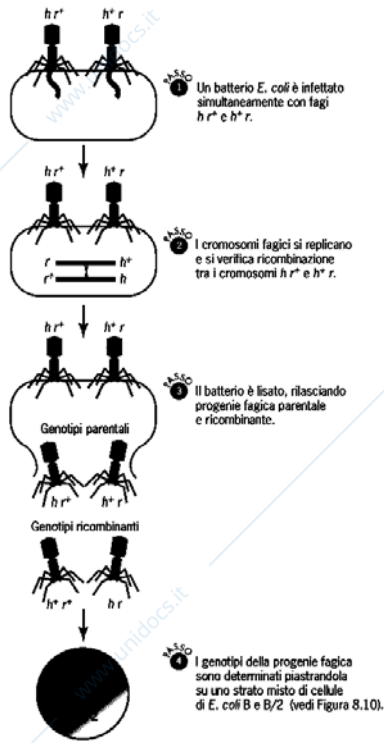
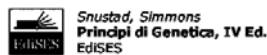


Figura 8.9 ► Incrocio tra batteriofagi in cui le cellule di *E. coli* di ceppo B sono state infettate simultaneamente con virus T2 hr^+ e h^+r .



allora stiamo contando i **fagi parentali** e i **fagi ricombinanti**: il numero di placche torbide con margini netti saranno h^+r (parentali); il numero di placche chiare con margini frastagliati saranno hr^+ (parentali); il numero di placche torbide con margini frastagliati saranno h^+r^+ (ricombinanti); il numero di placche chiare con margini netti saranno hr (ricombinanti). In un esperimento del genere riusciamo ad osservare il 2% circa di **progenie ricombinante**. Questo risultato ci offre anche una **stima della distanza di mappa**, ovvero significa che i marcatori h ed r sono distanti 2cM. Queste infezioni miste di solito le chiamiamo **incroci fagici** anche se non è corretto perché i fagi non fanno riproduzione sessuale.

Evoluzione del concetto di gene

L'esistenza della ricombinazione fagica è stata fondamentale per la comprensione della natura del gene. Abbiamo detto precedentemente che un **gene** è un tratto di DNA responsabile di un certo fenotipo, codifica quindi un polipeptide, ma non è sempre vero perché ci sono dei geni che trascrivono RNA che non viene mai tradotto in polipeptide ma che svolge la sua funzione come RNA (ribosomale, messaggero o miRNA). Con **Mendel** (1866) abbiamo parlato di **caratteri**, ciascuno dei quali determina un fenotipo (fenotipi alternativi). Successivamente abbiamo parlato degli

La genetica fagica e la ricombinazione

Con i fagi è possibile effettuare qualcosa di molto simile ad un incrocio se allestiamo un'**infezione mista**, cioè infettiamo un ceppo batterico utilizzando due tipi differenti di ceppi fagici e un **titolo fagico**, cioè una quantità tale di fagi che consenta ai due diversi ceppi fagici di coinfettare la stessa cellula batterica. Nell'immagine abbiamo un ceppo hr^+ e un ceppo h^+r che inietta contemporaneamente il loro DNA all'interno di una cellula batterica che viene infettata: questa cellula ora conterrà il cromosoma del ceppo hr^+ e il cromosoma del ceppo h^+r , due cromosomi omologhi che possono **ricombinare**, e se avviene ricombinazione (tra r ed h) si formeranno **fagi ricombinanti** h^+r^+ e hr rispetto ai fagi parentali. Poiché abbiamo degli strumenti per discriminare i genotipi fagici sulla base della morfologia di placca e della specificità d'ospite possiamo verificare se la ricombinazione avviene o meno effettuando un'infezione mista. Il fenotipo r^+ dà placca piccola ed il fenotipo r dà placca grande; il fenotipo h^+ mostra infezione su Coli B e su Coli B/2 e il fenotipo h mostra infezione solo su Coli B.

Nell'infezione mista che stiamo osservando i due ceppi fagici infettano uno strato di cellule costituito da Coli B e Coli B/2; se osserviamo la morfologia di placca e il numero di placche di lisi di ciascun tipo

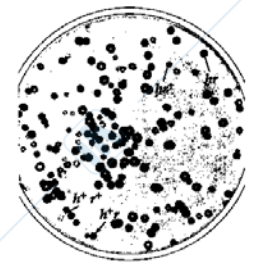
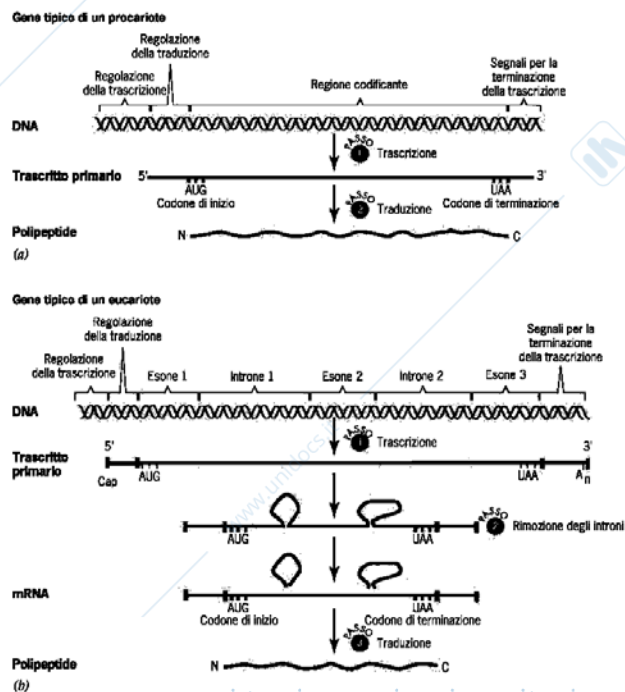
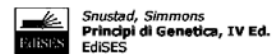


Figura 8.10 ► Batteriofago T2: placche a fenotipo spettro d'ospite e lisi rapida. Fotografia che mostra i tipi di placche generate da fagi T2 hr^+ , h^+r , hr^+ e h^+r su uno strato misto di cellule di *E. coli* B e B/2.



errori congeniti del metabolismo (1909): Garrod ipotizzava quindi che un gene qualora fosse mutato corrispondesse ad un blocco metabolico specifico e che quindi un gene codificasse un enzima.

Mutazioni metaboliche in *Drosophila* (Beadle ed Ephrussi, 1937)

Spesso abbiamo osservato che i prodotti codificati da geni differenti complementano e determinano un **unico fenotipo**. Beadle ed Ephrussi effettuarono degli esperimenti in *Drosophila* su due geni mutanti (cinnabar **cn** e vermilion **v**). Il colore dell'occhio selvatico di *Drosophila* è rosso scuro dato dall'unione di due pigmenti (marrone e rosso brillante), sia i mutanti **cn** che i mutanti **v** hanno uno stesso fenotipo dell'occhio (rosso brillante) perché sono incapaci di sintetizzare il pigmento marrone. Questi scienziati fecero dei trapianti di **dischi immaginali**: nel momento in cui si forma la larva si ha la definizione di tutti i territori che porteranno alla formazione nell'adulto di specifiche strutture, quindi se prendiamo un gruppo di cellule che si trova in uno specifico punto nella larva e lo trasferiamo in un'altra larva ma in una posizione differente, quando questa seconda larva diventerà adulta, nella posizione in cui ha ricevuto le cellule trapiantate si formerà la struttura specifica che si doveva formare da quelle cellule perché nella larva si ha la formazione di questi dischi immaginali che contengono cellule non differenziate che possiedono un'informazione già definita. Beadle ed Ephrussi prelevavano cellule dal disco immaginale dell'occhio di una larva di *Drosophila* e le trapiantavano in un'altra larva di *Drosophila* in una posizione opposta a quella in cui si trova il disco immaginale dell'occhio; nella *Drosophila* adulta si osserveranno occhi nella posizione normale e un altro paio di **occhi ectopici** nella posizione dove erano state trapiantate le cellule del disco immaginale. Se gli scienziati prendevano cellule dal disco immaginale di una **larva selvatica** e le trasferivano in una **larva mutante (cn o v)** in posizione opposta rispetto a quella del disco immaginale nella larva selvatica, la *Drosophila* mutante adulta che si sviluppava aveva un paio di occhi mutanti (**cn** o **v**) e un paio di occhi ectopici selvatici (rosso scuro) nella posizione caudale del corpo. Se gli scienziati prendevano cellule dal disco immaginale di una **larva mutante (v)** e le trasferivano in una **larva selvatica** in posizione opposta rispetto a quella del disco immaginale nella larva mutante, la *Drosophila* selvatica adulta che si sviluppava aveva un paio di occhi selvatici (rosso scuro) e un paio di **occhi ectopici selvatici** (rosso scuro) nella posizione caudale del corpo: questa situazione si ripeteva a prescindere del genotipo della larva mutante donatrice. Se gli scienziati prendevano cellule dal disco immaginale di una **larva mutante (v)** e le trasferivano in una **larva mutante (cn)** in posizione opposta rispetto a quella del disco immaginale nella larva mutante donatrice, la *Drosophila* mutante adulta che si sviluppava aveva un paio di occhi mutanti (**cn**) e un paio di **occhi ectopici selvatici** (rosso scuro) nella posizione caudale del corpo. Se gli scienziati prendevano cellule dal disco immaginale di una **larva mutante (cn)** e le trasferivano in una **larva mutante (v)** in posizione opposta rispetto a quella del disco immaginale nella larva mutante donatrice, la *Drosophila* mutante adulta che si sviluppava aveva un paio di occhi mutanti (**cn**) e un paio di **occhi ectopici mutanti (cn)** nella posizione caudale del corpo.

- Gli occhi dei moscerini sono di colore rosso scuro per la presenza di due pigmenti, uno rosso acceso e uno marrone.
- I mutanti del gene *v* o del gene *cn* hanno occhi rosso acceso a causa della mancanza del pigmento marrone.
- Trapiantando dischi immaginali di una larva mutante *v* o *cn* in una larva selvatica si ottiene un moscerino con occhi ectopici rosso scuro (selvatici) per diffusione del pigmento del moscerino selvatico.
- Trapiantando dischi immaginali di una larva *v* in una larva *cn* si ottiene un moscerino con occhi ectopici selvatici, ma trapiantando dischi *cn* in una larva *v* il moscerino sviluppa occhi ectopici rosso brillante!

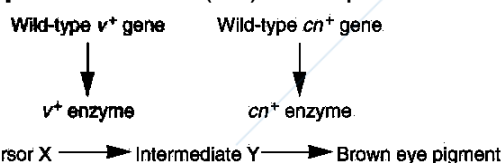


Figure 15.5 Beadle and Ephrussi's interpretation of the results of their reciprocal transplants of vermilion and cinnabar eye disks in *Drosophila*. They proposed that the *v*⁺ and *cn*⁺ genes control two different steps in the synthesis of the brown eye pigment and that the *v*⁺ gene product acts before the *cn*⁺ gene product.
Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

A questo punto ipotizzarono che per il colore dell'occhio di *Drosophila*, i geni **cn** e **v** fossero due geni differenti e ciascuno di questi codificasse un enzima coinvolto in uno specifico passaggio della via metabolica che portava alla formazione del pigmento marrone: il prodotto del gene **v** è un enzima che catalizza la trasformazione di un precursore in un intermedio, il quale poi viene trasformato

dall'enzima codificato dal gene **cn** in prodotto finale (pigmento marrone). Quindi se prendiamo il disco immaginale da una larva **v** (incapace di produrre il primo enzima, ma capace di produrre l'enzima **cn**) e lo trapiantiamo in una larva **cn** (che produce il primo enzima ma non il secondo) osserviamo occhio ectopico selvatico perché la larva ricevente possiede il primo enzima funzionale (**v**⁺) e quindi anche l'intermedio, e per diffusione l'intermedio può entrare nelle cellule del disco immaginale trapiantato ed essere trasformato dall'enzima codificato da **cn** in pigmento marrone. Al contrario, quando il donatore è **cn** (che produce il primo enzima ma non il secondo **cn**) e il ricevente è **v** (incapace di produrre il primo enzima, ma capace di produrre l'enzima **cn**) non è possibile arrivare alla produzione del pigmento marrone nonostante il ricevente abbia l'enzima **cn** funzionale perché non c'è un precursore né un intermedio che possano essere trasformati.

Beadle e Tatum (1942) - Un gene, un enzima

- La muffa del pane *Neurospora crassa* cresce generalmente su un terreno di coltura minimo, in quanto riesce a sintetizzare la maggior parte dei metaboliti essenziali (ceppi **prototrofi**).
- Se la biosintesi dei metaboliti essenziali è sotto il controllo genetico, è possibile isolare mutanti per irradiazione che necessitano di specifiche aggiunte nel terreno di coltura (ceppi **auxotrofi**).
- Ciascuna mutazione corrisponde a una specifica richiesta metabolica: un gene – un enzima.
- Studi successivi, ad esempio su enzimi eteromultimerici e sull'emoglobina consentirono di modificare questo concetto in un gene – un enzima.

I geni rappresentano la più piccola unità strutturale, mutazionale e funzionale?

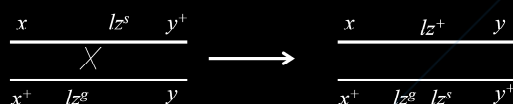
Il filo di perle

- Prima del 1940, il gene era considerato l'unità di base dell'informazione genetica, definito da tre criteri:
 - **Unità di funzione:** in grado di controllare l'ereditarietà di un fenotipo (un gene – un fenotipo).
 - **Unità di struttura:** non divisibile per ricombinazione né per mutazione (un gene – una mutazione).

Il gene era visto come un'unità di **mutazione** e unità di **ricombinazione**: si credeva che un gene potesse mutare in una forma alternativa in una posizione e che la ricombinazione potesse avvenire solo tra geni differenti e che non potesse avvenire nello stesso gene; quindi l'unità di mutazione e di ricombinazione fosse il gene. Questa convinzione era errata.

Oliver (1940) – ricombinazione intragenica del locus *lozenge*

- Le mutazioni del locus X-linked *lozenge* influenzano la forma dell'occhio di *Drosophila*.
- Due mutazioni, *lz*^s e *lz*^g, erano considerate alleli dello stesso gene in quanto gli eterozigoti *lz*^s/*lz*^g hanno occhi a losanga, mutanti.
- Quando femmine *lz*^s/*lz*^g sono incrociate con maschi *lz*^s o *lz*^g, circa lo 0,2% della progenie è selvatica!
- Questi individui selvatici si originano in seguito alla ricombinazione tra le mutazioni *lz*^s e *lz*^g, perché presentano sempre marcatori fiancheggianti ricombinanti e la frequenza di 0,2% è molto più elevata del tasso spontaneo di reversione delle mutazioni.



Oliver (1940) - Ricombinazione intragenica del locus *lozenge*

Oliver era un genetista che studiava *Drosophila*; si soffermò su una mutazione X-linked che determinava occhio a **losanga**, una morfologia particolare dell'occhio di *Drosophila*. In particolare aveva isolato due ceppi di mutanti che avevano lo stesso fenotipo, queste due mutazioni erano *lozenge s* e *lozenge g* (**lz**^s **lz**^g). Costruendosi una femmina eterozigote per queste due mutazioni (**lz**^s **lz**^g) Oliver notò che continuava ad avere fenotipo mutante, di conseguenza pensò che si trattasse di due mutazioni dello stesso gene. In-

crociando poi una femmina eterozigote (**lz**^s **lz**^g) per un maschio mutante (**lz**^s oppure **lz**^g) nella progenie osservava lo 0,2% di progenie con occhio selvatico: lo 0,2% è una percentuale troppo alta per poter essere una retromutazione. Di conseguenza Oliver ipotizzò che i selvatici fossero il prodotto della **ricombinazione** tra le due mutazioni (**lz**^s e **lz**^g) e per dimostrarlo si costruì dei ceppi eterozigoti che avessero dei marcatori fiancheggianti in configurazioni opposte.

Nell'immagine quindi abbiamo i marcatori fiancheggiati in trans ($x\ lz^s\ y^+/x^+ lz^g\ y$); nei moscerini selvatici ottenuti nella progenie (lo 0,2%) i marcatori fiancheggiati dovevano essere in assetto ricombinante rispetto alla configurazione dei mutanti. Questa è stata la prima dimostrazione che la ricombinazione può avvenire anche all'interno dello stesso gene.

Restava da chiarire quale fosse l'unità minima di ricombinazione, cioè fino a che punto si può scendere all'interno della stessa regione di un gene perché possa avvenire ricombinazione tra due cromosomi omologhi e per risolvere questo problema c'era bisogno di un sistema fagico, perché a differenza di *Drosophila* consente di avere una progenie molto numerosa in breve tempo e in poco spazio. Infatti **Benzer** ha chiarito e definito in un sistema fagico che l'unità minima di ricombinazione e di mutazione è la **coppia di basi**.

Esperimenti con sistemi modello differenti (progenie molto più numerosa) confermarono la scoperta di Oliver e dimostrarono che l'unità minima di mutazione è la coppia di basi e quella di ricombinazione è costituita da due coppie di basi adiacenti.

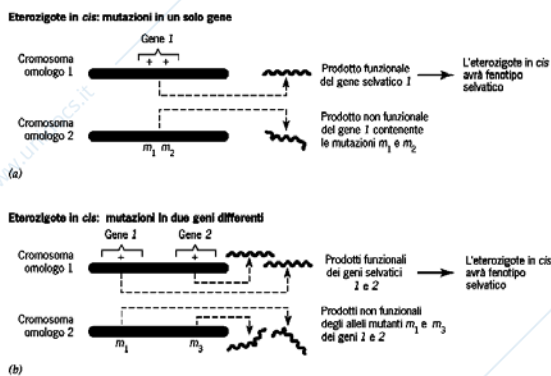


Figura 14.10 ► Il test in cis. L'eterozigote in cis deve presentare fenotipo selvatico, sia che le mutazioni si trovino nello stesso gene (a) sia che si trovino in geni differenti (b).

Shustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

mutazioni siano dello stesso gene o di geni differenti, nell'eterozigote in cis osserveremo sempre fenotipo selvatico, perché ci sarà sempre la controparte selvatica che produrrà un prodotto funzionale selvatico.

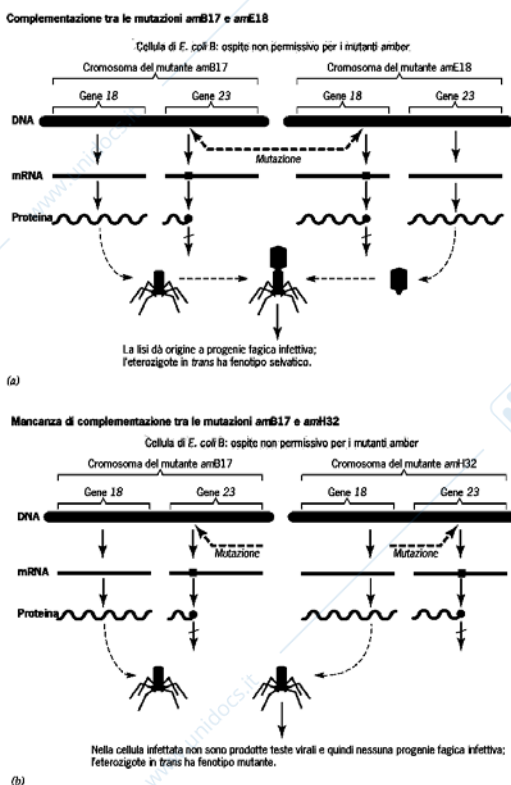


Figura 14.12 ► Complementazione e assenza di complementazione negli eterozigoti in trans. (a) Complementazione tra la mutazione amb17 del gene 23 del fago T4, che codifica la proteina principale della testa, e la mutazione amE18 del gene 18, che codifica la proteina principale della coda. All'interno della cellula vengono sintetizzate sia la testa sia la coda del fago, con produzione di progenie infettiva. (b) Quando l'eterozigote in trans contiene due mutazioni (amb17 e amH32) nello stesso gene 23, non viene prodotta la testa fagica e la progenie non può essere assemblata. Confronta con la Figura 14.13.

Shustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

Analisi della funzione genica: la complementazione (Lewis, 1951)

La **complementazione** è l'interazione di prodotti di geni differenti che sono coinvolti in un unico fenotipo e il **test di complementazione** ci consente di capire se due mutazioni che stiamo osservando e che determinano un unico fenotipo sono dello stesso gene o di geni differenti. Se facciamo un test di complementazione in **cis**, cioè mettiamo le due mutazioni in cis (sullo stesso cromosoma) sia che le due

Nel test di complementazione in **trans** invece, se mettiamo in trans due mutazioni di **geni differenti**, l'eterozigote in trans avrà **fenotipo selvatico** perché ciascuno dei due cromosomi avrà l'altro gene selvatico che produrrà un prodotto funzionale che potrà complementare con l'altro prodotto per dare il fenotipo selvatico; se invece le due mutazioni sono dello **stesso gene**, l'eterozigote in trans avrà **fenotipo mutato** perché su tutti e due i cromosomi ci sarà lo stesso gene mutato e l'altro gene sarà selvatico, di conseguenza solo uno dei due geni darà un prodotto funzionale mentre per il gene mutato mancherà il prodotto funzionale e non potrà avvenire la complementazione tra i due prodotti; quindi si osserva un fenotipo mutante.

EVOLUZIONE DEL CONCETTO DI GENE: UNO SGUARDO GENERALE

- **Mendel:** il gene è un fattore ereditario che controlla un carattere fenotipico specifico.
- **Garrod:** un gene mutante implica un blocco metabolico. Garrod ha studiato diversi difetti congeniti del metabolismo e analizzando gli alberi genealogici ha compreso che il difetto metabolico che origina una malattia era determinato dal materiale genetico.
- **Badle e Tatum:** un gene codifica per un enzima/ un polipeptide/ un trascritto (rna)
- **Oliver :** un gene è una coppia di nucleotidi indivisibile per ricombinazione
- **Lewis-Benzer :** un gene codifica un polipeptide (definizione funzionale spiegata con il test di complementazione)
- **Yanofsky-Brenner:** un gene è una sequenza continua di coppie di nucleotidi che specificano una sequenza aa.

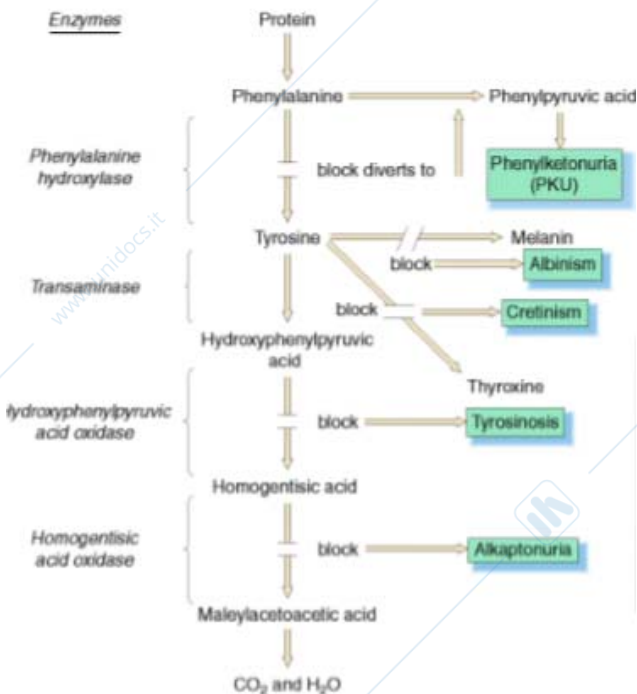
La definizione di gene deve essere flessibile per far riferimento a tutte le relazioni tra struttura e funzione nei vari organismi. In senso lato, un gene è l'unità di informazione genetica che controlla la sintesi di un polipeptide o di RNA e può essere definito operativamente dal test di complementazione.

Strutturalmente il gene è la regione trascritta per una molecola di RNA; nel caso dei geni sovrapposti, alcune sequenze nucleotidiche sono di più geni. Se gli introni sono eliminati il gene è una sequenza codificante di DNA.

I geni sono tutti nello stesso nucleo e sono dipendenti gli uni dagli altri. Il fenotipo è il prodotto di tutti i geni che si esprimono in relazione all'ambiente. Ogni gene ha anche un effetto sulla popolazione di appartenenza dell'individuo, così come sulla specie e così come sulla biosfera.

Gene (DNA) → RNA → PROTEINA → effetto sulla cellula → effetto sui tessuti → Effetto fenotipico individuo → effetto sulla popolazione → effetto sulla specie → effetto sulla biosfera

GARROD E LA CORRELAZIONE TRA GENE E DISFUNZIONE METABOLICA



Nel 1900 Garrod stava studiando diversi difetti congeniti del metabolismo come l'alcaptonuria facilmente diagnosticabile se si espongono le urine del paziente all'aria aperta e queste cambiano di colore.

Il responsabile di questo cambiamento è l'alcaptone, un prodotto intermedio del metabolismo della tirosina e della fenilalanina. La presenza di alcaptone nelle urine è associata ad un blocco nella via metabolica degli aa e analizzando gli alberi genealogici si è visto la malattia è trasmessa con modalità recessiva.

BEADLE E TATUM: UN GENE → UN ENZIMA / UN POLIPETIDE / UN TRASCRITTO

Chairirono la funzione del gene utilizzando *Neurospora crassa*. E' un lievito in grado di crescere in un terreno minimo con Sali inorganici, uno zucchero e la biotina. Da questi elementi minimi, è in grado di sintetizzare tutti i fattori di crescita necessari e la sintesi dei fattori di crescita è sotto il controllo genico. Conseguenza di ciò è che mutazioni nei geni per i fattori di crescita codificano prodotti mutanti che non riescono a ultimare la biosintesi del fattore di crescita che dovrà essere somministrato dall'esterno.

→ Esperimento

- 1) Spore asexuali selvatiche sono irradiate con raggi UV o X. Si ottengono ceppi mutanti.
- 2) I ceppi mutanti sono incrociati con ceppo selvatico di sesso opposto (i ceppi mutanti sono quelli che incrociati con un selvatico danno un rapporto di progenie 1:1)
- 3) Si ottiene un corpo fruttifero che contiene ascospore
- 4) Ogni ascospora è trasferita in una provetta di coltura che analizza le richieste nutrizionali generali : l'ascospora ha bisogno di aa o di vitamine per crescere? Ipotizziamo che ha bisogno di vitamine in quanto in un terreno minimo non riesce a crescere senza vitamine.
- 5) Analizzarono ora le richieste specifiche: di quali vitamine hanno bisogno?

Dimostrarono così che una mutazione corrisponde alla perdita di un'attività enzimatica.

Numerose proteine enzimatiche sono multimeri cioè sono formate da più polipeptidi e ogni catena può essere codificata da geni diversi o dallo stesso gene. Ad esempio l'emoglobina è tetramerica con due catene a-globuliniche e due b-globuliniche: il concetto un gene → un enzima si modifica in un gene → un polipeptide.

LA TEORIA DELLA COLLANA DI PERLE

Fino agli anni '50 si pensava che i geni sui cromosomi erano come perle di una collana e che la ricombinazione avvenisse solo fra perle differenti e non all'interno della stessa perla cioè solo da geni diversi e non all'interno dei geni.

Il gene quindi può essere definito come:

- a) Unità funzionale in quanto controlla attraverso i polipeptidi un carattere fenotipico
- b) Unità strutturale definibile a sua volta per:
 - Ricombinazione: un gene non può essere diviso
 - Mutazione: il gene è la più piccola unità che muta

(Poi arriva Benzer e vi scombina i piani eh eh eh)

OLIVER E LA PRIMA PROVA DELLA RICOMBINAZIONE INTRAGENICA

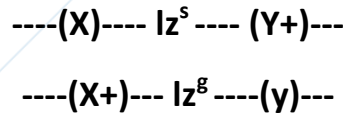
Clarence Oliver studiò due mutazioni del locus losenge sul cromosoma X di *Drosophila* lz^s e lz^g ritenute alleliche e che davano un fenotipo simile.

Incrociando femmine eterozigoti per le due mutazioni una volta per maschi solo con la mutazione lz^s e solo con la mutazione lz^g si ha una progenie composta dallo 0,2 % di selvatici.

Questa frequenza è troppo esigua e

- 1) Non è una reversione perché la frequenza di reversione nei maschi è $< 0,2\%$
- 2) Le femmine eterozigoti con i marcatori genetici che fiancheggiano il locus lozenge producono progenie selvatica per lz^+ ma con marcatori ricombinati

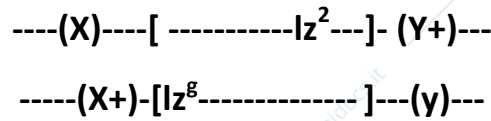
Ciò fa pensare che le femmine siano



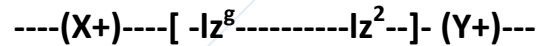
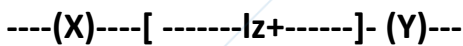
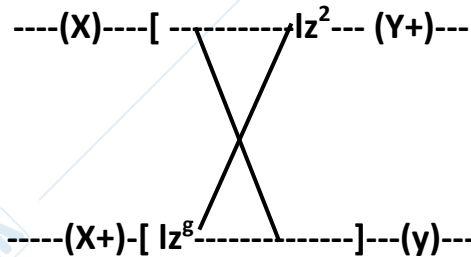
E la rara progenie

---(x)--- lz^+ ---(y) e non compare mai il reciproco con x^+ e y^+

Questo suggeriva che le mutazioni - lz^s - lz^g si trovassero in siti diversi dello stesso gene che lz^+ fosse il prodotto della ricombinazione di queste regioni



Con la ricombinazione si ottiene:



Il doppio mutante con marcatori ricombinati fu scoperto da Green, uno studente di Oliver.

La ricombinazione intragenica quindi produce selvatici con bassa frequenza e doppi ricombinanti.

I risultati di Oliver indicavano infatti che in un singolo gene esistono siti mutabili e separabili per ricombinazione. Benzer ampliò questa visione dimostrando l'esistenza di 199 diversi siti di mutazione separabili per ricombinazione nel gene rIIA del fago T4. Si dedusse quindi che la più piccola unità in grado di mutare è la singola coppia di nucleotidi e che la ricombinazione può avvenire tra coppie adiacenti di nucleotidi sia tra geni diversi sia nello stesso gene.

SUMMARY

- **Prima di Oliver, Yakonfsky, Benzer si credeva che...** LA MUTAZIONE COINVOLGESSE IL GENE IN TOTO
Dopo si è visto che... la più piccola unità a mutare è la coppia di nucleotidi.
- **Prima di Oliver, Yakonfsky, Benzer si credeva che...** la ricombinazione avviene tra un gene e l'altro
Dopo si è visto che... la ricombinazione può avvenire tra singole coppie di nucleotidi dello stesso gene o di un gene differente.

YAKONFSKY E 1) LA RICOMBINAZIONE INTRAGENICA; 2) LA COLLINEARITA' TRA SEQUENZA NUCLEOTIDICA E SEQUENZA AA

Yakonfsky capì principalmente due cose:

- OGNI MUTAZIONE NEL GENE CORRISPONDE AD UN POLIPEPTIDE DIFETTIVO E CHE C'E' CORRELAZIONE TRA LA SEQUENZA NUCLEOTIDICA E LA SEQUENZA AA NEL SENSO CHE IL PRIMO CODONE CORRISPONDE AL PRIMO AA
- OTTENNE UN RICOMBINATE SELVATICO TRA DUE MUTAZIONI CHE SOSTITUISCONO LO STESSO AA DIMOSTRANDO CHE L'UNITA' DI RICOMBINAZIONE PIU' PICCOLA E' LA COPPIA DI NUCLEOTIDI

Isolò molti mutanti auxotrofi per il triptofano con mutazioni del gene TrpA la cui forma selvatica codifica un polipeptide di 268 aa. Usò il sequenziamento proteico per determinare gli aa del polipeptide a selvatico e dei polipeptidi mutanti derivati da geni mutati. Mappò le mutazioni all'interno del gene trpA con incroci opportuni e vide la collinearità tra sequenza nucleotidica e sequenza aa. La presenza di introni non invalida la teoria della collinearità : significa solo che non vi è una relazione diretta in termini di distanza fisica tra le posizioni delle triplette e le posizioni degli aa sul polipeptide.

Per dimostrare la ricombinazione intragenica prese in considerazione due mutazioni che sono trpA23 che sostituisce la glicina con l'arginina e la mutazione trpA46 che sostituisce la glicina con l'acido glutammico: trpA23 e trpA46 sono due mutazioni in siti diversi dello stesso gene e quindi sono separabili per ricombinazione. Gli eventi che producono trpA26 e trpA43 sono transizioni tautomeriche G:C → A:T

La ricombinazione avviene tra coppie adiacenti e l'unità più piccola di ricombinazione è la coppia nucleotidica.

TEST DI LEWIS O COMPLEMENTAZIONE

Lessico:

- a) Complementazione: interazione tra prodotti di geni diversi per ottenere il fenotipo selvatico.
- b) Allelismo funzionale: due mutazioni presenti nello stesso gene e che sono riconosciute grazie al test della complementazione. Non daranno mai fenotipo selvatico perché due mutazioni nello stesso gene non complementano.
- c) Allelismo strutturale: due mutazioni presenti nello stesso gene che sono riconosciute attraverso la ricombinazione.
- d) Doppio eterozigote in cis o in trans: è un eterozigote per due mutazioni. Se le due mutazioni si trovano sullo stesso cromosoma, la configurazione è cis cioè $m1+ m2+ / m1 m2$; se le due mutazioni si trovano una su un cromosoma e l'altra sull'altro cromosoma la configurazione è trans cioè $m1 m2+ / m1+ m2$

Il test di complementazione consente di stabilire se due mutazioni che danno fenotipo simile sono localizzate sullo stesso gene o su un gene diverso. Per fare ciò è necessario costruire doppi eterozigoti in

trans. Questi eterozigoti doppi in trans negli eucarioti sono prodotti incrociando omozigoti per le due mutazioni in analisi cioè:

- (P) AAbb x aaBB sono omozigoti per le due mutazioni a e b
- (F1) AaBb e le mutazioni (a e b) sono disposte in trans A b / a B

Nei virus, come il fago T4, i doppi eterozigoti in trans si hanno con coinfezione di un ceppo di E.coli ad esempio di T4 mutanti per due mutazioni diverse rIIA e rIIB sono due mutanti di rII+ che infettano insieme E.coli.

Una volta costruiti gli eterozigoti in trans si analizza il fenotipo:

- Se il fenotipo dell'eterozigote in trans è mutante, vuol dire che le due mutazioni che volevo analizzare sono mutazioni dello stesso gene: le mutazioni m1 e m2 sono nello stesso gene



- Se il fenotipo dell'eterozigote in trans è selvatico, vuol dire che le due mutazioni sono di geni diversi e i prodotti complementano per dare fenotipo selvatico:



In questi casi si può produrre il polipeptide selvatico sia di m1 e sia di m2 e si ottiene il fenotipo selvatico.

Idealmente il test di complementazione in trans deve essere accoppiato al test di complementazione in cis di controllo: l'eterozigote doppio mutante in cis sarà sempre selvatico sia se le mutazioni si trovano sullo stesso gene, sia se si trovano in geni diversi. Qualora il controllo fosse mutante, non si può proseguire con il test in trans.

Il test in trans si può usare per l'allelismo funzionale: facciamo un esempio.

amB17 e amH23 sono due mutazioni del gene 23 del fagot T4 che codificano per la proteina fondamentale della testa;

amE18 è una mutazione del gene 18 che codifica per la proteina fondamentale del corpo

- Ho un doppio eterozigote in trans per amB17 e amE18 e osservo il fenotipo: le due mutazioni sono in geni diversi, quindi vuol dire che il gene che ha la mutazione amB17 avrà come selvatico il gene amE18 e quindi produrrà il polipeptide per la coda mentre il gene che ha la mutazione amE18 avrà selvatico il gene amB17 e produrrà il polipeptide per la testa. In conclusione si avrà un fago selvatico.
- Ho un doppio eterozigote in trans per amE18 e amE18: le mutazioni si trovano sullo stesso sito quindi non sarà prodotto il polipeptide della coda ma solo della testa perché il gene 23 non ha le mutazioni amB17 e amH23.

Quindi l'allelismo strutturale fa riferimento a due mutazioni nello stesso gene ed è definito con la ricombinazioni perché due mutazioni che non ricombinano o sono nello stesso sito o sono sovrapposte; l'allelismo funzionale fa riferimento a due mutazioni nello stesso gene ed è definito con il test di complementazione in quanto due mutazioni nello stesso gene non complementano.

THE LAST BUT NOT THE LEAST : IL TEST IN TRANS SI USA SOLO CON LE MUTAZIONI RECESSIVE

COMPLEMENTAZIONE INTRAGENICA

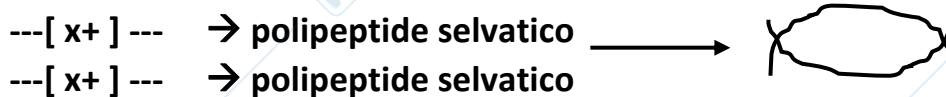
In genere i test di complementazione non sono ambigui quando si analizzano mutazioni che determinano:

- 1) Un prodotto non funzionale
- 2) Un prodotto parzialmente funzionale
- 3) La mancanza di un prodotto

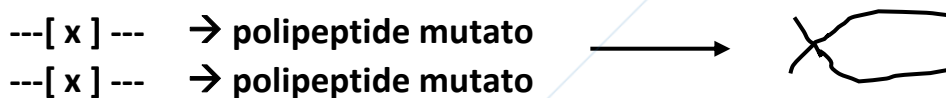
Possono essere invece ambigui i test di complementazione intragenica che riguardano sostituzioni amminoacidiche. La complementazione intragenica si verifica quando la proteina è un multimerico, cioè formata da più polipeptidi, contenente almeno due copie di un prodotto genico.

Ho un gene X che codifica un'enzima che è costituito da due subunità, cioè l'enzima è un dimero (omodimero).

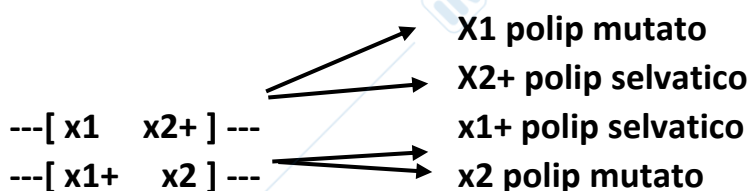
- Se il gene è selvatico, in entrambe le copie del diploide $x+x+$ l'omodimero è selvatico cioè il primo $x+$ forma un polipeptide selvatico, il secondo $x+$ forma un polipeptide selvatico e in conclusione ho un omodimero selvatico funzionale:



- Se il gene è mutato cioè c'è una mutazione in omozigoti, una copia darà un polipeptide mutato e l'altra un polipeptide mutato



- Un eterozigote in trans per due mutazioni diverse nello stesso gene



- a) Poli x1 mutato + poli x1 mutato = omodimero non funzionale
 b) Poli x2 mutato + poli x2 mutato = omodimero non funzionale
 c) Poli x1 mutato + poli x2 mutato = selvatico o parzialmente selvatico perché la complementazione strutturale si dilata anche in complementazione funzionale e ci darà se non un enzima selvatico al 100%, un polipeptide intermedio che mima una situazione di normalità.

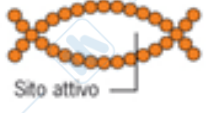
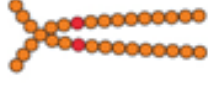
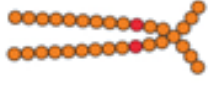
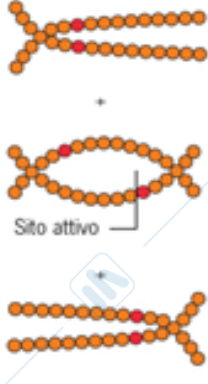
Genotipo	Proteina	Fenotipo
Gene Selvatico	 Attiva	Selvatico
Mutazione Mutante 1	 Inattiva	Mutante
Mutazione Mutante 2	 Inattiva	Mutante
Eterozigote in trans	 Attiva	Selvatico o intermedio

Figura 14.14 ► In alcuni casi avviene complementazione *intragenica* quando la forma attiva di un enzima o di una proteina strutturale è un multimero che contiene almeno due copie di ogni prodotto genico. In questo caso, la forma funzionale dell'enzima è un dimerico costituito da due polipeptidi codificati da un unico gene. Gli aminoacidi alterati dalle mutazioni sono raffigurati da cerchi rossi nelle catene polipeptidiche; essi impediscono la formazione della normale struttura tridimensionale della proteina.

CODICE GENETICO

Quando si comprese che i geni erano depositari dell'informazione genetica e che tale informazione veniva esplicitata, nella maggior parte dei casi, con la formazione di polipeptidi era necessario comprendere con quali modalità il linguaggio contenuto nelle 4 basi azotate del DNA diventasse il linguaggio dei 20 amminoacidi presenti in natura. Era necessario quindi una chiave di lettura che collegasse le informazioni contenute nel DNA e le informazioni delle proteine.

Si stipulò quindi l'esistenza del codice genetico le cui caratteristiche più importanti sono:

- 1) Il codice genetico è costituito da triplette di nucleotidi e ogni tripletta corrisponde ad un amminoacido. Pertanto, il codone è una tripletta di nucleotidi
- 2) Il codice genetico non è sovrapposto: ogni nucleotide fa parte del proprio codone
- 3) Il codice genetico non ha punteggiature: tra un'unità informazionale ed un'altra non vi sono virgole o punti ma vi è una lettura consecutiva di tutti i codoni
- 4) Il codice genetico è degenerato: più codoni possono codificare lo stesso amminoacido
- 5) Il codice genetico è ordinato: i diversi codoni che codificano per uno stesso amminoacido e i codoni che codificano per amminoacidi con le stesse proprietà chimico-fisiche sono correlati tra loro
- 6) Il codice genetico presenta codoni di inizio e di fine
- 7) Il codice genetico è quasi universale cioè i codoni hanno quasi lo stesso significato in tutti gli organismi.

NATURA DEL CODICE GENETICO: Gli esperimenti di Crick e Brenner

Crick e Brenner fecero una serie di esperimenti che evidenziarono:

- a) Il codice genetico non ha punteggiatura
- b) Il codice genetico è costituito da triplette di nucleotidi

L'organismo modello usato è il **FAGOT4** che è un fago virulento con ciclo litico. Il fenotipo in esame è stato il fenotipo "specificità d'ospite": trovarono un mutante del fagoT4 chiamato rII che era incapace di crescere su E.coli ceppo λ cioè su un terreno restrittivo rispetto al selvatico che era in grado di crescere sia su E.coli ceppo B e sia su E.coli ceppo λ .

Gli esperimenti di Crick e Brenner

Pre-esperimento: Crick e Brenner fecero un pre-esperimento. Dei ceppi selvatici di T4 vennero sottoposti a mutagenesi con proflavina. All'epoca non si conosceva il meccanismo d'azione della proflavina cioè con quale meccanismo la proflavina induce mutazione. Conoscevano però bene il meccanismo di azione degli analoghi di base come il 5-bromouracile che agiva per sostituzione. Quindi :

- a) Un ceppo selvatico di T4 su sottoposto ad un primo ciclo di mutagenesi con un analogo di base e si ottenne un T4 mutato. Questo T4 mutato fu sottoposto ad un secondo ciclo di mutagenesi con l'analogo di base e si ottenne il fenotipo selvatico. C'era stata quindi una retromutazione cioè una mutazione che cade nello stesso posto della prima mutazione in grado di revertire il mutante a fenotipo selvatico. Con analogo di base si ha allora:
 $T4^+ \rightarrow rII \rightarrow T4^+$
- b) Un ceppo selvatico di T4 è sottoposto ad un primo ciclo di mutagenesi con proflavina e si ottiene un mutante. Il secondo ciclo di mutagenesi è effettuato con un analogo di base: non si ottiene il fenotipo selvatico ma rimane mutante.
 $T4^+ \rightarrow rII \rightarrow rII$

Questo pre-esperimento portò Crick e Brenner ad ipotizzare che la proflavina non fosse un analogo di base e che mediasse mutazioni utilizzando inserzioni o delezioni (oggi diremo che porta a mutazioni puntiformi e che è un agente intercalante).

I ESPERIMENTO: dimostrazione che il codice genetico non ha punteggiatura

Un ceppo di T4 selvatico è sottoposto a mutagenesi con proflavina: si ottiene un mutageno per specificità d'ospite chiamato FC0. FC0 viene sottoposto ad un secondo ciclo di mutagenesi con proflavina e si recupera una percentuale di T4 selvatici FENOTIPICAMENTE. Il tasso di T4 selvatici recuperati è maggiore rispetto al tasso di mutazione spontanea nel locus in esame.

Per scoprire se questo REVERTANTE, in quanto da mutageno è diventato di nuovo selvatico, è GENOTIPICAMENTE selvatico si incrocia il revertante con il selvatico:

rII+ = selvatico

"rII+"= revertante o pseudo-selvatico

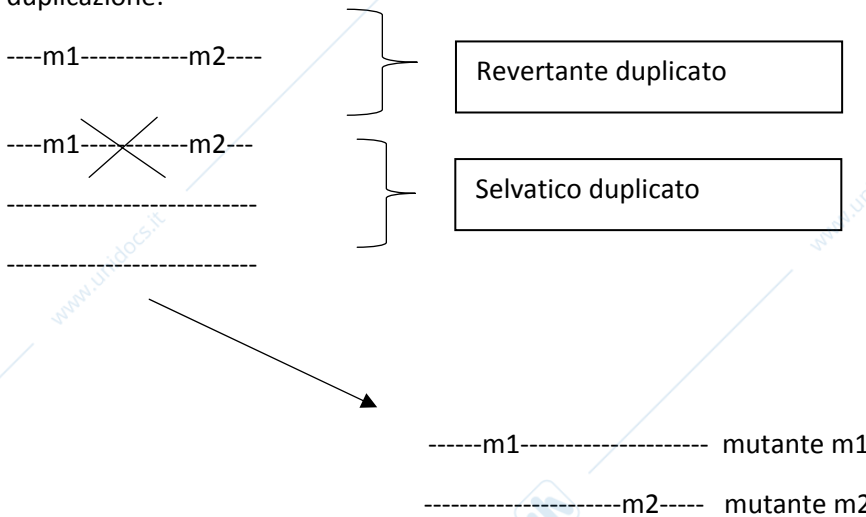
(P) rII+ x "rII+"

(F1) rII+ rII

Da questo incrocio otteniamo sia progenie selvatica e sia progenie mutata quindi il revertante genotipicamente non è selvatico. Se il revertante fosse stato genotipicamente selvatico, incrociandolo con il selvatico tutta la progenie sarebbe stata selvatica e il tasso di mutanti sarebbe stato equipollente al tasso di mutazione spontanea nel locus in esame.

Il revertante (P) è un doppio mutante con due mutazioni presenti nello stesso gene: una mutazione 1 che dà fenotipo FC0 e una seconda mutazione che invece sopprime la prima mutazione.

I mutanti di F1 derivano da crossing-over che avviene tra il selvatico e tra il revertante in seguito a duplicazione:



Il mutante M1 viene incrociato con FC0:

----m1----- x ----FC0----- → NESSUN SELVATICO

Da questo incrocio nessuno nella progenie è selvatico: ciò dimostra che FC0 è la mutazione originaria e le due mutazioni sono nello stesso sito.

Il mutante M2 viene incrociato con FC0:

-----m2--- x ----FC0----- → SIA SELVATICI E SIA MUTANTI

Questo incrocio dimostra che il fago rII è un nuovo mutante rispetto a FC0 che Crick e Brenner chiamarono FC1.

Il ceppo "rII*" del primo incrocio è un doppio mutante capace di crescere su E.Coli λ per le mutazioni FC0-FC1 sono soppressori intragenici reciproci.

La soppressione intragenica può avvenire solo se c'è una lettura continua delle informazioni contenute nella sequenza di nucleotidi cioè solo se il codice genetico non presenti punteggiature a monte e a valle di ogni unità informazionale.

II ESPERIMENTO: il codice genetico è formato da triplette di nucleotidi

FC1 subendo un ciclo con proflavina dava un mutante che subendo un secondo ciclo di proflavina aveva di nuovo FENOTIPO selvatico.

Questo pseudoselvatico del secondo ciclo con proflavina veniva incrociato con:

- Il ceppo selvatico
- I mutanti che ne derivavano venivano incrociati con FC1

Cioè venivano fatti gli stessi incroci precedenti.

In questo modo costruirono molti soppressori intragenici reciproci cioè molti mutanti di rII che singolarmente erano mutanti rispetto al fenotipo selvatico ma che in coppia erano soppressori intragenici per FCn-1 e Fcn+2

Questi doppi mutanti furono usati per classificare le mutazioni in due categorie:

- Mutazioni +
- Mutazioni -

Seguendo il principio per il quale il ceppo pseudo selvatico si ha quando ci sono due mutazioni opposte cioè una mutazione è + e una mutazione è - (in termini moderni diremo che poiché il processo è mediato dalla proflavina, una mutazione è un'inserzione e un'altra è una delezione).

La scoperta che il codice genetico fosse a triplette o per lo meno in base tre si ottenne quando costruirono i tripli mutanti: con un triplo mutante il fenotipo selvatico si otteneva solo quando vi erano tre mutazioni dello stesso ordine cioè o tre mutazioni +++ (3 inserzioni ad esempio) o tre mutazioni --- (3 delezioni ad esempio).

Se vi erano due inserzioni e una delezione o due delezioni e un'inserzione si aveva fenotipo mutante.

Questo è spiegabile solo con un codice genetico la cui unità fondamentale è formata da 3 nucleotidi.

Ipotizziamo che la seguente sequenza subisca una delezione

ATC AAC AA(T) GCG CCG * → filamento selvatico senza delezione (in parentesi c'è la base che subisce delezione nel filamento mutato)

ATC AAC AA GCG CCG → filamento mutato

Se volessimo seguire un codice di lettura a triplette di nucleotidi:

- 1) In entrambi i filamenti i primi due amminoacidi sarebbero identici perché si leggono i codoni ATC AAC

- 2) A partire dal terzo codone, gli amminoacidi saranno diversi perché nel filamento selvatico avrò come codoni AAT – GCG – CCG ; nel filamento mutato invece AAG – CGC – CG – . Questo è un frameshift.

Un discorso equipollente si può fare con un inserzione

Con un doppio mutante succederà che vi sarà un frameshift solo nella regione compresa tra le due mutazioni che copre poche triplette di nucleotidi. Quindi vi sarà una mutazione irrisoria che non influenzerà il fenotipo in quanto la cornice di lettura resta sempre selvatica. Spieghiamoci meglio con un disegno:

ATG AAC AAT GCG CCG GAG GAA GCG * → FILAMENTO SELVATICO

ATC AAC AAT [G]GCG CCG GAG GA (A) GCG → FILAMENTO MUTATO [] = INSERZIONE; () = DELEZIONE

Seguiamo la lettura:

- 1) In entrambi i filamenti i primi tre codoni sono ATG AAC AAT quindi avranno lo stesso aa;
- 2) Nel filamento selvatico seguono GCG CCG GAG GAA, nel filamento mutato invece GGC – GCC –GGA GGA –
- 3) In entrambi i filamenti alla fine c'è GCG quindi il frameshift è stato abolito e la cornice di lettura continuerà ad essere selvatica.

E' chiaro quindi che una tripla delezione o una tripla inserzione non provocano frameshift e quindi il codice genetico è costituito da triplette.

DECIFRAZIONE DEL CODICE GENETICO

Se ogni nucleotide corrispondesse ad un aa, con 4 nucleotidi copriremmo solo 4 dei 20 aa presenti in natura. Se il codice genetico fosse un nucleotide= un aa dovremmo aspettarci un codice genetico ambiguo dove una volta un nucleotide specifica per un aa e un'altra volta per un altro aa.

Un discorso equipollente al suddetto si può fare pensando che l'unità informazionale corrisponda a un dinucleotide cioè ogni due nucleotidi= un aa. Avremmo 16 su 20 combinazioni possibili.

Il codice genetico è invece a triplette : abbiamo quindi 64 combinazioni possibili per i 20 amminoacidi presenti in natura, un numero che può sembra eccessivo ma che è stato dimostrato essere il numero giusto.

- ➔ Per decifrare il codice genetico, **Matthei e Nirenberg** per primi effettuarono il processo di traduzione o sintesi proteica in vitro utilizzando come mRNA poli(U), poli(A), poli(C). Marcarono la fenilalanina con carbonio 14 e notarono che emetteva radioattività solo quando si utilizzava il poli (U). Quindi la fenilalanina era associata ad un codone UUU. Per dimostrare ciò marcarono i restanti aa con carbonio 14 e utilizzarono come precursore poli(U): la radioattività non veniva mai emessa. Associazono in questo modo poli(A) alla lisina e poli(C) alla prolina cioè AAA= LISINA e CCC= PROLINA. Il secondo esperimento fu quello di utilizzare copolimeri casuali che avessero la stessa percentuale di adenina e di citosina e di analizzare la frequenza degli aa.
- ➔ Uno degli esperimenti principe della decifrazione del codice genetico fu quello di **Ghobin e Khorana** che costruirono copolimeri con trinucleotidi in replica cioè UUG UUG UUG UUG UUG ad esempio. In questo copolimero, la lettura può cominciare in 3 punti
 - 1) Lettura 1 UUG UUG UUG UUG e si otteneva un poli leucina
 - 2) Lettura 2 UGU UGU UGU UGU e si otteneva un poli cisteina
 - 3) Lettura 3 GUU GUU GUU GUU e si otteneva un poli valina
- ➔ L'ultimo esperimento della decifrazione del codice genetico fu quello di valutare l'attività del tRNA sintetasi e l'efficienza del legame di Trna SINTETASI con Mrna: notarono che quando vi è un poli(U) come mRNA si attivava solo il tRNA sintetasi della fenilalanina.

AUG: CODONE DI INIZIO; UAA UAG UGA: CODONI DI STOP

Nel codice genetico sono presenti codoni di inizio e codoni di stop.

Il codone di inizio sia negli eucarioti e sia nei procarioti è AUG che viene riconosciuto da

- tRNA^{f^{met}} nei procarioti e AUG è codone di inizio quando è seguito da una specifica sequenza
- tRNA^{i^{met}} negli eucarioti e l'AUG codone di inizio è il primo AUG letto dai ribosomi

I codoni di stop sono UAA UAG UGA e sono riconosciuti dai fattori di rilascio:

- nei procarioti i fattori di rilascio sono RF1 che riconosce UAA UAG e RF2 che riconosce UAA UGA
- negli eucarioti vi è un solo fattore di rilascio che riconosce i tre codoni di stop.

DEGENERAZIONE DEL CODICE

Il codice genetico è degenerato: un amminoacido x può essere specificato da più di un codone. Spesso i codoni che specificano per lo stesso aa o per aa da proprietà chimiche simili sono correlati: differiscono per una sola base, la terza.

La degenerazione può essere parziale quando la terza base può essere sostituita solo da purine o solo da pirimidine: di conseguenza si ha un nuovo aa: può essere invece completa quando la terza base viene sostituita da tutte e quattro le basi e si ha sempre lo stesso aa.

UNIVERSALITA' DEL CODICE

I codoni hanno lo stesso significato in tutti gli organismi. Le rare eccezioni le possiamo trovare nei mitocondri dove:

- UGA codifica per il triptofano e non è un codone di stop
- AUA codifica per la metionina e non per l'isoleucina
- AGA AAG sono triplette di stop piuttosto che codificare per l'arginina.

BENZER E LA STRUTTURA FINE DEL GENE

Riprendiamo alcuni concetti:

- ➔ Prima di Benzer si pensava che il gene fosse un'unità indivisibile e che la ricombinazione avvenisse solo fra geni diversi. Attraverso gli esperimenti di Oliver in primis e di Yanofsky si è dimostrato che ciò non è vero e la ricombinazione intragenica è possibile e l'unità più piccola di ricombinazione sono due coppie nucleotidiche.
- ➔ Il test di complementazione si avvale dell'utilizzo di doppi eterozigoti in trans cioè sono eterozigoti per due geni che presentano mutazione ($m_1 m_2^+/m_1^+ m_2$) e le due mutazioni sono disposte in trans. Questi eterozigoti doppi in trans negli eucarioti sono prodotti incrociando omozigoti per le due mutazioni in analisi cioè:
(P) $AAbb \times aaBB$ sono omozigoti per le due mutazioni a e b
(F1) $AaBb$ e le mutazioni (a e b) sono disposte in trans $A b / a B$
Nei virus, come il fago T4, i doppi eterozigoti in trans si hanno con coinfezione di un ceppo di E.coli ad esempio di T4 mutanti per due mutazioni diverse $rIIA$ e $rIIB$ sono due mutanti di rII^+ che infettano insieme E.coli
- ➔ Il fago T4 ha un ciclo litico cioè uccide la cellula ospite.

Benzer si chiese due cose:

- a) La mutazione coinvolge il gene in toto oppure può avvenire mutazione negli elementi che compongono il gene?
- b) La ricombinazione avviene solo tra geni diversi oppure può avvenire tra le componenti dello stesso gene?

Per rispondere a tale domanda, utilizzo come organismo modello il fago T4 perché è facile da allevare e fa una progenie numerosa in modo tale da evidenziare gli eventi di ricombinazione rari come la ricombinazione intragenica.

Del fago T4 studiò il locus rII che determina la capacità del fago di infettare una cellula ospite e come la infetta cioè influenza due fenotipi:

- Specificità d'ospite
- Morfologia della placca di lisi

I fagi selvatici possono infettare sia il ceppo B di E.coli sia il ceppo restrittivo K12 di E.coli e la placca di lisi che formano ha margini frastagliati. I mutanti invece possono solo infettare il ceppo B di E.coli e formano una placca con margini lineari.

Benzer dimostrò che il locus rII era sotto il controllo di due geni che sono $rIIA$ e $rIIB$ e che i mutanti singoli in questi due geni non sono in grado di infettare il ceppo K12.

Produsse circa 20.000 mutanti del locus rII e per rispondere alle sue domande usò:

- 1) TEST DI COMPLEMENTAZIONE con il quale dimostrò che rII era formato da due geni
- 2) CON LE COINFEZIONI DI MUTANTI DOPPI IN $rIIA$ O $rIIB$ dimostrò la ricombinazione intragenica
- 3) UTILIZZO' LA MAPPATURA PER DELEZIONE per determinare le mutazioni puntiformi sul locus rII

TEST DI COMPLEMENTAZIONE

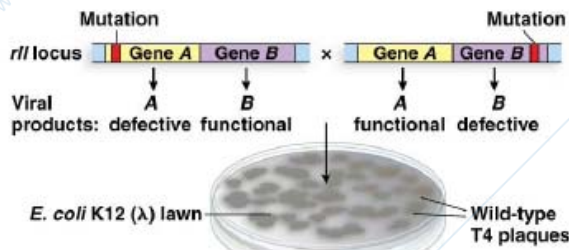
Isola due mutanti che mi danno lo stesso fenotipo: i mutanti non sono in grado di infettare K12.

Fa una coinfezione di questi mutanti su un terreno contenente K12: sta producendo eterozigoti in trans per due mutazioni.

Una volta avuta coinfezione osserva se si formano le placche di lisi o meno che in termini di test di complementazione significa se ho il fenotipo selvatico o se ho il fenotipo mutante.

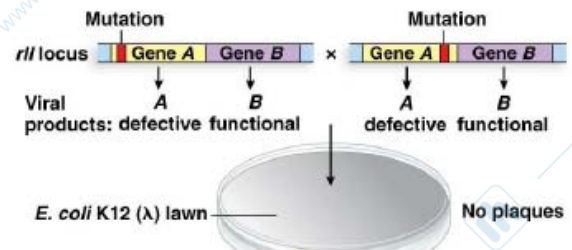
Dal test di coinfezione con due mutanti che danno lo stesso fenotipo ottengo placche di lisi cioè ottengo il fenotipo selvatico che è in grado di infettare il ceppo K12 di E.coli. Questo significa che le due mutazioni isolate si trovano su due geni diversi che tra loro complementano e che di conseguenza il locus rII è composto da due geni che chiameremo rIIA e rIIB.

(a) Complementation of mutations in different genes

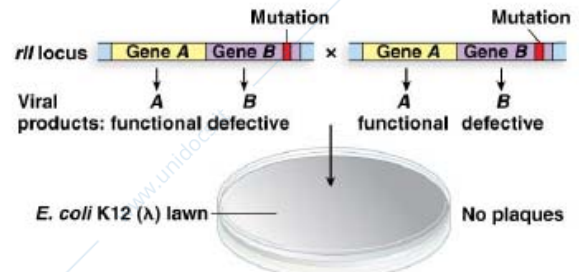


During simultaneous infection, complementation occurs because functional forms of both A and B proteins are present.

(b) No complementation of mutations in the same genes

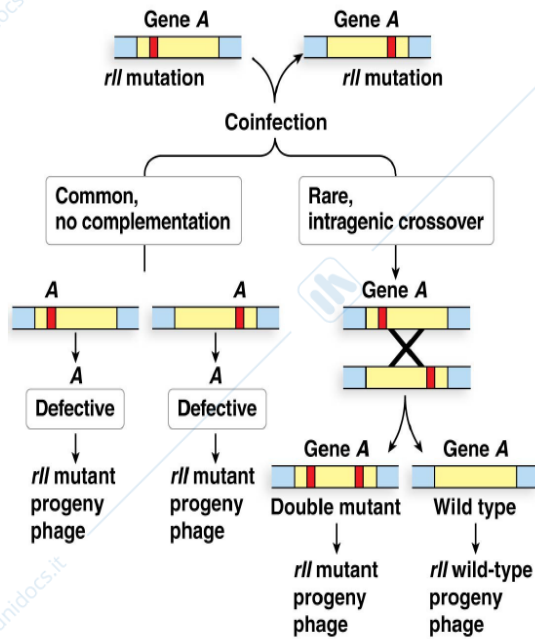


During simultaneous infection, no complementation occurs because no functional A proteins are present.



During simultaneous infection, no complementation occurs because no functional B proteins are present.

ANALISI DI RICOMBINAZIONE



A questo punto sarà assodato che mutazioni nello stesso gene anche se in siti diversi non complementano tra loro.

Come si spiega allora che la coinfezione tra due mutanti rIIA produca, anche se raramente, dei fagi T4 wt cioè selvatici?

Le due mutazioni in siti diversi dello stesso gene possono ricombinare tra loro dando sia fagi selvatici e sia fagi doppi mutanti.

Questo dimostra che la ricombinazione intragenica è possibile e che la più piccola unità di ricombinazione è rappresentata dalla coppia di nucleotidi.

A questo punto Benzer calcolò la frequenza di ricombinazione intragenica e la distanza di mappa tra due mutazioni nello stesso gene.

La frequenza di ricombinazione intragenica è data dalla formula:

$$F(RI) = \frac{2 \times n \text{ di selvatici ricombinanti}}{\text{progenie totale}}$$

Mentre la distanza di mappa cioè % di ricombinanti è data da

$$DM = \left(\frac{2x \text{ placche su K12}}{\text{placche su B}} \right) \times 100$$

Il numero di progenie fagica viene determinata diluendo il lisato e poi piastrando su un ceppo di E. Coli B.

Se in un campione diluito 10^6 volte ci sono 250 placche di lisi, nel campione originario erano presenti 250×10^6 fagi per unità di volume.

MAPPATURA PER DELEZIONE

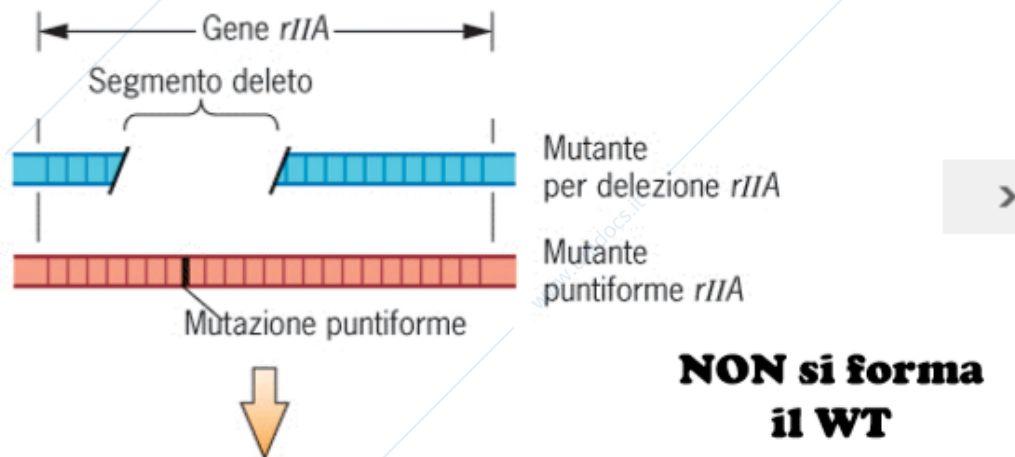
Le mutazioni prodotte da Benzer ricadevano principalmente in due classi:

- ➔ Mutazioni per delezione cioè mutanti non revertibili
- ➔ Mutazioni puntiformi cioè mutanti revertibili

Con questo tipo di mutazioni poteva usare la mappatura per delezione per stabilire la posizione di ciascuna mutazione puntiforme.

Coinfetta un ceppo di E.coli con mutanti per delezioni e mutanti puntiformi:

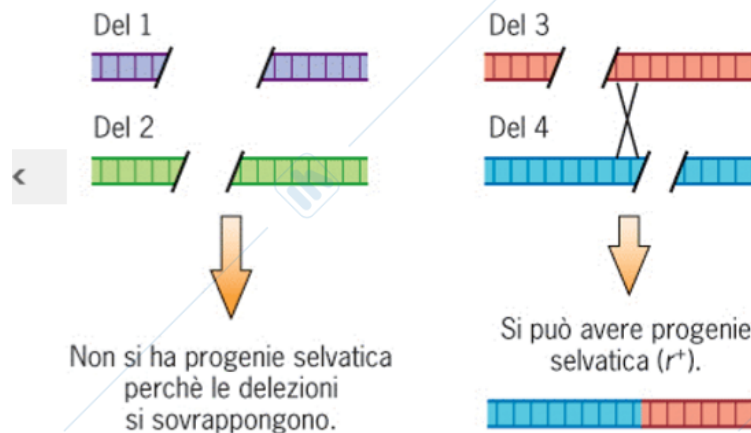
- a) se le due mutazioni sono sovrapposte cioè si trovano nello stesso sito dello stesso gene, non producono ricombinanti wt



Quando la mutazione puntiforme è compresa nella regione della delezione, non si producono cromosomi ricombinanti selvatici (r^+).

- b) se le due mutazioni non sono sovrapposte, possono ricombinare e fare il fenotipo wt.

Due delezioni NON sovrapposte possono invece ricombinare



Quindi quando incrocio un mutante per delezione e un mutante puntiforme se non ho il wt vuol dire che le due mutazioni sono sovrapposte e ciò implica che:

- 1) La regione della delezione contiene la mutazione puntiforme
- 2) conoscendo la mutazione puntiforme e la regione deleta posso associare ad ogni regione del cromosoma la sua mutazione puntiforme

Esempio banale ma esplicativo

Il mio mutante per delezione ha una delezione nella regione 1 che è formata ATTC. Questo mutante viene incrociato con un mutante che presenta una mutazione puntiforme come una inserzione nella regione 1 quindi sarà ATTCG.

Li incrocio, le mutazioni sono sovrapposte, non c'è possibilità di ricombinazione.

Io sono quindi che la mia mutazione puntiforme che è un'insertione si trova nella regione 1 del cromosoma perché è compresa dalla delezione che si trova nella regione 1 del cromosoma in esame.

Genetica di popolazioni



La genetica di popolazioni studia le variazioni genetiche cioè le differenze genetiche all'interno di una popolazione.

È un'estensione del mendelismo che fa riferimento non più ai genomi di singoli individui bensì fa riferimento al pool genico della popolazione.

Le popolazioni possono essere:

- ➔ polimorfiche se per un dato locus sono presenti più alleli
- ➔ monomorfiche se per un dato locus vi è una sola forma e quindi il locus è fissato e la popolazione è omozigote per tale locus

La genetica di popolazioni analizza le frequenze alleliche cioè quanti alleli di un tipo e quanti alleli di un altro tipo sono presenti all'interno della popolazione.

Le frequenze alleliche possono essere calcolate a partire dalle frequenze genotipiche in due modi:

- ➔ regola della conta: si contano gli alleli nella popolazione e la frequenza è data dalla somma degli alleli in omozigosi $\times 2$ + il numero di alleli in eterozigosi / totale $\times 2$

ad esempio:

MM= 50

MN= 40

NN=10

Il gruppo sanguigno MM è genotipicamente $L^M L^M$, MN $L^M L^N$ e NN è $L^N L^N$.

Quindi calcoliamo con la regola della conta allele L^M e l'allele L^N

$$F(L^M) = ((50 \times 2) + 40) / 100 \times 2$$

$$F(L^N) = ((10 \times 2) + 40) / 100 \times 2$$

Questa regola si può applicare sia per le popolazioni in equilibrio H-W sia per le popolazioni che non lo sono.

N.b. poiché il locus è biallelico e la somma delle frequenze deve essere SEMPRE uguale ad 1 io posso calcolare ad esempio la frequenza di L^N facendo il complemento ad 1 cioè sottraendo ad 1 la frequenza di L^M

$$L^M + L^N = 1$$

$$L^N = 1 - L^M$$

Se il locus è monogenico, la popolazione sarà omozigote per quel locus e quindi la frequenza di quell'allele sarà uguale ad 1:

popolazione : aa aa aa aa aa aa

popolazione monogenica, allele presente a, $q(a)=1$

→ la regola della radice quadrata invece si applica solo con le popolazioni in equilibrio H-W (vedi dopo)

Equilibrio H-W

“In assenza di forze evolutive attive, le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche non cambiano in una popolazione di generazione in generazione e la popolazione è in equilibrio H-W”

- 1) L'equilibrio H-W fa riferimento ad un locus e alle sue frequenze
- 2) Se confronto la generazione 1 con la generazione 2 di questa popolazione non ci sono variazioni nelle frequenze
- 3) Affinchè si realizzi, è necessario che la popolazione sia grande, che gli incroci per il locus in esame siano casuali e che non vi siano forze evolutive attive come selezione, migrazione, deriva ec.

Come conseguenza a tale principio, si può avere una relazione matematica tra le frequenze alleliche e genotipiche e di conseguenza solo per le popolazioni in H-W si possono calcolare le frequenze genotipiche dalle frequenze alleliche.

La relazione matematica nasce dal presupposto che:

- Indico con p la frequenza dell'allele A nel locus in esame e indico con q la frequenza del locus a;
- Per ottenere AA genotipicamente ho la necessità di A che venga dato dal padre e di A che venga dato dalla madre che è quindi $p \times p = p^2$
- Per ottenere aa genotipicamente faccio un discorso equipollente ad AA e quindi q^2
- Per ottenere Aa devo considerare due eventi : A dato dalla madre e a dato dal padre, A dato dal padre e a dato dalla madre quindi $2pq$

Quindi la relazione alla base è la risoluzione di un quadrato di un binomio $(p+q)^2$.

- **UNA POPOLAZIONE CHE NON E' IN EQUILIBRIO H-W SARA' IN EQUILIBRIO H-W PER UN LOCUS DOPO SOLO UNA GENERAZIONE DI INCROCI CASUALI QUANDO SI TRATTA DI UN CARATTERE AUTOSOMICO; QUANDO SI TRATTA DI UN CARATTERE X-LINKED, TALE POPOLAZIONE RAGGIUNGERA' L'EQUILIBRIO CON PIU' GENERAZIONI IN QUANTO LA FREQUENZA DEGLI ALLELI MASCHI SARA' OGNI GENERAZIONE PARI ALLA FREQUENZA DEGLI ALLELI FEMMINILI DELLA GENERAZIONE PRECEDENTE E LA FREQUENZA DEGLI ALLELI FEMMINILI SARA' LA MEDIA DELLA FREQUENZA DEGLI ALLELI MASCHILI E GLI ALLELI FEMMINILI DELLA GENERAZIONE PRECEDENTE**
- **UNA POPOLAZIONE IN H-W RIMANE IN EQUILIBRIO H-W PER IL LOCUS IN ESAME DI GENERAZIONE IN GENERAZIONE (amen).**

APPLICAZIONI DI H-W

1) CALCOLO DELLE FREQUENZE GENOTIPICHE A PARTIRE DALLA FREQUENZE FENOTIICHE

$p = 0,53$ $q = 0,46$

→ Applico la relazione matematica per i genotipi = $(p+q)^2$

$AA = (0,53^2) = 0,28$

$Aa = (0,53 \times 0,46 \times 2) = 0,48$

$aa = (0,46 \times 0,46) = 0,21$

→ Le frequenze teoriche corrispondo a quelle attese? Per avere quelle attese moltiplico le frequenze teoriche x tot della popolazione (6129)

$AA(ATTESO) = 0,28 \times 6129 = 1784$

$Aa(ATTESO) = 0,48 \times 6129 = 1300$

$aa(ATTESO) = 0,21 \times 6129 = 3044$

→ Uso il test del chi-quadro per confrontare e uso come gradi di libertà 1 in quanto gli alleli considerati sono 2 quindi $(2-1)=1$

2) CALCOLO DELLE FREQUENZE ALLELICHE DALLE FREQUENZE GENOTIPICHE: REGOLA DELLA RADICE QUADRATA

Tra le frequenze alleliche e quelle genotipiche vi è una relazione matematica che se usata all'inverso mi permette di calcolare le frequenze alleliche dalle frequenze genotipiche.

La radice quadrata è infatti l'inverso dell'elevamento a potenza quindi se io ho che la frequenza di aa e faccio la radice quadrata di questa frequenza ho la frequenza allelica

$Q^2 = 0,0025$

$Q = \sqrt{0,0025} = 0,05$

3) LOCI MULTIPLI

Quando abbiamo allelia multipla di un locus come nel sistema ABO la relazione tra le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche è un'estensione del polinomio di base

$I^A = p$
 $I^B = q$
 $I^0 = r$

All'equilibrio avremo $(p + q + r)^2$

$I^A I^A$ $I^B I^B$ $I^0 I^0$ $I^A I^B$ $I^A I^0$ $I^B I^0$
 $p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr$

4) GENI X-LINKED

Con i geni X-linked le frequenze genotipiche nelle femmine si calcolano a partire dalla frequenze alleliche nei maschi.

Per geni legati al cromosoma X		
Sesso	Genotipo	Frequenza
Maschi	$X^A Y$	p
	$X^a Y$	q
Femmine	$X^A X^A$	p^2
	$X^A X^a$	$2pq$
	$X^a X^a$	q^2

FENOMENI CHE MODIFICANO L'EQUILIBRIO H-W**1) ACCOPPIAMENTO NON CASUALE**

L'accoppiamento non casuale si può verificare quando vi è accoppiamento fra consanguinei e accoppiamento assortativo (tra individui simili o diversi).

L'effetto dell'accoppiamento assortativo e tra consanguinei è lo stesso: si riducono gli eterozigoti a favore degli omozigoti. Si può analizzare l'effetto di riduzione degli eterozigoti analizzando il coefficiente di inincrocio che è F ed è compreso tra 0 ed 1.

$$F = \frac{H_0 - H}{H_0}$$

H_0 = INDIVIDUI ETEROZIGOTI OSSERVATI

H = INDIVIDUI ETEROZIGOTI ATTESI SECONDO H-W CIOE' $2pq$

Il coefficiente di inincrocio paragona la riduzione di eterozigoti in una popolazione con accoppiamento tra consanguinei rispetto ad una popolazione in cui tale accoppiamento non c'è.

Le frequenze genotipiche saranno:

$$AA = p^2 + pqF$$

$$Aa = 2pq - 2pqF$$

$$aa = q^2 + pqF$$

$$\text{Se } F = 1$$

$$AA = p^2$$

$$Aa = 0 \text{ e } aa = q^2$$

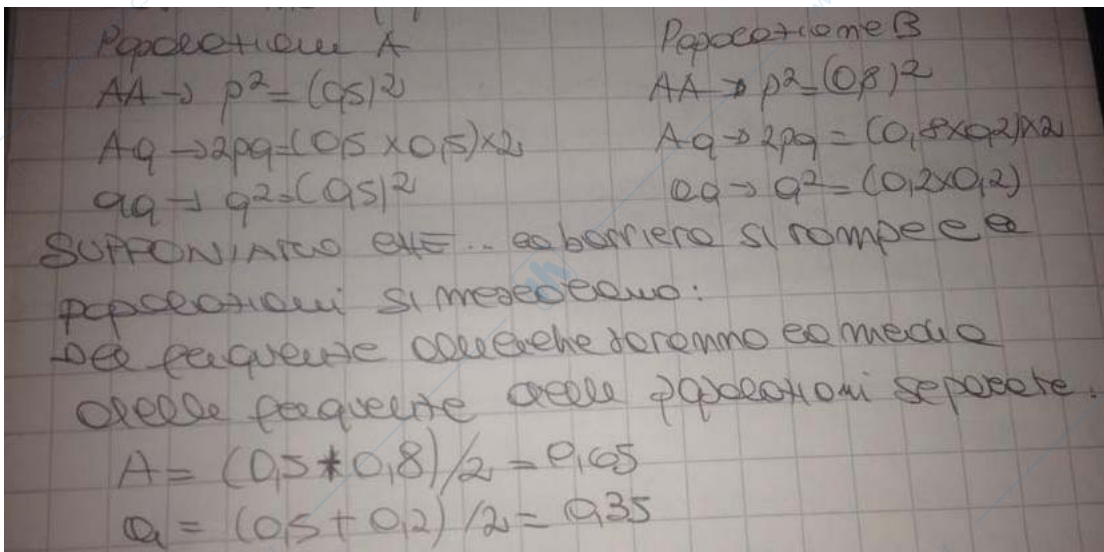
2) MIGRAZIONE

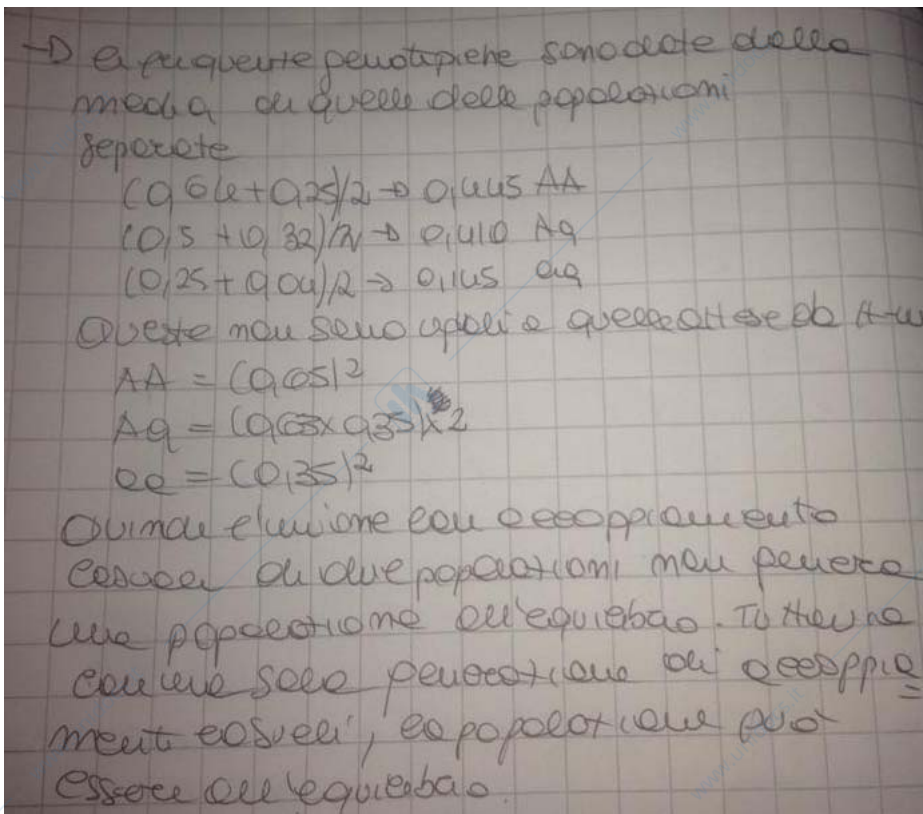
La migrazione consiste nello spostamento di una popolazione da un territorio all'altro. Tale spostamento porta a variazione delle frequenze alleliche e genotipiche. Considero 2 popolazioni

a. con $p(A) = 0,5$ e $q(a) = 0,5$

b. con $p(A) = 0,8$ e $q(a) = 0,2$

Analizzo le frequenze genotipiche con il principio H-W





SELEZIONE NATURALE

La selezione naturale è la forza che guida l'evoluzione e il fenotipo su cui agisce è la fitness.

La fitness è l'idoneità biologica cioè la capacità di sopravvivere e di riprodursi.

Non si può mai parlare di fitness assoluta in quanto questa dipende dall'ambiente cioè in un ambiente x saranno avvantaggiati certi individui rispetto ad altri. Se un individuo avvantaggiato ha una fitness 1 in un ambiente, l'individuo svantaggiato in quell'ambiente avrà una fitness che si discosta da 1 indicata come $1-s$ dove s è il coefficiente di selezione (= intensità della selezione).

La fitness è indicata con w e se una popolazione

- Muore o non si riproduce ha $w=0$ (o $w<1$)
- Se ogni individuo in media fa un solo figlio $w=1$
- Se fa più figli in media $w>1$

La fitness influenza anche le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche in quanto influenza la capacità di un individuo con un x genotipo di potersi riprodurre e quindi trasmettere i suoi geni alla generazione successiva.

Analizziamo ad esempio il locus A che presenta due forme alleliche A e a. Di questo locus sappiamo che A porta al colore scuro dell'insetto mentre a al colore chiaro. Il colore scuro è avvantaggiato nella foresta rispetto al colore chiaro. Quindi io ora analizzo una popolazione di insetti nella foresta e analizzo la selezione naturale contro il locus aa in quanto aa che implica colore chiaro è svantaggiato nella foresta.

$A = 0,5$ e $a = 0,5$ come frequenze alleliche ed $s = 0,1$

Se c'è un incrocio casuale, i genotipi possibili sono:

AA Aa aa

Di questi genotipi conosco la fitness

AA = 1 (perché sono nella foresta ed è avvantaggiato)

Aa = 1 (stesso motivo)

aa = 1-s

le frequenze genotipiche sono

AA 0,25

Aa = 0,50

aa = 0,25

Nella generazione successiva a questa condizione le frequenze genotipiche sono date dal prodotto tra le frequenze genotipiche e la fitness.

$$\begin{aligned} AA &\rightarrow (0,25) \times 1 = 0,25 \\ Aa &\rightarrow (0,50) \times 1 = 0,50 \\ aa &\rightarrow (0,25) \times 0,9 (= 0,1) = 0,225 \end{aligned}$$

Questi sono anche detti contributi relativi. Se divido ogni contributo relativo per la somma dei tre contributi ottengo il contributo effettivo di ogni genotipo nella generazione successiva alla prima condizione (cioè quanto genotipo AA Aa e aa ci sarà nella generazione successiva alla prima):

AA = 0,256; Aa = 0,513; aa = 0,231

Da questi contributi ci calcoliamo le frequenze alleliche sommando gli alleli in aa + gli alleli a in Aa (perché la popolazione risente della forza evolutiva della selezione naturale e non è più in equilibrio H-W):

$$q' = (0,231) + (0,513 : 2) = 0,48$$

questa è la frequenza allelica di q dopo una generazione sotto effetto della selezione contro aa.

0,48 è di poco inferiore a 0,50 che sarebbe la frequenza di q all'inizio della generazione cioè prima che la generazione si riproducesse e risentisse della selezione: la riduzione implica che la selezione cerca di eliminare le forme aa e di generazione in generazione la frequenza di a e quindi di aa sarà sempre inferiore cosa che non succede nelle popolazioni in equilibrio H-W.

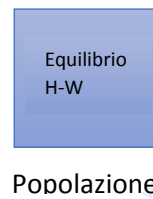
→ Equilibrio dinamico

Una popolazione è in equilibrio dinamico quando le forze evolutive agenti sono uguali ed opposte, vale a dire che agiscono diverse forze che essendo opposte portano al raggiungimento di un equilibrio dinamico in cui le frequenze alleliche sono pressoché costanti.



→ Equilibrio H-W

Una popolazione è in equilibrio H-W quando non vi sono forze evolutive agenti.



L'equilibrio dinamico si può raggiungere in due modi:

a) Selezione a vantaggio degli eterozigosi

In una popolazione il locus 9 presenta due forme alleliche A e a. Gli alleli A e a sono deleteri in omozigosi mentre non hanno problemi in eterozigosi. Su questa popolazione agiscono due forze:

- Una selezione a favore degli eterozigosi che porta alla sovradominanza
- Una selezione contro gli alleli in omozigosi

Pertanto possiamo schematizzare il tutto come

Genotipo	AA	Aa	aa
Fitness	1-t	1	1-2

Da questi dati possiamo estrapolare un'equazione che ci permette di capire quando la popolazione è in equilibrio dinamico:

la popolazione è in equilibrio dinamico quando gli alleli A e a avranno le seguenti frequenze negli eterozigoti

$$p(A) = t/s+t$$

$$p(a) = s/s+t$$

b) Bilanciamento mutazione-selezione

Questo tipo di bilanciamento si ottiene quando in una popolazione agiscono due forze:

- La mutazione che introduce l'allele mutante a ad esempio con un proprio tasso
- La selezione che elimina gli alleli mutanti introdotti dalla mutazione

Anche se il tasso di mutazione è spesso basso, se si considera una mutazione in a, questa mutazione si protrae maggiormente nella popolazione in quanto l'allele a è mascherato negli

eterozigoti. In questa situazione, possiamo schematizzare il rapporto genotipi-fitness in questo modo:

GENOTIPO	AA	Aa	aa
Fitness	1	1	1-s
F(gen.)	p^2	$2pq$	q^2

Quindi la mutazione induce mutazioni con un tasso pari ad u mentre la selezione elimina a con un tasso pari a sq^2 : all'equilibrio $u=sq^2$ quindi $q = \sqrt{u/s}$.

→ SELEZIONE DIREZIONALE

La selezione direzionale favorisce i caratteri che si trovano all'estremo della loro distribuzione. Un esempio di selezione direzionale si ha quando in natura la popolazione è costretta ad adattarsi ad una situazione.

→ DERIVA GENICA

La deriva genica è una forza evolutiva all'interno della popolazione che porta al cambiamento casuale delle frequenze alleliche: un allele può essere più rappresentato o meno rappresentato. Generalmente le popolazioni più piccole sono più soggette a deriva genica rispetto alle popolazioni più grandi: se cambiano le frequenze alleliche cambiano anche le frequenze degli eterozigosi. Si può analizzare la deriva genica proprio analizzando gli eterozigoti in una piccola popolazione attraverso la seguente equazione:

$$H' (1- 1/2N) H$$

Ciò ci dice che la deriva genica implica una diminuzione di eterozigosi nella generazione successiva H' rispetto alla prima generazione H (cioè eterozigosi di prima generazione) pari a $1-1/2N$ dove N è il totale della popolazione.

Dopo t generazioni, vi sarà sempre riduzione di eterozigosi in una popolazione soggetta a deriva genica:

$$H'_t (1- 1/2N)^t H$$

La deriva genica si può avere in due modi:

1. **EFFETTO DEL FONDATORE:** una piccola parte della popolazione si stacca ed emigra in un nuovo territorio. Ciò porta alla formazione di una nuova popolazione con incroci tra gli individui emigrati. Di conseguenza il pool genico (dato da incroci di un gruppo esiguo di emigranti) della nuova popolazione sarà ridotto rispetto alla popolazione di partenza;
2. **EFFETTO COLLO DI BOTTIGLIA:** una catastrofe naturale ad esempio porta alla morte di una buona parte della popolazione. La popolazione che non c'è più, non è in grado di riprodursi. Si riprodurranno i sopravvissuti con il proprio pool genico che è ridotto rispetto al pool genico iniziale. Ciò implica che la popolazione nuova avrà un pool genico ridotto rispetto alla popolazione di partenza.

In entrambi i casi l'effetto finale è lo stesso: la nuova popolazione ha un pool genico ridotto rispetto alla popolazione iniziale.

Benzel

Prima di Benzel il gene era visto come unità indivisibile e si pensava che la ricombinazione avvenisse solo tra geni diversi. Oliver dimostrò che è possibile anche avere la ricombinazione intragenica e l'unità di ricombinazione è la coppia di basi. Fino a questo momento erano stati fatti esperimenti su *Drosophila* che non dava una progenie abbastanza numerosa per studiare l'evento. Benzel per capire fino a che punto si potesse addentrare nel gene utilizzò il fago T4 e analizzò una regione rII responsabile di 2 fenotipi diversi: la morfologia di placca (placche grandi e margini netti per i mutanti e placche piccole con margini frastagliati per i selvatici) e la specificità d'ospite (*E. coli* B è un ceppo permissivo, viene infettato sia da mutanti che selvatici formando placche di lisi; *E. coli* K12λ è un ceppo restrittivo che viene infettato solo dai selvatici formando placche di lisi).

La prima operazione di Benzel fu allestire un Testi di Complementazione: fece un' infezione mista in K12λ utilizzando 2 mutanti rII del fago T4 che davano lo stesso fenotipo. Otteme in alcuni casi placche di lisi e in altri casi no. Quando si formavano era avvenuta complementazione, cioè le 2 mutazioni si trovavano in geni differenti; quando non si formavano le 2 mutazioni ricadevano nello stesso gene dando fenotipo mutato. Da questi risultati capì che la regione rII era formata da 2 geni, rIIA

ed rITB. Allora fece infezioni miste di ceppi mutanti dello stesso gene (rITA-rITA) e la maggior parte delle volte non otteneva placche di lisi; in altri casi erano presenti placche di lisi con un numero maggiore rispetto al tasso di retromutazione e da ciò capì che quando otteneva placche di lisi era dovuto alla ricombinazione intragenica tra le due mutazioni rITA. Cioè sponadicamente avveniva crossing-over all'interno dello stesso gene e si otteneva un doppio mutante e un cromosoma fenotipicamente selvatico che dava lisi. La frequenza molto bassa di questi risultati suggerivano che fossero mutazioni molto vicine tra loro. Allora mappò tutte le possibili mutazioni all'interno dello stesso gene; per farlo necessitava di una progenie abbondante e per ottenerla infettò prima un ceppo permissivo (E. coli B) dove si notavano placche dovute sia a T4 selvatici che mutanti. In questa progenie sicuramente 2 mutanti in posizioni diverse potevano ricombinare per dare fenotipo selvatico. Benzen valera individuare proprio i selvatici frutto di ricombinazione; li prelevò, li diluì e fece un'infezione su un ceppo restrittivo (E. coli K12λ) e ottenne placche di lisi provenienti dai selvatici ricombinanti; su questi si calcolò la frequenza di ricombinazione intragenica per avere la distanza di mappa e fece $(\text{numero di ricombinanti} / \text{progenie totale})$ perché su K12λ si osservano solo i ricombinanti selvatici; ma per ciascuno di essi viene formato anche un doppio mutante che non cresce su K12λ. La progenie totale è data dal numero di placche di lisi che si contano su E. coli B $\times 100$; da ciò ottenne che la distanza minima di ricombinazione intragenica è una coppia di basi adiacenti. Di tutti i mutanti che aveva ottenuto li divise in mutanti (rIT) reversibili (che avevano mutazione puntiforme) e mutanti non reversibili (non revertivano in quanto avevano delezioni). Li utilizzò per definire le sottoregioni dei geni rITA ed rITB; cioè fece una mappatura per delezione; sfruttò il fatto che incrociando 2 mutanti per delezione, se le 2 delezioni tra loro si sovrappongono allora non si ottengono ricombinanti selvatici; se le 2 delezioni non si sovrappongono allora possono ricombinare e dare una copia del cromosoma selvatico e un cromosoma doppio delecto. Allora effettuò incroci per le mappature dei singoli mutanti per delezione, per stabilire se fossero sovrapposte. Finì così per prima

mutanti della serie 1, che hanno delezioni molto ampie, e le mappò. Poi incrociò tra loro mutanti della serie 2, che hanno delezioni più piccole e poi incrociò i mutanti della serie 1 con quelli della serie 2. In questo modo riuscì a fare la mappatura di mutazioni all'interno dello stesso gene evidenziando delle regioni dette punti caldi, cioè regioni con un numero elevato di mutazioni.

Esempio di mappatura per delezione: si incrociano mutanti per delezione con mutanti puntiformi. + indica crescita (placche di lisi) o no placche di lisi. Se i 2 mutanti complementano si formano placche di lisi e le 2 mutazioni non sono sovrapposte, altrimenti se non danno placche di lisi allora sono entrambe sovrapposte.

Esempio:
 _____ (Mutante per delezione) } fenotipo mutante
 _____ (mutante puntiforme) } (no placche di lisi)
 su K12A

_____ (mutante per delezione)
 X
 _____ (Mutante per delezione)
 ↓
 _____ (Ricombinante selvatico) → sì placche di lisi
 _____ (Doppio mutante delete) → no placche di lisi
 su K12A

Decifrazione del Codice Genetico

Con Guick e Brenner capiamo con la approssimazione intragenica che il codice è a multipli di 3; contemporaneamente vengono fatti esperimenti di decifrazione del codice, cioè m-RNA e traduzione in vitro e ibridazione di mimi RNA e t-RNA per uno specifico AA. L'esperimento in vitro fu fatto da Nirenberg e Matthae: utilizzarono poliU cioè sintetizzarono m-RNA costituito dalla successione di un solo codone e compresero il significato (non si potevano sequenziare ancora le proteine) e osservarono solo gli AA aggiunti alla catena polipeptidica. Allora poli-U (fenilalanina); poli-A e poli-C. Con i polinucleotidi decifrarono solo 4 codoni. Poi costruirono dinucleotidi fino a Tetranucleotidi e ottennero catene di diversi AA. Ovviamente essendo una Traduzione in vitro non vi erano

Segnali di inizio e di stop; potevano esserci 3 frame di lettura; ad esempio UUC può iniziare dalla prima UUC; dalla seconda UCU o dalla terza CUU. In questo modo decifriamo molti codoni, ma non tutti. Inoltre fecero polimeri di RNA con sequenze casuali, mettendo i precursori in proporzioni note, ad esempio 70% G e 30% di U e si calcolavano tutte le possibili combinazioni e poi analizzavamo il contenuto amminoacidico. Nell'esperimento di ibridazione con t-RNA ed m-RNA mini (cioè formati da 3 soli nucleotidi) si formava una miscela di t-RNA carichi di AA marcati, ribosomi e mini m-RNA. Si incubava, poi si analizzava l'AA legato al t-RNA che aveva ibridato con l'm-RNA. Ciò portò alla decifrazione completa dei 64 codoni. Yamofsky nel 1964 grazie al sequenziamento polipeptidico scoprì tutte le caratteristiche del Codice genetico. Studiando il gene trpA dell'operone del triptofano e analizzando i mutanti sequenziò la catena polipeptidica selvatica e la confrontò con quella mutante e comprese che vi è collinearità tra gene e prodotto polipeptidico e la mutazione della sequenza nucleotidica corrisponde ad una specifica posizione amminoacidica in un prodotto polipeptidico, quindi il codice non è sovrapposto = 1 nucleotide sul DNA fa parte di un solo codone nell'm-RNA. Studiando i mutanti di trpA notò che alcuni presentavano un polipeptide tronco che si era interrotto in prossimità di una mutazione del DNA; ciò indica che quella mutazione aveva creato un codone di fine traduzione; quindi ci sono segnali di inizio e fine della Traduzione, infatti di 64 codoni 64 codificano per AA e 3 sono di fine - AUG = inizio (Metionina); UAA; UAG; UGA di fine. Avendo sequenziato il prodotto polipeptidico selvatico di TrpA conosceva anche la sequenza nucleotidica dell'm-RNA.

sequenza <u>trpA</u> selvatica :	TYR - LEU - THR - GLY	m-RNA <u>trpA</u> selvatico:	ATA - GAC - TAT - GGG
Mutante 1 <u>trpA</u>	: CYS - LEU - THR - GLY	ACA - GAC - TAT - GGG	
Mutante 2 <u>trpA</u>	: TYR - ARG - THR - GLY	ATA - GCC - TAT - GGG	
Mutante 3 <u>trpA</u>	: TYR - LEU - ILE - GLY	ATA - GAC - TGT - GGG	

Confrontando l'mRNA selvatico e quello mutante quale tripletta cambia e confronta la mutazione con l'AA mutato e da ciò capisce che una tripletta o codone codifica per un AA. Divide il n° di AA per il n° di m-RNA corrispondente.

Regolazione dell'espressione genica dei procaruoti

Controllo negativo dell'induzione: Repressore si lega al sito operatore e ne blocca la trascrizione; se un induttore si lega al repressore esso blocca il legame al sito operatore e comincia la trascrizione.

Controllo negativo della repressione: Il repressore non si lega al sito operatore e la trascrizione avviene; se è presente un corepressore questo si lega al repressore e il complesso si lega al sito operatore e ^{non} avviene la trascrizione.

Controllo positivo dell'induzione: L'attivatore non si lega al sito operatore; se è presente un induttore questo si lega all'attivatore e il complesso si lega al sito operatore e comincia la trascrizione.

Controllo positivo della repressione:

Controllo positivo della repressione: L'attivatore si lega al sito operatore e la trascrizione avviene; se è presente un corepressore esso si lega all'attivatore e non lo fa legare al sito operatore e blocca la trascrizione.

Sistema inducibile:

Controllo \ominus : Repressore è legato all'operatore \longrightarrow NO TRASCRIZIONE

INDUTTORE lega il repressore \longrightarrow SÌ TRASCRIZIONE

Controllo \oplus : Attivatore non è legato all'operatore \longrightarrow NO TRASCRIZIONE

INDUTTORE lega l'attivatore \longrightarrow SÌ TRASCRIZIONE

Sistema repressibile:

Controllo \ominus : Repressore non è legato all'operatore \longrightarrow SÌ TRASCRIZIONE

COREPRESSORE lega il repressore \longrightarrow NO TRASCRIZIONE

Controllo \oplus : Attivatore è legato all'operatore \longrightarrow SÌ TRASCRIZIONE

COREPRESSORE lega l'attivatore \longrightarrow NO TRASCRIZIONE

Controllo positivo = Gene regolatore codifica un attivatore.

Controllo negativo = Gene regolatore codifica un repressore.

Operone lac (Via catabolica del lattosio)

Sistema inducibile controllato negativamente Il lattosio è un disaccaride.

I geni strutturali dell'operone codificano enzimi per la degradazione del lattosio.

Quando c'è glucosio il repressore si lega al sito operatore e blocca la trascrizione.

Il lattosio si converte in allolattosio (induttore) che si lega al repressore il quale si stacca dal sito operatore e fa partire la trascrizione dei geni strutturali.

lacI | P | O | lacZ | lacY | lacA

lacA = Transacetilasi
(ruolo incerto)

↓
repressore

blocca la trascrizione

(c'è glucosio) e parte la trascrizione

quando c'è lattosio (allolattosio) questo lega il repressore

Nella cellula c'è sempre un livello basale di lattosio, quindi è sempre presente la β -galattosidasi (lacZ) e la permeasi (lacY).

lacI è un gene costitutivo (viene sempre espresso).

Abbiamo i mutanti per lacI (lacI⁻) e lacIS⁻ (super-repressore).

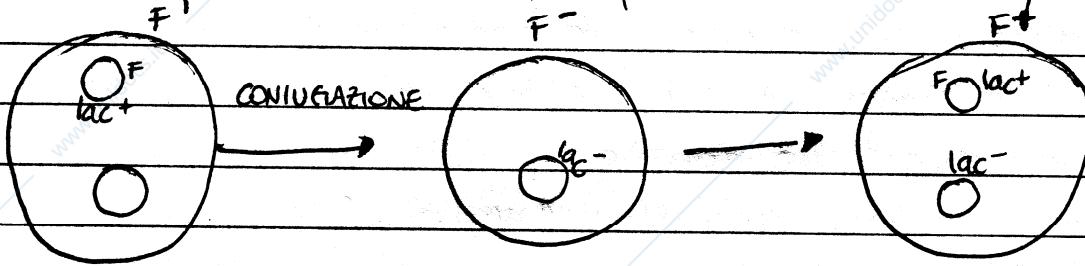
Mutanti per il sito operatore (O⁻) e del promotore (P⁻).

Abbiamo mutanti per i geni strutturali (lacZ⁻; lacY⁻; lacA⁻).

Repressore = Omotetramero: 2 siti per il sito operatore e 2 per l'allolattosio.

Il lattosio viene poi scisso in glucosio e galattosio.

lacI⁻ = produce un repressore non funzionale. lacIS un repressore costitutivo.



Diploidi parziali

Donatore F⁺ lacZ⁺ lacY⁺ lacA⁺ selvatici

Ricevente F⁻ lacZ⁻ lacY⁺ lacA⁻ →

mutanti lacI⁻ = sintesi costitutiva

mutanti lacIS = Blocco costitutivo

donatore F⁺ P⁻ O lacZ lacY lacA

ricevente F⁻ P O⁻ lacZ lacY lacA → sintesi costitutiva

mutanti $lacI^-$ = donatore F' $lacI^- P_O lacZ lacY lacA$ → Trascrizione
 ricevente F^- $lacI P_O lacZ lacY lacA$ attiva - Regolata

Il gene $lacI$ selvatico produce un repressore diffusibile.

Regioni O_1 e O_3 del sito operatore; devono entrambe legare il repressore, il quale crea un'ansa fra le 2 regioni e l'RNA polimerasi si fissa.

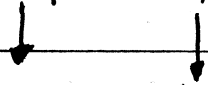
Controllo positivo del sistema inducibile dell'operone lac

Induttore è il CAP; l'attivatore è il CAP. Il CAP non si lega al sito operatore se non si lega prima all'induttore cAMP. A questo punto si lega al sito operatore e comincia la trascrizione dei geni strutturali. L'induttore cAMP è presente nella cellula solo quando c'è poco glucosio.

Operone trp (Via anabolica del triptofano)

Il trp è un regolatore della via anabolica. È un sistema reprimibile controllato negativamente.

P_{Trp} | O | $TrpL$ | $trpE$ $TrpD$ $TrpC$ $TrpB$ $TrpA$



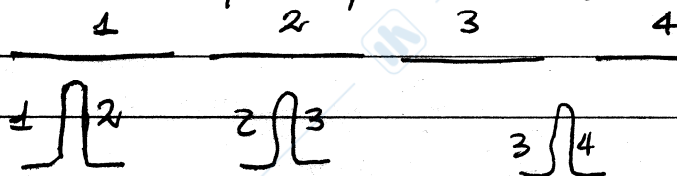
A monte di P_{Trp} è posizionato $TrpR$.

$TrpR$ = Gene costitutivo produce un aporepressore che deve essere attivato in presenza di alte concentrazioni di triptofano.

$TrpR^-$ = Aporepressore incapace di bloccare la trascrizione dei geni strutturali.
 mutanti. In realtà la regione leader $TrpL$ effettua attenuazione, un ulteriore meccanismo di controllo della via metabolica.

$TrpL$ = Codifica un peptide leader costituito da 4 regioni.

Abbiamo 4 sequenze palindromiche.



Pausa Antiterminazione Terminazione

sequenza leader = 2 codoni che codificano Trp (sempre di trp cellulare).
 Nella regione 1.

Il ribosoma scorie sulla regione 1; se c'è molto trp subito occupa la regione 2 e la regione 3 e 4 libere si appaiano dando un segnale di terminazione della trascrizione a valle del gene trpL. (Controllo post-trascrizionale).

Se i livelli di trp sono bassi, allora il ribosoma resta sulla regione 1 in attesa di un t-RNA carico di trp; le regioni 2 e 3 già trascritte si appaiano dando un segnale di antiterminazione e l'RNA polimerasi continua a trascrivere i geni strutturali (E; D; C; B; A).

Mutanti dell'Attenuazione: se vengono mutati i codoni nella regione 1 del trp, non si ha l'attenuazione e si osserva trascrizione costitutiva dei geni strutturali perché si forma l'appaiamento delle regioni 2 e 3 (Antiterminazione). Mutazioni delle regioni 3 e 4 impediscono l'appaiamento che dà il segnale di terminazione della trascrizione (appaiamento 3 e 4) e quindi avremo trascrizione costitutiva dei geni strutturali.

Regolazione dell'espressione genica negli Eucarioti

Fattori trascrizionali: Leucine zipper; domini stem-loop-stem.

Ogni gene ha un suo promotore e una sequenza enhancer che attiva la trascrizione e una sequenza silencer che impedisce la trascrizione.

Lieviti = Gene gal; a monte ha sequenza enhancer UAS e il promotore.
PROMOTORE | UAS | GAL

Geni gal coinvolti nel catabolismo del galattosio.

GAL4 = Proteina si lega ad UAS e attiva la trascrizione. Interagisce con GAL80 (lo blocca). In Assenza di galattosio.

In presenza di galattosio esso attiva GAL3 e lo lega a GAL80 così GAL4 si può legare ad UAS facendo attivare la trascrizione. GAL4 è una proteina codificata da un gene costitutivo, quindi c'è sempre nella cellula.

Geni per le catene globiniche sono sullo stesso cromosoma.

Insulator tra il promotore e i geni; fanno da spaziatori per silenziare i geni.
Metilazione del DNA (Issole CPG) = Blocca la trascrizione. Dimetilazione

Esercizio trasduzione

donatore $syn P^+ Sup M^+ Trp z^+$

ricevente $syn P^- Sup M^- Trp z^+$

$M^+ P^+ z^+$
 \times $M^- P^- z^-$

Selezioniamo per $Sup M^+$:

68 $M^+ P^+ z^+$

100 $M^+ P^+ z^-$

480 $M^+ P^- z^-$

0 $M^+ P^- z^+$

648

Ordine dei marcatori ?

Freq. cotrasduzione MP

ed Mz ?

Doppia ricombinazione rara !

$Freq MP = \frac{(68+100)}{648} \times 100 = 25,9\%$

$Freq Mz = \frac{(68)}{648} \times 100 = 10,5\%$

Poiché la frequenza di Mz è minore di MP allora M e z sono lontani e l'ordine sarà MPz.

Esercizio 2 Coniugazione

Donatore $Hfr = arg^+ bro^+ leu^+$

ricevente $F^- = arg^- bro^- leu^-$

1) Ordine dei geni ?

2) Distanze di mappa ?

320 $arg^+ bro^+ leu^+$

8 $arg^+ bro^+ leu^-$

0 $arg^+ bro^- leu^+$ = Doppia ricombinanti

48 $arg^+ bro^- leu^-$

① Ordine dei geni

$Arg^+ bro^+ leu^+$
 \times $arg^- bro^- leu^-$

$Arg^+ leu^+ bro^+$
 \times $arg^- leu^- bro^-$

4 scambi

$Arg^+ bro^- leu^+$

2 scambi

Ordine corretto

$Arg - bro - leu$

② Distanze di mappa :

$d arg - bro = \frac{48}{376} \times 100 = 12,76 \text{ cM}$

$d bro - leu = \frac{8}{376} \times 100 = 2,12 \text{ cM}$

Esercizio 1 ConiugazioneDonatore Hfr = $his^+ thr^+ ser^+$ ricevente F^- = $his^- thr^- ser^-$

His entra per ultimo nel ricevente. Selezioniamo i ricombinanti His^+ su terreno contenente solo thr e ser . Selezioniamo poi per thr e ser .

Abbiamo ottenuto:

685 $his^+ thr^+ ser^+$ 1) Ordine dei geni?80 $his^+ thr^- ser^-$ 2) Pistanza di mappa?18 $his^+ thr^+ ser^-$ (doppi ricombinanti)180 $his^+ thr^- ser^+$ Ordine dei geni (1)Blocchiamo his e proviamo le configurazioni

Config. 1 $his^+ thr^+ ser^+$
 Config. 2 $his^+ ser^+ thr^+$ } donatore

Doppi ricombinanti = $his^+ thr^+ ser^-$ (minori di tutti)Incrocio col primo ordine:

$$\begin{array}{r} his^+ thr^+ ser^+ \quad D \\ \times his^- thr^- ser^- \quad R \end{array}$$
2 scambiIncrocio col secondo ordine:

$$\begin{array}{r} his^+ ser^+ thr^+ \\ \times his^- ser^- thr^- \end{array}$$
4 scambi

Configurazione giusta perché la frequenza è bassa.

HIS - SER - THRDistanze di Mappa: (2)

$$d = \frac{SR * DR}{\text{TOTALE}} \times 100;$$

$$d_{his ser} = \frac{80 + 18}{963} \times 100 = 10,17 \text{ cM}$$

$$d_{ser thr} = \frac{180 + 18}{963} \times 100 = 20,53 \text{ cM}$$

✗ **Esercizio 1**

Viene fatto un incrocio tra un Hfr che è met⁺ thi⁺ pur⁺ e un F⁻ che è met⁻ thi⁻ pur⁻. Studi sull'accoppiamento interrotto hanno dimostrato che met⁺ entra nel ricevente per ultimo per cui i ricombinanti per met⁺ in un insieme di F⁻ sono selezionati su terreno che soddisfa solo le richieste di pur e thi. Questi ricombinanti vengono quindi analizzati per la presenza degli alleli thi⁺ e pur⁺. Per ciascun genotipo sono stati trovati i seguenti risultati:

met⁺ thi⁺ pur⁺ 280
 met⁺ thi⁺ pur⁻ 0
 met⁺ thi⁻ pur⁺ 6
 met⁺ thi⁻ pur⁻ 52

Qual è l'ordine dei geni? Quali sono le distanze di mappa in unità di ricombinazione?

✗ **Esercizio 2**

In un sistema di trasduzione generalizzata che usa il fago P1, il donatore è pur⁺ nad⁺ pdx⁻ mentre il ricevente è pur⁻ nad⁻ pdx⁺. L'allele del donatore pur⁺ viene selezionato dopo la trasduzione, e 50 trasdotti pur⁺ sono esaminati per gli altri alleli presenti, con i seguenti risultati:

nad⁺ pdx⁺ 2
 nad⁺ pdx⁻ 10
 nad⁻ pdx⁺ 24
 nad⁻ pdx⁻ 13

Qual è la frequenza di cotrasduzione per pur e nad? Qual è la frequenza di cotrasduzione per pur e pdx? Quale dei loci non selezionati è più vicino a pur? Nad e pdx sono dalla stessa parte di pur? Spiegare perché.

✗ **Esercizio 3**

Il ceppo batterico n.1 ha costituzione m⁻ n⁻ o⁺ e il ceppo 2 è m⁺ n⁺ o⁻.

Vengono usati fagi trasducenti per effettuare trasduzione generalizzata dal ceppo 1 al 2 e viceversa. Si ottengono i seguenti risultati dopo piastratura dei batteri riceventi: trasduzione da 1 a 2: 2/10 alla -5 cellule di tipo selvatico; trasduzione da 2 a 1: 2/10 alla -7 cellule di tipo selvatico. In base a questi risultati determinare e spiegare l'ordine dei geni.

Esercizio 1 (Coniugazione)donatore Hfr = Met⁺ thi⁺ Pur⁺ricevente F⁻ = Met⁻ thi⁻ Pur⁻Met⁺ entra per ultimo nel ricevente

Ordine dei geni? Distanze di mappa?

280 Met⁺ thi⁺ Pur⁺Met⁺ Pur⁺ thi⁺0 Met⁺ thi⁺ Pur⁻① × Met⁻ Pur⁻ thi⁻ ×6 Met⁺ thi⁻ Pur⁺

4 scambi, configurazione connessa

52 Met⁺ thi⁻ Pur⁻

Il marcatore centrale è Pur

② Distanze di mappa:

$$d \text{ Met} - \text{Pur} = \frac{(SR + DR)}{\text{TOTALE}} \times 100 = \frac{52}{338} \times 100 = 15,38 \text{ cM}$$

$$d \text{ Pur} - \text{thi} = \frac{(SR + DR)}{\text{TOTALE}} \times 100 = \frac{6}{338} \times 100 = 1,77 \text{ cM}$$

Esercizio 2 (Trasduzione)donatore = pur⁺ nad⁺ pdx⁻ricevente = pur⁻ nad⁻ pdx⁺

1) Ordine dei geni?

2 Pur⁺ nad⁺ pdx⁺

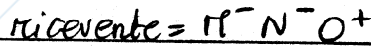
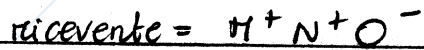
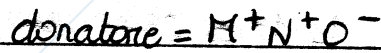
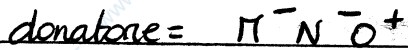
2) Distanza di mappa?

10 Pur⁺ nad⁺ pdx⁻① pur⁺ nad⁺ pdx⁻ no 2 scambi24 Pur⁺ nad⁻ pdx⁺× pur⁻ nad⁻ pdx⁺13 Pur⁺ nad⁻ pdx⁻nad⁺ pur⁺ pdx⁻ no 2 scambi× nad⁻ pur⁻ pdx⁺pur⁺ pdx⁻ nad⁺× pur⁻ pdx⁺ nad⁻ si 4 scambi

2) Distanze di mappa

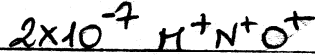
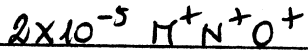
$$d \text{ pur} \text{ pdx} = \frac{(10+13)}{49} \times 100 = 46 \text{ cM}$$

$$d \text{ pur} \text{ nad} = \frac{(10+2)}{49} \times 100 = 24 \text{ cM}$$

Esercizio 3 (Trasduzione)

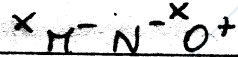
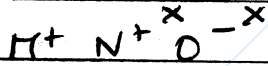
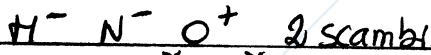
(Esercizio 1)

(Esercizio 2)



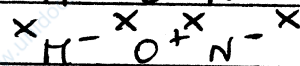
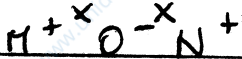
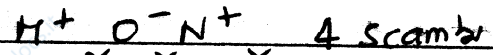
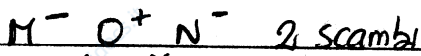
Esercizio 1 Ordine 1:

Esercizio 2 Ordine 1:



Ordine 2:

Ordine 2:



Confrontando i risultati dall'esercizio 1 e 2; l'esercizio 2 ha frequenza minore rispetto ad 1 ed è confermato dai 4 scambi poco probabili.
L'Ordine giusto è $\Pi-O-N$

- ESTENSIONI MENDELISMO -

ESERCIZIO 1

Ci sono 2 linee pure di granturco, una presenta chicchi viola, e l'altra chicchi arancio. Esse vengono incrociate e si ottengono in F_1 tutte piante a chicchi gialli. Quando le piante della F_1 vengono autofecondate producono in F_2 : 182 gialli, 80 viola e 58 arancio. Indicare i genotipi e i rapporti fenotipici della progenie parentale, F_1 ed F_2 .

ESERCIZIO 2

Incrociando 2 linee pure di fiori bianchi si ottiene una F_1 tutta a fiori rossi. Autofecondando la F_1 otteniamo una F_2 costituita da 141 fiori bianchi e 182 fiori rossi. Spiegare il risultato.

ESERCIZIO 3

Incrociando 2 linee pure di girasole con basso contenuto di olio si ottiene una F_1 costituita da girasoli ad alto contenuto di olio. La F_1 viene autofecondata e viene fuori una progenie F_2 costituita da 325 girasoli ad alto contenuto di olio e 75 a basso contenuto di olio. Spiegare il risultato.

ESERCIZIO 4

Incrociando 2 piante con fiori bianchi si ottiene una progenie costituita da 120 piante a fiori bianchi e 24 a fiori blu. Spiegare il risultato.

ESERCIZIO 5

In una varietà di melissa, i fiori possono essere rossi, arancioni o bianchi. Incrociando una pianta con fiori rossi e una pianta con fiori bianchi, si ottiene una progenie tutta con fiori rossi. L'autofecondazione della F_1 produce 99 piante con fiori rossi, 32 con fiori arancioni e 39 con fiori bianchi. Qual'è la base genetica di questo carattere e i genotipi?

ESERCIZIO 6

Due orchidee provenienti da differenti campi e fenotipicamente bianche vengono incrociate. La progenie consiste di individui fenotipicamente viola. Incrociando la F_1 otteniamo una progenie costituita da 44 orchidee viola e 36 bianche. Come si può spiegare questo risultato?

Genetica di Popolazioni (Esercizi Prof)

Esercizio 1 blocco 1

Una popolazione AA 165

Frequenze alleliche?

Aa 350

È in equilibrio?

aa 85

TOT. 600

Frequenze alleliche:

$$f_A = \frac{(165 \times 2) + 350}{1200} = 0,56 \text{ (p)}$$

$$f_a = \frac{(85 \times 2) + 350}{1200} = 0,43 \text{ (q)}$$

Frequenze genotipiche all'equilibrio:

$$p^2 = AA = (0,56)^2 = 0,31$$

$$2pq = Aa = 2 \cdot (0,56)(0,43) = 0,48$$

$$q^2 = aa = (0,43)^2 = 0,18$$

Numero di individui attesi all'equilibrio:

$$AA = 0,31 \times 600 = 186$$

$$Aa = 0,48 \times 600 = 288$$

$$aa = 0,18 \times 600 = 108$$

Verifica ipotesi:

$$\chi^2 = \frac{(165 - 186)^2}{186} + \frac{(350 - 288)^2}{288} + \frac{(85 - 108)^2}{108} = 2,37 + 13,34 + 4,89 = 20,60$$

Gradi di libertà = Classi genotipiche - Alleli in esame = 3 - 2 = 1

L'ipotesi è verificata. È in equilibrio.

Il calcolo numerico del chi-quadro è errato; ma l'impostazione dei valori è corretta ☺

Esercizio 4

Popolazione AA 4 Frequenze alleliche?
 Aa 400 La popolazione è in equilibrio?
 aa 9596

Frequenze alleliche:

$$f(A) = \frac{(4 \times 2) + 400}{20000} = 0,0204 \quad (p)$$

$$f(a) = \frac{(9596 \times 2) + 400}{20000} = 0,98 \quad (q)$$

Frequenze genotipiche all'equilibrio:

$$f(AA) = p^2 = (0,0204)^2 = 0,0004$$

$$f(Aa) = 2pq = 2 \times (0,0204)(0,98) = 0,039$$

$$f(aa) = q^2 = (0,98)^2 = 0,9604$$

Individui attesi all'equilibrio:

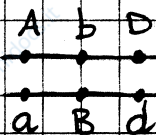
$$AA = 0,0004 \times 9565 = 4$$

$$Aa = 0,039 \times 9565 = 3604$$

$$aa = 0,9604 \times 9565 = 9604 \quad (390)$$

Il test del χ^2 conferma l'ipotesi.

ESERCIZIO FREQUENZE GENI ASSOCIATI (Aceto)

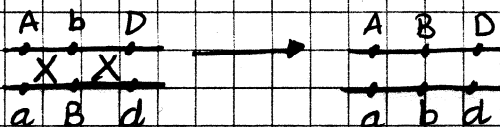


distanza $Ab = 10\text{cM}$
distanza $bD = 10\text{cM}$

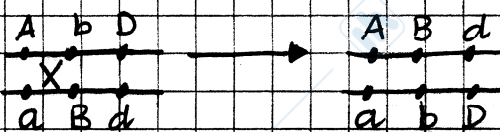
- 1 - Quanti tipi di gameti si ottengono da questo triibrido in configurazione trans?
- 2 - Quali sono le frequenze dei tipi gametici?

1 - Per calcolare i tipi di gameti che si ottengono utilizziamo la formula 2^n ($n =$ numero dei geni in eterozigosi); $2^3 = 8$ tipi di gameti. 5 tipi di gameti che si ottengono sono: $ABD; abd; ABd; abD; aBd; aBD; Abd$.

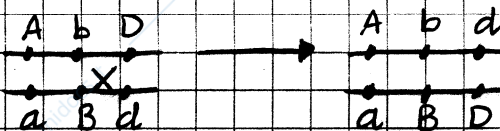
2 - Poiché i 3 geni sono associati, i vari tipi di gameti non avranno tutti la stessa frequenza come in un triibrido con 3 geni indipendenti ($1/8$ frequenza). Poiché conosciamo l'ordine e la configurazione del triibrido, possiamo già stimare le classi gametiche più abbondanti: esse saranno quelle parentali (P); ABD e aBd . Le classi gametiche meno abbondanti sono i doppi ricombinanti, e cioè:



Le classi gametiche intermedie saranno i singoli ricombinanti in 1^a regione:



e i singoli ricombinanti in 2^a regione:



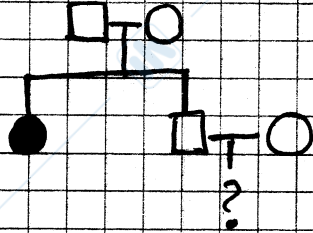
D.R.	ABD	0,5%
	abd	0,5%
R.I	ABd	4,5%
	abD	4,5%
R.II	$A bd$	4,5%
	$a BD$	4,5%
P	$A b D$	40,5%
	$a B d$	40,5%

La frequenza dei doppi ricombinanti è data dal prodotto delle 2 distanze di mappa: $f(D.R.) = (0,1) \times (0,1) \times 100 = 1\%$. di conseguenza i 2 tipi di gameti doppi ricombinanti hanno frequenza 0,5% a testa. La frequenza dei singoli ricombinanti in 1^a regione è data dalla distanza di mappa in 1^a regione meno la frequenza dei doppi ricombinanti: $f(RI) = (10\%) - (1\%) = 9\%$; quindi 4,5% a classe di ricombinanti in 1^a regione. La frequenza dei singoli

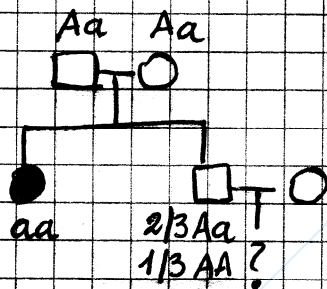
ricombinanti in 2^a regione è data dalla distanza di mappa in 2^a regione meno la frequenza dei doppi ricombinanti: $f(RII) = (10\%) - (1\%) = 9\%$; quindi 4,5% per classe di ricombinanti in 2^a regione. Le frequenze dei parentali (P) sono date dal 100% di frequenza meno la somma delle frequenze dei D.R.; RI e RII; quindi $f(P) = (100\%) - (1\% + 9\% + 9\%) = 81\%$; quindi 40,5% per classe gametica parentale. N.B. Nel D.R. la frequenza 1% è data da: $(10\%)(10\%) = (0,1 \times 0,1) \times 100 = 1\%$.

ALBERO GENEALOGICO

Calcolare la probabilità che nasca un figlio affetto dal seguente incrocio. Il tasso di incidenza della patologia in esame è $1/10000$ nascite.



La patologia è autosomica recessiva; proviamo ad attribuire i genotipi.



Poiché l'individuo II-3 esterno non presenta la patologia dovremmo assumere che abbia genotipo AA. Poiché ci è stato dato il tasso di incidenza della patologia allora dobbiamo essere più scrupolosi.

Secondo la Genetica di popolazioni:

$$A = p$$

$$a = q$$

$$Aa = 2pq$$

$$\text{quindi } aa = q^2$$

$$q^2 = aa = 1/10000$$

$$q = \sqrt{1/10000} = 1/100$$

$$p = (1 - q) = (1 - 1/100) = 99/100$$

Quindi la probabilità che la femmina esterna II-3 sia eterozigote Aa è uguale a $2pq$ e quindi:

$$2pq = 2 \left(\frac{99}{100} \times \frac{1}{100} \right) = 0,02 = \frac{21}{100} = \frac{1}{50}$$

La probabilità che nasca un figlio affetto è data da:

la probabilità che il padre II-2 sia eterozigote ($2/3 Aa$) per

la probabilità che la madre II-3 sia eterozigote ($1/50 Aa$) per

la probabilità che il padre II-2 dia l'allele a ($1/2 a$) per

la probabilità che la madre II-3 dia l'allele a ($1/2 a$) e quindi:

$$\left(\frac{2}{3} \right) \times \left(\frac{1}{50} \right) \times \left(\frac{1}{2} \right) \times \left(\frac{1}{2} \right) = \frac{1}{300}$$

ESTENSIONI MENDELISMO (SOLUZIONI)ESERCIZIO 1

P: Viola x Arancio
(aaBB) (AAbb)



F₁: Giallo
(AaBb)



F ₂ :	182 Gialli	182 : 320 = x : 16 → 9
	80 Viola	80 : 320 = x : 16 → 4
	58 Arancio	58 : 320 = x : 16 → 3
	<u>TOTALE 320</u>	

9 : 3 : 4 (Epistasi recessiva)

Quindi alla F₂:

9/16	A- B-	→	Giallo	9/16
3/16	A- bb	→	Arancio	3/16
3/16	aa B-	}	Viola	4/16
1/16	aa bb			

L'allele a in omozigosi (aa) è epistatico sul gene B (allele B e b).

ESERCIZIO 2

P: Bianco x Bianco
(aaBB) (AAbb)



F₁: Rosso
(AaBb)



F ₂ :	141 Bianchi	141 : 323 = x : 16 → 7
	182 Rossi	182 : 323 = x : 16 → 9
	<u>TOTALE 323</u>	

9 : 7 (Complementazione)

Quindi alla F₂:

9/16	A- B-	→	Rosso	9/16
3/16	A- bb	}	Bianco	7/16
3/16	aa B-			
1/16	aa bb			

Il prodotto funzionale dell'Allele A complementa con il prodotto funzionale dell'allele B per dare il fenotipo Rosso.

ESERCIZIO 3

P: Poco olio x Poco olio
(AABB) (aabb)



F1: Tanto olio
(AaBb)



F2:	325 Tanto olio	$325:400 = x:16 \rightarrow 13$
	75 Poco olio	$75:400 = x:16 \rightarrow 3$
	<u>TOTALE 400</u>	

Quindi alla F2:

13:3 (soppressione dominante)

9/16	A-B-	→ Poco olio	9/16
3/16	A-bb	→ Tanto olio	3/16
3/16	aa B-	} Poco olio	4/16
1/16	aa bb		

L'allele dominante B sopprime l'espressione dell'allele dominante A responsabile della massima quantità di olio.

ESERCIZIO 4

P: Bianco x Bianco
(AaBb) (AaBb)



F1:	120 Bianchi	$120:144 = x:16 \rightarrow 13$
	24 Blu	$24:144 = x:16 \rightarrow 3$
	<u>TOTALE 144</u>	

Quindi alla F2:

13:3 (soppressione dominante)

9/16	A-B-	→ Bianco	9/16
3/16	A-bb	→ Blu	3/16
3/16	aa B-	} Bianco	4/16
1/16	aa bb		

L'allele dominante B sopprime l'espressione dell'allele dominante A responsabile del fenotipo Blu del fiore.

ESERCIZIO 5

P: Rosso x Bianco
(AABB) (aabb)



F₁: Rosso
(AaBb)



F ₂ :	99 Rossi	99 : 140 = x : 16 → 9
	32 Anacamomi	32 : 140 = x : 16 → 3
	39 Bianchi	39 : 140 = x : 16 → 4
	<u>TOTALE 170</u>	

9:4:3 (Epistas recessiva)

Quindi alla F₂:

9/16	A-B-	→ Rossi	9/16
3/16	A-bb	→ Anacamomi	3/16
3/16	aa B-	→ Bianchi	4/16
1/16	aa bb	→	

L'allele a in omozigosi (aa) è epistatico sul gene B (allele B e b) e quindi B non produce il fenotipo colorato.

ESERCIZIO 6

P: Bianco x Bianco
(AAbb) (aaBB)



F₁: Viola
(AaBb)



F ₂ :	44 Viola	44 : 80 = x : 16 → 9
	36 Bianchi	36 : 80 = x : 16 → 7
	<u>TOTALE 80</u>	

9:7 (Complementazione)

Quindi alla F₂:

9/16	A-B-	→ Viola	9/16
3/16	A-bb	} → Bianchi	7/16
3/16	aa B-		
1/16	aa bb		

Il prodotto funzionale dell'allele A complementa con il prodotto funzionale dell'allele B per dare il fenotipo Viola.