



Appunti di Genetica Generale (corso di Biotecnologie)

Genetica

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna (UNIBO)

90 pag.

Prova gratis!



docsity AI

Genera mappe concettuali, riassunti e altro con l'AI

[Clicca qui](#)

GENETICA

Che cos'è la genetica?

La genetica si occupa di studiare l'informazione biologica, andare a studiare i meccanismi che sono alla base di tutte le forme di vita; è una disciplina che unifica tutte le scienze della vita.

Studia anche come queste informazioni possono essere trasmesse da una cellula all'altra e da una generazione all'altra (la variazione genetica: fonte delle differenze da individuo a individuo). Si occupa di studiare la natura e l'organizzazione del materiale genetico e di come si esprime il materiale genetico. L'oggetto fondamentale della genetica sono i **geni**: "geni" deriva da una parola greca che sta a indicare "generazione".

Gene:

Il concetto di gene è stato modificato nel corso del tempo.

Nella genetica formale ci si riferiva all'unità d'informazione che influenza un carattere (caratteristica che possiamo osservare).

Con lo sviluppo delle conoscenze molecolari per gene si intende poi una sequenza di DNA o un'unione di più segmenti di DNA che danno informazione per generare un prodotto funzionale: nella maggior parte dei casi si parla di proteina come prodotto finale.

Uno stesso gene può codificare più proteine tra di loro correlate tramite il processo di **splicing alternativo**

Non tutti i geni codificano per una proteina ma a volte codificano per un RNA funzionale NON tradotto in proteina.

La genetica è suddivisa in 4 branche principali:

- **genetica di trasmissione:** genetica delle origini iniziali, eredità di trasmissione dei caratteri
- **genetica molecolare:** descrive la struttura e l'organizzazione del materiale ereditario (DNA)
- **genetica di popolazione:** studia gruppi di individui che si incrociano tra loro e studia la frequenza di diverse varianti genetiche e di come queste frequenze possono variare nel tempo e nello spazio
- **genomica:** studio di interi genomi, non del singolo gene. Si analizza la loro struttura, come sono fatti, cosa contengono e la loro funzione di evoluzione.

La molecola fondamentale di cui si occupa la genetica è il DNA che contiene l'informazione principale. L'espressione dei geni è la base di qualsiasi funzione biologica, è fondamentale per qualsiasi fenomeno biologico. L'informazione contenuta viene trascritta in mRNA e sintetizzata poi in proteine. Le caratteristiche di ciascuna cellula dipendono da che tipi di proteine vengono espresse in quelle determinate cellule: informazioni per la sintesi proteica in quantità appropriate e al corretto momento.

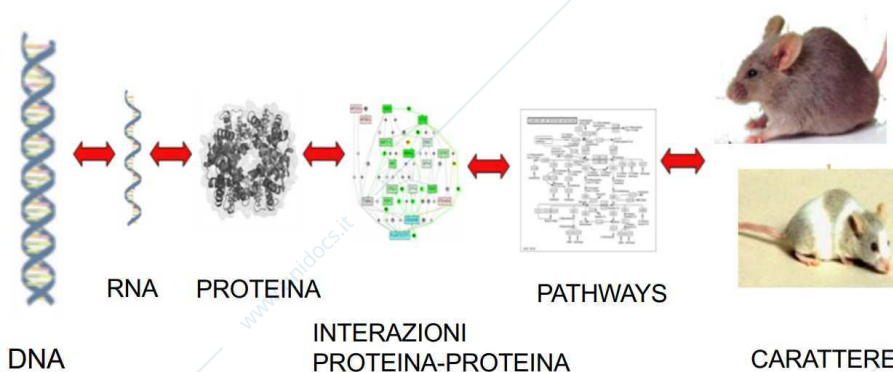
Genotipo e fenotipo:

- **genotipo:** rappresenta il corredo genetico, l'informazione genetica contenuta nelle cellule di un individuo. E' soggetta a variabilità genetica che può esprimersi in variazioni del fenotipo.

- **fenotipo;** una caratteristica osservabile in un individuo che deriva dall'espressione dei geni.

Uno dei principali scopi è capire la relazione tra genotipo e fenotipo; come sono collegati tra loro? Per

quale motivo un individuo ha occhi azzurri piuttosto che marroni? Un primo esempio è stata la scoperta di una varianza genetica: una variazione di una singola base dava l'insorgenza, per esempio, dell'anemia falciforme.



La relazione tra genotipo e fenotipo è molto complessa, perché il legame tra genotipo e fenotipo non è diretto, ci sono tanti passaggi che devono avvenire affinché una sequenza di DNA si esprima in fenotipo.

L'espressione dei geni è alla base della manifestazione dei caratteri di un organismo. Possiamo studiare tali relazioni (genotipo-fenotipo) a diversi livelli:

- **livello molecolare:** es. una particolare sequenza che si trova sul cromosoma 7 contiene delle sequenze (introni ed esoni; esoni parti codificanti del gene) che codificano per la CFTR proteina che viene trascritta dagli esoni; il prodotto proteico è una proteina di membrana espressa in determinate cellule. Si studia quindi il prodotto di tali sequenze: una proteina di membrana
- **livello cellulare:** qual è la funzione di tale proteina codificata? Questa proteina codifica per un canale ionico, permette di far passare gli ioni cloro da un spazio intracellulare a uno extracellulare. In alcune situazioni possiamo trovare delle varianti, dei cambiamenti nella sequenza del DNA che determinano forme anomale della proteina. La mutazione del gene determina forme proteiche difettive che perdono la loro funzione e non permettono il passaggio degli ioni cloro.
- **a livello dell'organismo:** individui che hanno forme mutanti di tale proteina sviluppano una malattia genetica chiamata fibrosi cistica; avendo tale difetto del canale, c'è un difetto dell'equilibrio idrosalino che comporta la formazione di un muco denso nei tessuti con fenotipo polmonare e maggiore suscettibilità di infezioni batteriche.
- **a livello di popolazione:** si analizza cosa succede per le varianti di tale gene in una popolazione. È stato scoperto che le frequenze di mutazioni della fibrosi cistica hanno diversa frequenza in diverse popolazioni, in particolare è più presente in individui del nord europa rispetto all'europa del sud. Ciò è dipeso sicuramente dalla storia evolutiva della popolazione.

Storia della genetica:

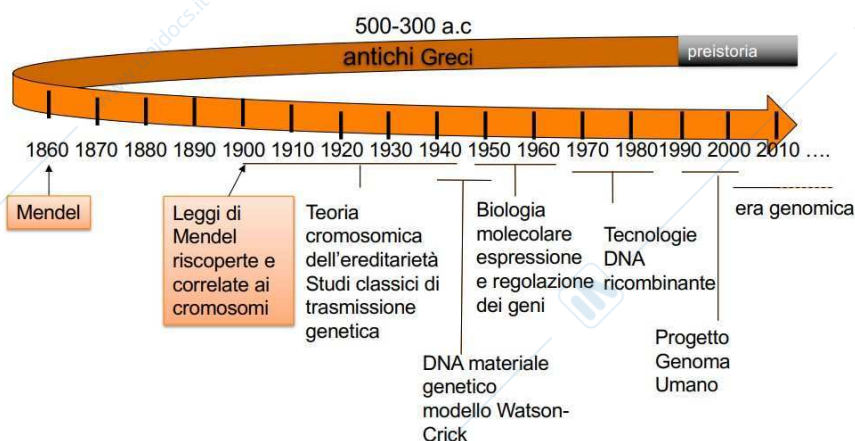
La genetica è una disciplina relativamente giovane, nata all'incirca all'inizio del 900. In realtà dalla nascita dell'agricoltura e dell'allevamento gli uomini utilizzavano già delle conoscenze della genetica perché provavano a incrociare piante e/o animali per ottenere caratteristiche più utili. Il problema era che nessuno riusciva a capire le leggi e i meccanismi fondamentali che determinavano la trasmissione delle caratteristiche genetiche fino alla teoria di Mendel e la scoperta delle leggi fondamentali dell'ereditarietà.

- **Antichi greci:** teoria della pangenesi. Pensavano che i caratteri che un individuo acquisisce durante la vita venissero trasferiti agli organi riproduttivi da delle particelle (gemmule) che potevano venire trasmesse dai genitori.

Ci si basava anche sul fatto che i caratteri ereditari si possono mescolare tra loro; le caratteristiche paterne e materne si mescolano tra loro in modo che la progenie abbia delle caratteristiche intermedie. Ma non si sapeva quasi nulla di qual era l'origine della vita, si credeva ancora nella generazione spontanea cioè si pensava che la vita si generasse spontaneamente per qualche motivo.

Un altro passo avanti fu fatto

quando grazie allo sviluppo del microscopio fu possibile studiare la struttura delle cellule al microscopio; l'osservazione di tali cellule e l'osservazione dei gameti (spermatozoi) portò allo sviluppo dell'ereditarietà



di altre teorie: **performazionismo**, si pensava che all'interno dei gameti fossero in qualche modo preformate le caratteristiche degli individui della generazione successiva.

Solamente nell'800 attraverso l'esperimento di Weisman fu possibile dimostrare che l'ereditarietà è determinata dall'unione di cellule germinali e solo grazie a tale unione si trasmettono le caratteristiche ereditarie. Le cellule somatiche non sono coinvolte nella trasmissione e le caratteristiche acquisite durante la vita NON possono essere trasmesse geneticamente alle generazioni successive.

L'esperimento consisteva nel prendere dei topi e tagliargli la coda; ciò che si notò fu che la generazione successiva aveva comunque la coda.

Darwin ebbe un ruolo fondamentale in quanto sviluppò la teoria dell'evoluzione ma uno dei problemi che rimase da chiarire era proprio come avveniva la trasmissione, perché avveniva una trasmissione piuttosto che un'altra. Di fatto Darwin, non trovando una risposta, accettava lui stesso la teoria della pangenesi.

Mendel arrivò a formulare delle regole astratte che spiegavano i meccanismi di base di come delle caratteristiche venivano trasmesse dai genitori ai figli.

Il lavoro di Mendel rimase sconosciuto fino agli inizi del 1900 quando venne riscoperto e sviluppato dai genetisti della generazione successiva.

Il successo di Mendel dipese dal fatto che studiò dei caratteri molto semplici: monogenici, molto più semplici da studiare perché hanno un pattern di trasmissione più semplice e più prevedibile. La maggior parte dei caratteri hanno origine genetica molto più complessa e dipendono dall'influenza di molti geni e la maggior parte dei caratteri non sono solo in due forme alternative, nella maggior parte avremo che le differenze negli individui non solo binarie ma variazioni quantitative.

Lo sviluppo della genetica ha un'influenza enorme su come viene condotta la ricerca biologica, ci permette di andare a studiare le basi di una qualsiasi funzione biologica che vogliamo comprendere. Se vogliamo studiare un determinato fenomeno biologico, la genetica ci offre due diverse possibilità, due approcci che possono essere utilizzati per capire quali sono le caratteristiche di una determinata funzione biologica: analisi genetica o dissezione genetica.

A questo scopo la genetica utilizza i **mutanti** cioè degli individui (organismo, cellula, prodotto genico) che manifestano un fenotipo alterato a causa di un'alterazione genetica.

Nella genetica classica si possono quindi utilizzare 2 approcci:

- **genetica diretta**: si parte dall'osservazione di un carattere, si va a cercare dei mutanti (fenotipo variato) e si vanno a identificare quali sono i geni o le varianti genetiche che influenzano la comparsa di questo fenotipo mutante. Dal fenotipo si arriva quindi ai geni; è un approccio tradizionale ed è lo stesso approccio che ha utilizzato Mendel.

Si tratta quindi dell'osservazione di un fenotipo mutante o in alternativa selezionare una funzione biologica di interesse e generare appositamente dei mutanti attraverso agenti chimici mutageni. Si seleziona il fenotipo di interesse e dopodiché si va a capire quali sono le caratteristiche e i geni che determinano la comparsa di questo fenotipo mutante; è dipeso da un gene o da più geni?

Posso fare una mappatura genetica e andare a isolare le sequenze di dna che ne sono responsabili (es. analisi di linkage, basata sulle frequenze di ricombinazione)

- **reverse genetics**: questo approccio è stato possibile solo dopo che si è sviluppata la genetica molecolare. Si parte da un gene di cui non si conosce la funzione, si va a generare artificialmente una mutazione e si va poi a studiare l'effetto che ha sul fenotipo. Servono degli organismi modello cioè organismi che si prestano bene a tale analisi genetica (es. piante di piselli per Mendel).

Organismi modello:

- **ciclo vitale breve**: permette di vedere quali sono gli effetti degli incroci, non posso aspettare anni e anni per analizzare i risultati
- **progenie numerosa**: per avere dati statisticamente significativi.
- **facile da gestire sperimentalmente**: da incrociare e da tenere in coltura in laboratorio
- **presenza di variabilità genetica** che posso osservare e la possibilità di **introdurre mutazioni**: ingegneria genetica.

La ricerca, dopo la riscoperta delle leggi di Mendel, è progredita utilizzando un organismo modello: moscerino della frutta (*Drosophila*), piante di pisello, batteri (*Escherichia coli*, per i meccanismi della biologia molecolare), il lievito (eucariote unicellulare, da informazioni in più rispetto ai procarioti), il verme nematode (organismo studiato perché è trasparente e permette di osservare al microscopio direttamente le cellule all'interno dei tessuti), la pianta (*Arabidopsis thaliana*) e il topo (organismo più vicino all'uomo). L'uomo non è un organismo modello perché non presenta nessuna delle caratteristiche citate prima. Come si può quindi studiare la genetica? Tutto ciò che si è scoperto utilizzando i batteri, è valido anche per tutti gli altri organismi, uomo incluso perché molte funzioni biologiche sono altamente conservate nell'evoluzione: posso usare diversi organismi modello per la stessa funzione biologica. Oggi giorno sono state sviluppate tecniche di colture cellulari per studiare in vitro, cellule staminali fluid potenti indotte permettono di ottenere cellule staminali da cellule somatiche differenziate di un individuo con caratteristiche di totipotenza e indurre poi al differenziamento queste cellule staminali ottenendo linee cellulari con diverse caratteristiche molecolari

Alla metà del 900 si arriva alla scoperta del DNA come una molecola che contiene l'informazione genetica: scoperta del dogma centrale della biologia molecolare (come l'informazione può essere codificata in una sequenza proteica) e la scoperta del codice genetico.

Rivoluzione molecolare: una serie di tecniche che sono state sviluppate che permettono di andare a manipolare e studiare le sequenze di DNA. L'oggetto fondamentale di studio della genetica classica sono stati gli incroci, capire come venivano ereditati i caratteri attraverso gli incroci. Non si poteva andare a studiare la struttura e la funzione dei geni perché erano entità astratte. Solamente attraverso lo sviluppo della genetica è stato possibile studiare tali sequenze.

Alcune tecniche:

- dna ricombinante: cambiare e ricucire delle sequenze di DNA
- tecniche di sequenziamento di dna
- tecniche di ibridazione
- pcr: amplificare una piccola sequenza a nostro piacimento

Queste tecniche permettono di ottenere una quantità specifica di una sequenza di DNA da poter studiare nel dettaglio. Si aggiungono poi altre tecniche per ottenere organismi transgenici e tecniche di sequenziamento più efficaci per studiare interi genomi e la possibilità di introdurre modificazioni esattamente nel punto dove si desidera: **BIOTECNOLOGIE**

Esempio di applicazione di biotecnologie: creazione di biofarmaci (es. per la cura del diabete prima bisognava prelevare insulina da animali, ora si può produrre in vitro.), generare piante geneticamente modificate, creare organismi transgenici a scopi commerciali. Negli ultimi anni ha avuto ulteriore sviluppo grazie alla CRISPR/CAS9, modificare geni endogeni direttamente in organismi viventi

Un altro cambiamento epocale nella storia della genetica fu agli inizi del 2000, l'era della **genomica**, in cui non si studiano più singoli geni ma interi genomi; prima non era possibile perché le tecniche di

genetica molecolare permettevano solo di analizzare piccoli tratti di DNA. Il genoma è l'insieme completo delle istruzioni genetiche di ciascun organismo (DNA). La data di nascita della genomica coincide con gli inizi degli anni 2000, precisamente il 2001, data in cui è stato portato a termine il progetto "genoma umano" con la prima bozza della sequenza completa del genoma umano. E' stato un progetto epocale per la ricerca biologica in quanto è stato un primo esempio di progetto multidisciplinare e collaborativo. La genomica si sviluppa in una serie di discipline chiamate **omiche**: trascrittomica (trascritti di DNA che la cellula produce), proteomi (proteine che vengono prodotte all'interno della cellula): sono fondamentali nella biologia. Conoscere la sequenza del genoma umano non dice in realtà molto se non si è in grado di interpretare tale sequenza. Il sequenziamento del genoma è solo il primo step, bisogna poi capirne la funzione.

Il completamento del progetto genoma umano è stato solo il primo passo per capire come funziona un genoma (e le proteine che codifica)

La scoperta dell'eterocromatina e il completamento di esso è stata solamente due anni fa, perché anche le nuove tecniche si basano sempre sul sequenziare pezzi corti di DNA.

Per poter capire come funziona il DNA sono stati necessari altri progressi: tecniche di sequenziamento di dna (sono stati necessari 15 anni di tempo per sequenziare il primo genoma umano (una sola versione)

Legge di Moore: sta a rappresentare il miglioramento dei supporti informatici, raddoppia ogni 18 mesi, è considerata il benchmark dell'innovazione tecnologica, si rinnova molto velocemente

La tecnica di sequenziamento del dna è migliorata però più velocemente della legge di Moore e, di conseguenza, ora sequenziare il dna costa più o meno un migliaio di euro e lo si fa in circa 24 ore.

tecniche ngs: next generations sequency, sequenziamento massivo parallelo. Si vanno a sequenziare tanti frammenti corti di dna ma in modo parallelo e massivo, si fanno milioni di sequenze contemporaneamente.

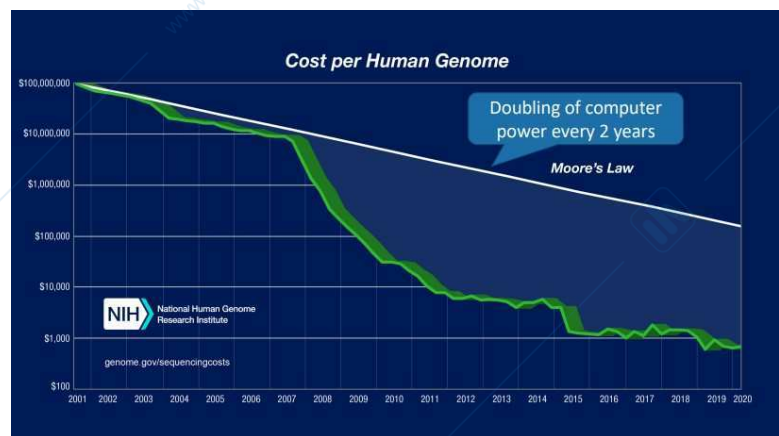
Variabilità genetica dei genomi: il primo genoma scoperta era UNO solo ma ognuno di noi ha il proprio genoma e le nostre varianti che costituiscono i caratteri fenotipici.

Grazie alla capacità di poter sequenziare tanti frammenti è stato possibile andare a studiare le varianti genetiche, cioè le differenze che contraddistinguono i genomi dei singoli individui. Nel genoma umano aploide sono presenti 3 miliardi di nucleotidi che contengono circa 20.000 geni. l'1% di questi nucleotidi sono diversi l'uno dall'altro.

E' importante quindi trovare le differenze e capire quali tratti sono correlati per esempio ad alcune malattie genetiche.

In realtà solamente il 1,5/2% di DNA codifica per proteine (se ne occupano gli esoni).

Fra le sequenze non codificanti ce ne sono molte conservate nell'evoluzione e che molto probabilmente sono sequenze funzionali e sono più resistenti alle mutazioni (avvengono in modo random e possono



avvenire ovunque). Le sequenze conservate sono fondamentali perché per esempio regolano l'espressione genica: tutti quei meccanismi che permettono a un gene di essere espresso o di rimanere silenziato. Ogni tipologia cellulare deve esprimere nel momento corretto e nella quantità corretta un set di proteine. Sono fondamentali questi meccanismi per regolare l'espressione dei geni.

epigenomica: fenomeno importante e sul quale la ricerca deve fare passi avanti. La sequenza del genoma contiene informazioni per esprimere la funzione delle cellule. Tuttavia ci sono fenomeni che vanno a modificare il dna senza alterarne la sequenza vera e propria. Queste modifiche sono importanti nella regolazione dell'espressione genica.

es. modifica attraverso metilazione della citosina (si aggiunge un gruppo metile) oppure modifica degli istoni (per formazione della cromatina insieme agli esoni.)

cromatina: dna compatto, può essere più o meno compatta. se è aperta i fattori di trascrizione possono andare a contattare gli elementi regolatori e permette l'espressione di un gene. Se, al contrario, è chiusa, i fattori non possono entrare e i geni vengono spenti ..

paleogenetica: studiare l'origine dell'homo sapiens a partire da uomini primitivi e studiare come queste popolazioni si sono evolute e come hanno colonizzato per fondare le popolazioni umane di oggi. E' stato necessario prelevare dna da omini fossili.

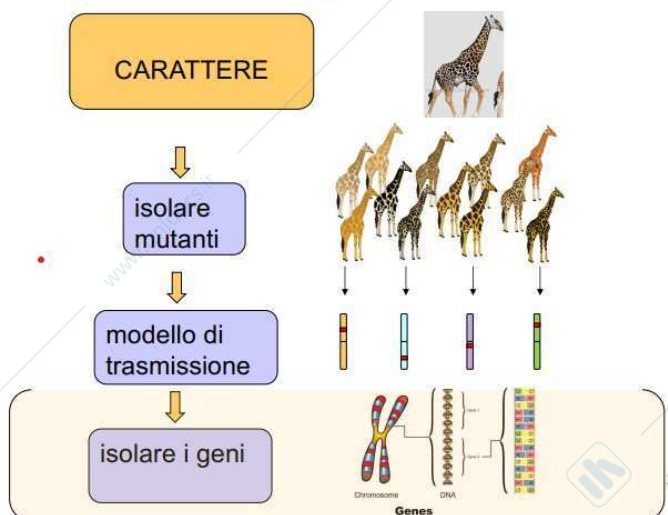
GENETICA MENDELIANA

L'approccio utilizzato da Mendel può essere considerato come il prototipo dell'approccio sperimentale utilizzato ancora oggi per analizzare i caratteri genetici. L'approccio si può considerare come un primo esempio di analisi genetica, si può prendere in esame una funzione biologica per capirne i meccanismi fondamentali e utilizzare la genetica per indagare il funzionamento.

Step:

1. definire quindi il carattere di interesse. es. colore della giraffa
2. voglio studiare le basi biologiche di questo fenotipo e isolo quindi dei mutanti: identifico giraffe con colori diversi e faccio incrociare tra loro individui con variazione del fenotipo e vedo come si trasmettono le caratteristiche di generazione in generazione.
3. uso degli strumenti per andare a localizzare la posizione dei geni sui cromosomi, sfruttando la ricombinazione meiotica (crossing over)
4. utilizzare gli strumenti di genetica molecolare per isolare i geni, sequenziali e capirne la funzione.

Analisi genetica



Mendel era un monaco che visse nell'800 a Brno (repubblica ceca), monastero dell'ordine

agostiniano, una delle attività principali era lo studio e la ricerca, era quasi un istituto scientifico.

Mendel andava contro le concezioni della pangenesi e dell'ereditarietà per mescolamento. In realtà i fattori ereditari sono immutabili, non si mescolano tra di loro

Il **successo** di Mendel fu dovuto da:

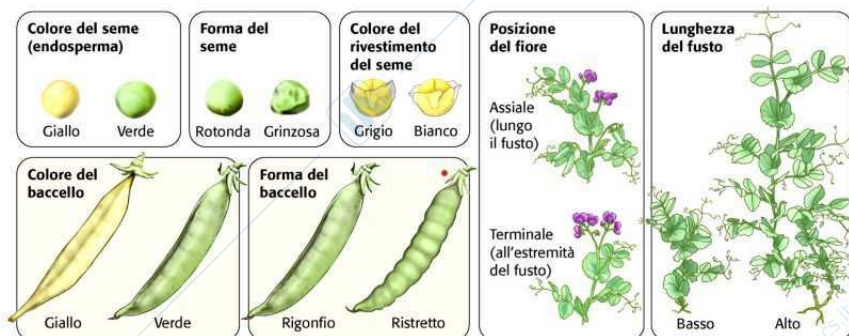
- scelta di condurre l'esperimento sulla pianta di pisello da giardino: organismo modello.
 - facile da coltivare e con una progenie numerosa
 - varietà di piselli a disposizione
 - escluse dall'analisi i caratteri che variano molto, selezionò caratteri che si manifestano in due forme facilmente differenziabili.;
 - linee pure: essere sicuro che questo carattere rimaneva immutato di generazione in generazione.
- Cominciò a incrociare queste piante per vedere come venivano trasmessi i caratteri tra due piante con caratteri diversi. Fu capace di semplificare il problema; ha utilizzato quindi un approccio sperimentale.

Cosa si sapeva a proposito della riproduzione?

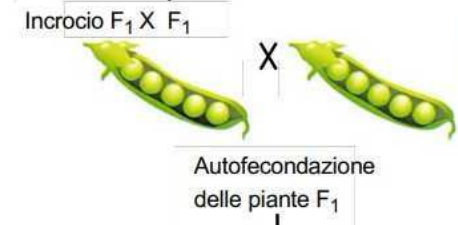
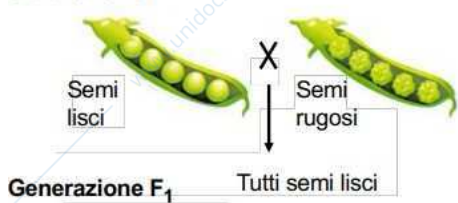
Si sapeva che la riproduzione avviene per via sessuata, esiste la linea germinale (cellule per lo sviluppo degli spermatozoi e delle cellule uovo) e linee somatiche, cellule che compongono un organismo. Nelle gonadi sono presenti le cellule germinali che danno origine agli spermatozoi e cellule uovo; dall'unione dei gameti si ottiene lo zigote che darà origine a un nuovo organismo adulto. Si pensava che tutto ciò avvenisse anche nelle piante.

La pianta di piselli studiata da Mendel si riproduceva però attraverso l'autoimpollinazione: i gameti maschili e femminili si trovano quindi tutti e due nella stessa pianta e il polline della pianta va a fecondare l'ovulo della stessa pianta.

Di tutte le caratteristiche della pianta, ne scelse 7 e le lasciò riprodurre per autoimpollinazione.



Generazione P



Dopo aver ottenuto delle linee pure va a fare una serie di incroci chiamati ibridazione: incrocio tra due piante con caratteristiche diverse. Nella prima serie Mendel seleziona una varietà che differenziava solamente per una caratteristica es. colore dei piselli. Questo è possibile andando a incrociare varietà diverse rimuovendo gli stami in un fiore prima che venga prodotto il polline. Dopodiché si prende la pianta con i fiori bianchi e si raccoglie da quest'ultima il polline e si va a fecondare la pianta con i fiori viola. Dopo questa fecondazione si svilupperanno i semi (piselli) e ogni pisello rappresenterà il risultato di ogni incrocio.

Inizialmente Mendel incrociò le piante che differivano solamente per i semi lisci o rugosi.

Il primo incrocio fu quindi tra una pianta con semi lisci e una pianta con semi rugosi. La generazione che si ottenne (F1) conteneva tutti semi lisci.

Incrocio successivamente due piante della F1, ottenendo una nuova generazione F2 e con caratteristiche particolari: il fenotipo rugoso scomparso nella F1 si ripresenta nella F2. Attraverso i numerosi incroci conta 5474 semi lisci e 1850 semi rugosi.

Fece gli stessi procedimenti per tutti gli altri 7 caratteri che aveva isolato e ottenne sempre lo stesso risultato: nella F1 i fenotipi erano tutti uguali mentre nella F2 ricompariva l'altro carattere in proporzioni 3:1; solamente un quarto dei "risultati" mostrava il carattere "scomparso" nella F1.

Anche gli **incroci reciproci** davano sempre lo stesso risultato: incrociava un gamete maschile in un fiore bianco e un gamete femminile in un fiore viola ottenendo come risultato dei fiori viola. Invertendo i sessi (gamete femminile in un fiore bianco) il risultato non cambiava.

Mendel quindi ipotizza che il carattere rugoso che scompariva nella F1 doveva essere però mantenuto in qualche modo perché ricompariva nella F2.

Prima legge di Mendel:

Ciascun carattere è codificato da una coppia di fattori genetici (alleli) che vengono rappresentati con delle lettere. RR= semi lisci rr=semi rugosi

Nella generazione parentale lisci erano linee pure quindi avevano alleli RR, alleli identici.

Nella generazione F1 si ottiene un pisello con genotipo Rr ma manifesta solamente il fenotipo dominante (R). il dominante è quello che domina e quello recessivo sparisce nella progenie **eterozigote**.

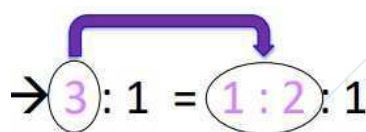
Incrociando tra loro le F1 all'inizio pensava di ottenere gameti differenti con uguale probabilità (o un allele o l'altro). Si ottiene però una F2 che mostra un fenotipo dominante e recessivo in rapporto 3:1 perché dipende dalle combinazioni casuali dei gameti che si incontrano in modo casuale per dare origine alla progenie.

Risultato F2: $\frac{1}{4}$ RR, $\frac{1}{4}$ rR, $\frac{1}{4}$ Rr, $\frac{1}{4}$ rr
rR e Rr: sono indistinguibili

- I "fattori" mendeliani oggi si chiamano geni
- Gli alleli sono versioni diverse dello stesso gene
- Un individuo con due alleli identici viene definito **omozigote**
- Un individuo con due alleli diversi viene definito **eterozigote**
- Il genotipo definisce la composizione allelica di un individuo
- Il fenotipo si riferisce all'aspetto esteriore di un individuo

Mendel decide poi di far fecondare la F2:

I semi rugosi sono per forza omozigoti perché il carattere recessivo si manifesta solamente con entrambi gli alleli recessivi. Quando fa fecondare la pianta con semi lisci non sono tutte uguali (RR ma altre Rr) Quando autofeconda Rr si ottengono di nuovo progenie in rapporto 3:1 semi lisci-rugosi



3 si può dividere in $\frac{1}{3}$ dominante dominante (omozigoti)
 $\frac{2}{3}$ eterozigoti

Mendel quindi formula il test cross: gli individui della F1 sono effettivamente eterozigoti? Sono tutti col fenotipo dominante.

Quadrato di Punnett:

è una tabella che permette di prevedere il risultato di incroci genetici.

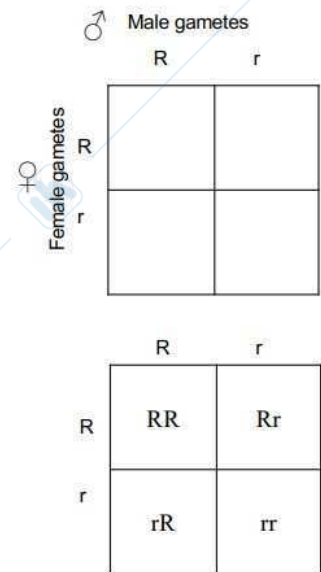
1. genotipi dei due parentali:

- Parentale maschile = R r
- Parentale femminile = R r

2. Scrivere ai lati possibili gameti che possono essere prodotti da ciascun parentale

- Parentale maschile: R oppure r
- Parentale femminile: R oppure r

3. Scrivi nei singoli quadrati i genotipi della progenie che si ottengono dalla combinazione dei vari gameti



Predire il risultato di un incrocio:

La probabilità: possibilità che un evento avvenga. Si divide in:

- probabilità **teorica**: definisco qual è la probabilità che mi aspetto
- probabilità **empirica**: numero effettivo di volte in cui si osserva l'evento

Come calcolo la probabilità?

- **regola del prodotto**: se considero due eventi indipendenti tra loro (non si influenzano a vicenda) allora la probabilità che si verifichino contemporaneamente è data dal prodotto delle due probabilità.
- **regola della somma**: quando voglio sapere la probabilità di ottenere un evento oppure un altro evento (o uno o l'altro)

Ci dà la probabilità di ciascun genotipo nella progenie F2

Spiegazione

molecolare:

Ma com'è possibile che un allele sia dominante e uno recessivo?

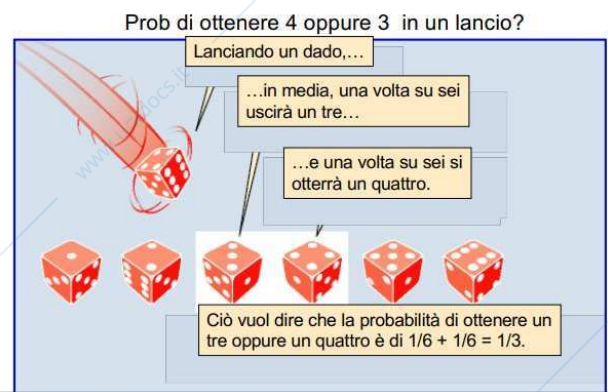
L'allele dominante codifica per un enzima che è responsabile di una reazione che va a ramificare l'amido all'interno del seme di pisello, è quindi una proteina attiva.

L'allele recessivo, al contrario, è una variante della sequenza di questo gene e produce un enzima inattivo, l'enzima non funziona. Determina che l'amido non venga ramificato e porta alla formazione del seme rugoso.

Come mai però è dominante sul recessivo?

In una pianta eterozigote, l'allele dominante mi produce abbastanza l'enzima funzionante che va a ramificare l'amido quindi poi il fenotipo che appare è comunque il pisello liscio.

Mendel fu il primo a poter effettuare e considerare i risultati dell'esperimento da un punto di vista quantitativo.



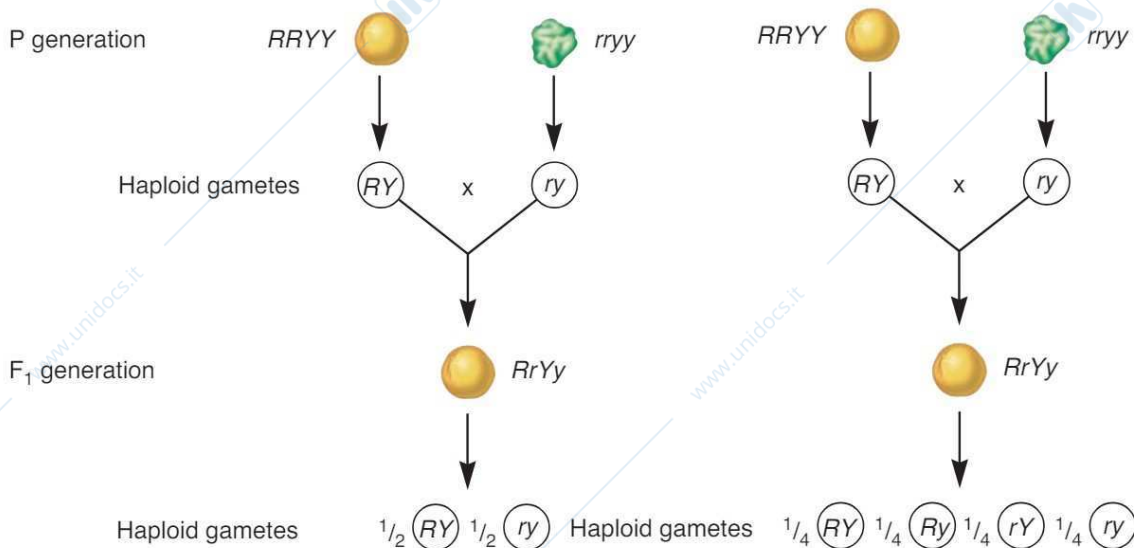
Incroci di diibridi:

Mendel considerò poi piante di piselli che differivano per due caratteri (**diibridi**). Prese es. colore del seme e la forma del seme (liscio o rugoso)

Prese una linea pura con semi gialli e lisci e la incrociò con semi rugosi e semi verdi.

Ottiene F1: tutte le piante mostrano i fenotipi dominanti (semi gialli e lisci).

Per la generazione F2 fa 2 ipotesi:



- i due caratteri vengono ereditati insieme: i fattori rimangono "attaccati" tra loro quindi mi aspetto gameti solo di 2 tipi RY o ry

- assortimento indipendente: gli alleli formano tutte le possibili combinazioni.

Mendel fa quindi l'esperimento e nella F2 ottiene 4 tipi di piante:

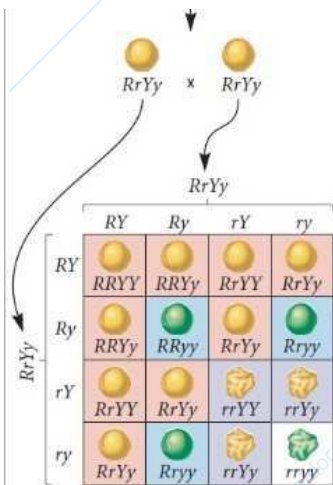
- piante che mostravano le due caratteristiche parentali: seme giallo e liscio e seme verde rugoso
- piante con semi gialli rugosi oppure verdi e lisci.

Ottenendo come risultato:



Quindi arrivò alla conclusione che queste piante seguono l'ipotesi dell'**assortimento indipendente**.

Possiamo quindi avere nella F2, ben 16 combinazioni di gameti:



2 legge

- 1/16 SS YY
- 2/16 Ss YY
- 2/16 SS Yy
- 4/16 Ss Yy
- 1/16 SS yy
- 2/16 Ss yy
- 1/16 ss YY
- 2/16 ss Yy
- 1/16 ss yy

S- Y- 9 lisci e gialli

NON PARENTALI

S- yy 3 lisci e verdi

ss Y- 3 rugosi e gialli

ss yy 1 rugosi e verdi

di Mendel:

Durante la formazione dei gameti, i fattori responsabili dei due fattori si assortiscono indipendentemente gli uni dagli altri. Concettualmente, un incrocio tra diibridi è come due incroci tra monoibridi condotti separatamente (eventi indipendenti)

In realtà alcuni caratteri però si comportano secondo l'ipotesi 1, si ereditano insieme.

L'assortimento indipendente non vale quindi per tutte le coppie di caratteri; altre coppie ancora di caratteri si comportano in modo intermedio.

Un modo alternativo per rappresentare la seconda legge sono i diagrammi ramificati. Considero un carattere e un gene per volta e poi faccio il prodotto delle singole probabilità

es. $SsYy \times ssyy$ ottengo:

	S	s
S	Ss	Ss
s	Ss	Ss

	Y	y
Y	Yy	Yy
y	Yy	Yy

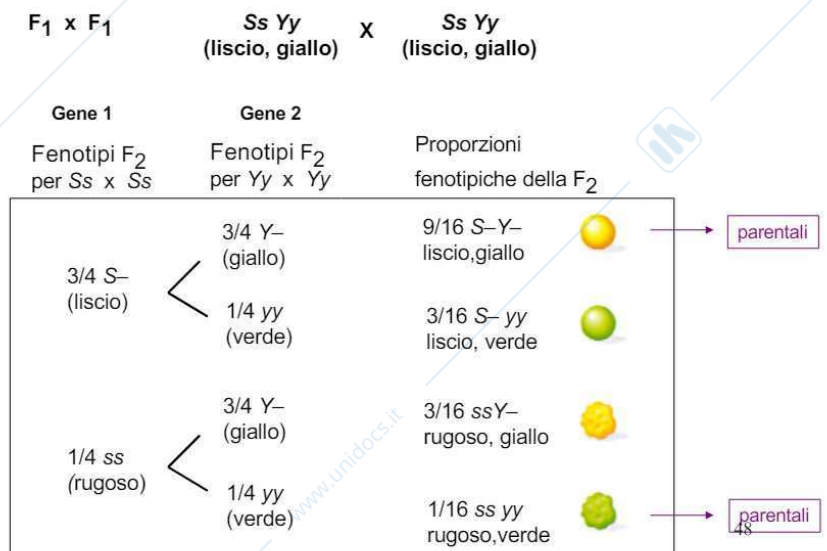
ottengo $\frac{1}{2}$ liscio e $\frac{1}{2}$ rugoso, $\frac{1}{2}$ verde e $\frac{1}{2}$ giallo.
moltiplico poi i risultati.

- $\frac{1}{4}$ lisci e rugosi
- $\frac{1}{4}$ lisci e verdi
- $\frac{1}{4}$ gialli e rugosi
- $\frac{1}{4}$ verdi e rugosi

incrocio tra tri-ibridi:

$SsYyCc \times SsYyCc$

$\frac{3}{4}$ S- da cui avremo $\frac{3}{4}$ Y- e $\frac{1}{4}$ yy da cui avremo $\frac{3}{4}$ Cc e $\frac{1}{4}$ cc poi moltiplico in base a cosa voglio ottenere
es. $\frac{27}{64}$ S- Y- C-
 $\frac{1}{4}$ ss da cui avremo: $\frac{3}{4}$ Y- e $\frac{1}{4}$ yy



Incroci tra organismi eterozigoti per geni che segregano indipendentemente *

Numero di Coppie alleliche segreganti	Numero dei diversi tipi di gameti che si formano	Numero di diverse classi genotipiche nella progenie	Numero di diverse classi fenotipiche nella progenie
1	2	3	2
2	4	9	4
3	8	27	8
n	2ⁿ	3ⁿ	2ⁿ

Nel 1800 in modo parallelo c'erano altre investigazioni per andare a studiare le cellule attraverso il microscopio: si scoprì che all'interno delle cellule era possibile osservare il nucleo ma non c'erano tecniche per andare a colorare le strutture cellulari. Grazie a un metodo che andava a colorare la cromatina, si osservò che all'interno dei nuclei c'era questa sostanza che si colorava,

la "cromatina", e vennero osservate per la prima volta queste strutture che erano i cromosomi. I cromosomi sono i responsabili del trasporto delle informazioni genetiche.

La statistica è nata in parallelo con la genetica.

Alcuni principi di statistica sono fondamentali per andare a predire i risultati genetici.

biometria: disciplina che analizza la variabilità biologica cercando di capire e predire come alcuni caratteri possono essere trasmessi geneticamente. Credeva di spiegare l'ereditarietà di qualsiasi carattere.

Con la riscoperta delle leggi di Mendel, apparve chiaro quali erano i principi di base di come i caratteri potevano essere trasmessi dai genitori ai figli.

2 scuole di pensiero:

1. capeggiata da Pearson: ampliare il modello mendeliano, studiare i caratteri analizzati da Mendel. Caratteri che si mostrano in due forme alternative con pattern di ereditarietà discontinua.
2. L'altra scuola credeva che le leggi di Mendel valessero solamente per quei particolari caratteri e che fosse quindi un'eccezione. Non era possibile spiegare la trasmissione di caratteri quantitativi. es. altezza, colore della pelle.

La teoria di Fisher riuscì a unire fra loro le due scuole e a rendere spiegabile la trasmissione di caratteri quantitativi attraverso la teoria mendeliana. I caratteri non quantitativi non sono dovuti al contributo di un solo gene ma da più geni che si sommano per dare il risultato finale.

Verifica delle ipotesi:

In base alla nostra ipotesi possiamo raccogliere dei dati, confermare l'ipotesi di partenza oppure no e proporre quindi un'ipotesi alternativa.

Dobbiamo quindi fare osservazioni idealmente sull'intera popolazione ma non è possibile quindi si misura la variabile di interesse su un campione, un sottoinsieme della popolazione di interesse. Il campione deve rappresentare il più possibile la popolazione generale e deve essere un campione causale rispetto alla popolazione di partenza. Da questo campione possiamo stimare e ottenere parametri. Ogni volta che studiamo un campione avremo delle deviazioni che sono casuali; ci servono dei criteri che ci permettono di capire se le deviazioni sono semplicemente dovuti al caso o se i dati osservati non confermano l'ipotesi zero ma sono a favore di un'ipotesi alternativa. Servono quindi dei metodi per prendere delle decisioni.

es. Ho un sacchetto con 1000 palline rosse e 1000 palline nere. Voglio sapere qual è la proporzione di palline rosse e nere e ne tiro fuori solamente 100, il campione è 100 palline. Su queste 100 palline, 40 sono rosse e 60 sono nere.

L'ipotesi 0 è che si ha $\frac{1}{2}$ rosse e $\frac{1}{2}$ bianche. La differenza di 40 e 60 è dovuta al caso o non è vero che dentro questo sacchetto ci sono metà di un colore e metà di un altro?

Quando studiamo dei campioni, tanto più grandi sono, tanto meno sarà l'errore di campionamento

Verifica statistica delle ipotesi:

Prendiamo in considerazione il test del Chi Quadrato: metodo per stabilire la bontà di adattamento dei dati osservati e attesi. .

Test che viene utilizzato per studiare variabili categoriche, non continue.

Dato quantitativo: il colore dei capelli, variazione continua, dal biondo al moro. es altezza

Dato qualitativo: studenti con o senza occhiali, non ci sono altre variazioni.

L'ipotesi 0 è di ottenere $\frac{1}{4}$ di ogni progenie.

1. formulare ipotesi 0 = H_0
2. faccio l'esperimento e determino la stima dei miei parametri nel campione.
3. valuto la probabilità che lo scostamento tra i valori osservati e attesi sia dovuto solo all'effetto del caso o se i dati sono troppi diversi. Devo decidere se accettare o rifiutare l'ipotesi 0

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(f_o - f_a)^2}{f_a} \right]$$

l'analisi delle frequenze: il chi quadrato vale con variabili categoriche; misura di quanto sono simili le frequenze osservate da quelle attese. Faccio la differenza tra l'osservato e l'atteso al quadrato e poi divido per il numero atteso. Il chi quadrato è dato dalla sommatoria di tutte le misure ottenute

Se i miei dati osservati fossero come quelli attesi, il chi quadrato = 0

Se sono molto diversi, il chi quadrato è molto grande; se invece sono simili, il chi quadrato è piccolino.

I gradi di libertà corrispondono al numero di classi che possono variare nel nostro set. Il totale della progenie è noto quindi le variabili che possiamo avere sono 3.

Stabilito il numero totale, la 4 caratteristica si calcola per differenza.

gradi di libertà = $n-1$

Devo fissare un livello di significatività come valore soglia per rifiutare H_0 :

- $P >$ valore soglia (0.05) : le deviazioni tra valori osservati e attesi hanno un'elevata probabilità di essere dovuti al caso, quindi accetto H_0
- $P <$ valore soglia (0.05) : le deviazioni tra valori osservati e attesi hanno una bassa probabilità di essere dovuti al caso, quindi rifiuto H_0

I CROMOSOMI:

"cromo": colorate

"somi: cose

Walter sutton e Theodor Boveri descrissero come si comportavano i cromosomi durante la meiosi per origine dei gameti (cellule germinali) e formularono una teoria cioè che il comportamento dei cromosomi durante la meiosi ricalca perfettamente il comportamento dei fattori ereditari descritti da Mendel, quindi ipotizzavano che i cromosomi rappresentavano la sede su cui erano posizionati i fattori ereditari. Venne poi dimostrata in seguito da un punto di vista genetico grazie agli studi di Morgan sulla drosophila.

I CROMOSOMI:

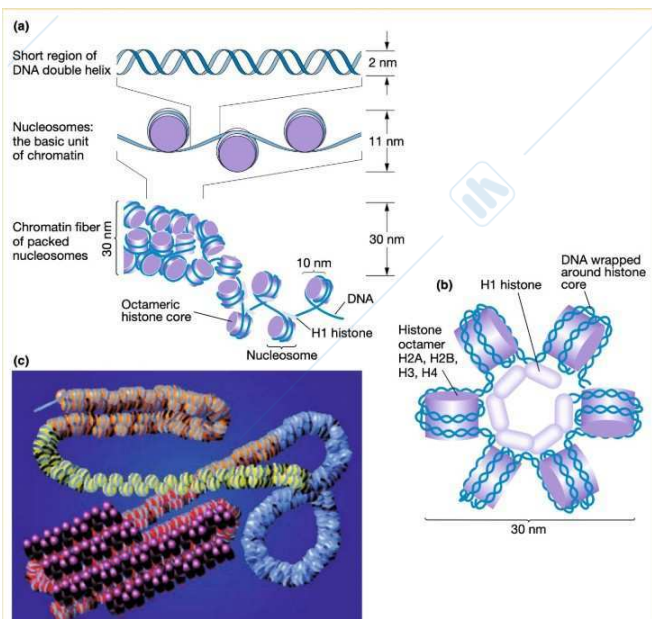
I cromosomi sono strutture cellulari presenti dentro il nucleo che contengono il materiale genetico.

Sono composti da:

- DNA
- proteine

Fenotipo	Numero osservato (o)	Numero atteso (e)	d (o - e)	d ²	d ² /e
Liscio, giallo	154	142	+12	144	1,01
Liscio, verde	124	142	-18	324	2,28
Rugoso, giallo	144	142	+2	4	0,03
Rugoso, verde	146	142	+4	16	0,11
Totale	568	568	0		3,43

Differenze tra procarioti ed eucarioti: le cellule dei batteri (procarioti) contengono un singolo cromosoma e di conseguenza una singola molecola di DNA circolare presente nel citoplasma. hanno un nucleo. Negli eucarioti il materiale è suddiviso in diversi cromosomi: il DNA non è libero ma è associato a diverse proteine che formano la struttura chiamata "cromatina". Il DNA non ha una struttura lineare ma si compatta attraverso il legame con proteine specializzate che sono gli "istoni" formando la cromatina.

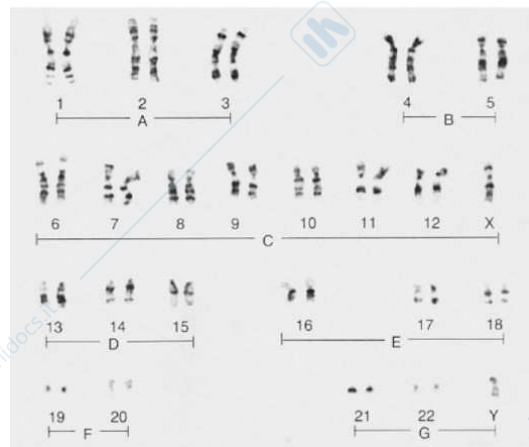


La cromatina può essere più o meno compatta a seconda della regione e della funzione. Vari nucleosomi si compattano ulteriormente andando a formare la fibra di cromatina.

Durante la maggior parte della vita della cellula (interfase) la cromatina è una sostanza dispersa. I cromosomi sono visibili all'interno delle cellule quando la cromatina si compatta al momento della mitosi ed è possibile osservare i cromosomi al microscopio.

Citogenetica: studia la struttura dei cromosomi di una cellula

Cariotipo: rappresentazione della costituzione cromosomica della cellula al microscopio attraverso delle tecniche di colorazione che individuano i cromosomi attraverso pattern di bande specifici. Per avere il cariotipo devo trovare cellule che si stanno dividendo (in mitosi) (es. cellule del sangue) e si aggiunge poi un composto che ferma le cellule nella metafase, si prelevano le cellule e si fanno aderire a un vetrino, li si colorano e si osservano al microscopio ottenendo il cariotipo.



Ogni coppia di cromosomi è caratterizzato da una dimensione particolare e possono avere diverse forme a seconda della posizione del centromero: piccolo restringimento nei bracci dei cromosomi che serve come punto di formazione del cinetocore che durante la mitosi serve a connettersi con le fibre del fuso mitotico per poter separare i cromosomi durante la mitosi.

Centromere location	Designation	Metaphase shape	Anaphase shape
Middle	Metacentric		
Between middle and end	Submetacentric		
Close to end	Acrocentric		
At end	Telocentric		

Tipi di cromosomi:

- metacentrico: il centromero si trova a metà del cromosoma
- submetacentrico: il centromero non si trova esattamente nel centro
- acrocentrico
- telocentrico: si trova in uno dei vertici dei due cromatidi.

In ogni cellula umana sono presenti 23 coppie di cromosomi in ogni cellula.

La maggior parte degli organismi sono diploidi; cromosomi delle cellule somatiche sono in coppia e i cromosomi derivano uno dalla madre e uno dal padre: **CROMOSOMI OMOLOGHI**

Le cellule germinali invece sono aploidi: contengono un solo membro di ciascuna coppia e hanno solamente uno dei due membri della coppia. Attraverso la fecondazione le cellule aploidi si uniscono per dare poi lo zigote.

l'uomo ha $n = 23$ ma essendo diploide ha 46 cromosomi.

DIVISIONE CELLULARE:

procarioti: la divisione cellulare avviene tramite riproduzione sessuata: scissione binaria.

il cromosoma si duplica e poi viene diviso semplicemente fra le 2 cellule figlie.

Negli eucarioti ci sono 2 diversi processi: mitosi (cellule somatiche) e meiosi (linea germinale, meccanismo che dà origine ai gameti aploidi da cellule diploidi)

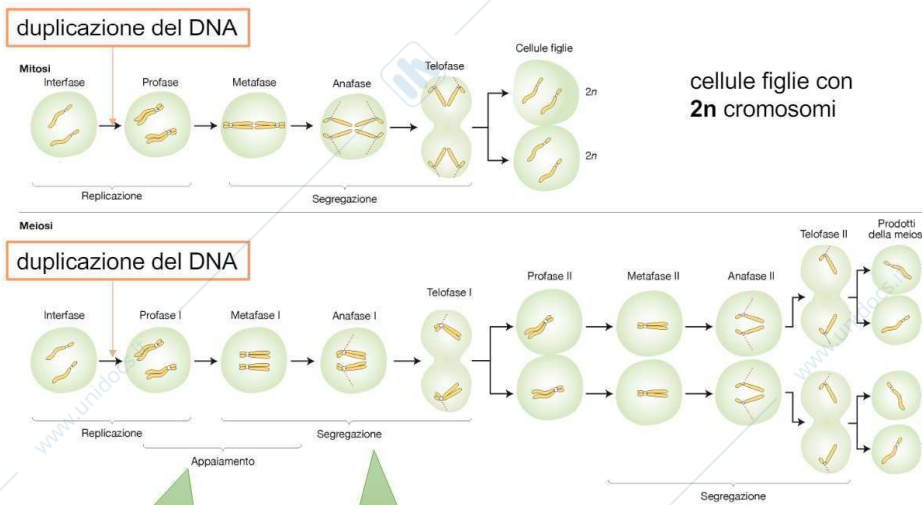
Attraverso la mitosi le cellule somatiche producono le stesse cellule con la stessa composizione cromosomica.

Nella meiosi avremo la produzione di gameti aploidi: metà dei cromosomi rispetto alla cellula parentale diploide. La meiosi genera diversità genetica.

Prima della divisione cellulare le cellule duplicano il proprio dna (cromosomi) sia prima della mitosi che prima della meiosi.

Alla fine della mitosi: cellule figlie con gli stessi cromosomi

Meiosi: 2 cicli di divisione precedute da un solo ciclo di duplicazione dei cromosomi quindi otteniamo cellule aploidi



Come sono fatti i cromosomi?

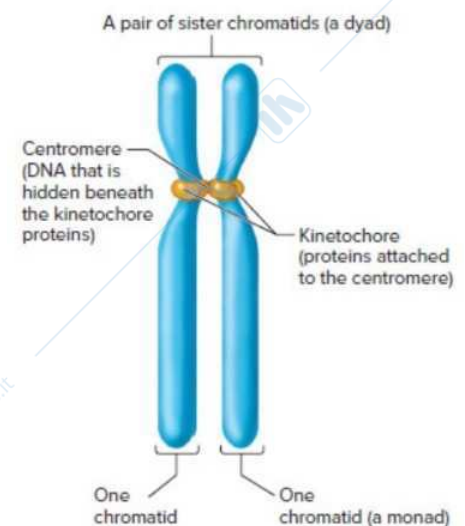
Quando si condensano, sono composti da 2 strutture che sono i cromatidi fratelli uniti fra di loro attraverso il centromero dove si forma il cinetocore.

cromatidi fratelli: le due copie della stessa molecola di DNA che si sono duplicati in fase S

Fase G1: segue la fase M attraverso la quale le cellule accrescono

Fase S: avviene la duplicazione del DNA, il genoma viene duplicato

Fase G2: la cellula si prepara per la mitosi



Da un punto di vista dei cromosomi, prima della fase S i cromosomi sono formati da un unico cromatide che corrisponde a una molecola di DNA a doppia elica.

Le due copie di ogni singola molecola di DNA rimangono unite fra di loro uniti dal centromero e tenute insieme dalle coesine:

$2n$ cromosomi: dopo la fase S i cromatidi sono duplicati.

C= contenuto aploide. in una diploide= $2C$
 dopo la fase S il contenuto di dna è $4C$

mitosi: i 2 cromatidi fratelli si separano e il contenuto torna a essere di $2c$ nelle cellule figlie.

cinetocore: punto di attacco dei microtubuli

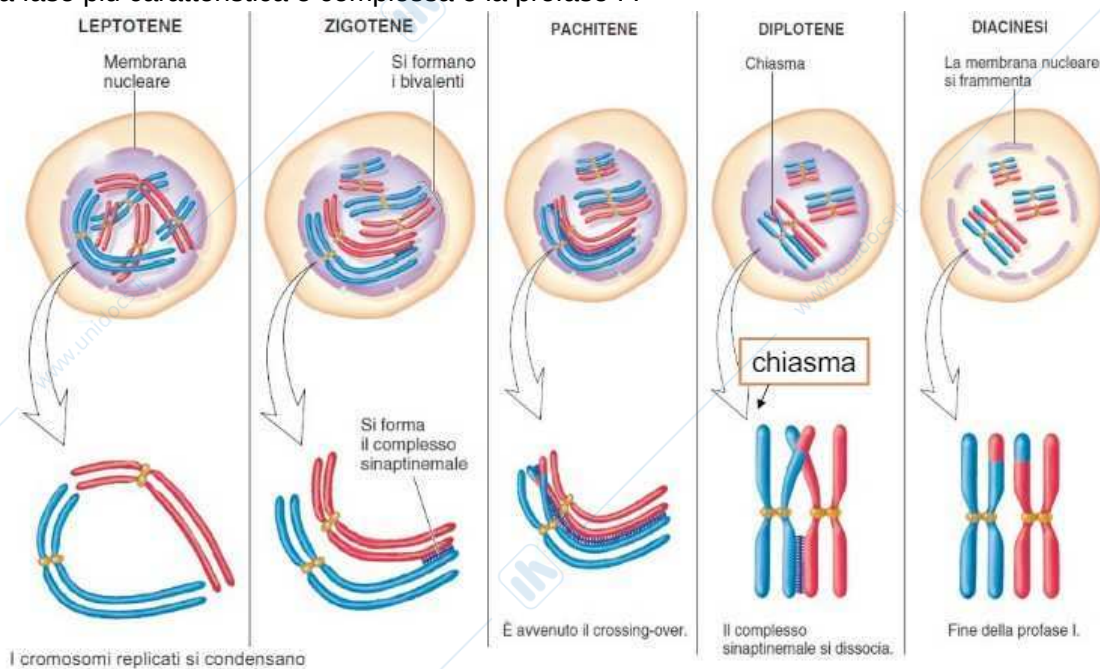
coesine: tengono insieme i cromatidi fratelli e creano un meccanismo che permette di sentire la tensione fra i due cromatidi fratelli che da una parte sono tenuti dalle coesine e dall'altra sono tirati dai microtubuli: meccanismo di rilevazione della tensione. Costituisce il segnale che dice alla cellula e manda un checkpoint, dice che tutti i cromosomi sono tutti correttamente allineati nella metafase. Si rimuovono le coesine e i cromosomi vengono tirati e separati verso poli opposti.

Meiosi: processo che permette di creare gameti aploidi da una cellula diploide. E' composta da 2 divisioni cellulari: meiosi I e meiosi II

nella meiosi I si separano i cromosomi omologhi. i cromatidi fratelli restano attaccati tra loro.

nella meiosi II: non avviene un'altra duplicazione del DNA ma si separano i cromatidi fratelli.

La fase più caratteristica e complessa è la profase I :



Durante la profase I:

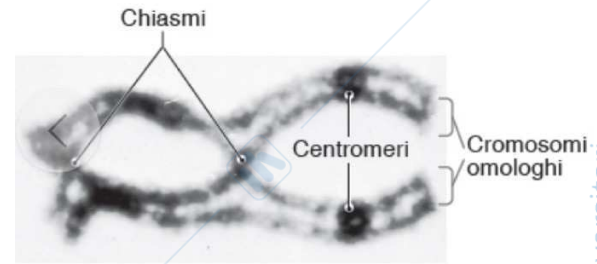
- i cromosomi omologhi si appaiano: **sinapsi**.

- Ciascuna coppia di cromosomi, sulla base dell'omologia di sequenza, si appaia tra di loro costituendo il complesso sinaptnemale: **4 cromatidi**

- ricombinazione meiotica: rotture sui filamenti a doppia elica dei cromatidi fratelli che vengono rotti e riuniti con uno scambio reciproco di materiale tra i cromosomi omologhi: **crossing over**. (avviene nel momento del pachitene della profase I)

Alla fine i due cromatidi rimangono attaccati tra loro perchè si staccano i cromosomi omologhi che hanno effettuato crossing over.

Chiasmi: incroci fra i 2 cromosomi omologhi; corrispondono ai siti in cui sono avvenuti i crossing over. è presente più di un chiasmo in ogni coppia di cromosomi omologhi. Ciò che è importante è che deve avvenire **ALMENO** un crossing over perchè la presenza dei chiasmi ha un ruolo molto importante per la corretta segregazione dei cromosomi in anafase.



segregazione dei cromosomi:

Come già accennato, i cromatidi fratelli sono uniti dalle coesione. I cromosomi omologhi alla fine della profase I vengono tenuti insieme dai chiasmi; i due cromosomi che hanno subito crossing over rimangono appaiati attraverso i chiasmi. Le fibre del fuso si attaccano ai cinetocori di ciascuna coppia di cromatidi fratelli. Da una parte sono attaccate da un cinetocore del cromosoma omologo e dall'altra parte dal cinetocore dell'altro cromosoma omologo.

Shugoshin: protegge il centromero inibendo la separasi: elimina le coesine ma non elimina le coesine nei centromeri perchè protette dalla shugoshin

Nella meiosi II le fibre del fuso verranno a entrare in contatto con i cinetocori dei due cromatidi fratelli. La separasi elimina la coesina a livello dei centromeri e i due cromatidi fratelli migrano ai poli opposti.

Da cosa è determinata la diversità genetica?

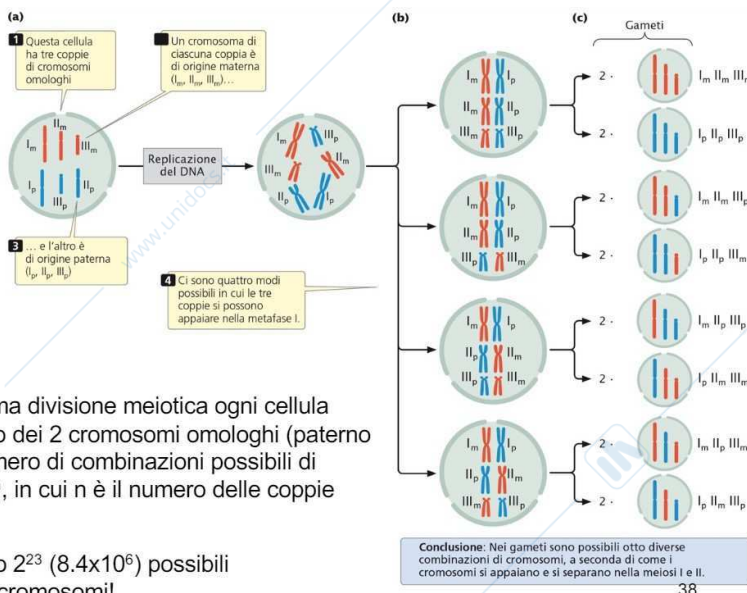
- ciascuna coppia di cromosomi omologhi alla meiosi I può **segregare in modo indipendente**.

L'orientamento delle coppie dei cromosomi è causale.

- **crossing over**: i cromatidi risultanti sono una miscela tra materni e paterni.

Nelle cellule animali la meiosi in realtà avviene leggermente diverso nel genere maschile e femminile:

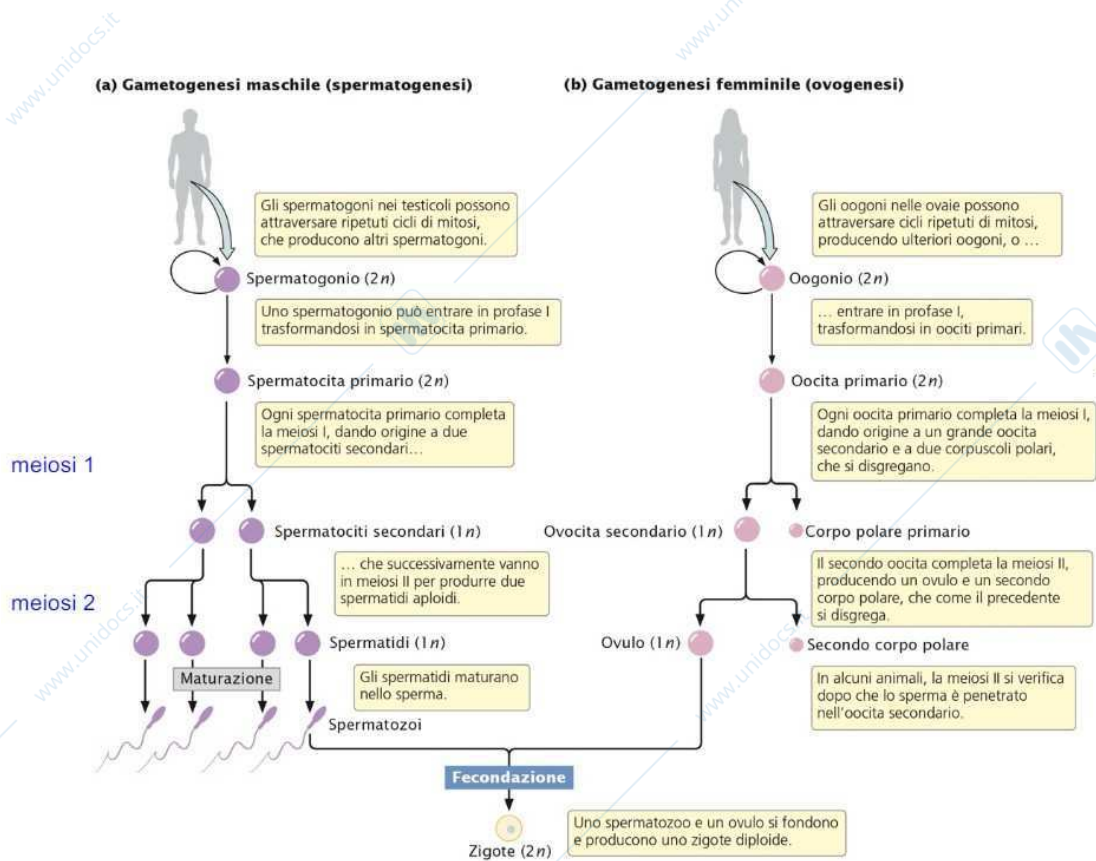
le cellule germinali primordiali migrano nelle gonadi embrionali e vanno incontro a mitosi per formare gli **oogoni** nelle femmine e **spermatogoni** nei maschi. Successivamente gli oociti primari e spermatoociti primari andranno incontro alle due divisioni meiotiche per dare origine a spermatozoi e cellule uovo. Nei maschi le cellule indifferenziate continuano a dividersi in mitosi durante tutta la vita. Nella femmina la proliferazione delle



na divisione meiotica ogni cellula
o dei 2 cromosomi omologhi (paterno
nero di combinazioni possibili di
, in cui n è il numero delle coppie

o 2^{23} (8.4×10^6) possibili
cromosomil

cellule indifferenziate avviene solo nella fase prenatale: alla nascita gli oociti primari si arrestano in profase I, nelle ovaie c'è un numero definito di oociti primari. A ogni ciclo mestruale verrà rilasciato un solo oocita primario che completerà la meiosi I e meiosi II.



Quindi c'è parallelismo tra le proprietà dei cromosomi e le leggi di Mendel e si propone la **teoria cromosomica dell'ereditarietà**:

- i cromosomi sono la sede del materiale genetico
- nelle cellule eucariotiche i nuclei contengono coppie di cromosomi omologhi
- durante la meiosi, ogni coppia segrega nelle due cellule figlie
- durante la formazione dei gameti ciascuna coppia di cromosomi omologhi segrega indipendentemente dalle altre
- durante la fecondazione i gameti di ogni genitore si uniscono casualmente e la progenie riceve un assetto completo di cromosomi da ciascun genitore

Mendel diceva che i caratteri sono determinati da coppie di alleli in cui possiamo avere in un eterozigote un allele S e un allele s. Gli alleli corrispondono e risiedono nei 2 cromosomi omologhi, Secondo la seconda legge di Mendel se ci sono più caratteri questi si comportano indipendentemente gli uni dagli altri. Se abbiamo un eterozigote per due caratteri si possono formare 4 possibili combinazioni di alleli nei gameti. Le copie materne e paterne migrano in poli opposti in modo indipendente: questo è vero se gli alleli non sono sullo stesso cromosoma.

I caratteri che Mendel aveva scelto erano in geni su cromosomi diversi e osservò che segregavano sempre in modo indipendente. Se avesse studiato coppie diverse, avrebbe notato un risultato differente. coppie di caratteri migrano più frequentemente insieme nello stesso gamete.

Eredità legata al cromosoma X:

La prova della teoria cromosomica dell'eredità venne sostenuta intorno agli anni 30 del 900 grazie a Morgan che fu il primo a introdurre l'utilizzo di un organismo modello: la drosophila (moscerino della frutta). La drosophila rappresenta un ottimo organismo modello poiché è un organismo piccolo, facilmente recuperabile e facilmente allevabile in laboratorio facendola crescere in fiasche e fornendo

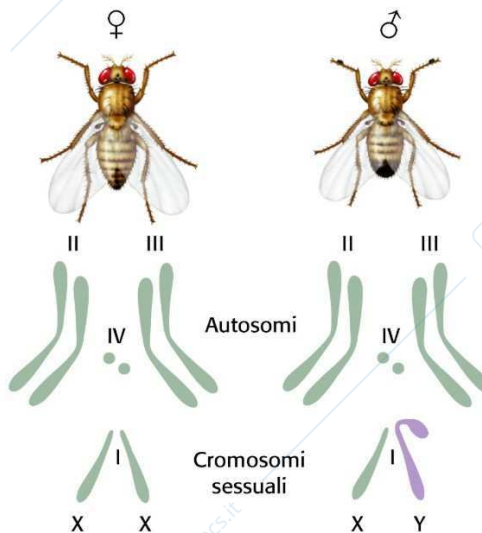
fonte di cibo. Morgan riuscì a dimostrare la teoria cromosomica dell'ereditarietà perché si accorse che nelle eccezioni il comportamento anomalo nella trasmissione mendeliana di un carattere corrispondeva a un'anomalia nei cromosomi.

Caratteristiche della *Drosophila* come organismo modello:

- ciclo vitale breve (12 giorni)
- prole molto numerosa
- facile da mantenere in laboratorio
- ha pochi cromosomi (4) che si possono facilmente distinguere
- per qualche motivo nelle ghiandole salivari della *Drosophila* si formano cromosomi giganti (**politenici**) ma senza avere una divisione cellulare: mega cromosomi che rendono molto più facile l'osservazione della struttura al microscopio.
- si presenta con vari fenotipi che si possono osservare in natura o indurre attraverso raggi X per generare mutanti. (es. colore degli occhi, forma delle ali)

I maschi e le femmine della *Drosophila* sono facilmente riconoscibili perché hanno una struttura del corpo diversa: le femmine hanno il corpo più allungate.

Quando Morgan osservò al microscopio le cellule della *Drosophila* o di altri insetti si accorse che c'era una differenza tra cromosomi dei maschi e cromosomi delle femmine.



Si accorse quindi che i maschi presentavano coppie di cromosomi sessuali XY mentre la femmina XX: si pensò quindi che la presenza o meno del cromosoma Y avesse qualche influenza sulla determinazione del sesso della *Drosophila*.

eterogametico: cromosomi diversi XY (nei maschi)

sesso **omogametico**: cromosomi XX (nelle femmine)

In alcuni uccelli il sesso omogametico è quello maschile e viceversa QUINDI dipende dagli organismi.

Trasmissione dei cromosomi sessuali:

Il sesso dipende solo da quale cromosoma viene ereditato nel gamete. Quando avviene la meiosi, nelle femmine la coppia di cromosomi X si separa e in ogni gamete ci sarà un cromosoma X. Nei gameti

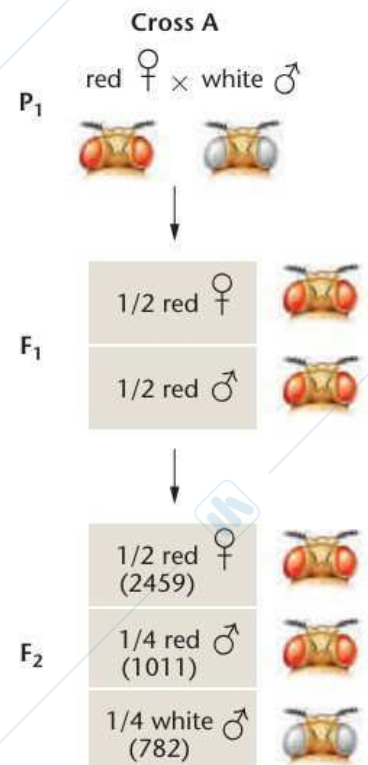
ottenuti dai maschi, sarà presente o il cromosoma X o Y

Morgan quindi stava eseguendo i suoi esperimenti e studiava l'eredità di diversi caratteri della *Drosophila* per le regole dei caratteri ereditari e scoprì una variante fenotipica: un maschio con occhi bianchi (normalmente hanno gli occhi rossi)

wild-type: fenotipo più comunemente osservato, caratteristica normale. Gli occhi rossi sono wild-type. Il fenotipo mutante è quindi avere gli occhi bianchi.

Morgan analizza quindi le leggi di Mendel e incrocia una femmina con occhi rossi con un maschio con occhi bianchi.

La generazione F1 avrà solo occhi rossi (carattere dominante) ma dal punto di vista del genotipo saranno eterozigoti (Aa). Decide poi di incrociare fra di loro gli individui della generazione F1 ottenendo una F2 in cui $\frac{1}{4}$ della progenie mostrava gli occhi bianchi: tutto come aveva predetto Mendel.

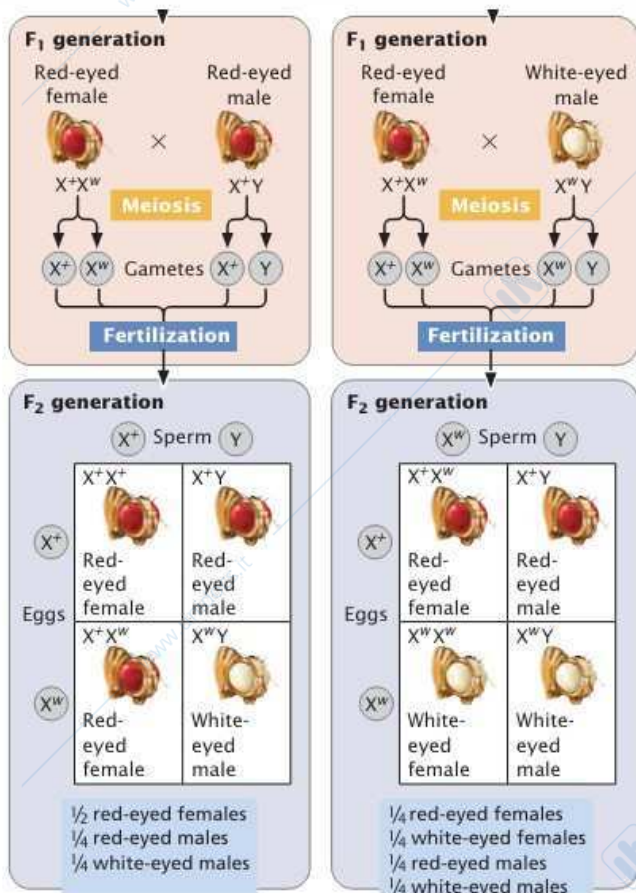
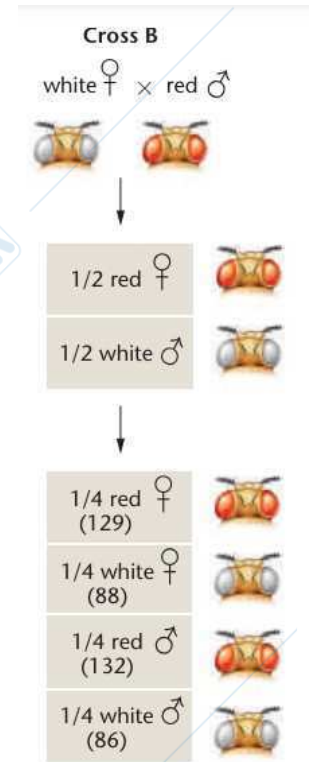


Però c'è qualcosa di strano: si accorge che tutti i moscerini con gli occhi bianchi erano maschi e che quindi non segue l'aspettativa mendeliana perchè per i caratteri mendeliani classici gli incroci erano reciproci e non c'era differenza tra i due sessi. Decide quindi di prendere le femmine con occhi bianchi e incrociarle con maschi con occhi rossi, ottenendo una F1 in cui la metà della progenie ha occhi rossi e metà occhi bianchi. Tutti gli individui con occhi rossi sono femmine mentre gli individui con occhi bianchi sono maschi. Incrocia poi fra loro individui della generazione F1 ottenendo una F2 con 1/4 femmina con occhi rossi, 1/4 femmina con occhi bianchi, 1/4 maschio con occhi rossi e 1/4 maschio con occhi bianchi.

Pensò quindi che il carattere degli occhi rossi fosse legato alla coppia dei cromosomi sessuali.

L'ipotesi fu:

- questo fattore che specifica il carattere degli occhi corrisponde a qualche cosa sul cromosoma X
- le femmine possono quindi essere o omozigoti o eterozigoti perchè hanno due cromosomi X



- i maschi hanno solo un cromosoma X quindi sono emizigoti. Gli alleli sul cromosoma X nei maschi si esprimono direttamente nel fenotipo e non c'è più la relazione sulla dominanza tra gli alleli come invece avviene nelle femmine.

Quindi l'eredità di uno specifico carattere (occhio bianco in Drosophila) segue in parallelo la trasmissione di uno specifico cromosoma (cromosoma X) provando l'ipotesi che i geni sono localizzati sui cromosomi. Caratteri determinati da geni localizzati sul cromosoma X sono detti "Caratteri legati al sesso (X-linked)"

Bridges condusse esperimenti più approfonditi per studiare lo stesso carattere degli occhi rossi e bianchi e si accorse che studiava un grande numero di progenie e se incrociava una femmina con occhi bianchi e un maschio con occhi rossi otteneva una progenie 50% con occhi rossi e 50% con occhi bianchi ma una piccola percentuale, meno dell'1%, aveva un fenotipo strano: alcuni maschi con occhi rossi erano fertili e alcune femmine con occhi bianchi erano fertili. Andando a esaminare i cromosomi di queste femmine con occhi bianchi e i cromosomi dei maschi con occhi rossi scoprì che avevano un assetto cromosomico diverso da quello

atteso e interpretò che questo fenomeno si poteva spiegare con un errore di segregazione dei cromosomi durante la meiosi che portava alla formazione di gameti anomali durante la gametogenesi femminile.

Durante la gametogenesi nelle femmine, ci aspettiamo che i gameti contengano entrambi un allele X ma

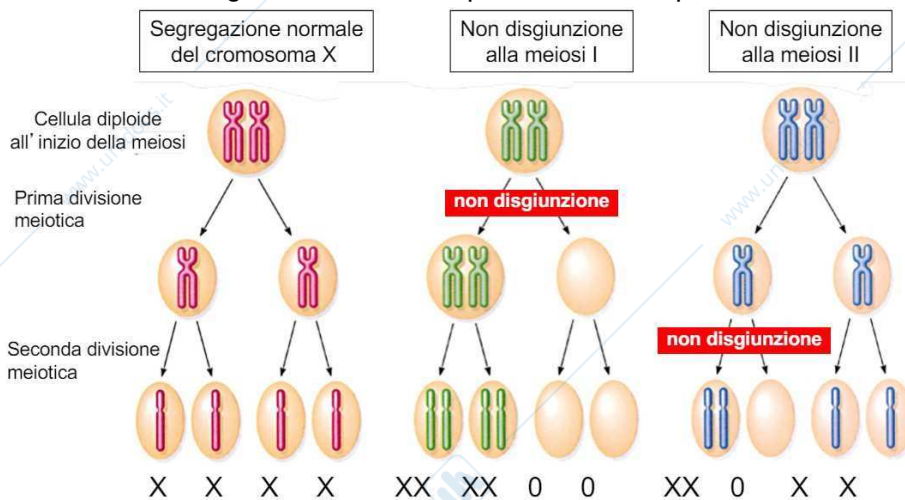
se avviene un errore durante la meiosi, i cromosomi X potrebbero rimanere uniti tra loro e finire tutte e due nella stessa cellula uovo ottenendo così una cellula uovo con due cromosomi XX e una cellula uova senza cromosomi X

Se fecondo questi gameti anomali (evento raro) ottengo il seguente risultato:

- se fecondo un gamete XX con XY posso ottenere un embrione XXX (muoiono precocemente) oppure un embrione XXY che avrà come fenotipo gli occhi bianchi perché ha ricevuto entrambi i cromosomi X dalla madre.

- se fecondo un gamete senza cromosoma X con un gamete XY, posso ottenere XO che deve mostrare occhi rossi, perché X viene dal padre. Se ottengo YO lo sviluppo non è possibile per mancanza del cromosoma X.

Gli errori della disgiunzione meiotica può avvenire in qualsiasi cellula, sia nei maschi che nelle femmine.



La determinazione del sesso è un evento che avviene durante lo sviluppo. In tutti i casi è un evento che dipende da qualche segnale che comporta una cascata di segnalazione genica per cui si attiva una via di geni durante lo sviluppo per sesso maschile o femminile.

Nella drosophila non è il cromosoma X che determina il sesso, ma il rapporto di cromosomi X e di assetti autosomi.

Da cosa deriva la determinazione del sesso?

Il cromosoma Y è irrilevante per lo sviluppo maschile di fatto la drosophila con assetto XO sarà comunque un maschio ma sterile perché non ha il cromosoma Y per lo sviluppo degli spermatozoi: NON È COSÌ PER GLI UMANI

Negli esseri umani il segnale è innescato da un gene segnalatore primario che determina un ulteriore sviluppo dell'embrione in senso maschile o femminile. Questo gene si chiama "SXL" ed è espresso nelle prime fasi dello sviluppo e solo se sono presenti due cromosomi X che stabiliscono l'innescamento della espressione di questo gene. Questa espressione viene mantenuta nelle femmine attraverso un meccanismo di autoregolazione. Se è presente un solo cromosoma X non c'è abbastanza segnale per innescare l'espressione del gene e quindi non viene espresso. La presenza o assenza di SXL modula l'espressione di geni a valle i cui prodotti determinano le caratteristiche somatiche femminili o maschili. Il controllo dell'espressione di proteine sesso-specifiche avviene tramite meccanismi di **splicing differenziale**

Il controllo dell'espressione dei geni è un meccanismo nella drosophila che avviene attraverso la regolazione dello splicing: dallo stesso trascritto primario posso avere diversi mRNA maturi.

Nelle femmine di drosophila quindi avendo XX si attiva SXL che è una proteina che promuove lo splicing alternativo. Nel maschio non c'è produzione di SXL e ci sarà quindi splicing che include un esone con un codone di stop prematuro che porta a una proteina non funzionale.

Il gene SXL promuove a sua volta lo splicing di un altro gene "TRA" che andrà a promuovere un splicing di un altro trascritto prodotto da DSX che andrà a stimolare l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo di tutte le caratteristiche sessuali femminili.

Nel maschio non viene prodotto SXL funzionante, non ci sarà di conseguenza TRA e risulterà nello splicing di DSX in una forma differente con esoni diversi che andranno a stimolare l'espressione di geni specifici per il differenziamento maschile.

La determinazione del sesso nei mammiferi:

Anche nei mammiferi il sesso viene specificato da una diversa costituzione di cromosomi sessuali.

Femmina XX Maschio XY

La femmina può formare gameti solo con cromosomi X mentre il maschio forma gameti con X o con Y.

I cromosomi X e Y nell'uomo hanno un'origine evolutiva comune, avevano la stessa struttura e lo stesso contenuto di geni ma a un certo punto l'evoluzione ha determinato che su Y si è evoluto un gene fondamentale per la determinazione del sesso maschile e alcuni arrangiamenti cromosomici che hanno portato alla perdita di alcuni geni su X che sono omologhi a quelli presenti su Y.

Ci sono però 2 regioni che sono rimaste omologhe: regioni **pseudoautosomiche** (perché presenti in coppia, sia in X che Y e si comportano come autosomi)

- regione PAR1: è la più grande, circa 20 geni con la stessa sequenza sul cromosoma X e Y
- regione PAR2: all'estremità del braccio lungo del cromosoma

Il cromosoma X è molto più grande rispetto al cromosoma Y, contiene circa 1000 geni e molti di questi sono essenziali per lo sviluppo, un embrione senza cromosoma X muore subito dopo la fecondazione, non si sviluppa.

Il cromosoma Y invece ha pochi geni espressi, sono circa 200

La maggior parte del braccio lungo contiene eterocromatina.

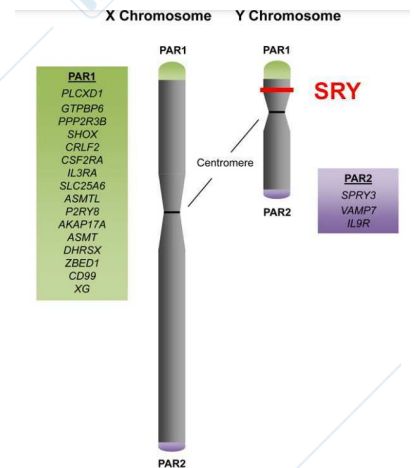
sul cromosoma Y ci sono pochi geni espressi, un embrione si può sviluppare anche senza Y ma sul cromosoma Y ci sono geni deputati per il differenziamento degli spermatozoi per cui se a un individuo manca il cromosoma Y, sarà sterile.

Sul cromosoma Y c'è un gene fondamentale chiamato "SRY" che si occupa di innescare lo sviluppo in senso maschile durante lo sviluppo delle fasi precoci.

I crossing over tra i cromosomi sessuali avvengono solamente nelle regioni pseudoautosomiche.

"aneuploidia" malattie dovute a numero diverso di cromosomi:

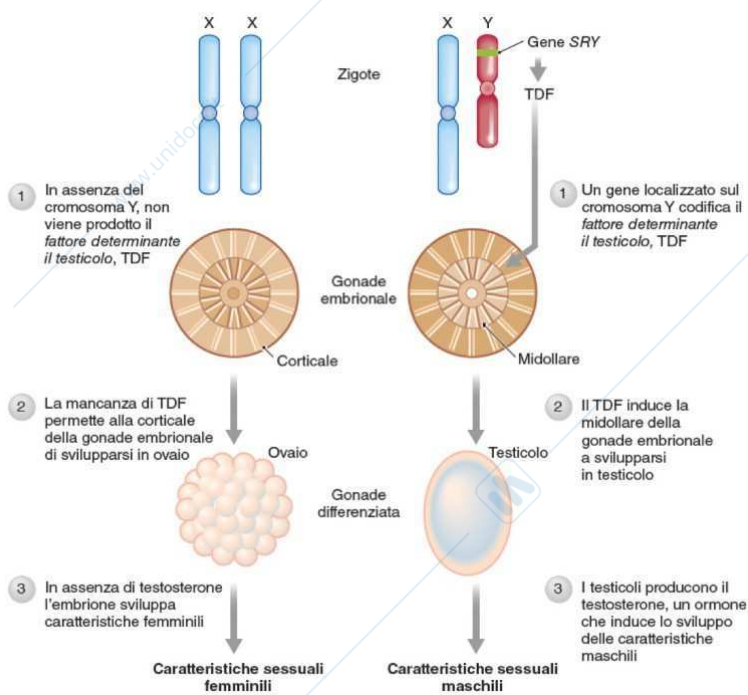
- Sindrome di Klinefelter: la più frequente, con un cariotipo XXY, sono individui maschi ma con alcune lievi alterazioni fenotipiche (più alti e sterili)
- Sindrome di Turner: individui con solo una X con alterazioni fenotipiche, ridotta fertilità e alcune caratteristiche femminili immature.



- **Sindrome del triplo X:** sono femmine e non manifestano nessuna caratteristica particolare, alcune hanno ridotta fertilità
- **individui con XYY:** maschi normali, più alti della media e alcuni possono avere problemi di fertilità

Tutte le aneuploidie sono dovute a errori di disgiunzione dei cromosomi durante la meiosi (sia meiosi I che II); gli errori di disgiunzione possono avvenire sia nei cromosomi sessuali sia in quelli autosomici. Tuttavia le aneuploidie che riguardano gli autosomi sono molto rare, a parte la trisomia 21 è molto raro dare origine a embrioni con sviluppo anonimo che vengono eliminati quindi il bambino non nasce. Le aneuploidie dei cromosomi sessuali sono più frequenti perché il fenotipo risultante è poco grave.

Come avviene il differenziamento sessuale nell'uomo?



Il differenziamento avviene nelle prime fasi dello sviluppo, inizialmente durante le prime fasi, le gonadi primordiali sono indifferenziate (no differenze tra maschile e femminile). In una fase precoce dello sviluppo, se c'è il cromosoma Y il gene SRY si attiva e viene espresso precocemente in individui XY. L'espressione di questo gene fa attivare lo sviluppo dei testicoli (c'è una cascata di espressione genica e la gonade embrionale viene differenziata in testicolo)

Se non c'è il cromosoma Y, il gene SRY non viene espresso e il differenziamento della gonade primordiale si sviluppa in ovaio. Il testicolo produce testosterone dal quale derivano poi tutte le caratteristiche maschili. L'ovaio produce ovaia in assenza di testosterone quindi lo sviluppo femminile è lo sviluppo di default

SRY chiamato TDF: fattore che determina lo

sviluppo dei testicoli.

E' possibile inserire all'interno del DNA del materiale genetico che corrisponde al gene SRY che si inserisce nel genoma e il topo modificato che ha due cromosomi XX si sviluppa in un maschio invece che in femmina. Quindi la presenza di SRY è sufficiente per il differenziamento maschile ma sono sterili perché l'assenza di geni sul cromosoma Y sono importanti per il differenziamento degli spermatozoi.

Il ruolo fondamentale di SRY si dimostra anche in rari casi di reversione del sesso:

es. individuo con XX ma un pezzo di Y è stato spostato su il cromosoma X

Il differenziamento sessuale è un processo di sviluppo che comporta una serie di passaggi; SRY non è l'unico gene per avere un normale sviluppo sessuale la cui espressione può essere modificata da diverse varianti e comportare una serie di condizioni di differenze dello sviluppo sessuale: lo sviluppo normale è quello più frequente.

Come mai gli errori sui cromosomi autosomici non sono tollerati e su quelli sessuali si?

Affinché un embrione possa svilupparsi normalmente, il dosaggio genico è importante ed è importante che ciascun gene venga espresso nel corretto dosaggio; una grande proporzione di geni devono essere espressi nel corretto dosaggio (per gli autosomi), il dosaggio di doppia copia è quello di default. Se c'è un cromosoma in più, sbilancia tutti i geni presenti su quel cromosoma e viene alterato: non è compatibile con un normale sviluppo.

Per i cromosomi sessuali, nelle femmine abbiamo XX e nei maschi solo un X e questo pone già un problema di compensazione del dosaggio di tutti i geni che sono sui cromosomi X nelle femmine rispetto ai maschi. Sul cromosoma X ci sono tanti geni essenziali per lo sviluppo e l'evoluzione ha escogitato un modo per andare a compensare i geni. Per controbilanciare il fatto che nelle femmine ci sono 2 X e nei maschi solo una X, c'è un meccanismo che inattiva uno dei due cromosomi X: **inattivazione del cromosoma X** (e se ho sry in X ma in quello inattivo si manifesta ???)

Osservando la cromatina dei nuclei di cellule di maschi e femmine si nota che nelle femmine di mammifero c'è una zona di addensamento che non c'è nei maschi e che prende il nome di "corpo di barr" (zona di eterocromatina). E' stato visto che i corpi di barr sono proporzionali al numero di cromosomi X; quindi il corpo di barr corrisponde alla cromatina di X che viene inattivato.

Ipotesi di Mary Lyon:

Fu la prima che ipotizzò che questo corpo di barr fosse la cromatina corrispondente al cromosoma X inattivo. Durante lo sviluppo nelle cellule delle femmine inizialmente tutti e due i cromosomi X sono attivi ma a un certo punto nelle cellule somatiche uno dei due cromosomi X viene determinato e inattivato, la cromatina si condensa e diventa corpo di Barr.

Questa attivazione avviene quando abbiamo circa un centinaio di cellule nell'embrione. Questa inattivazione poi viene mantenuta e trasmessa clonalmente per mitosi a tutte le altre cellule. Indipendente in ogni cellula si può disattivare sia l'X materno sia l'X paterno. Una volta che questo cromosoma viene inattivato, lo stato di inattivazione è come una memoria. Alla fine una femmina adulta avrà alcune cellule in cui la X inattivo materna e altre in cui l'X inattivo è paterno. Le femmine di mammifero si comportano quindi come dei mosaici: mosaico genetico, organismo in cui ci sono alcune cellule con costituzione genetica diversa da altre.

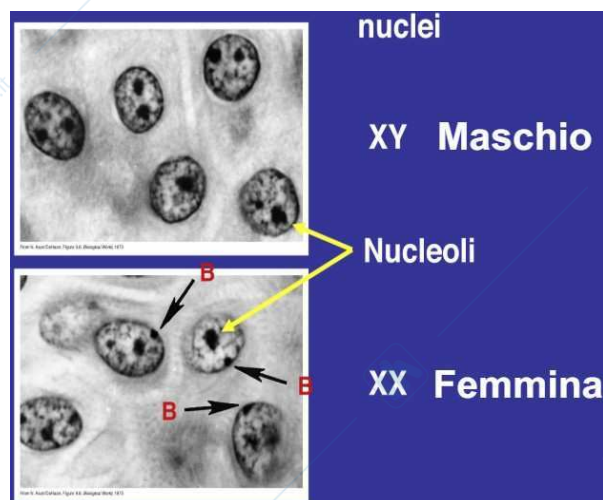
L'inattivazione del cromosoma X è un fenomeno epigenetico, implica un meccanismo di regolazione dell'espressione genica, i geni NON vengono cancellati ma semplicemente non vengono trascritti perché il cromosoma si condensa.

epigenetico: cambiamento dell'espressione genica senza avere cambiamento della sequenza di DNA. Il cromosoma rimane uguale e semplicemente si condensa. .

Per tutti gli autosomi un gene viene espresso per tutti e due gli alleli mentre per il cromosoma X si esprime solo uno due due alleli: si studia l'espressione di una proteina codificata da un gene. Enzima G-6.PD attraverso l'elettroforesi si può analizzare che i maschi esprimono solo slow g-6-pd o solo fast g-6-pd mentre nelle femmine dipende da qualche cromosoma viene silenziato.

C'è un meccanismo che conta quanti cromosomi sono da inattivare.

Ci sono però dei geni che sfuggono all'inattivazione del cromosoma X e sono quei geni della regione pseudoautosomica che non vengono silenziati altrimenti ci sarebbe uno sbilanciamento.



E' stato visto poi che ci sono dei geni che si trovano sparsi anche sul cromosoma X che per qualche motivo sfuggono all'inattivazione. E' stato anche visto che a volte questa espressione è variabile. (il motivo non è chiaro)

L'inattivazione del cromosoma X è un cambiamento epigenetico: cambiamento alla conformazione della cromatina.

Un gene per essere espresso deve essere libero, non deve essere compatto.

Rimodellamento della cromatina: cromatina aperta in cui i nucleosomi sono spazati tra di loro e i promotori possono essere accessibili oppure ci possono essere dei fattori che vanno a rimodellare la cromatina che vanno a spostare i nucleosomi.

Da cosa è influenzata la struttura della cromatina più o meno condensata?

La struttura della cromatina più o meno condensata dipende da molte modificazioni: modificazione del DNA (metilazione della citosina, può essere modificata attraverso un gruppo metile) oppure modifiche alle proteine istoniche.

Diverse modificazione degli istoni inducono la formazione di cromatina più o meno condensata.

Sul cromosoma X inattivo, la cromatina viene modificata per essere condensata, questo avviene tramite un fenomeno che ha origine dal centro di inattivazione XIC (zona del cromosoma X), regione da cui parte l'inattivazione. Se non c'è tale regione, quel cromosoma non può attivarsi.

XIST: gene essenziale per l'inattivazione del cromosoma X, è l'unico gene che viene espresso dal cromosoma X inattivo. Il gene XIST viene espresso durante lo sviluppo ed è un gene che non viene trasmesso in proteina, gene molto strano perché codifica per mRNA non codificante.

Lo XIST va ad associarsi alla cromatina ricoprendo il cromosoma da cui è trascritto e va a richiamare tutta una serie di fattori di rimodellamento della cromatina che modifica gli istoni, la citosina e andando a compattare la cromatina.

Questo fenomeno di attivazione può essere studiato tramite cellule staminali in coltura (cellule indifferenziate) che possono essere indotte al differenziamento e quando si differenziano avviene proprio l'inattivazione del cromosoma: ibridazione in situ, si usa una sonda complementare al gene XIST.

Quando una cellula si duplica, come fa a sapere quale cromosoma deve essere inattivato?

Avviene la metilazione del DNA: trasformazione epigenetica. Avviene a livello della citosina e viene aggiunto il gruppo metile CH₃ e la citosina diventa metilata.

Questo processo è svolto dalla DNA metilasi (DNA metil-transferasi): metila la citosina ma solamente quando è seguita dalla base azotata G (guanina).

Quando una sequenza è metilata, ha conseguenze sulla trascrizione perché ci sono regioni (CpG island) che contengono nucleotidi CG e si trovano vicino ai promotori dei geni. Se queste regioni sono demetilate, permettono la trascrizione; se invece le regioni vengono metilate ci sono dei fattori specifici, per esempio MeCP (proteina che lega il dna metilato) che reprimono la trascrizione e impediscono il legame con i fattori di trascrizione.

Esistono due tipi di DNA metiltransferasi:

- agiscono durante lo sviluppo: "DNA metiltransferasi de novo", metilano per la prima volta
- DNA metiltransferasi di mantenimento: metila un nuovo filamento di DNA se l'altro è già metilato, riconosce la situazione e aggiunge un gruppo CH₃ anche il nuovo filamento post trascrizione del DNA

ANALISI DEI PEDIGREE UMANI:

Fino ad ora abbiamo parlato solamente di organismi modello ma sappiamo che l'uomo è l'organismo meno adatto e quindi non possiamo programmare incroci; inoltre i tempi di generazione sono lunghi e le famiglie hanno una progenie poco numerosa.

Fino agli anni 80, il genoma era per lo più inesplorato: ciò che si sapeva era perché lo si aveva studiato in organismi modello.

I caratteri più facili da studiare sono quelli monogenici ma è un'eccezione; nella maggior parte dei casi, le caratteristiche che contraddistinguono gli essere umani sono caratteri complessi e caratterizzati da più geni.

esempi di caratteri più facili da osservare (mendeliani e monogenici): lobo dell'orecchio attaccato o staccato, oppure la presenza di lentiggini, daltonismo.

Il problema che ancora tormentava i biologi era: le leggi di Mendel sono veritiere anche per gli essere umani

Il primo studio che dimostrò che anche un carattere umano viene ereditato secondo i principi mendeliani fu eseguito da un medico (Garrod) che aveva osservato alcuni pazienti affetti da una patologia in cui le urine assumono un colore bruno se esposte all'aria. (**alcaptonuria**). Guardando come si trasmetteva questo carattere all'interno di famiglie, notò che aveva le caratteristiche di un carattere mendeliano recessivo e aveva notato che spesso individui affetti erano tra loro fratelli. Inoltre, quando c'erano 2 fratelli affetti, i genitori tendevano a essere consanguinei: carattere autosomico recessivo in cui i genitori sono entrambi eterozigoti e hanno 1/4 di probabilità di trasmettere l'allele recessivo al figlio.

Se sono consanguinei hanno un progenitore comune che gli ha "donato" l'allele recessivo.

Fu anche il primo studio a portare una prima ipotesi tra la funzione del gene e produzione di proteine: andando a studiare le caratteristiche biochimiche, si notò che questa malattia era dovuta a un blocco in una via metabolica che portava alla trasformazione della fenilalanina in altri composti. Di solito viene trasformata in tirosina e in altri composti e poi espulsa nelle urine. Questi passaggi sono controllati da un enzima ma gli individui affetti presentano un blocco nell'ultimo passaggio in quanto l'enzima è mancante o non funziona, portando a un accumulo di acido omogentisico che determina il colore scuro delle urine.

Questo difetto si chiama "errore congenito del metabolismo" e rappresenta un difetto delle vie metaboliche dovuto alla mancanza di un enzima specifico.

Altri errori del metabolismo comportano la comparsa di altre malattie: fenilchetonuria, assenza di enzima che modifica la fenilalanina in tirosina.

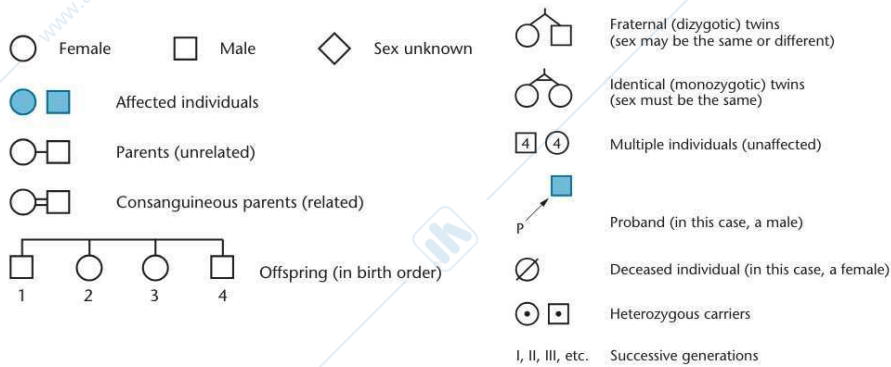
Albinismo: tirosina che NON sintetizza la melanina (assenza della melanina)

Per esaminare come vengono trasmessi i caratteri genetici nell'uomo si utilizza uno strumento tecnico che permette di rappresentare in modo schematico come un carattere viene trasmesso da una generazione all'altra all'interno di una famiglia. Si utilizza il pedigree o albero genealogico in cui:

- si individuano i maschi con i quadrati e le femmine con il cerchio.
- quando il simbolo è colorato o nero, il carattere di interesse è presente.
- se il simbolo è bianco, l'individuo non è affetto dal carattere di interesse.
- un pallino all'interno rappresenta che la persona è portatore sano eterozigote per un allele recessivo

Il "probando" è la prima persona dalla quale si inizia a tracciare il pedigree.

Dall'analisi del pedigree umano si possono individuare 4 tipi di caratteri:



- autosomico recessivo
- autosomico dominante
- legato al cromosoma X dominante
- legato al cromosoma X recessivo

Carattere autosomico recessivo:

- appare in entrambi i sessi con

frequenza uguale.

- la progenie affetta nasce solitamente da genitori non affetti. (ma entrambi eterozigoti Aa)
- quando entrambi i genitori sono eterozigoti, la probabilità di un figlio affetto è $\frac{1}{4}$
- compare più frequentemente nei figli nati da matrimoni tra consanguinei.

Carattere autosomico dominante:

- se l'allele è raro, si può ipotizzare che gli individui affetti siano eterozigoti perché è un carattere raro.
- a volte si ha la comparsa di alleli dominanti da genitori sani omozigoti recessivi: questo può essere dovuto alla comparsa di una nuova mutazione. Ogni tanto il DNA muta.
- appare nei due sessi con frequenza uguale
- entrambi i sessi trasmettono il carattere alla prole
- generalmente non salta la generazione
- la prole affetta deve avere un genitore affetto a meno che non possieda una nuova mutazione.
- quando un genitore è affetto (eterozigote) e l'altro genitore non lo è, la probabilità di avere un figlio affetto è $\frac{1}{2}$
- i genitori non affetti non trasmettono il tratto.
- i caratteri dominanti associati a riduzione di fertilità o vitalità sono rari: nella popolazione gli individui affetti sono eterozigoti per l'allele dominante
- i casi isolati possono essere dovuti a nuove mutazioni

Caratteri recessivi legati al cromosoma X:

- il carattere è più frequente nei maschi rispetto alle femmine
- le femmine eterozigoti sono di solito non-affette (ma in alcuni casi possono esprimere il fenotipo con variabile intensità in seguito al pattern di inattivazione del cromosoma X)
- l'allele mutato è trasmesso da un uomo affetto attraverso le sue figlie, che saranno portatrici (eterozigoti) ad un $\frac{1}{2}$ dei loro figli maschi
- l'allele mutante non può essere trasmesso direttamente dal padre ai figli maschi.
- i casi isolati possono essere dovuti a nuove mutazioni.

Caratteri dominanti legati al cromosoma X: (molto rari)

Possiamo avere che quando le donne sono eterozigoti e possono esprimere il fenotipo. Tuttavia entra in gioco l'inattivazione del cromosoma X quindi il fenotipo risultante è una media tra i cromosomi X sani e X mutati.

La trasmissione è particolare perché se un maschio è malato, tutte le figlie femmine saranno malate mentre i figli maschi di un padre malato saranno sani perché prendono il cromosoma X dalla madre. se ho una femmina eterozigote affetta, metà sani e metà malati.

Nelle varianti con perdita di funzione, nella maggior parte dei casi il risultato è un fenotipo recessivo; ciò è dovuto al fatto che in un eterozigote ci sarà comunque l'altro allele sano che produrrà la proteina normale, la quale sarà sufficiente. Per gli alleli di guadagno, la nuova funzione sarà presente anche in eterozigosi quindi l'allele sarà dominante.

Ereditarietà monogenica (1 singolo gene):

- sono presenti differenti relazioni di dominanza: dominanza incompleta e codominanza.
- il gene ha più di due alleli
- un gene può contribuire a più caratteristiche (alleli letali recessivi)
- interazione gene-ambiente: penetranza incompleta / dipende da età, espressività variabile, caratteri influenzati dal sesso

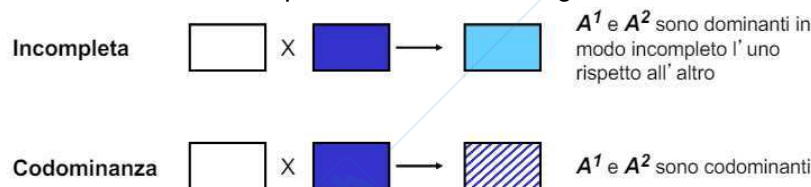
Ereditarietà digenica: caratteri determinati da 2 geni

Ereditarietà multifattoriale: caratteri influenzati da tanti fattori genetici e ambientali.

Differenti relazioni di dominanza:

- **dominanza incompleta / parziale:** l'eterozigote mostra un fenotipo che rappresenta essere una via di mezzo dei due genitori omozigoti.

- **codominanza:** le caratteristiche di entrambi gli alleli sono mostrati fenotipicamente nell'eterozigote.



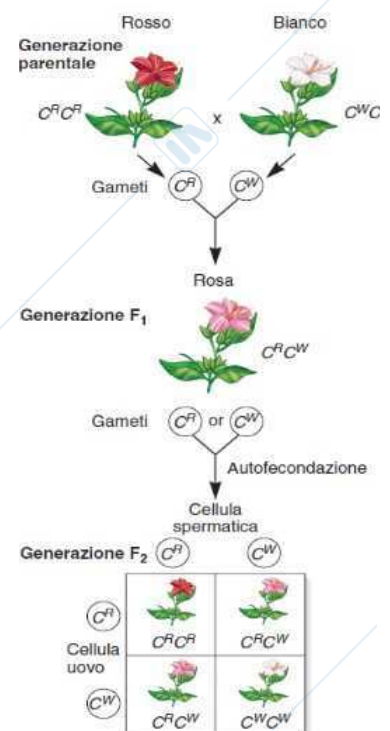
Dominanza incompleta: il fenotipo è una via intermedia tra i due genitori omozigoti. In questo caso, il carattere è determinato da un singolo gene ma nell'eterozigote si produce il 50% di pigmento che darà origine a un colore più chiaro.

La dominanza incompleta riguarda molto spesso la maggior parte degli alleli. es. ipercolesterolemia familiare. L'ipercolesterolemia familiare è dovuta a un elevato aumento di colesterolo, dovuto alla mutazione di un singolo gene che codifica per il recettore "LDL" espresso sulla membrana plasmatica, la quale è responsabile di attaccare le particelle LDL e riassorbirle dal sangue. Il fenotipo è dominante perché gli eterozigoti hanno la metà di recettori rispetto ai livelli normali. Negli omozigoti c'è la totale mancanza di recettori e il fenotipo sarà quindi ancora più pericoloso.

Diversi alleli nello stesso gene possono produrre diverse varianti e proteine leggermente diverse, corrispondendo a un fenotipo diverso.

es. fibrosi cistica: dovuta a delle mutazioni a livello della proteina CFTR, canale di membrana. L'allele più frequente ha come conseguenza la delezione di un singolo amminoacido. La fibrosi cistica può essere causata da anche altre alterazioni, l'effetto sarà recessivo; di fatto un eterozigote con un allele sano e un allele mutato mostrerà un fenotipo sano.

Alleli multipli:



es.colore dell'occhio della drosophila: il locus white rappresenta il colore bianco degli occhi. Una drosophila femmina con colore eosina ha gli occhi di un rosso più chiaro.

Incrociando un individuo con occhi eosina e uno con occhi bianchi, si ottengono individui eterozigoti che mostrano fenotipicamente il colore eosina. L'eosina è quindi dominante sul bianco.

Incrociando eosina e rosso, si ottengono individui eterozigoti con occhi rossi. L'eosina in questo caso è recessivo rispetto al wild-type (rosso).

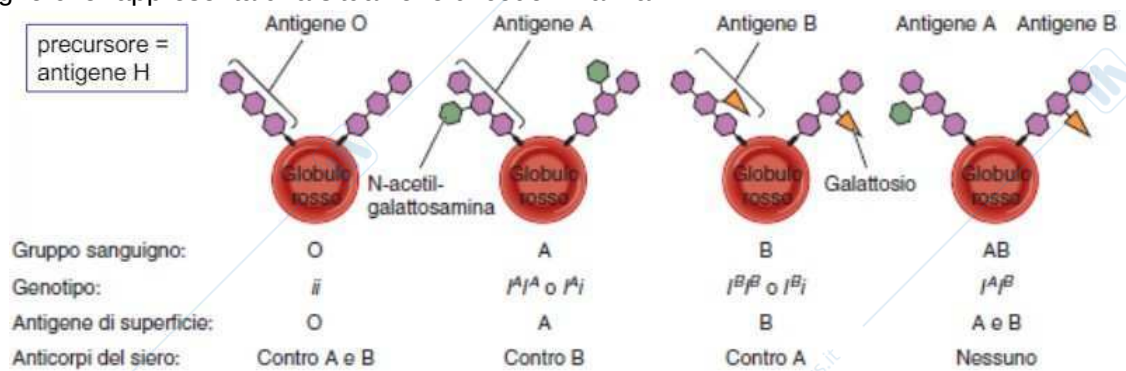
Si può quindi definire una scala di dominanza: Wild-type >>W eosina >> W white

Codominanza:

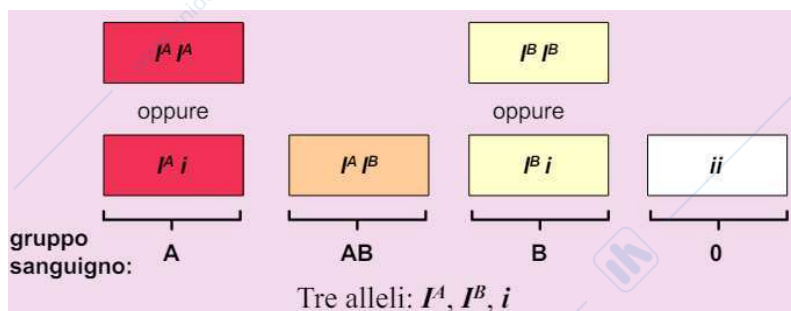
In caso di codominanza, l'eterozigote mostra fenotipicamente le caratteristiche di entrambi gli alleli. Un esempio molto classico è il carattere dei gruppi sanguigni nell'uomo. .

I gruppi sanguigni vengono determinati da un singolo locus:

- negli individui con gruppo sanguigno O viene espressa una proteina chiamata antigene O (catena di 3 zuccheri).
- negli individui con gruppo sanguigno A, si esprime l'antigene A con una diversa catena di zuccheri (è presente un residuo di galattosamina.)
- negli individui con gruppo sanguigno B, si esprime l'antigene B con una catena di zuccheri alla quale è presente un residuo di galattosio.
- negli individui con gruppo sanguigno AB, si esprime sia l'antigene A che l'antigene B. E tale gruppo sanguigno che rappresenta una situazione di codominanza.



I gruppi sanguigni ABO sono determinati da tre tipi di alleli: I^a, I^b, i



i è recessivo rispetto a I^a e I^b.

Perchè I^a e I^b sono dominanti?

Il locus i codifica per un enzima chiamato glicosiltransferasi, il quale è necessario per aggiungere lo specifico residuo di zucchero all'antigene H che viene espresso sulla superficie delle cellule del sangue (determina la caratteristica dell'antigene A o B).

Per il gruppo sanguigno O, a differenza, l'enzima glicosiltransferasi non è funzionante e l'antigene H non viene quindi modificato.

Alleli letali: possono esistere varianti di alleli che riducono la vitalità. In particolare, gli alleli letali arrestano lo sviluppo in un momento prenatale; ciò significa che non verranno mai osservati nella progenie. Solitamente tali alleli si trovano nei geni essenziali, ovvero quei geni necessari per far sì che lo sviluppo sia portato a termine. (si stima che circa $\frac{1}{3}$ di tutti i geni siano essenziali).

Normalmente gli alleli letali sono ereditati con una modalità recessiva ma ne esistono alcuni, purtroppo, dominanti: tali alleli non possono ovviamente essere trasmessi alla progenie (l'individuo con un allele letale dominante non nasce) a meno che non siano alleli letali espressi in età avanzata, i quali comportano una limitata sopravvivenza. (es. Malattia di Huntington).

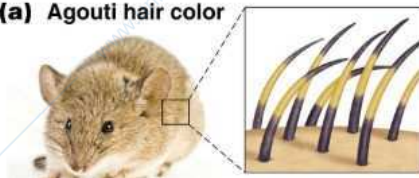
Un esempio di allele letale recessivo è l'agouti yellow, il quale influenza il colore del mantello dei mammiferi (es. topi). L'allele wild-type A è dato da una colorazione NON omogenea del pelo, colorazione grigiastra dovuta alla presenza di una banda più chiara del pelo stesso. Di fatto il colore dipende dall'espressione di pigmenti di melanina (pigmento che si produce nelle cellule melanociti che si trovano nella cute) e anche dal tipo di melanina prodotta.

Di fatto esistono 2 tipi di melanina:

- eumelanina: melanina che determina una colorazione più scura

- feomelanina: melanina che determina il colore biondo / rossiccio

(a) Agouti hair color



Nei topi wild-type, il colore del pelo è dato dal fatto che durante la fase di crescita del pelo si avvia un'espressione genica e cambia il tipo di melanina espressa, dando una banda più gialla.

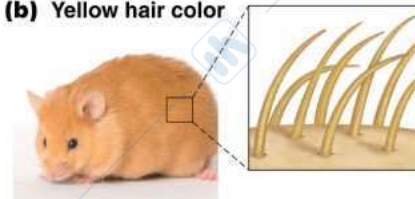
L'allele wild-type A corrisponde quindi alla banda gialla sul pelo del topo, mentre gli

alleli a corrispondono al colore nero del pelo.

Una variante di questo allele è "agouti yellow" che determina il colore giallo omogeneo del pelo ed è dominante rispetto all'allele wild-type. I topi eterozigoti per agouti yellow mostrano quindi il colore giallo e altre caratteristiche fenotipiche (es. sono obesi e regolazione dell'appetito).

Tuttavia agouti yellow ha un'altra caratteristica particolare: non si osserva MAI in topi omozigoti perché è un allele letale se presente in omozigosi.

(b) Yellow hair color



Da cosa sono dipese le caratteristiche fenotipiche di questo agouti yellow?

E' necessario analizzare la via metabolica della sintesi di melanina.

Sul melanocita ci sono dei recettori (melanocortina) che normalmente vengono legati da un ormone (melanotropo in questo caso) che fa aumentare il livello di AMP ciclico, che avvia una trasduzione del segnale per determinare la sintesi di eumelanina. Se la via del recettore è ON, la produzione porterà alla melanina nera; se viene espressa un'altra proteina (prodotto del locus Agouti) che si lega al posto

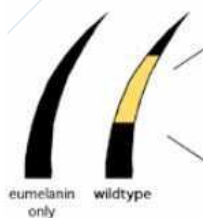
dell'ormone melanotropo il recettore viene silenziato, la via è OFF e porta alla formazione di feomelanina. Quindi se Agouti è assente, il prodotto sarà eumelanina; se è presente si esprime la feomelanina.

Tuttavia questo gene wild-type viene espresso in vita solo per un periodo limitato; quando si esprime la colorazione cambia e determina la comparsa della banda gialla nel pelo nero del topo. L'allele agouti yellow è una mutazione che determina un errore nella regolazione della trascrizione del gene: invece di essere espresso in uno specifico momento della vita, viene espresso sempre e in tutti i tessuti.

Quindi l'allele agouti yellow è dominante rispetto al colore ma è recessivo rispetto alla

letalità.

Come mai questo locus agouti yellow ha questo tipo di letalità?



Ciò è dovuto al fatto che la mutazione che corrisponde all'agouti yellow è una delezione di un pezzo di DNA. A monte del gene agouti c'è un gene "Raly" il quale è essenziale per poter avere un normale sviluppo. La delezione di DNA porta via la regione a monte del gene agouti e anche un pezzo del gene Raly. Quindi agouti non verrà più regolato dal proprio promotore ma dal promotore di Raly. Raly non viene espressa perchè viene tagliata a metà. L'assenza totale (agouti yellow in omozigosi) di Raly determina la letalità.

Anemia falciforme: un esempio delle diverse estensioni dell'ereditarietà monogenica

L'anemia falciforme è una malattia del sangue dipesa dalla produzione di emoglobina, formata da 4 catene (2 catene alfa e 2 beta) e da un atomo ferro. Le alterazioni della catena beta possono comportare diversi difetti e una ridotta capacità di trasportare ossigeno. La variante allelica che comporta l'anemia falciforme è l'allele HBS (riguardo alla catena beta); è recessivo.

La beta globulina assume una conformazione errata e i globuli rossi perdono la classica forma del globulo assumendo una forma a fauce la quale comporta un difetto di trasporto di ossigeno.

es. a normale altezza di altitudine, gli individui eterozigoti per HBS hanno una normale concentrazione di cellule sanguigne mentre ad alte altitudine mostrano parziali sintomi: l'effetto ambientale influenza l'espressione fenotipica.

es. malaria: individui eterozigoti per l'allele HBS sono resistenti alla malaria perché l'agente infettivo della malaria compie il ciclo vitale attraverso le punture di zanzara; se le cellule sono falciformi, il protozoo non cresce bene e non si replica. In questo caso HBS è dominante perché si è resistenti alla malaria anche solo avendo un solo allele HBS.

Nei modelli mendeliani, l'espressione fenotipica è sempre completa.

In realtà a causa delle interazioni con fattori esterni o background genetici (altri alleli che interagiscono con il locus principale) l'espressione potrebbe non essere completa.

Si parla di **penetranza incompleta** quando NON tutti gli individui con un determinato genotipo lo esprimono in fenotipo. La penetranza può essere completa quando tutti gli individui (100%) manifestano un dato fenotipo, oppure incompleta se non tutti gli individui manifestano un dato fenotipo.

- espressività variabile: il fenotipo si esprime in tutti gli individui ma in modo variabile (più o meno intenso)

Penetranza ed espressività si possono anche sommare tra loro

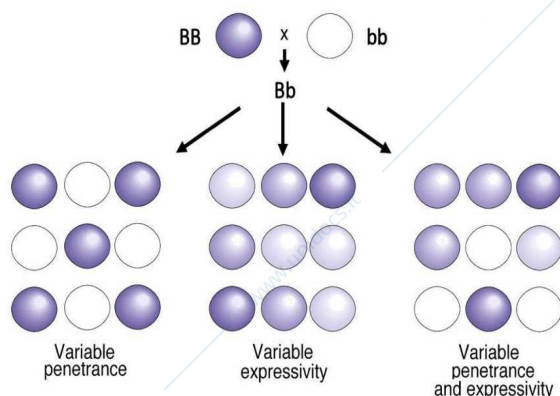
Interazioni gene - ambiente: l'ambiente ha un impatto sull'espressione del fenotipo e ciò lo si osserva in tante malattie genetiche. es. fenilchetonuria (autosomica recessiva) è una malattia dovuta all'assenza di un enzima, non si metabolizza. Può essere prevenuta se diagnosticata precocemente, con una dieta particolare povera di fenilalanina, per ridurre lo sviluppo della sintomatologia.

Come si manifesta la penetranza incompleta?

Se ho un allele dominante, un individuo può non manifestare la malattia anche se in presenza di tale allele. La penetranza si può determinare a livello della popolazione.

es. di penetranza incompleta : polidattilia (difetto autosomico dominante)

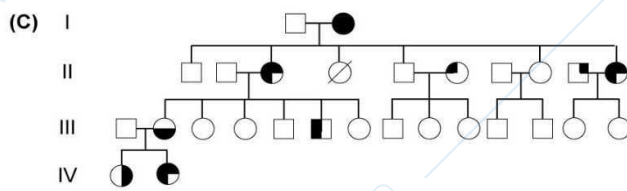
Anche se una singola copia dell'allele causa il difetto, alcuni individui portatori dell'allele dominante non mostrano il carattere



Espressività variabile: è il grado di espressione di un carattere.

es. nei cani l'allele Sp determina il fatto di avere delle chiazze più o meno estese. L'espressività variabile comporta ad avere dimensioni più o meno grandi di tale chiazze.

Un esempio di espressività variabile nell'uomo è la sindrome di Waardenburg

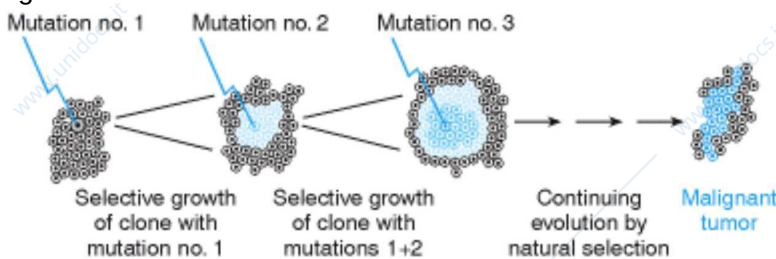


Sindrome di Waardenburg

- 1° quadrante: sordità
- 2° quadrante: occhi con colore diverso
- 3° quadrante: sopracciglia bianche
- 4° quadrante: capelli bianchi

Penetranza: probabilità che un determinato genotipo si manifesti al 100% o in modo ridotto. La penetranza può variare in base all'età. Alcune malattie potrebbero manifestarsi durante il corso della vita, solitamente in età più avanzata, la penetranza aumenta man mano che aumenta l'età. Alla nascita gli individui portatori non manifestano nessun sintomo, ma dopo i 30/40 anni di età iniziano a manifestare i primi.

Origine del cancro:

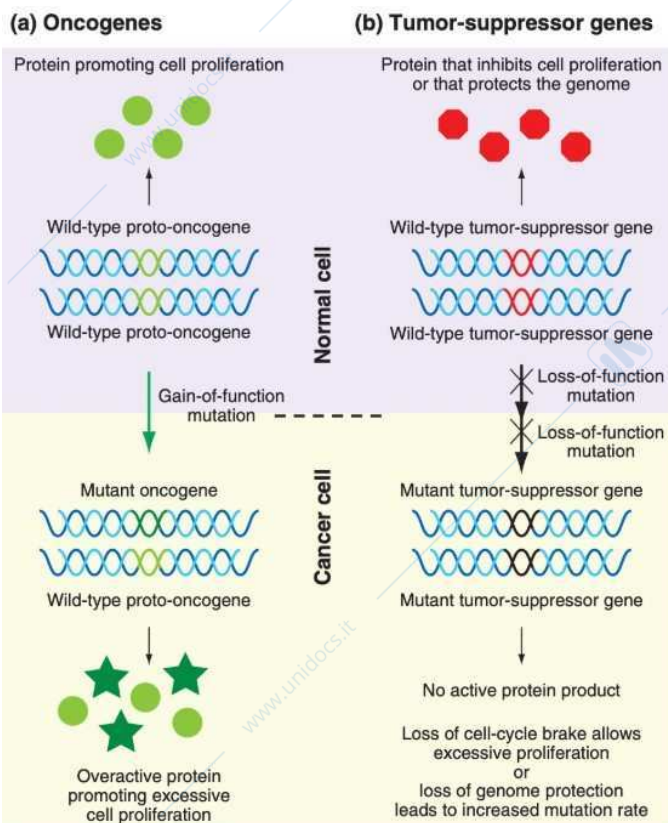


Ci sono molti geni che possono essere mutati e alterati e che possono condurre verso cancerogenesi. I geni si distinguono in:

- **oncogeni**: geni che promuovono la proliferazione cellulare. Una mutazione con un guadagno di funzione, rende attivo in modo inappropriato un oncogene e rende la cellula più propensa a replicarsi. La mutazione risulta essere dominante per cui si manifesta anche in individui eterozigoti.
- **geni oncosoppressori**: a differenza degli oncogeni, sono dei "freni" che inibiscono la progressione della cellula verso il cancro, impedendone la proliferazione. A differenza delle mutazioni degli oncogeni,

le mutazioni degli oncosoppressori risultano essere recessive, per cui si manifestano solamente in individui omozigoti.

Ci sono alcuni casi in cui il cancro invece di avere origine casuale, è ereditario dagli alleli dei genitori. Una forma di cancro ereditario (es. tumore della retina) si eredita come un carattere mendeliano. Gli individui che hanno un allele alterato sono più suscettibili ad avere questo tipo di mutazione (inattivazione di geni oncosoppressori o oncogeni), poichè hanno ereditato un gene inattivato da uno dei due genitori; di conseguenza avrà tutte le cellule eterozigoti che non basteranno però a scatenare il tumore. Casualmente durante la vita dell'individuo può capitare che anche l'altro allele venga inattivato da delle mutazioni casuali.



Man mano che aumenta l'età, aumenta anche la penetranza e di conseguenza aumenta la possibilità che il avvenga una mutazione.

Cancro del seno: legato a mutazioni in geni BRCA-1

L'aver ereditato un allele mutato porta a un elevato rischio di sviluppare cancro al seno e alle ovaie.

Un altro tipo di mutazione che riguarda l'interazione gene-ambiente sono i caratteri influenzati dal sesso e si manifestano in modo prevalente nei maschi o nelle femmine.

es: calvizia comune. Non è un singolo gene che causa la calvizia, ma sono tanti geni che portano ad avere più o meno predisposizione alla calvizia.

Le donne trasmettono gli alleli di rischio ma non manifestano il fenotipo perché è dovuto a una sensibilità di androgeni nelle cellule del bulbo del cuoio capelluto.

INTERAZIONI GENICHE:

Come già anticipato, la maggior parte dei caratteri sono influenzati da più geni. Più geni influenzano la manifestazione di un determinato carattere. Di fatto nessun gene nella cellula funziona da solo, coopera con un'altra serie di geni per determinare strutture complesse (organi, sistemi).

Un esempio di geni che agiscono insieme ad altri sono quei geni che controllano le vie metaboliche che agiscono nei nostri organismi. Alterazioni in qualche livello delle vie metaboliche comporta una alterazione fenotipica. Un altro esempio sono i geni implicati nelle vie di trasduzione del segnale: propagazione del segnale da una cellula all'altra.

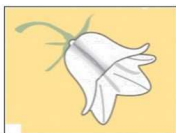
La conseguenza più semplice ed evidente è quindi la **eterogeneità genetica**: quando osserviamo un fenotipo alterato esso può essere la conseguenza di mutazioni in geni diversi; la mutazione porta all'assenza del prodotto finale quindi il fenotipo finale sarà comunque lo stesso anche se la mutazione si presenta in geni diversi.

E' possibile fare un'analisi genetica diretta: isolo dei mutanti e faccio incroci per vedere come si trasmette il fenotipo. Se un carattere è dovuto da più geni, uno strumento dell'analisi genetica classica è **l'analisi di complementazione**. Tale analisi è una strategia che si può utilizzare per studiare delle interazioni geniche ma funziona solo se il fenotipo è dovuto a mutazioni recessive.

Ceppo selvatico



Ceppo Mutante # 1



Ceppo Mutante # 2



Supponiamo di voler studiare un carattere del colore del fiore: si isolano 2 fiori mutanti bianchi, indistinguibili.

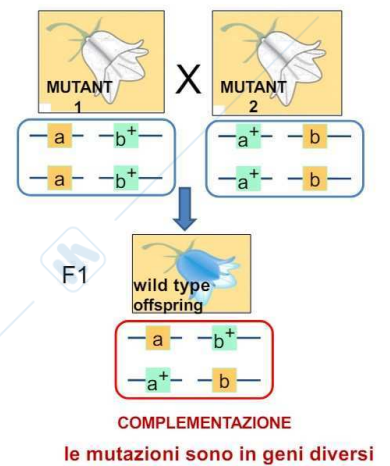
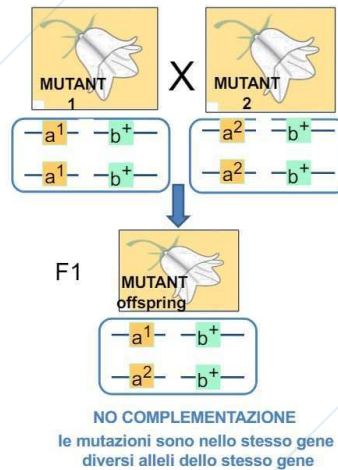
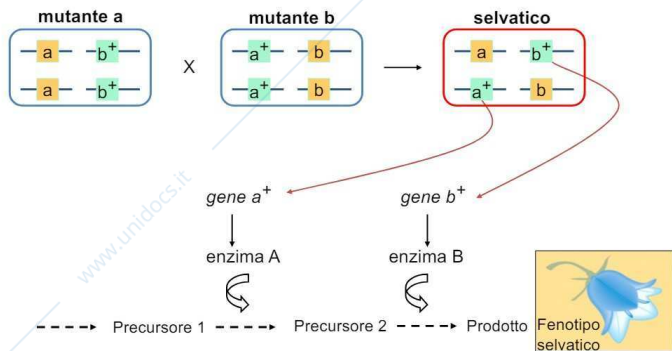
Le mutazioni che producono questo fenotipo corrispondono allo stesso gene o a mutazioni in geni diversi?

Si effettua l'analisi di complementazione: supponiamo che il colore sia dovuto a una via metabolica. Si incrociano quindi i due mutanti e da tale incrocio è possibile ottenere due risultati:

1. la progenie mostra lo stesso fenotipo (fiori bianchi): non è avvenuta la complementazione
2. La progenie mostra fiori blu (ceppo selvatico): è avvenuta la complementazione.

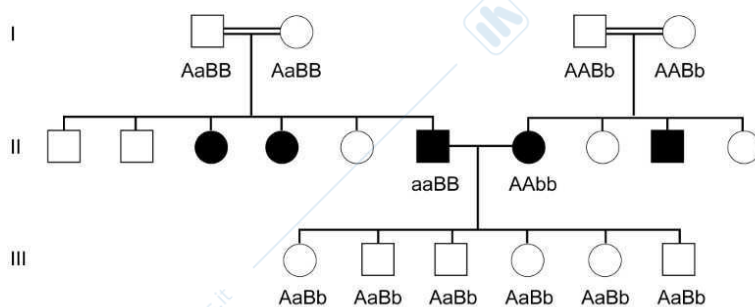
Nel primo caso i due mutanti sono entrambi dovuti a mutazioni recessive nello stesso gene.

Nel secondo caso, le mutazioni sono in geni diversi. Quando incrocio i due mutanti, la progenie avrà comunque preso un allele wild-type dal padre e dalla madre.



Quindi le mutazioni che complementano sono in geni differenti mentre quelle che NON complementano sono sullo stesso gene.

Viene definito **“gruppo di complementazione”** l’insieme di alleli che fanno parte dello stesso gene e che non complementano tra di loro.



Nell’uomo sono note diverse situazioni in cui geni diversi possono dare lo stesso risultato finale: es. la sordità. Due individui sordi possono avere figli sani se le due mutazioni sono in geni diversi.

Esempio di **“complementazione”** fra 2 loci autos. recess. responsabili di **sordità**

Interazioni geniche: effetti di più geni che

controllano un carattere fenotipico

Le interazioni geniche possono essere di diverso tipo:

- **effettivo additivo**: il risultato fenotipico è dato dalla somma dei contributi dei singoli geni
- **epistasi**: interazioni non additive. Se ci sono geni di uno stesso pathway, la variante in un gene va a influenzare il risultato delle varianti in un altro gene. Una sorta di effetto a catena.

A/a B/b x A/a B/b

	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

9 genotipi:

- 1/16 **A/A B/B**
- 2/16 **A/A B/b**
- 1/16 **A/A b/b**
- 2/16 **A/a B/B**
- 4/16 **A/a B/b**
- 2/16 **A/a b/b**
- 1/16 **a/a B/B**
- 2/16 **a/a B/b**
- 1/16 **a/a b/b**

- 9 **A/- B/-**
- 3 **A/- b/b**
- 3 **a/a B/-**
- 1 **a/a b/b**

Incroci di-ibridi: 2 geni con due alleli alternativi: A a / B b, segregano indipendentemente l'uno dall'altro. E' possibile evidenziare delle differenze: il risultato "normale" è un rapporto 9:3:3:1. Se ci sono delle interazioni geniche allora il risultato è diverso.

Un esempio di due geni che controllano un singolo fenotipo con effetto additivo sono i geni che controllano il colore degli occhi della drosophila:
 - wild-type: occhi rossi
 - allele recessivo scarlet: occhi scarlatto

Se i geni controllano caratteri diversi, segregano indipendentemente e la dominanza è completa: allora si otterrà il **rapporto fenotipico: 9:3:3:1**

- allele recessivo brown: occhi marroni

Cosa succede se incrocio un individuo con occhi scarlatto con un individuo con occhi marroni?

La progenie sarà omozigote sia per l'allele brown che per l'allele scarlet. Ciò che si ottiene (F1) è il colore dell'occhio rosso (è un esempio di complementazione): significa che i due alleli non fanno parte dello stesso gene, sono su geni diversi e la loro complementazione dà origine ad individui con occhi rossi.

Successivamente, incrociando tra loro individui della F1 si ottiene una progenie in cui si ha un rapporto di 9:3:3:1 ma con una diversa

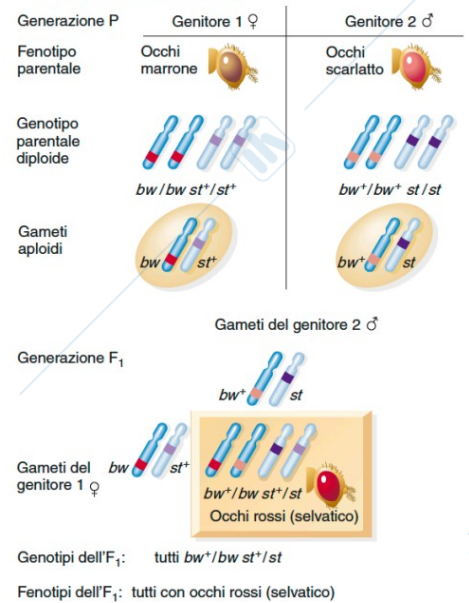
distribuzione di colori, c'è la comparsa di un nuovo colore: colore bianco. Ciò significa che questi sono due geni che operano parallelamente e gli effetti sono additivi tra loro.

Spiegazione molecolare: il colore finale dell'occhio è dato dal contributo indipendente di due vie metaboliche che sintetizzano due diversi pigmenti; il colore finale è una miscela dei due pigmenti.

(drosotermina e xantommatina); solo quando entrambi i pigmenti sono presenti nella retina dell'occhio, si manifesta il colore rosso scuro (wild-type)

Se si presenta una mutazione recessiva che mi elimina la produzione di un pigmento, l'occhio fenotipicamente mostrerà il colore che corrisponde all'altra via metabolica. Se tutte e due le vie sono bloccate, l'occhio risulterà fenotipicamente bianco perché non sono presenti pigmenti.

a) Moscerino di linea pura con occhi marrone x moscerino di linea pura con occhi scarlatto



b) F1 x F1

Generazione F2

Rapporto fenotipico in F2 per bw+/bw x bw+/bw	Rapporto fenotipico in F2 per st+/st x st+/st	Rapporti combinati in F2	Proporzioni fenotipiche attese in F2
3/4 bw+/bw	3/4 st+/st	9/16 bw+/bw st+/st	9/16 rosso (selvatico)
	1/4 st/st	3/16 bw+/bw st/st	3/16 scarlatto
1/4 bw/bw	3/4 st+/st	3/16 bw/bw st+/st	3/16 marrone
	1/4 st/st	1/16 bw/bw st/st	1/16 bianco

F2 9:3:3:1

il colore dell'occhio è dato dal contributo indipendente (ADDITIVO) dei due geni

Il doppio mutante ha fenotipo diverso (albino)

La mutazione legata al cromosoma X interessa un gene diverso che codifica per un trasportatore necessario per trasportare i pigmenti all'interno dell'occhio durante lo sviluppo; questo tipo di interazione è, invece, epistatica: se manca tale trasportatore, si manifestano comunque gli occhi albinici.

Epistasi: geni che fanno parte della stessa via metabolica: un gene maschera o modifica l'espressione fenotipica di un altro gene:

- il contributo di ciascun gene non è additivo
- non vengono prodotti nuovi fenotipi
- il rapporto in un incrocio tra diibridi 9:3:3:1 viene modificato

Il gene che maschera l'espressione viene detto **epistatico** mentre il gene che viene mascherato viene detto **ipostatico**.

Tipi di epistasi:

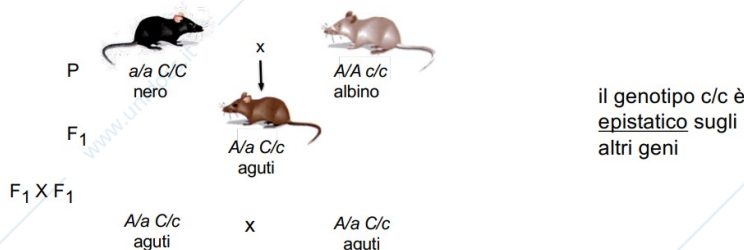
- epistasi recessiva: non importa quale sia il genotipo
- epistasi dominante: basta avere un allele A grande per avere almeno un fenotipo alterato.
- epistasi recessiva doppia (geni complementari)

esempio di epistasi recessiva:

molti gene cooperano per determinare il colore del mantello dei mammiferi. Nei topi sono presenti tre geni principali che costituiscono il colore del mantello:

- **gene A (agouti)**: determina la distribuzione del pigmento feomelanina (giallo) o eumelanina (nero). Tale locus agouti corrisponde a una proteina "asip" che si lega a un recettore di membrana Mc1r. In assenza di agouti, il recettore Mc1r andrà a legare il suo ligando "ormone", aumentando cAMP e attivando una via biosintetica che in presenza di tirosina porta alla sintesi di eumelanina. In presenza di agouti, la via di segnalazione della eumelanina viene bloccata e viene sintetizzata feomelanina. Se ho una mutazione di perdita di funzione che mi elimina la presenza della proteina agouti, il pelo sarà totalmente nero perché agouti non si attiverà mai.
- **gene C**: codifica per l'enzima C il quale corrisponde alla tirosinasi (fondamentale per la sintesi della melanina). Se è presente una mutazione sulla tirosinasi, i topi saranno albinici

- **gene B**: coinvolto nella sintesi del pigmento nero e nell'efficienza della sintesi biosintetica; se è presente un individuo bb, il colore del mantello sarà marrone poiché si produce meno pigmento.



Altro esempio di epistasi recessiva:

Epistasi recessiva nei labrador: i 3 colori dei labrador sono il risultato dei diversi geni di vie metaboliche.

Due geni:

- **gene TYRP**: enzima che viene a valle della tirosinasi e porta alla sintesi di melanina.
- B (wild-type): colore nero
- b: colore marrone

	A/a X A/a	C/c X C/c	Rapporti F ₂ combinati	Rapporti fenotipici F ₂
F ₂	3/4 A/-	3/4 C/-	9/16 A/- C/-	9/16 aguti
		1/4 c/c	3/16 A/- c/c	3/16 albinici
	1/4 a/a	3/4 C/-	3/16 a/a C/-	3/16 neri
		1/4 c/c	1/16 a/a c/c	1/16 albinici

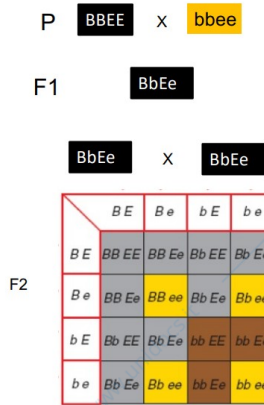
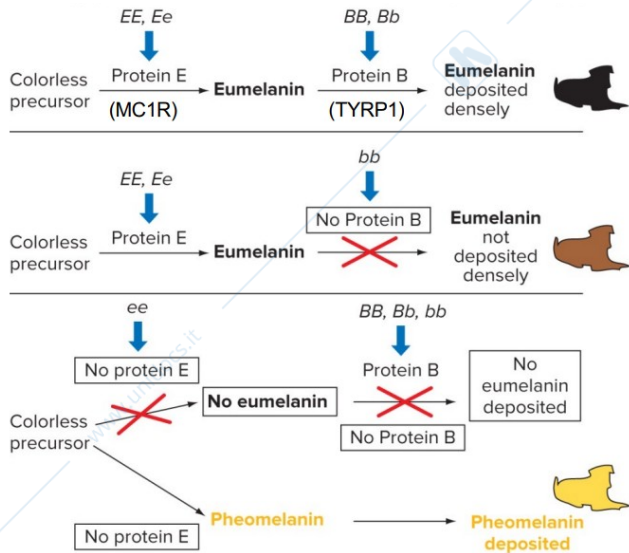
**Epistasi recessiva:
alla F₂ rapporto 9:3:4**

Epistasi di cc su A/- e a/a

- **gene MC1R**: se la via è on, il recettore funziona e si produce eumelanina, se non c'è si produce feomelanina.

E (wild-type): se è ON determina la produzione di eumelanina

e: recettore non funzionante, viene prodotta feomelanina



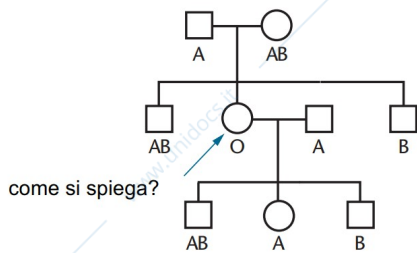
9/16 B-/E- (black)
 3/16 B-/ee (yellow)
 3/16 bb/E- (brown)
 1/16 bb/ee (tan)

B,e → TYRP
 E,e → MC1R

Per quanto riguarda gli umani, i loci coinvolti sono tanti

quindi la colorazione dipende da una serie di meccanismi che devono funzionare più o meno efficientemente:

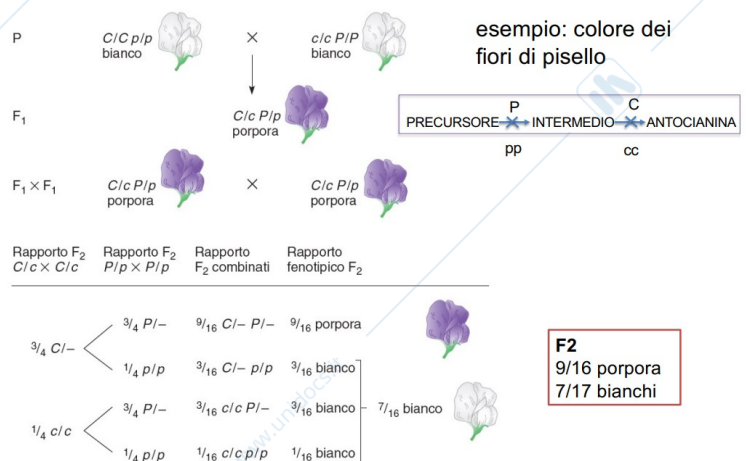
- sintesi di melanina
- quanta melanina viene sintetizzata
- regolazione della sintesi di quale tipo melanina (eumelanina o feomelanina)
- altri fattori che regolano qual è la vitalità di melanociti e di come vengono diffusi nella pelle. (es. pigmentazione delle pelle)



Un esempio di epistasi recessiva negli umani sono i gruppi sanguigni. Ci sono delle interazioni epistatiche che interagiscono con il locus ABO: l'omozigosi per un allele raro (h, detto Bombay) di un secondo gene FUTH1 ha un'azione epistatica recessiva sul gene I che determina i gruppi sanguigni. L'assenza dell'enzima FUTH1 determina il gruppo sanguigno 0.

Epistasi recessiva doppia: classica situazione di geni complementari: è un fenomeno genetico.

L'epistasi recessiva si presenta per esempio anche quando una proteina è costituita da due



subunità, le quali vengono codificate da geni differenti. Solamente se vengono prodotte entrambe le subunità si ottiene la proteina finale.

Oppure un gene potrebbe codificare per un fattore di trascrizione che va a stimolare la trascrizione di un enzima

Epistasi dominante doppia: un allele dominante A o dominante B, solamente aa bb mostra un fenotipo diverso.

CARATTERI QUANTITATIVI:

Si parla di caratteri quantitativi quando non è possibile stabilire dei sotto gruppi ben definiti ma è presente una variazione continua del carattere (altezza, contenuto di colesterolo, colore della pelle, degli occhi). Per alcuni decenni, caratteri qualitativi e quantitativi non sembravano conciliarsi tra loro poiché se si confronta come si comportano i caratteri qualitativi e i quantitativi, il comportamento apparentemente non torna:

- **caratteri qualitativi:** caratterizzati da fenotipi nettamente distinti; mostrano un'ereditarietà monogenica (di un singolo gene), hanno limitati effetti ambientali.

- **caratteri quantitativi:** presentano una distribuzione continua e normale, caratterizzata da una media e da una deviazione standard. Sono determinati da effetti ambientali che contribuiscono a modificare l'espressione fenotipica.

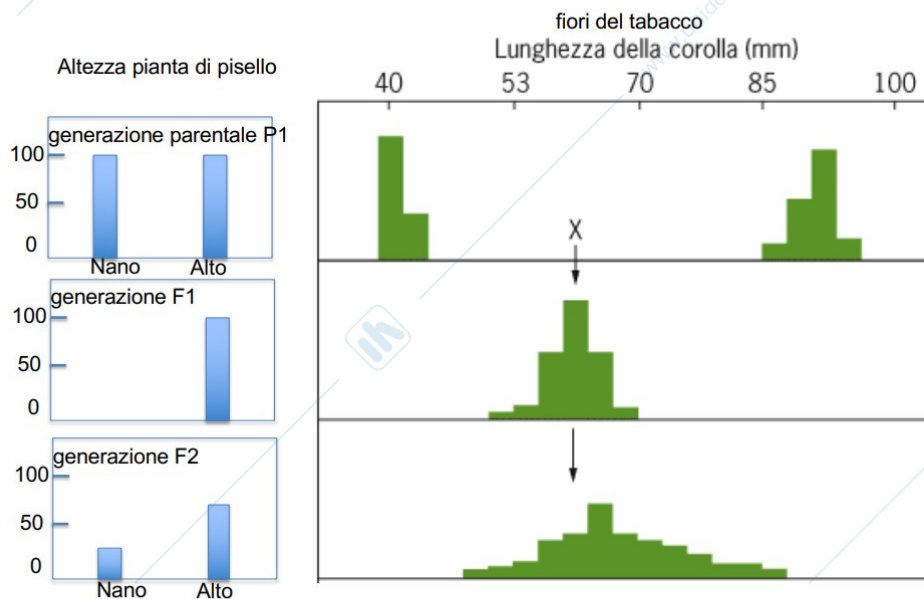
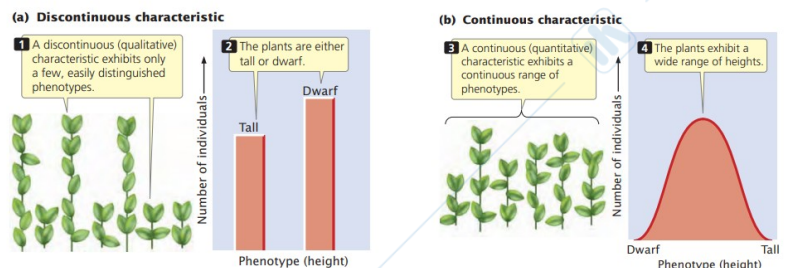
Caratteri qualitativi (discreti):

- Fenotipi nettamente distinti
- Mostrano in genere eredità monogenica
- Limitati effetti ambientali

Caratteri quantitativi (continui) :

- Variazione continua
- Ereditarietà complessa (multigenica)
- Effetti ambientali
- Esempi: altezza, pigmentazione, BMI, etc

Fisher ipotizzò che il carattere quantitativo è soggetto al controllo di più fattori mendeliani (tanti geni), poligeni che controllano il carattere e di cui gli effetti sono additivi. Ciascun gene ha diversi alleli che possono intensificare o ridurre l'espressione fenotipica complessiva. All'aumentare del numero dei loci, la risultante si approssima a una distribuzione normale del tratto fenotipo.



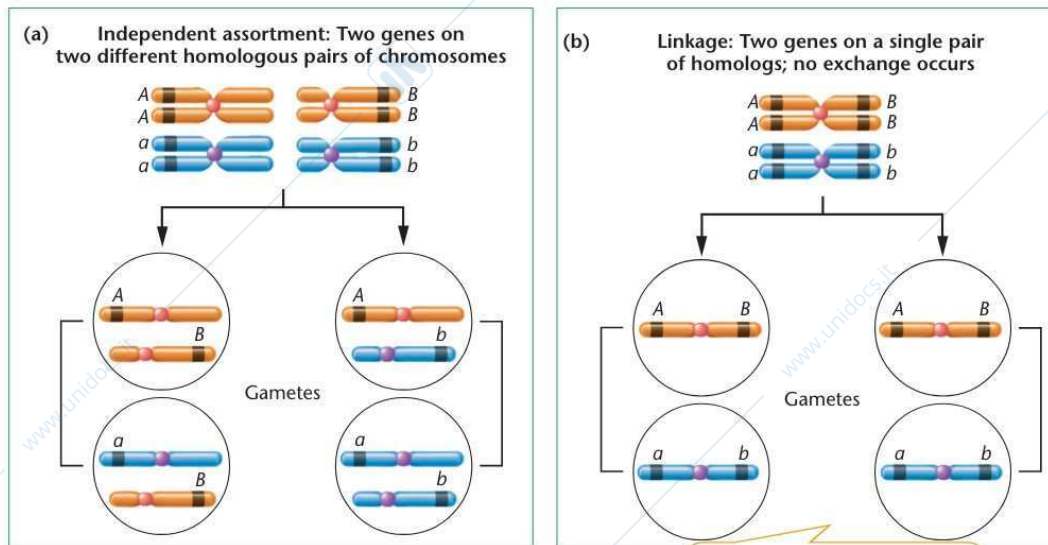
- l'ereditabilità di un carattere è sempre definita per una popolazione specifica in un dato ambiente. Non si riferisce ad un singolo individuo
- la stima potrebbe essere variabile applicabile a seconda della sottostruttura genetica della popolazione e/o diverse condizioni ambientali.
- l'ereditabilità non determina quanto un carattere sia "genetico" ma il grado in cui la variabilità genetica determina la variabilità fenotipica in una popolazione

Linkage: mappaggio genetico tramite l'analisi di ricombinazione.

Il linkage genetico permette di costruire mappe dei geni da cui è possibile andare a conoscere la posizione di un gene su un cromosoma; è uno step fondamentale per isolare un gene di interesse e studiarne la trasmissione. Quindi attraverso l'analisi dei mutanti e degli incroci si possono fare previsioni sulla modalità di trasmissione. Una volta aver stabilito qual è il modello di trasmissione che segue il gene, è possibile mappare i geni attraverso delle tecniche di mappaggio genetico: **analisi di linkage** per isolare questo gene.

Secondo la seconda legge mendeliana, quando ci sono due o più loci essi vengono trasmessi indipendentemente l'uno dall'altro. Tuttavia, al giorno d'oggi, si sa che la seconda legge di Mendel non è sempre valida in quanto i geni segregano in maniera indipendente solamente se si trovano su geni diversi. Se sono presenti due loci sullo stesso cromosoma ed essi si trovano molto vicini tra loro, allora l'assortimento indipendente non è più valido.

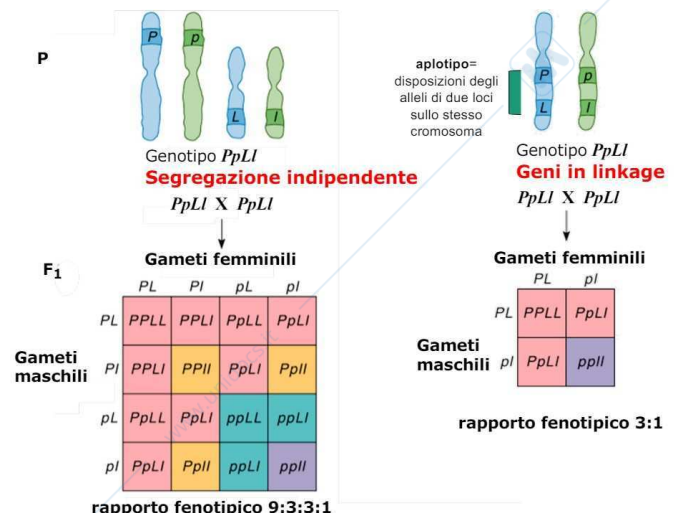
Se due geni che sintetizzano due tratti sono sullo stesso cromosoma (e molto vicini tra loro), essi segregano insieme e si avranno quindi solamente due possibili genotipi trasmessi ai figli:



Quindi il rapporto fenotipico di due geni che segregano insieme è di 3:1 con 2 possibili combinazioni di alleli.

Ma come si spiega allora la comparsa dei fenotipi non-parentali (ricombinanti)?

Venne scoperto il fenomeno del crossing over: osservando i cromosomi al microscopio durante il



fenomeno della meiosi è possibile osservare i chiasmi. Risultava come se i due cromosomi omologhi fossero uniti tra loro. L'ipotesi che fu poi dimostrata fu che i punti in cui i cromosomi omologhi sono uniti tra loro rappresentano i punti di scambio tra i cromosomi: crossing over.

I due cromosomi omologhi si appaiano tra loro e avviene lo scambio tra i due cromatidi NON fratelli, formando cromatidi con prodotti del crossing over con un pezzo del cromosoma materno e uno paterno: nuove combinazioni degli alleli.

La scoperta del linkage deriva dagli esperimenti di Morgan, riuscì a descrivere la presenza di linkage tra geni sullo stesso cromosoma. I suoi studi consistevano nell'analisi di tratti genetici della drosophila: aveva identificato un certo numero di geni associati al cromosoma X, tra cui il gene per gli occhi bianchi (white-eyes, **w**) e il gene per le ali miniatura (miniature wings, **m**)

Incrociò una femmina con occhi bianchi e ali miniatura (alleli recessivi per entrambi i caratteri) con un maschio di tipo selvatico.

Il risultato della F1 sono femmine con fenotipo wild-type (eterozigoti) in quanto hanno preso X recessiva dalla madre e X dominante dal padre; i maschi invece mostrano i due alleli recessivi presi dalla madre perché dal padre hanno preso il cromosoma Y



$\frac{w}{w} \frac{m}{m}$

Si usa la stanghetta per indicare che i due geni (w, m) sono sullo stesso cromosoma)

Incrociando tra loro poi individui della F1 ci si aspettavano 4 possibili combinazioni:

Fenotipi della F₁

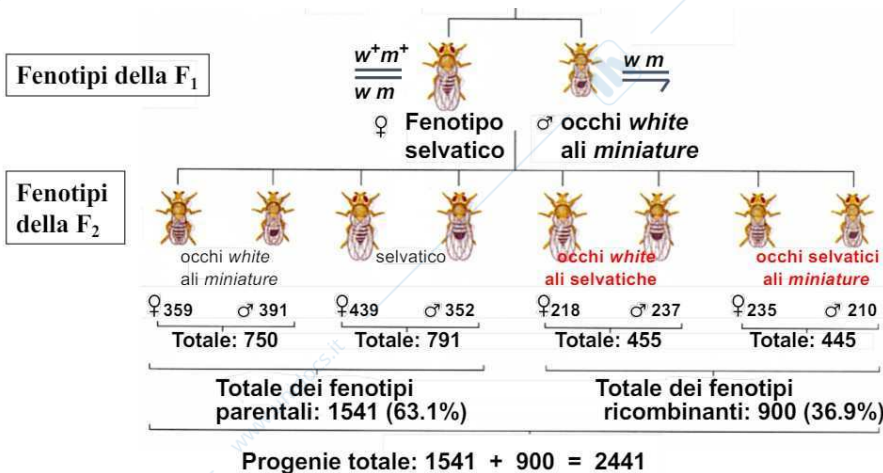


F₂

Gameti femm. Risultati attesi?

	w+ m+	w m	w+ m	w m+
Gameti masch. Y	$\frac{w^+m^+}{w m}$ occhi wt ali wt	$\frac{w m}{w m}$ occhi white ali min	$\frac{w^+ m}{w m}$ occhi wt ali min	$\frac{w m^+}{w m}$ occhi white ali wt
1/4 occhi wt ali wt	1/4 occhi white ali min	1/4 occhi wt ali min	1/4 occhi white ali wt	

In realtà osservò i seguenti risultati:

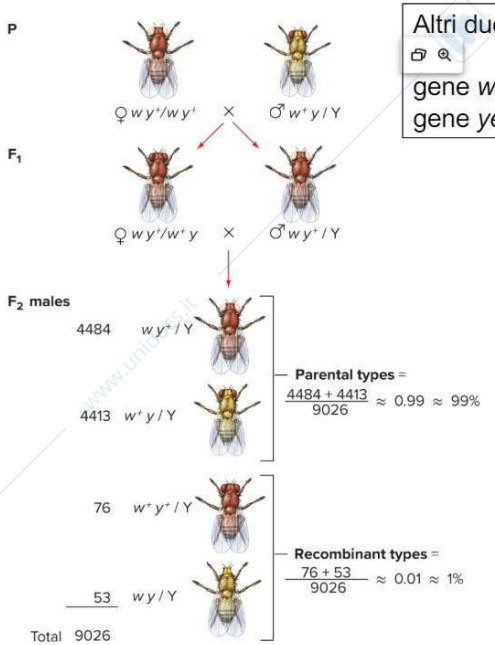


Quindi i risultati ottenuti non corrispondono a quelli ipotizzati: ci sono due coppie di fenotipi più presenti con una percentuale sommativa di 63%.

Le due classi più frequenti corrispondono ai fenotipi parentali mentre le due classi meno

frequenti (37%) corrispondono ai fenotipi ricombinanti: fenotipi diversi rispetto alle combinazioni parentali.

Morgan decide poi di effettuare un altro esperimento: incrocia una femmina con occhi bianchi e corpo wild-type con un maschio con occhi wild-type e corpo yellow. Ottiene una F1 in cui tutte le femmine sono eterozigoti wild-type mentre i maschi hanno occhi bianchi e corpo wild-type.



Incrociando nuovamente tra loro gli individui della F1, ottiene una F2 in cui si presentano 4 classi fenotipiche:

- le **parentali** sono molto più frequenti e sono in proporzioni simili tra loro (4484 e 4413). In totale rappresentano il 99% della progenie.

- le altre due classi costituiscono solamente l'1% della progenie e sono quindi i **fenotipi ricombinanti**

Anche se si cambia la disposizione degli alleli sui cromosomi (inverte cioè il fenotipo dei genitori) ottengo comunque la stessa percentuale di fenotipi ricombinanti

Quindi le osservazioni di Morgan furono le seguenti:

- le due classi fenotipiche parentali sono le più frequenti, mentre le classi ricombinanti hanno una frequenza minore.
- le due classi fenotipiche parentali hanno frequenza simile tra loro, e lo stesso vale per le due classi ricombinanti.
- la percentuale dei ricombinanti variava a seconda delle coppie di

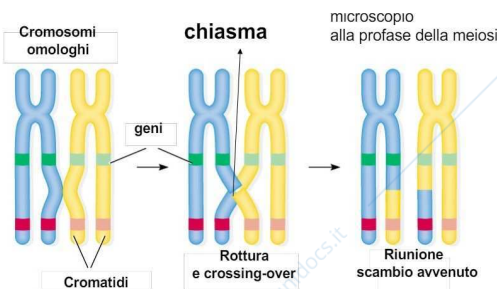
geni analizzati

Morgan quindi conclude che i geni hanno posizioni fisse e sono disposti in modo lineare, come un filo di perle, in cui i vari loci corrispondono a tante perle disposte una dietro l'altra.

Durante la meiosi gli alleli di alcuni geni tendono a segregare insieme se si trovano molto vicini tra loro sullo stesso cromosoma. Si parla quindi di "**linkage genetico**" (concatenazione)

I ricombinanti sono dovuti ad uno scambio (crossing-over) tra i due cromosomi omologhi alla meiosi. Il crossing-over è uno scambio reciproco, per cui le due classi ricombinanti hanno frequenza simile tra loro. Alla fine del crossing-over, un cromatide è costituito da un pezzo di cromosoma originale e un pezzo dell'altro cromosoma con cui ha effettuato crossing-over.

Ovviamente, in un determinato cromosoma, i geni possono essere più o meno distanti; se sono molto vicini allora è improbabile che vengano separati, ottenendo così una percentuali di fenotipi ricombinanti molto bassa. Se, al contrario, sono distanti allora è più probabile che i due alleli vengano separati durante il crossing-over. Quindi, **la frequenza di ricombinazione dipende dalla distanza tra due geni su un cromosoma.**



I chiasmi si presentano durante la profase della meiosi I, in cui i cromosomi iniziano a separarsi per andare verso la metafase. Il crossing-over avviene però nella prima metà della profase I, quando i due cromatidi fratelli sono connessi tra loro tramite il complesso sinaptonemale. I chiasmi rappresentano i siti del crossing-over e tengono uniti i cromosomi omologhi durante tutto

il processo di meiosi I e svolgono un ruolo importante per la corretta segregazione dei cromosomi omologhi. Di fatto, creano una tensione fondamentale per il meccanismo di segregazione, stabilizzano l'interazione del cinetocore con i microtubuli.

Nella meiosi I i due cromatidi fratelli sono appiccicati tra loro e si staccano solamente i cromosomi omologhi, i 2 cromatidi fratelli rimangono fusi grazie al cinetocore.

Se si svolgono degli studi in cui si va a bloccare il fenomeno del crossing-over, si osserva che la segregazione non funziona correttamente e si ottengono errori in cui i due cromosomi non si separano e vanno entrambi nella stessa direzione.

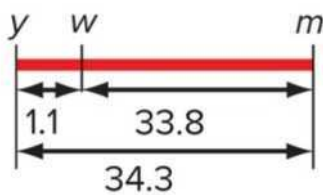
Nascita delle mappe genetiche:

Un allievo di Morgan pensò che la percentuale di ricombinazione si potesse utilizzare come una misura quantitativa per capire quanto fossero distanti sullo stesso cromosoma i due geni analizzati e pensò che si potessero costruire delle mappe (riferendosi sempre al cromosoma X).

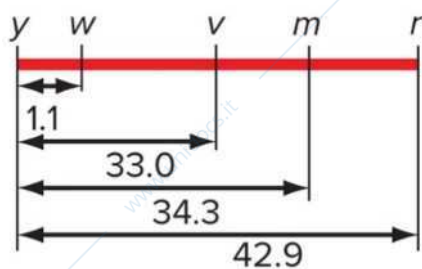
La distanza genetica tra due loci è proporzionale al numero medio di crossing over che avvengono tra essi alla meiosi

Questo allievo analizza diversi geni già identificati:

- corpo giallo (y)
- occhio bianco (w)
- occhio vermiglio (v)
- ali miniatura (m)
- ali rudimentali (r)



Focalizzandosi su questi geni fa degli incroci ed ottiene vari risultati, es. fra un moscerino con occhi white e uno con ali in miniatura, otteneva un 33% di fenotipi ricombinanti, mentre se incrociava un moscerino col corpo giallo e uno con ali in miniatura, otteneva un 34% di ricombinanti. Quindi il gene white era all'incirca tra il gene yellow e il gene miniatures



Analizzando tutte le coppie, costruisce una mappa coerente in cui le frequenze di ricombinazione tornavano; ipotizza quindi che si poteva utilizzare tale frequenza come una stima di distanza tra i geni.

La distanza di mappa si calcola facendo: (totale della progenie ricombinante / totale della progenie) x 100.

Le distanze si misurano in centiMorgan (cM); 1 centiMorgan equivale a una distanza tra due geni per cui solo l'1% dei prodotti è ricombinante. (tale concetto vale anche sugli autosomi ma è più complesso da

dimostrare)

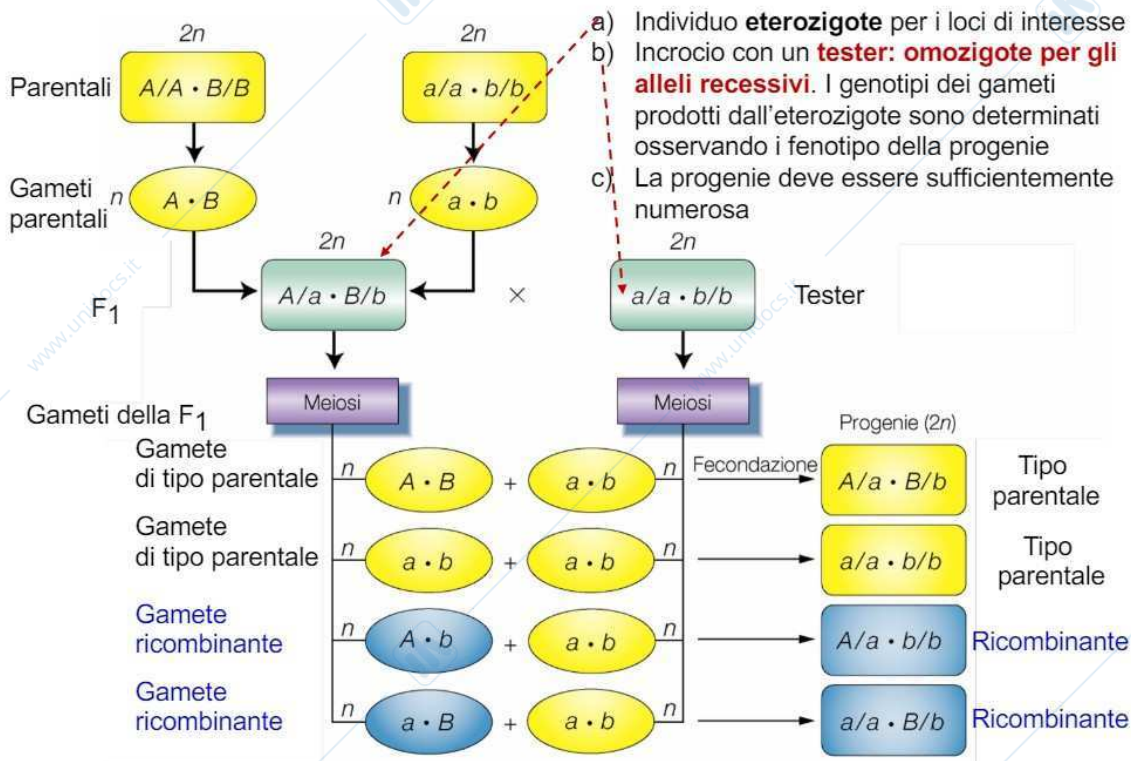
E' possibile individuare la presenza di linkage quando in un incrocio tra di-ibridi, il risultato delle classi fenotipiche è diverso rispetto al rapporto 9:3:3:1.

Il rapporto potrebbe venire alterato, per esempio, tramite epistasi ma in tal caso ci sono dei rapporti ben definiti; se c'è linkage è presente una deviazione NON spiegata con modelli epistatici.

E' difficile esaminare il linkage se si effettuano incroci tra di-ibridi, è più semplice effettuare un test cross. esempio: si effettua un incrocio tra un eterozigote e un omozigote per entrambi gli alleli recessivi (aa bb).

Il problema è semplificato perchè posso identificare gli alleli prodotti dalla meiosi del genitore eterozigote in quanto l'altro (omozigote) trasmette solo alleli recessivi e non influenzano, quindi, il fenotipo della progenie. Gli alleli prodotti dall'eterozigote potranno essere quindi:

- A B
- a b
- A b
- a B



Il risultato ottenuto saranno quindi 2 classi di fenotipi parentali e 2 classi di fenotipi ricombinanti. E' quindi necessario effettuare il test cross se si vogliono analizzare caratteri autosomici; per gli alleli sul cromosoma X non è necessario.

Il linkage quindi non è limitato ai geni del cromosoma X.; consideriamo due loci di drosophila presenti su cromosomi autosomici:

- allele recessivo b: determina il colore nero del corpo
- allele recessivo vg: determina la formazione di ali vestigiali (non funzionanti)

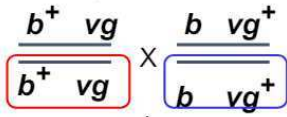
Si incrocia una femmina con corpo wild-type (grigio) e ali vestigiali con un maschio con corpo nero (b b) e ali wild-type (normali).

Si ottiene una F1 in cui sia le femmine che i maschi sono eterozigoti sia per l'allele b (corpo nero), sia per l'allele vg (ali vestigiali): hanno tutti gli stessi genotipi.

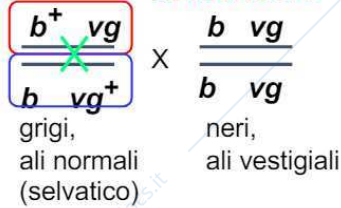
Si incrociano poi individui della F1 con degli omozigoti recessivi (corpo nero e ali vestigiali). Se i geni NON sono in linked, il risultato aspettato è sempre quello di ¼ ecc.. ma invece si ottiene:

Genotipi parentali

grigi, ali vestigiali neri, ali normali



REINCROCIO



283 grigi, ali normali	$\frac{b^+ \quad vg^+}{b \quad vg}$	ricombinante
1294 grigi, ali vestigiali	$\frac{b^+ \quad vg}{b \quad vg}$	parentale
1418 neri, ali normali	$\frac{b \quad vg^+}{b \quad vg}$	parentale
241 neri, ali vestigiali	$\frac{b \quad vg}{b \quad vg}$	ricombinante

Ciò che si osserva ancora una volta è che le combinazioni parentali si ottengono con una percentuale maggiore; i fenotipi ricombinanti sono in percentuale minore.

Le combinazioni parentali si ottengono con una percentuale maggiore. quelle ricombinanti sono in percentuali minori.

Tra i due loci ci sono circa 16 centiMorgan l'uno dall'altro. quindi un 16% di probabilità che possano manifestarsi fenotipi ricombinanti

Anche effettuando il test del chi-quadrato si ottiene come risultato che l'ipotesi pensata inizialmente (che i geni segregano in maniera indipendente) è da rifiutare, in quanto i geni sono in linked.

Configurazione degli alleli:

In un individuo doppio eterozigote per gli alleli w e m, questi possono essere situati sugli omologhi in due diverse combinazioni:

$\frac{w^+ \quad m^+}{w \quad m}$ I due alleli selvatici si trovano su un omologo e i due recessivi sull'altro, questa disposizione viene chiamata in **cis** Un crossing-over tra i due loci produce i ricombinanti $w^+ m$ e $w m^+$

oppure

$\frac{w^+ \quad m}{w \quad m^+}$ Ciascun cromosoma omologo porta l'allele selvatico di un gene e l'allele mutato dell'altro: questa disposizione viene chiamata in **trans**
 Un crossing-over tra i due loci produce i ricombinanti $w m$ e $w^+ m^+$

La frequenza di ricombinazione tra due geni in linkage è sempre la stessa

Crossing over come misura della distanza genetica:

- possiamo stimare la distanza relativa tra geni sul cromosoma, sulla base della probabilità che avvenga uno scambio tra loro. Come già anticipato, se i geni sono molto vicini, è molto difficile che avvenga un crossing-over, perciò la ricombinazione fenotipica sarà piuttosto rara.

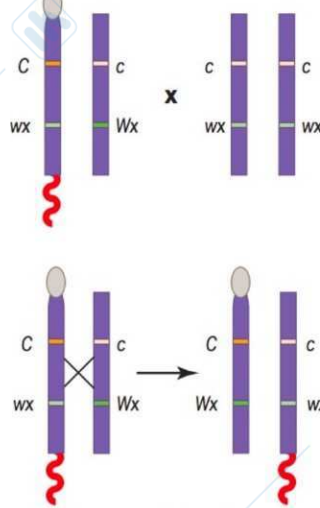
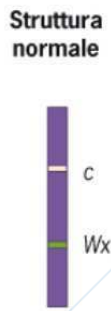
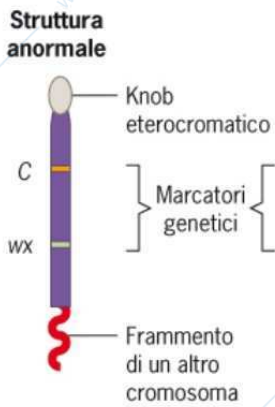
- poichè il risultato del crossing over sono due cromatidi "modificati" e due cromatidi originali, il massimo di probabilità di ottenere fenotipi ricombinanti è del 50%.

Se la frequenza di ricombinazione tra due geni è < 50% allora i geni sono in linkage; se, al contrario, la frequenza di ricombinazione tra due geni è = 50% allora i geni segregano indipendentemente.

La prova che dimostrò effettivamente che la ricombinazione avviene per crossing-over fu attraverso degli esperimenti sulla pianta di mais. Questi cromosomi hanno dei marcatori genetici particolari:

C, c (seme colorato, incolore) e Wx, wx (seme ricco amido, ceroso).

Attraverso degli incroci, si identificò in una linea di mais un cromosoma con delle caratteristiche particolari e ben visibili al microscopio; da una parte aveva un frammento di un altro cromosoma e dall'altra parte aveva una parte di eterocromatina addensata.



P

- $C\ wx / c\ wx$ colorato, ceroso
- $c\ Wx / c\ wx$ incolore, ricco amido

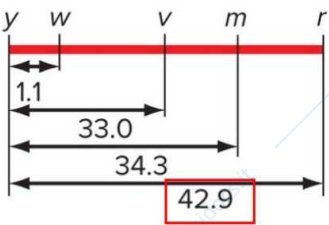
R

- $C\ Wx / c\ wx$ colorato, ricco amido
- $c\ wx / c\ wx$ incolore, ceroso

Le frequenze di ricombinazione osservate in un incrocio sono additive entro piccole distanze (< 10 cM) ma per distanze più grandi, le frequenze di ricombinazioni osservate non sono più additive.

y-w → 1.1
w-v → 32.1
v-m → 4
m-r → 17.8
f.r. osservate

$1.1 + 32.1 + 4 + 17.8 = 55$



Quindi, all'aumentare della distanza tra due geni, le frequenze di ricombinazione osservate tendono a sottostimare la reale distanza di mappa.

Perchè questo accade?

Ciò è spiegato dal fatto che tra due cromatidi possono avvenire più crossing-over. Solo in assenza di scambi multipli tra i geni ci sarebbe una relazione lineare tra distanza di mappa e frequenza di ricombinazione.

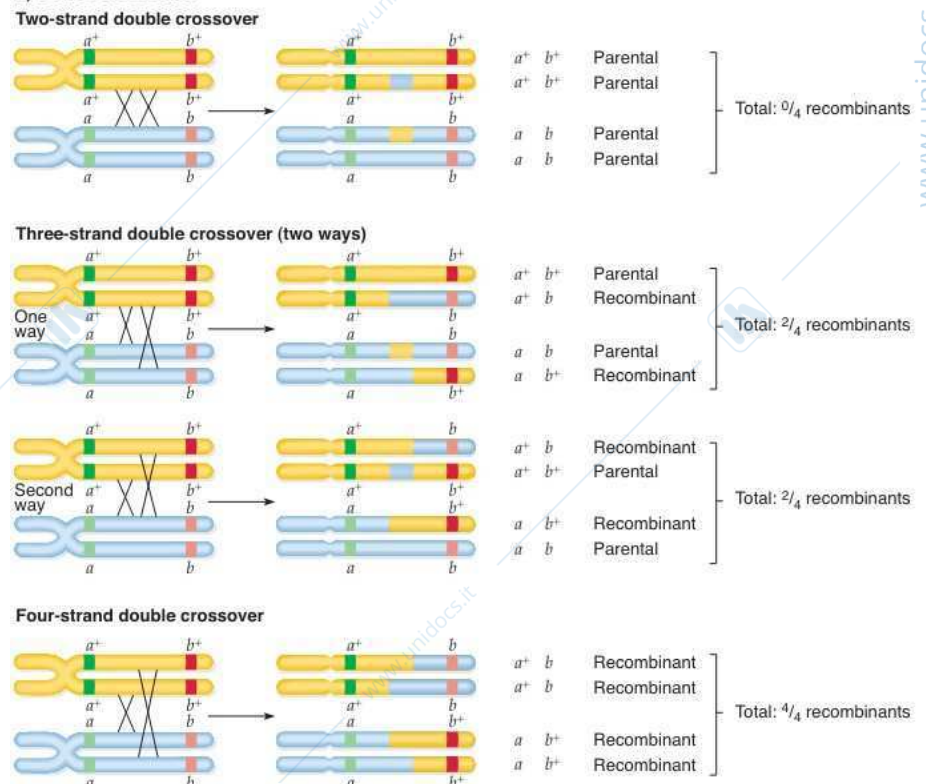
Se avvengono più crossing over tra due cromatidi, possono avvenire in più modi:

Totale ricombinanti = $0/4 + 2/4 + 2/4 + 4/4 = 8/16$
Quindi, complessivamente ricombinanti = 50%

DOPPI CROSSING OVER:

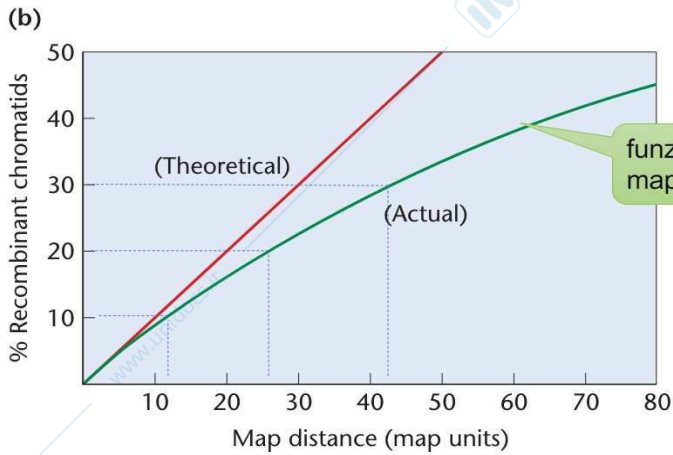
- singoli eventi di crossing-over producono metà cromatidi di tipo parentale e metà di tipo

b) Double crossovers



ricombinante. - doppi crossing-over (a due, tre e quattro filamenti) producono complessivamente metà cromatidi parentali e metà cromatidi ricombinanti. La frequenza di ricombinazione osservata in un incrocio a 2 punti tra due geni localizzati sullo stesso cromosoma non può superare il 50%.

I doppi crossing over avvengono casualmente e in media si riescono a osservare un 50% di ricombinanti. In realtà però si sottostima la reale frequenza di crossing over e la distanza di mappa.



Nell'asse x è espressa la distanza di mappa in centiMorgan, mentre nell'asse y è espressa la frequenza di ricombinazione. Se ci fosse una relazione diretta tra i due dati, si dovrebbe osservare una linea retta con una diretta proporzionalità. La relazione diretta, in realtà, è solo entro i 10 centiMorgan (la funzione teorica segue la funzione reale), ma poi la funzione reale (quella verde) inizia ad appiattirsi. es: se osservo un 30% di fenotipi ricombinanti, non corrisponde a una vera distanza di 30 centiMorgan in quanto possono avvenire più crossing over.

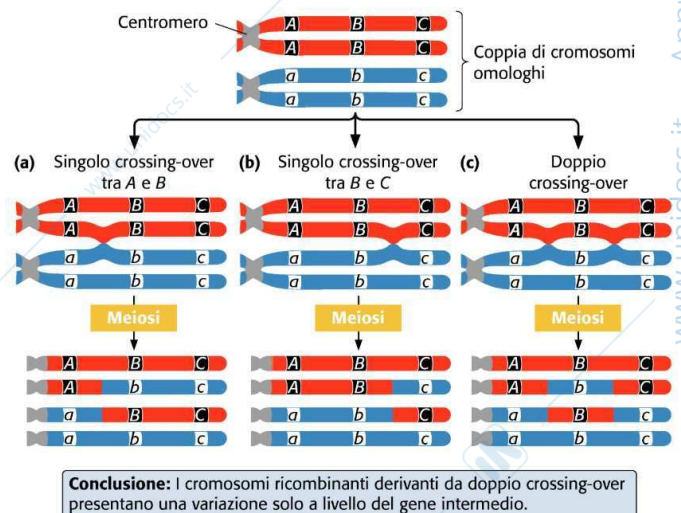
Attraverso una formula matematica è possibile convertire le due misure: $p = \frac{1}{2} (1 - e^{-2d})$, dove d è la distanza di mappa espressa in Morgans ed e è la base dei logaritmi naturali

Mappare tre geni contemporaneamente:

Avere una mappa permette di localizzare le regioni interessate del cromosoma per identificare un gene particolare. Esiste un metodo più veloce ed efficiente:

incrocio a tre punti

Si studiano 3 geni contemporaneamente (se ne possono studiare anche 4,5 ecc...). Non sapendo l'ordine dei tre loci sul cromosoma, si vuole capire se sono in linkage e qual è l'ordine delle distanze. Se si analizzano 3 loci, è possibile osservare i prodotti di singoli crossing over tra il primo e secondo locus, tra il secondo e il terzo e un doppio crossing over. Il prodotto del doppio crossing over è più raro perchè è meno probabile che avvengano 2 crossing over. Quindi andando ad analizzare i prodotti della meiosi è più semplice riconoscere i fenotipi che derivano da doppio crossing over perchè sono le classi meno frequenti.

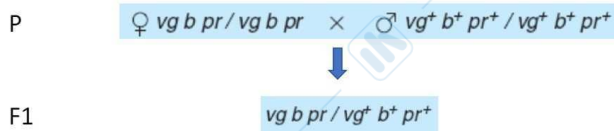


esempio: si incrociano due linee pure che differiscono

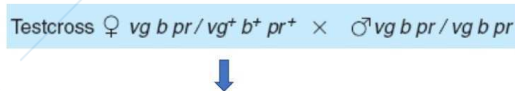
per tre loci (loci autosomici). La femmina ha tutti e tre gli alleli recessivi mentre il maschio è wild-type per tutti e tre gli alleli. Si ottiene una F1 eterozigote con fenotipo dominante (del padre).

Si incrocia poi la F1 con un individuo omozigote recessivo per tutti e tre i loci. Se i tre locus segregassero indipendentemente, si formerebbero tutte le combinazioni di alleli in uguale frequenza. In realtà, si ottengono 8 classi di alleli ma con frequenze diverse

1) Incrocio due linee pure che differiscono per tre loci.



2) testcross degli individui eterozigoti F1 con omozigoti recessivi rispetto a tutti e tre i loci



3) Analizzo i risultati della generazione F2

NB: in *Drosophila* il crossing-over avviene solo in meiosi femminile

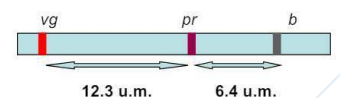
1779	$vg\ b\ pr$
1654	$vg^+\ b^+\ pr^+$
252	$vg^+\ b\ pr$
241	$vg\ b^+\ pr^+$
131	$vg^+\ b\ pr^+$
118	$vg\ b^+\ pr$
13	$vg\ b\ pr^+$
9	$vg^+\ b^+\ pr$
<hr/>	
4197	

In realtà si osserva che le prime due classi sono le più frequenti e rappresentano i fenotipi parentali (a livello di quei cromatidi non è avvenuto crossing over). Ci sono poi altre quattro classi con frequenza simile (252/241 e 131/118) che rappresentano i fenotipi ricombinanti con un singolo crossing over. Le ultime due classi (13/9) che sono le più rare e rappresentano i risultati del doppio crossing over.

Quindi, considerando che i più frequenti NON sono ricombinanti mentre quelli doppi ricombinanti hanno una frequenza più bassa, è possibile determinare l'ordine dei geni sul cromosoma. Il gene che sta in mezzo è quello che è stato scambiato nel doppio crossing over (in questo caso il gene in mezzo è pr^+). Si può ora calcolare le distanze attraverso delle frequenze di ricombinazione andando a prendere in considerazione due geni alla volta.

Calcolo della distanza tra vg e pr		
Crossing-over tra vg e pr	doppi crossing-over	X 100%
progenie totale		
$(252 + 241) + (9 + 13)$		= 12.3%
4197		

Calcolo della distanza tra pr e b		
Crossing-over tra pr e b	doppi crossing-over	X 100%
progenie totale		
$(131 + 118) + (9 + 13)$		= 6.4%
4197		



Per calcolare la distanza tra vg e pr bisogna considerare le frequenze di ricombinanti tra vg e pr (252 e 241) + i risultati dei doppi ricombinanti (9 e 13) diviso il totale della progenie. Si moltiplica poi x 100. Si ottiene così una percentuale di 12,3. Si fa lo stesso calcolo anche per gli altri due geni e poi si può scrivere la mappa con pr nel mezzo a 12,3 centiMorgan da vg e a 6,4 centiMorgan da b .

Interferenza cromosomica:

Ci si aspetta che i crossing over siano eventi che avvengono in modo uniforme lungo tutto il cromosoma e che se si considera, per esempio, la regione tra vg e pr ci sarà una certa frequenza di ricombinazione.

Le probabilità di crossing over dovrebbero essere in teoria indipendenti e si ipotizza che la probabilità di trovare doppi crossing over sia data dai prodotti delle singole probabilità.

Osservando i dati osservati però i doppi crossing over erano meno cioè sono stati osservati un numero minore di doppi ricombinanti rispetto all'atteso. Ciò avviene quasi costantemente; il valore dei doppi ricombinanti atteso è minore di quello osservato e ciò prende il nome di **interferenza da chiasma**: se si forma un crossing over in una regione è meno probabile che si formi un crossing over nella regione adiacente. Questo è dovuto a un fenomeno biologico non ancora chiaro.

Quindi i crossing over non avvengono in regioni vicine ma più distanti. E' stato ipotizzato che ciò sia dovuto dal fatto che dato che è cruciale che in ogni coppia di cromosomi avvenga almeno un crossing over ma dato che ci sono cromosomi più grandi e più piccoli ed il numero di crossing over è limitato, per cercare di aumentare la distribuzione di tali crossing over, si tende ad impedire che due crossing over avvengano in regioni vicine per cercare di distribuirli meglio.

Questo fenomeno fa sì che i due crossing over non avvengano in modo indipendente. Si fa il rapporto fra la frequenza dei doppi crossing over osservati e la frequenze dei doppi crossing over attesi:

coefficiente di coincidenza. Questo rapporto è quasi sempre minore di 1 in quanto gli osservati sono quasi sempre minori degli attesi.

$$\text{coefficiente di coincidenza} = \frac{\text{frequenza di doppi ricombinanti osservati}}{\text{frequenza di doppi ricombinanti attesi}}$$

Coefficiente di interferenza = 1 - coefficiente di coincidenza. Il coefficiente di interferenza indica che tale percentuale non è stata osservata a causa dell'interferenza.

$$\text{coefficiente di interferenza} = 1 - \text{coefficiente di coincidenza}$$

Sulle mappe ogni gene occupa un locus in una certa posizione del cromosoma. Quando ho due o più loci sullo stesso cromosoma essi sono un **gruppo di linkage** cioè un gruppo di geni che sono tutti legati fra di loro da relazioni di linkage. Non è possibile trovare linkage tra un gene che sta su un cromosoma e un gene che sta su un cromosoma diverso.

In realtà le mappe genetiche espresse in centiMorgan sono una approssimazione in quanto le distanze fisiche reali e la quantità di numero di basi di DNA non corrisponde esattamente alle distanze genetiche perché la probabilità di ricombinazione non è così uniforme; come approssimazione funziona bene ma nel dettaglio non tutte le regioni hanno le stesse probabilità di andare incontro a crossing over.

Con la possibilità di utilizzare dei marcatori molecolari è possibile notare che esistono degli **hot spots**, ovvero punti in cui la ricombinazione avviene più spesso. La ricombinazione, al contrario, avviene meno spesso nelle regioni eterocromatiche vicino al centromero mentre avvengono più frequentemente ai vertici del cromosoma.

Andando a sequenziare ogni cellula dello sperma si può osservare un gran numero di gameti, dove sono avvenuti i crossing over e si vede che la ricombinazione non è omogenea; in alcune regioni avvengono di più (regioni di chilobasi). Un'altra caratteristica particolare è che c'è una frequenza di ricombinazione diversa tra i due sessi. Le meiosi femminili hanno una frequenza di ricombinazione maggiore rispetto alla meiosi maschile. Inoltre le regioni in cui i cromosomi X e Y effettuano crossing over sono le regioni pseudo mondali, le uniche regioni che sono simili tra X e Y

Analisi di linkage nell'uomo: è impossibile fare incroci sperimentali.

Quali sono i problemi pratici?

- non si possono fare incroci sperimentali
- pedigree piccoli, progenie poco numerosa, spesso dati incompleti
- la maggior parte dei caratteri monogenici sono rari

Fino agli anni 80 era quindi impossibile, poi grazie a delle tecniche di genetica molecolare è stato possibile sequenziare le sequenze di DNA attraverso l'uso di polimorfismi ovvero varianti delle sequenze di DNA che si possono considerare come dei marcatori per l'analisi di linkage. Si guarda la frequenza nei marcatori di DNA. In base a questo è stato possibile creare mappe dei cromosomi umani.

Tramite il linkage era possibile osservare il modo in cui veniva trasmessa una malattia mendeliana, si studiava questo tratto fenotipico attraverso analisi di linkage con l'utilizzo di marcatori molecolari.

Osservando il numero limitato di famiglie in cui vi erano più fratelli affetti da fibrosi cistica, si è riusciti a mappare la posizione su una precisa posizione del cromosoma 7; è stato poi individuato il gene responsabile e la sua funzione era di codificare per una proteina di membrana per un passaggio di ioni cloro. Si stanno cercando di trovare delle strategie di terapie mirate sulla conoscenza molecolare che abbiamo e si sta lavorando sull'ipotesi di terapia genica.

L'utilizzo di microrganismi è stato molto importante in quanto ha "unito" la genetica con la biochimica. Esistono diverse forme di organismi:

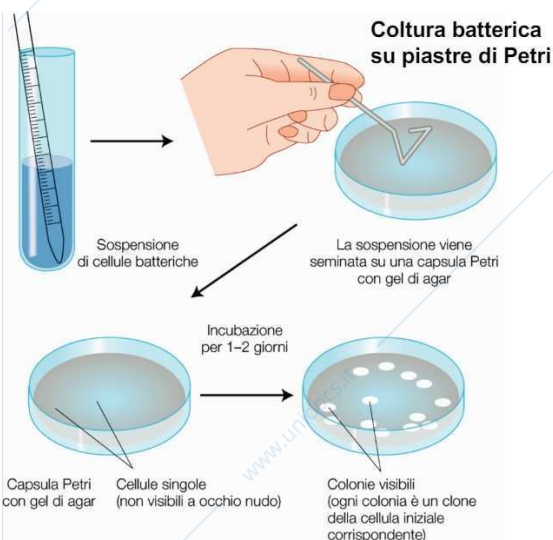
- **procarioti:** batteri (es. escherichia coli)
- **virus:** non sono organismi viventi assestati in quanto sono parassiti, non sono di per sé autosufficienti, hanno bisogno di replicarsi utilizzando altre cellule viventi.
- **eucarioti:** tipi di muffa, alcuni funghi o alghe (es. lievito di birra o muffa del pane)

Di fatto i biochimici studiano le funzioni della cellula e le proteine che compongono le varie vie metaboliche che sono alla base della biochimica cellulare. Attraverso l'utilizzo dei microrganismi si può studiare la genetica da un punto di vista dei meccanismi biochimici portando allo sviluppo della biologia molecolare.

I microrganismi sono organismi modello con caratteristiche ottimali:

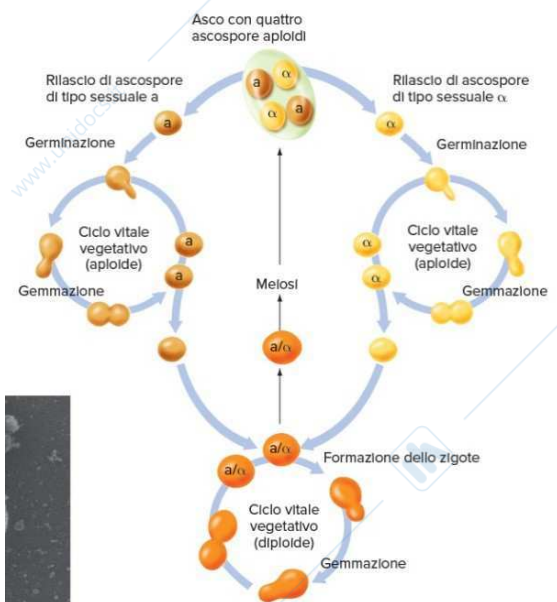
- piccole dimensioni
- ciclo vitale breve (es. 20 minuti)
- grandi numeri di individui: si analizzano quindi anche mutazioni estremamente rare
- sono facili da coltivare in laboratorio e da manipolare geneticamente.
- il genoma dei batteri è circolare e ci sono dei plasmidi, genoma aploide. Se è presente una mutazione, il fenotipo si esprime per forza, non c'è la relazione tra dominante e recessivo.

La maggior parte del ciclo vitale degli eucarioti è nello stato aploide, un'unica copia del genoma. Si riproducono però attraverso riproduzione sessuata, vanno quindi incontro a meiosi. Due cellule aploidi che sono di due tipologie sessuali diverse si fondono formando una cellula diploide la quale va incontro a meiosi e genera 4 spore aploidi che rimangono chiuse dentro un "contenitore" chiamato **asco**.



E' possibile studiare così i 4 prodotti della meiosi.

L'analisi di questi organismi è stata fondamentale per capire i meccanismi della ricombinazione omologa.



Lavorare con i microrganismi:

Come già anticipato, i batteri possono essere coltivati facilmente in laboratorio e vengono fatti crescere in delle provette contenenti un terreno di crescita. (es LB con delle molecole nutritive necessarie per far sì che possano crescere). I terreni devono essere trattati in sterilità, non devono essere contaminati. I batteri si possono far crescere anche su un terreno solido.

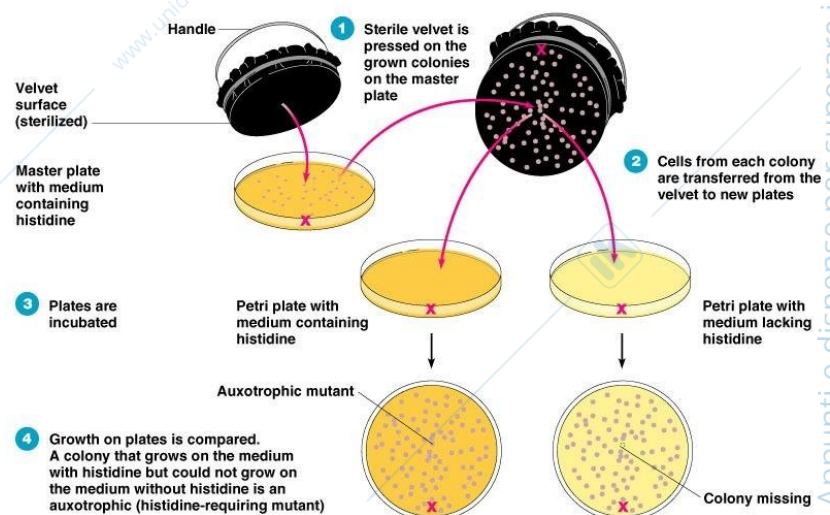
Quali fenotipi possiamo studiare?

- fenotipi che riguardano il metabolismo: **mutanti nutrizionali**. Mutanti difettivi nella capacità di produrre una o più molecole necessarie per la crescita. E' possibile studiare le vie metaboliche della cellula che portano alla sintesi e alla regolazione di ciascun composto biochimico.

es. se un mutante non sintetizza un amminoacido perchè ha una mutazione, questo tipo di mutante cresce su un terreno completo (amminoacidi compresi) ma nel terreno minimo non crescerà (non sono presenti amminoacidi) ed è possibile quindi identificare il mutante: **mutante auxotrofo** ovvero un mutante che ha bisogno di aiuto per poter crescere, è incapace di metabolizzare.

- mutanti incapaci di utilizzare una fonte di energia
- mutanti resistenti a antibiotici.

Una tecnica per isolare questi mutanti è creare delle repliche di colonie che sono state cresciute su una piastra. Utilizzando una specie di stampo lo si appoggia sulla superficie della piastra e successivamente lo appoggia su una piastra pulita. In questo modo si ottiene la replica della piastra madre in quanto la colonia ha aderito allo stampo. Si fa poi la replica su un terreno selettivo e su uno completo e si confrontano i due risultati ottenuti: **replica plating**



Ma se i batteri non si riproducono con riproduzione sessuata, come è possibile avere la meiosi? Come si ottengono gli incroci tra diversi ceppi batterici?

I batteri si trasferiscono e si scambiano materiale genetico in 3 modi:

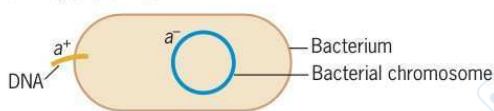
- **trasformazione**: se c'è del DNA presente nell'ambiente circostante, i frammenti di DNA possono entrare dentro la cellula batterica e andare a ricombinare con il genoma batterico. A volte è un processo spontaneo, a volte no (in questo caso bisogna utilizzare delle tecniche)

- **coniugazione**: richiede il contatto diretto tra due cellule batteriche, trasferimento diretto di un tratto di DNA da una cellula donatrice a una ricevente

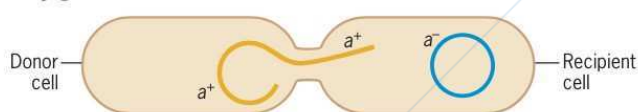
- **trasduzione**: data dalla presenza di un virus che infetta una cellula donatrice e per errore incorpora un frammento di genoma della cellula e quando viene liberato e infetta un'altra cellula, trasporta con sé il frammento di DNA alla cellula ricevente.

Rispetto al trasferimento genico degli eucarioti, nei procarioti prende il nome di "**trasferimento genico orizzontale**": un frammento di DNA viene trasferito da

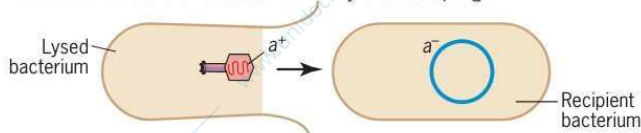
Transformation: uptake of free DNA.



Conjugation: direct transfer of DNA from one bacterium to another.



Transduction: transfer of bacterial DNA by a bacteriophage.



una cellula donatrice a una ricevente. Lo scambio avviene normalmente tra due organismi della stessa specie ma avviene anche tra specie diverse. In questo l'evoluzione avviene molto più velocemente (es. la resistenza agli antibiotici: avvengono scambi orizzontali tra due cellule batteriche anche di specie diverse)

I virus non si possono considerare organismi viventi indipendenti in quanto, per poter replicarsi, devono infettare una cellula vivente di un altro organismo.

I virus sono composti da una molecola di materiale genetico (DNA o RNA); nel caso dei batteriofagi normalmente è DNA. Questo materiale è contenuto dentro un involucro proteico e in alcuni casi anche da un rivestimento lipidico. Quando il virus infetta una cellula, può trasferire il genoma all'interno della cellula, e questo frammento di DNA prende poi il controllo del macchinario molecolare della cellula ospite, creando delle copie di se stesso, viene trascritto, tradotto e vengono sintetizzate le proteine necessarie per formare altre particelle virali che si assemblano fino a quando la cellula muore e libera la progenie dei fagi.

DNA: non si sapeva di cosa fossero fatti i cromosomi. Alla fine dell'800, un medico aveva studiato dei linfociti e aveva scoperto una sostanza chimica che conteneva del fosforo. Al tempo non si sapeva che il fosforo fosse presente nelle proteine. Successivamente la stessa sostanza "nucleina" venne identificata in diversi nuclei di cellule. Tramite alcune tecniche fu possibile andare a colorare la sostanza e vedere che si trovava a livello dei cromosomi. Quindi si ipotizzò che i cromosomi contenessero l'informazione genetica e la famosa sostanza chiamata nucleina e l'acido desossiribonucleico.

Successivamente fu decifrata la natura di questa sostanza ed era stato determinato che il DNA è costituito da 4 tipi di nucleotidi ripetuti; i nucleotidi sono quindi l'unità fondamentale degli acidi nucleici (DNA e RNA). I nucleotidi sono quindi costituiti da basi azotate, uno zucchero (desossiribosio) e un gruppo fosfato.

Le basi azotate si dividono in:

- purine: hanno un doppio anello e sono l'adenina e la guanina
- pirimidine: hanno un singolo anello e sono timina, citosina e uracile.

Successivamente Chargaff aveva stabilito che ci sono dei rapporti specifici tra questi 4 tipi di nucleotidi: c'è la stessa quantità di A e di T. Lo stesso vale per G e C.

La domanda che persisteva era però: i geni sono quindi composti da DNA o da proteine? Si credeva che il DNA costituito da solo 4 basi azotate fosse un pò poco per spiegare così tante combinazioni quindi si ipotizzò che i geni fossero costituiti da proteine.

Una serie di esperimenti portati avanti tra gli anni 20 e 50 portarono ad avere come risultato che in realtà il materiale genetico è costituito da acidi nucleici.

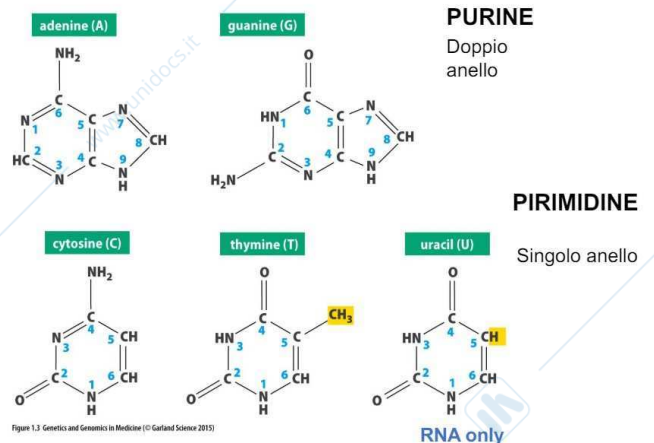
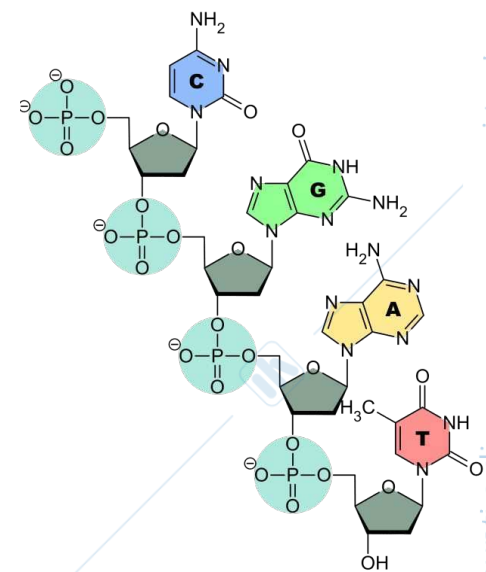
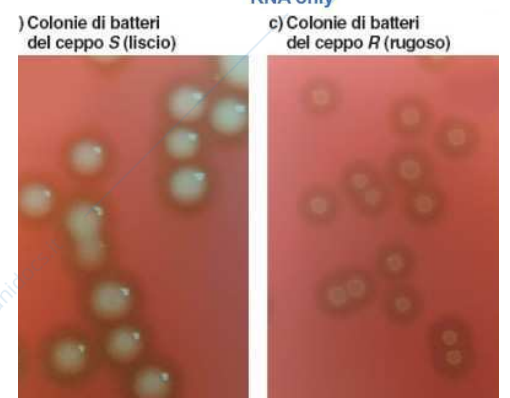


Figure 1.3 Genetics and Genomics in Medicine (© Garland Science 2015)



I primi esperimenti furono effettuati da Fred Griffith che utilizzò un batterio "streptococco" che causa polmonite e il fenomeno della trasformazione batterica.

Tramite questo esperimento dimostra che i topi si potevano infettare con questo pneumococco e sviluppare la polmonite. Esistevano però due ceppi di batteri:

- **ceppi S**: erano patogeni. Al microscopio mostravano una capsula liscia, rivestimento polisaccaridico che impedisce al sistema immunitario di poter combattere l'infezione
- **ceppo R**: NON sono patogeni, non hanno la capsula polisaccaridica e non causano quindi polmonite perchè vengono facilmente eliminati dal sistema immunitario.

L'esperimento che fa è il seguente:

- prende i batteri del ceppo S con i quali infetta dei topi e osserva che muoiono
- prende quelli del ceppo R, li inietta e i topi sopravvivono
- prende dei batteri del ceppo S uccisi dal calore e osserva che i topi non muoiono perchè sono morte le cellule batteriche.

Poi miscela batteri di tipo S che sono stati uccisi con calore e li mescola con batteri di tipo R ma nota che se uniti sono capaci di provocare polmonite. Recuperano i batteri dai topi morti, trova dei batteri di tipo S; ciò significa che "qualcosa" presente nei batteri S morti aveva trasformato i batteri R e gli aveva dato la capacità di infettare i topi e di causare polmonite. Questo elemento trasformante doveva contenere informazioni genetiche necessarie affinché il batterio di tipo R potesse sintetizzare i componenti della capsula del rivestimento del batterio e determinare la capacità di essere patogeno. In poche parole i batteri di tipo R avevano subito una trasformazione e avevano acquisito l'informazione per "creare" la capsula = **trasformazione batterica**

Tuttavia non si sapeva quale fosse questa sostanza che trasformava i batteri.

Venne dimostrato poi che questo principio trasformante fosse il DNA: era stata presa una coltura di batteri S uccisi col calore e si aveva cominciato a separare tutti i componenti che si potevano recuperare dall'estratto cellulare dei batteri S uccisi. Vennero separati carboidrati, lipidi, proteine; si aveva eliminato quasi tutto, il precipitato era una sostanza biancastra che si sapeva contenesse soprattutto acidi nucleici. Se si prendeva questa sostanza e la si mescolava ai batteri di tipo R, essi ottenevano la trasformazione (da R passavano ad S).

Nel 1952, grazie allo sviluppo di tecniche del microscopio elettronico si è potuto osservare cosa succede quando un fago infetta una cellula batterica. Ciò che si vede è che durante l'infezione il fago non viene incorporato dentro la cellula ma l'involucro del fago rimane attaccato alla parete cellulare, iniettando il materiale genetico all'interno della cellula batterica che dà istruzioni per sintetizzare nuove particelle virali che vanno a lisare la cellula.

Successivamente è stata determinata la struttura del DNA = polimero con 4 tipi di nucleotidi legato da legami fosfodiesterici.

Replicazione del DNA: come può essere replicato mantenendo la propria informazione? Quando le cellule si duplicano, si duplica anche il DNA: funzione essenziale eseguita con estrema precisione. La replicazione del DNA è semiconservativa: la doppia elica si separa e si sintetizza un filamento di DNA da un filamento stampo (quello originale). E' necessario un primer affinché la DNA polimerasi possa iniziare l'attività e sintetizza in direzione 5'3'.

Un'indagine riguardò lo studio di alcuni mutanti della muffa del pane: tipo di microrganismo unicellulare. Tramite questa indagine si formulò la prima ipotesi del collegamento tra geni ed enzimi, cioè che a livello

delle cellule un singolo gene si forniscono informazioni per la sintesi di uno specifico enzima e di catalizzare uno specifico passaggio in una via metabolica / biosintetica.

Ogni volta che avviene una mutazione, essa viene direttamente espressa fenotipicamente, facilita l'analisi genetica.

Cellule aploidi di tipo diverso possono fondersi e dare origine a zigote, andare incontro a meiosi e produrre spore aploidi chiuse dentro l'asco. Questo organismo si può far crescere in laboratorio e può normalmente crescere in un terreno completo o un terreno minimo.

Si possono andare a studiare dei meccanismi e fare una dissezione genetica, studiare ogni singolo passaggio di un pattern biochimico attraverso dei mutanti nutrizionali.

Si presero delle cellule wild-type, si sono irradiate con raggi x (aumentano il tasso di mutazione) e poi si sono selezionati i tipi di mutanti di interesse. Si fanno crescere su un terreno completo e su uno minimo; se c'è un'assenza di crescita sul terreno minimo significa che si è isolato un mutante nutrizionale e bisogna quindi capire qual è il tipo di mutazione, posso andare a vedere se la mutazione è relativa alla sintesi di amminoacidi. es. fornisco tutti gli amminoacidi e vedo se si recupera la crescita.

Ogni mutante auxotrofo richiede quindi uno specifico supplemento: l'ipotesi è che nel ceppo mutante auxotrofo c'è la mancanza di una attività enzimatica nel pathway per sintetizzare quello specifico enzima, manca un passaggio. Si ipotizza quindi che la mutazione è andata ad alterare l'informazione di un gene necessaria per sintetizzare quello specifico enzima.

Analisi delle vie metaboliche: si dissezionano le vie dimostrando che mutazioni diverse sono responsabili della mancata sintesi di enzimi che sono implicati in ciascuno step di una via biosintetica.

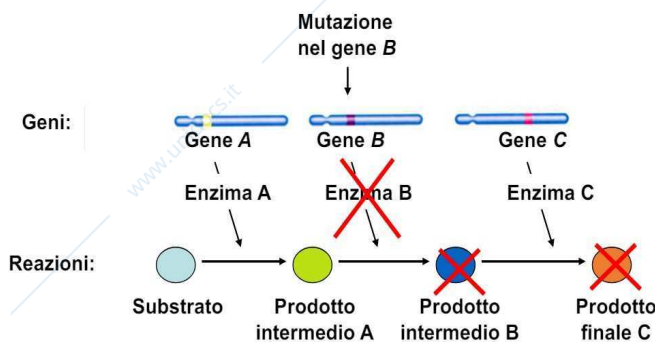
es. si trovano tanti mutanti auxotrofi per arginina (incapace di sintetizzare) e si nota che questi mutanti potevano essere divisi in 3 gruppi di complementazione: **arg1, arg2, arg3**.

Come faccio la complementazione se ho cellule aploidi? Il vantaggio è che quando le cellule aploidi formano il corpo vegetativo e formano filamenti allungati, questi filamenti sono formati da cellule che si dividono ma che non mantengono la parete cellulare, cellule allungate con più nuclei.

Le diverse mutazioni ottenute hanno come risultato finale la NON sintesi di arginina; probabilmente,

poiché complementano tra loro, le mutazioni sono responsabili di passaggi diversi nella via biosintetica che ha come prodotto finale la sintesi di arginina. Ci possono essere mutazioni che disattivano l'enzima A, B o C ma, la mancanza di uno di essi, determina la non sintesi di arginina. Si è ipotizzato quindi che i composti intermedi fossero i precursori dell'arginina. I precursori dell'arginina sono l'ornitina e la citrullina

Facendo crescere 3 tipi di mutanti arg1, arg2 e arg3, tutti e quanti non crescono sul terreno minimo ma



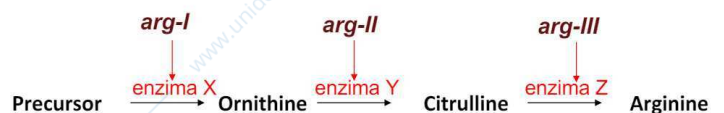
invece crescono se gli viene fornita l'arginina.

Cosa succede se tratto i mutanti con i possibili prodotti intermedi?

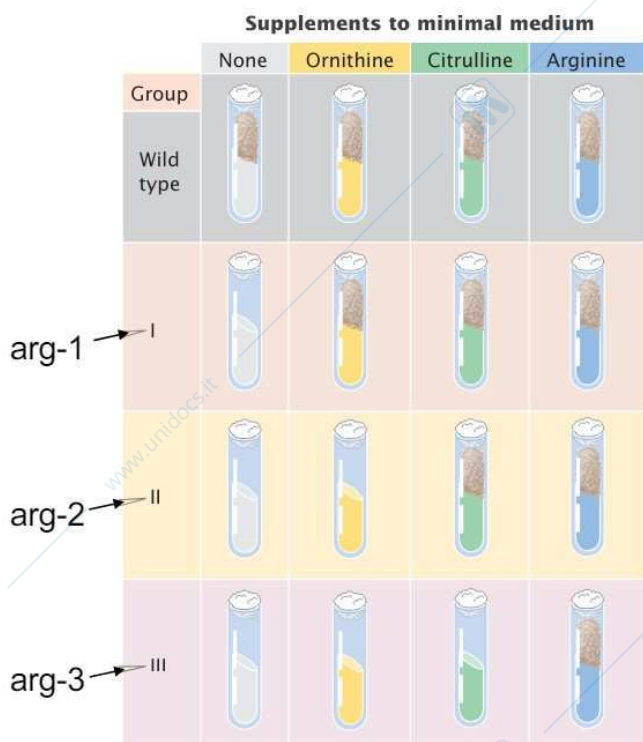
Si nota che:

- il ceppo arg1 cresce solo se viene fornita ornitina, citrullina e arginina. Ciò significa che la mutazione si trova a monte della via metabolica.

Ceppo mutante	Niente	Ornitina	Citrullina	Arginina
wild type	+	+	+	+
arg I	-	+	+	+
arg II	-	-	+	+
arg III	-	-	-	+



- il ceppo arg2 non cresce con l'ornitina ma con la citrullina; è presente quindi un difetto che viene dopo la sintesi dell'ornitina.
- il ceppo arg3 non cresce né con l'ornitina né con la citrullina ma solo con l'arginina.



Quindi un gene a livello biochimico va a controllare la sintesi di un enzima (proteina). Per la prima volta la funzione dei geni portava ad avere informazioni per sintetizzare le proteine.

Tuttavia un singolo gene NON codifica per un solo polipeptide in quanto c'è lo splicing di mezzo e si possono quindi generare diversi polipeptidi; alcuni geni codificano anche per mRNA non tradotti.

Struttura a doppia elica del DNA:

Il DNA viene tradotto da un linguaggio formato da una successione di nucleotidi che corrisponde a una catena di aminoacidi = **polipeptide**.

Il processo avviene tramite:

- **trascrizione**: si produce una copia di RNA che diventa mRNA e rappresenta una copia "temporanea" del DNA. Il filamento di rna è a singolo filamento ed è simile al dna; ha l'uracile invece della timina e ha come zucchero il ribosio. Avviene poi la maturazione del mrna attraverso lo splicing (si eliminano gli introni). Si ha ora un mRNA messaggero maturo che corrisponde alla

sequenza che verrà tradotta.

- **traduzione**: si determina un polipeptide come catena di aminoacidi; si traduce l'informazione del mRNA; le proteine sono formate da catene di aminoacidi.

amminoacidi: un carbonio legato a un gruppo amminico, uno carbossilico e un gruppo R specifico per ogni amminoacido. (ci sono 20 tipi di amminoacidi)

Il linguaggio che permette di tradurre l'mRNA è il codice genetico; il codice genetico si basa su gruppi di 3 basi azotate che corrispondono a codoni; 3 basi definiscono un amminoacido. Ci sono quindi $4^3 = 64$ possibili codoni. Ogni singolo codone specifica un solo aminoacido, il codice è degenerato e ridondante quindi un amminoacido può essere sintetizzata da più codoni.

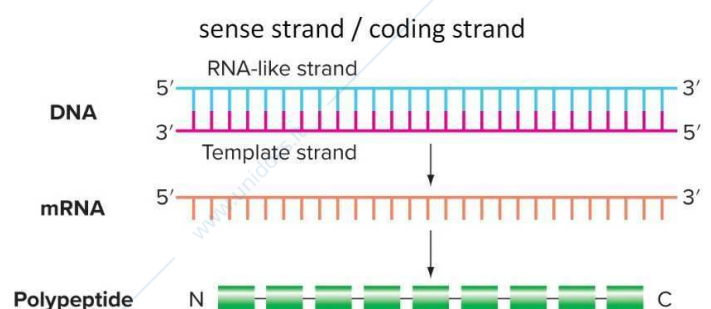
Esistono poi dei codoni di stop e dei codoni di inizio:

- codone di inizio: AUG, sintetizza per la metionina
- tre codoni di stop: UAA, UAG e UGA

"reading frame": se si ha una sequenza di DNA e la si vuole tradurre in una catena di aminoacidi, la stessa sequenza di DNA si può leggere a gruppi di 3 in modo diverso cioè si può partire a leggere i codoni da punti diversi. Il reading frame è dipeso sempre da AUG (metionina).

"open reading frame": porzione di una molecola di DNA che quando viene tradotta non contiene codoni di stop. Una sequenza di DNA può essere letta in uno dei qualsiasi sei possibili open reading.

Quando avviene la trasduzione l'RNA polimerasi può sintetizzare un mRNA leggendo il



DNA in una direzione o nell'altra. (da sinistra a destra o da destra a sinistra)

filamento stampo: complementare al mRNA.

RNA sense strand: stessa polarità e sequenza dell'RNA messaggero.

MUTAZIONI E ORIGINE DELLA VARIABILITA' GENETICA:

Quali sono i meccanismi molecolari che danno origine alle varianti genetiche?

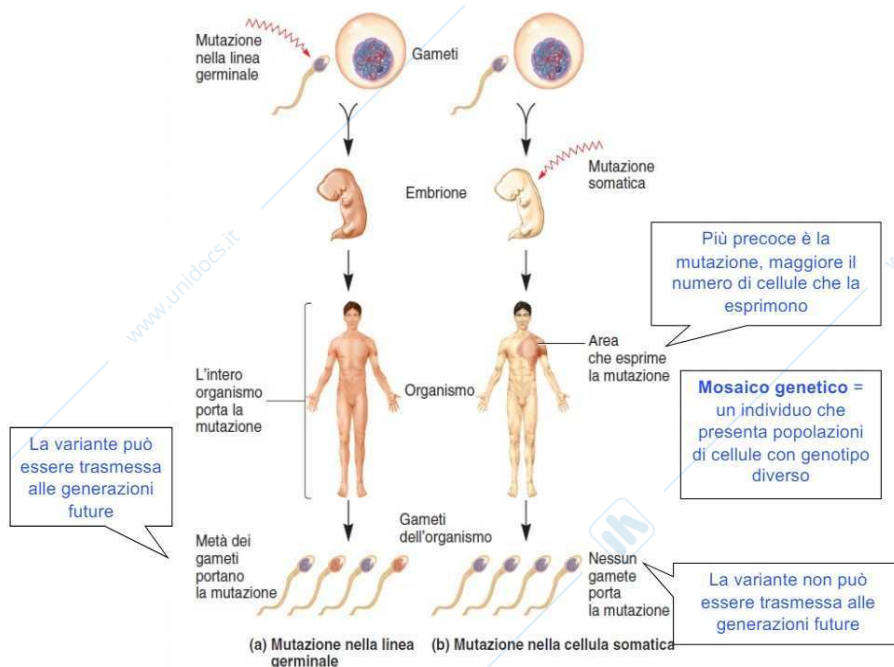
Le varianti genetiche sono delle differenze a livello della sequenza del DNA che contraddistinguono gli individui all'interno di una stessa specie. Per ciascuna sequenza ci sono due alleli ed essi possono differire fra loro. Se si confrontano le sequenze di tanti individui umani, si trova che l'1% delle basi differiscono da un individuo all'altro e ci sono anche differenze abbastanza comuni in specifiche posizioni (es. cambiamenti di una singola base); la maggior parte delle varianti sono comuni, mentre altre sono molto rare.

Le mutazioni sono gli eventi che determinano i cambiamenti nella sequenza del DNA che possono essere ereditati. Il DNA non cambia ma a volte insorgono delle mutazioni; se non avvenissero impedirebbero la presenza di variazioni genetiche e fenotipiche e non sarebbe esistita l'evoluzione. Le mutazioni possono quindi essere pericolose perché hanno effetti deleteri, ma una buona parte di varianti costituiscono la base della diversità genetica. La maggior parte delle varianti genetiche che ognuno di noi possiede, sono ereditarie attraverso i gameti ma talvolta possono insorgere nuove varianti.

Le mutazioni si possono trovare:

- a livello della linea germinale: cellule che danno origine ai gameti e che possono essere trasmessi alla progenie.
- a livello delle cellule somatiche: mutazioni che possono avvenire in qualsiasi momento e che non

vengono trasmesse alle generazioni successive. Se si verificano durante lo sviluppo, daranno origine a un individuo con due o più tipi di cellule geneticamente differenti (mosaico). Mutazioni a livello somatico possono portare alla cancerogenesi.



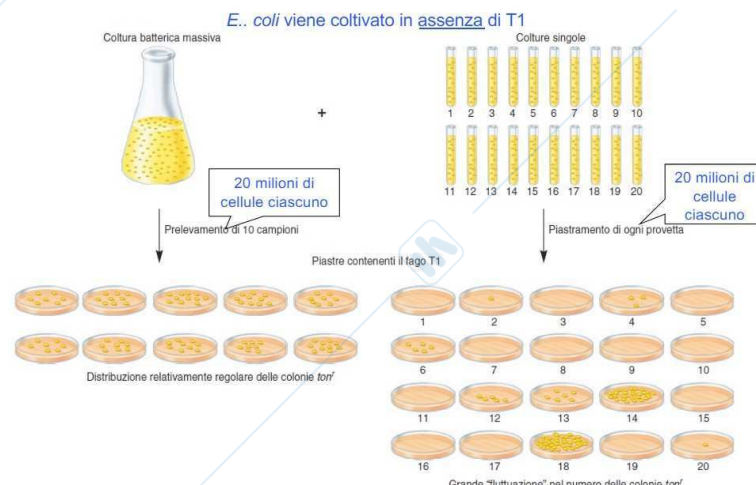
“**mutazione**”: evento che determina un cambiamento ereditabile nella sequenza del DNA. A volte viene usato per indicare varianti del DNA associate ad un fenotipo alterato.

“**polimorfismo**”: una variante che si osserva comunemente nella popolazione, con una percentuale >1%.

Tipi di mutazioni:

- una sostituzione di una singola base (**SNV**): la più semplice. Se si parla di polimorfismo si parla di SNP

Si testava l'esistenza dell'escherichia coli a un virus: se le cellule sono infettate, muoiono ma le cellule di E.Coli possono sviluppare la resistenza al virus, il fago non si attacca più. Un ceppo batterico viene cresciuto in una beuta, fino ad ottenere una buona concentrazione; successivamente si prelevano delle aliquote e si vanno a piastrare su delle petri dove ci sono i fagi T1. Il risultato è che solo un piccolo numero delle cellule hanno sviluppato la resistenza. Un altro esperimento fu quello di utilizzare le stesse cellule ma di farle crescere in colture singole, tante culture indipendenti. Si prende poi ciascuna cultura e la si va a piastrare; dove ci sono i fagi c'è una grande fluttuazione del numero di colonie resistenti. Ciò significa che se la mutazione fosse avvenuta in seguito all'esposizione al fago T1, sarebbe una mutazione somatica e non sarebbe trasmessa. In realtà è avvenuta precedentemente ed è quindi stata trasmessa alle cellule figlie.



Quindi le mutazioni possono essere causate da:

- errori durante la replicazione del DNA
- errori di ricombinazione e segregazione dei cromosomi: anomalie durante il crossing over
- danni al DNA dal metabolismo cellulare

Le mutazioni possono però anche essere indotte: ci sono degli agenti mutageni che fanno aumentare la frequenza delle mutazioni. es. radiazioni, agenti chimici mutageni.

Da un lato ci sono errori nella replicazione del DNA, dall'altra esistono dei meccanismi cellulari che sono deputati a riparare i danni del DNA; se le cellule non avessero meccanismi che correggono i danni, la frequenza di mutazioni sarebbe molto più elevata perché, in realtà, la maggior parte degli errori viene riparata. Se non viene riparato il danno, il DNA viene replicato, la mutazione insorge e diventa un evento che può essere trasmesso alle cellule discendenti..

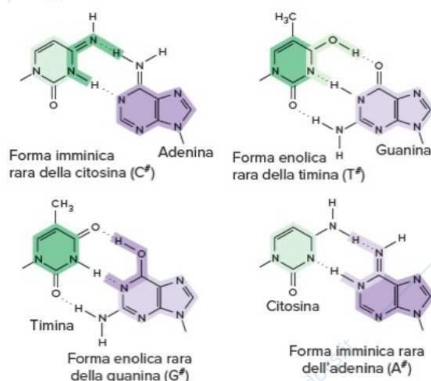
Meccanismi molecolari a base delle mutazioni spontanee:

- errori nella duplicazione del DNA: la DNA polimerasi è un enzima altamente fedele, la sua attività produce pochi errori. Nella maggior parte delle DNA polimerasi esiste una attività di **proofreading 3'5'** è

la capacità di scoprire se è stato introdotto un nucleotide sbagliato. Quando la DNA polimerasi commette un errore si corregge da sola (quando vengono accoppiate basi azotate sbagliate). Questo accade perché a volte la struttura delle basi è alterata, si formano delle conformazioni meno frequenti e instabili che portano all'appaiamento alterato. es. citosina che si appaia con la adenina, al posto della guanina.

Se l'errore non viene corretto, la coppia delle due basi rimarrà sbagliata. Un altro errore della replicazione è quando ci sono delle corte sequenze ripetute in tandem, la DNA polimerasi tende a fare errori, ricopiando il numero di ripetizioni in modo errato (aggiungendo o togliendo); sul filamento stampo che viene replicato, in presenza di sequenza ripetute,

(a) Le rare forme tautomeriche delle basi hanno proprietà di appaiamento alterate

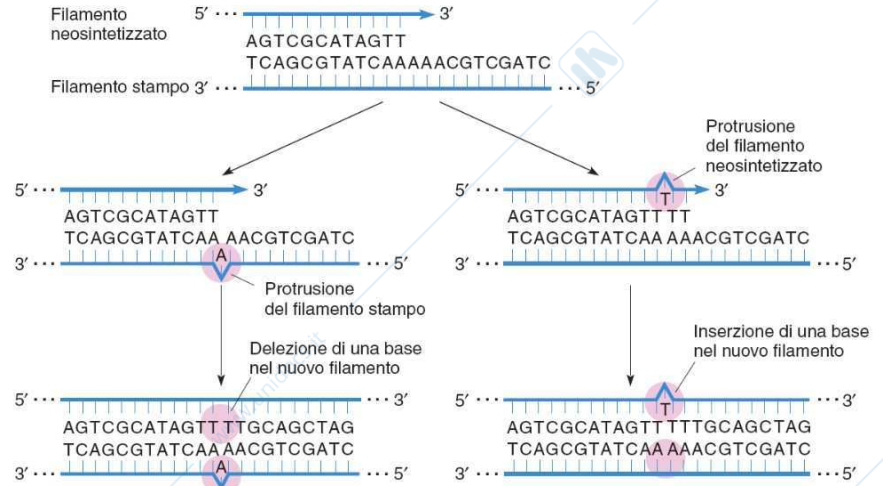


si creano dei piccoli protrusioni e ci sarà una delezione perchè non viene letta quella base azotata presente nella protrusione.

La protrusione può avvenire anche nel filamento neosintetizzato che causerà una inserzione

- danno chimico endogeno alla struttura del DNA: tale danno è dovuto ai normali processi che avvengono nel metabolismo

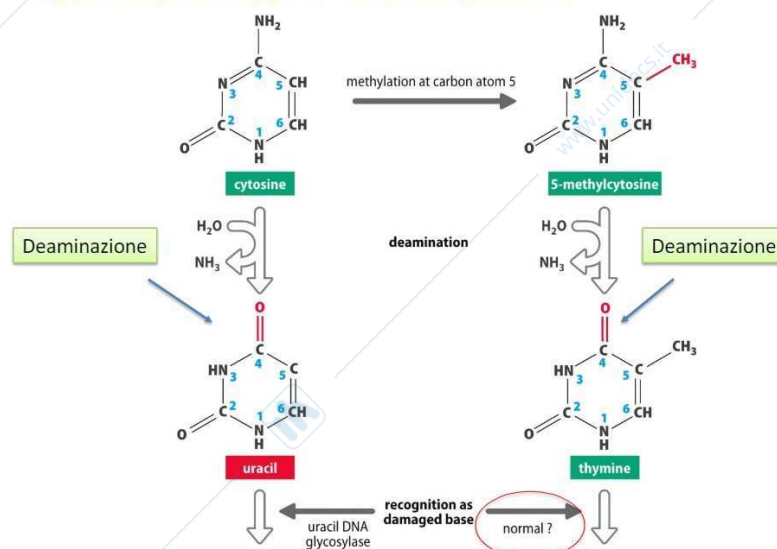
cellulare. Possono provocare: - **danno idrolitico**: una base viene rimossa dallo zucchero e si ottiene un nucleotide senza la sua base; questo cambiamento chimico prende il nome di **"depurinazione"**; solitamente la perdita di una base azotata avviene più spesso sulle purine. Nel dna, quindi, un nucleotide sarà senza base e se il danno non viene riparato e avviene la duplicazione, la DNA polimerasi in presenza di questo "buco" inserisce una base a caso e si formano mutazioni.



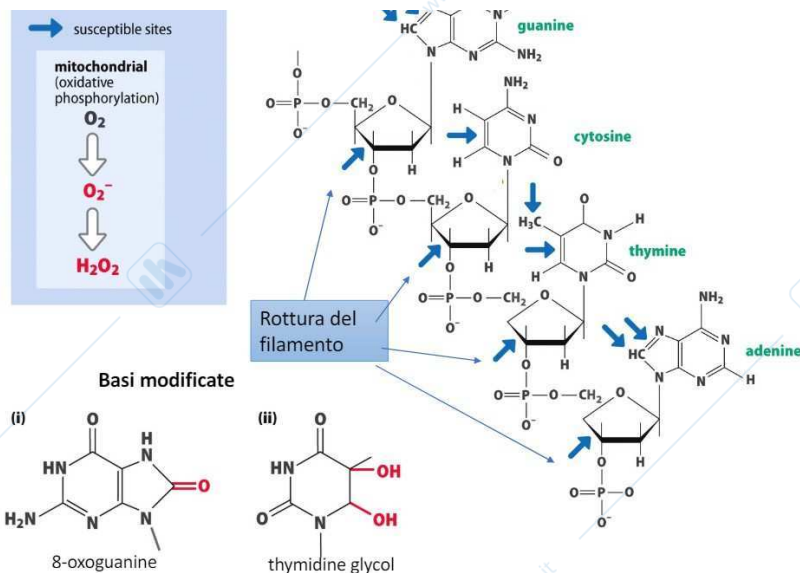
Un altro cambiamento che può avvenire è la **deaminazione** cioè la perdita di un gruppo amminico.

es. la citosina ha un gruppo amminico ma se viene eliminato il gruppo amminico, la citosina si trasforma in uracile. Durante la duplicazione, all'uracile viene quindi appaiata l'adenina in quanto l'uracile assomiglia alla timina. Questo errore viene frequentemente riconosciuto.

Tuttavia c'è un altro inghippo: la citosina molto spesso, nei vertebrati, viene modificata attraverso l'aggiunta di un gruppo metilico (5-metilcitosina); se la citosina metilata perde il gruppo amminico, invece di trasformarsi in uracile si trasforma in timina e se l'errore non viene riparato si dà origine alla mutazione con sostituzione di base perchè non viene riconosciuta come base anomala.

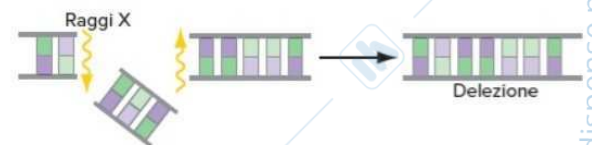


- **danno ossidativo**: presenza di radicali a ossigeno fortemente attivi che possono indurre cambi di qualsiasi tipo. Il danno più frequente è la rottura del legame fosfodiesterico e la rottura del filamento del DNA tra lo zucchero e il gruppo fosfato. Può andare anche a modificare basi creando strutture anomale e appaiamenti errati.

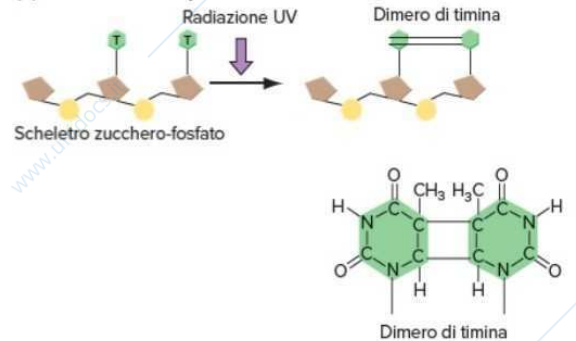


-radiazioni: possono essere ionizzanti o non ionizzanti a seconda della lunghezza d'onda. I raggi UV sono dovuti alle radiazioni solari e sono presenti in ambiente. Le radiazioni causano rotture nello scheletro zucchero-fosfato e inducono dei danni nel DNA. Inoltre determinano anche rotture a entrambi i filamenti. Se solo un filamento viene rotto non è importante perché viene riparato ma se entrambi i filamenti vengono rotti, sono più difficili da riparare. I raggi UV riguardano solo gli strati superficiali e sono meno pericolosi, hanno la capacità di indurre un tipo di danno che è la **formazione di dimeri di timina** (il danno più frequente): se ci sono due timine vicine, esse vengono attivate dai raggi UV e formano una struttura a dimento, si formano dei legami covalenti tra le due timine. I dimeri di timina sono danni importanti perché se tali mutazioni non vengono riparate inducono un blocco nella replicazione e trascrizione del DNA.

(c) I raggi X rompono lo scheletro del DNA



(d) La radiazione UV produce dimeri di timina



Quando si osserva una sequenza è impossibile sapere qual è il tipo di mutazione; il risultato è lo stesso cioè l'insorgenza di una nuova variante di DNA. Ci sono degli agenti mutageni che tendono a creare alcuni tipi di variante, altri altri tipi di variante.

Come agiscono i mutageni? Agiscono come analogo delle basi, sono agenti chimici che "mimano" la presenza di una base, si sostituiscono alle normali basi e determinano degli appaiamenti errati oppure altri agenti vanno a danneggiare le basi.

Il meccanismo di riparo del DNA è fondamentale per assicurare la stabilità del genoma; se i meccanismi di riparo non funzionano, le conseguenze possono portare a cancerogenesi, senescenza, morte cellulare.

E' fondamentale che la stabilità del genoma sia mantenuta; ci sono quindi diversi meccanismi deputati a riparare un particolare tipo di danno:

Tali meccanismi sfruttano la presenza del filamento complementare per andare a riparare la regione danneggiata, si rimuove il danno e si sintetizza un nuovo tratto di DNA copiando le informazioni dal filamento complementare.

A seconda del tipo di danno che deve essere riparato questi meccanismi si dividono in.

-**mismatch repair**: quando le basi sono mal appaiate o si parla di piccole inserzioni o delezioni. Il mismatch repair ha un ruolo importante di sorveglianza del genoma subito dopo la replicazione del DNA.

Se il riparo non avviene in tempo, il danno creerà una mutazione.

- **base-excision repair**: ripara le basi danneggiate: es. l'uracile ottenuto dalla deaminazione della citosina. Uno specifico enzima, la **DNA glicosilasi**, riconosce la base danneggiata, la rimuove e si crea un piccolo gap nel singolo filamento che viene riparato poi dalla DNA polimerasi che introduce la base corretta.

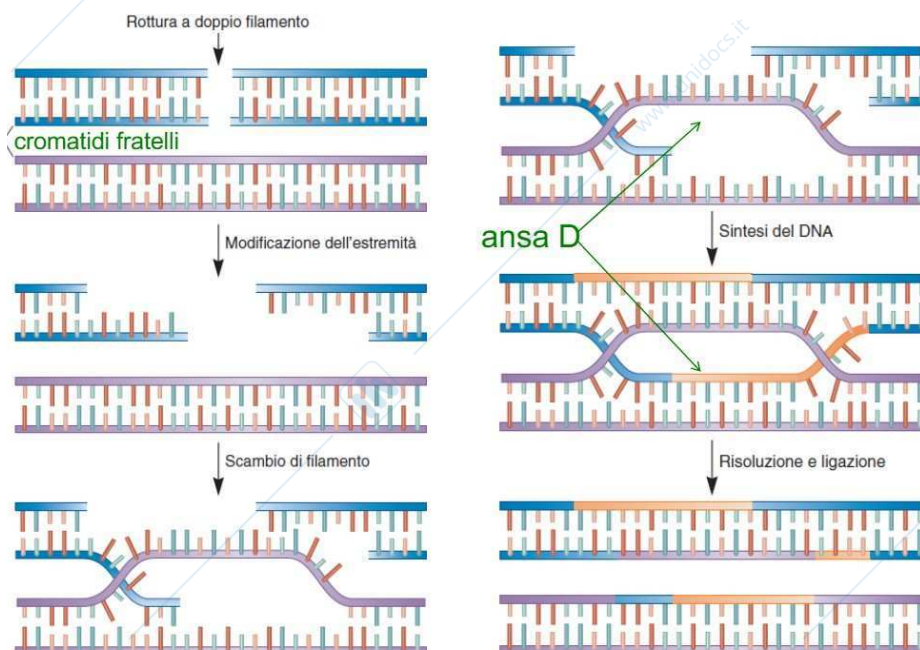
-**nucleotide excision-repair**: ripara le regioni più grosse che vanno a distorcere la doppia elica, i danni riparati più spesso sono i dimeri di timina. Il riparo viene fatto riconoscendo la distorsione della doppia elica, viene rimosso un tratto di DNA che comprende la zona danneggiata e il filamento viene risintetizzato dalla DNA polimerasi.

Meccanismi di riparo rotture a doppia elica:

Se entrambi i filamenti sono rotti, non c'è la possibilità di sfruttare il filamento complementare. Ci sono due meccanismi:

1. riparo per ricombinazione omologa: durante la meiosi due cromatidi non fratelli si rompono e si scambiano fra di loro. Il meccanismo molecolare della ricombinazione omologa è molto simile alla ricombinazione omologa che avviene normalmente nelle cellule somatiche dopo la fase S (quando il genoma si è replicato). Ogni cromosoma avrà quindi 2 cromatidi fratelli; la presenza di una mutazione su un cromatide fratello può essere riparato usando come stampo la sequenza del cromatide fratello.

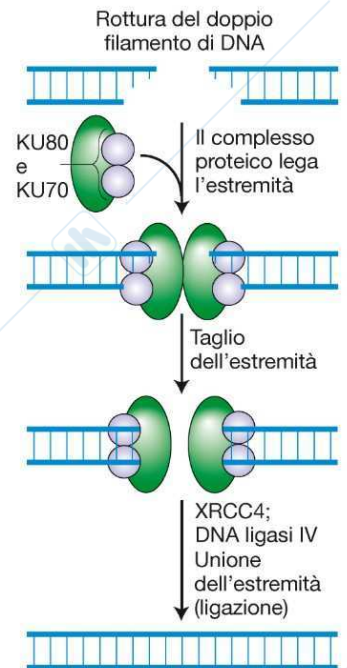
“**invasione dell'elica**”: si crea l'ansa di Loop che permette di dare alla DNA polimerasi la possibilità di sfruttare il filamento complementare andando a sintetizzare un pezzetto di DNA complementare. L'ansa di Loop può poi essere riparata e le due molecole a doppia elica sono ricreate e l'elica rotta è stata riparata.



2. Non Homologous End Joining (NHEJ): se le cellule sono ferme in fase G1 e non hanno quindi il cromatide fratello corrispondente, il danno viene riparato senza omologia; viene riconosciuto che ci sono delle estremità rotte e delle rotture cromosomiche, si uniscono le estremità rotte e si ricuciono. C'è un complesso proteico che se ne occupa ma il riparo è imperfetto: ci sono delle piccole delezioni. Questo tipo di riparo viene chiamato **"error prone"**: ripara il danno più grave ma può comunque introdurre errori più tollerabili.

Nelle cellule sane questi sistemi di riparo devono essere funzionali, se vi è un danno in un riparo di DNA, quel tipo di danno non viene riparato e si può avere l'insorgenza di malattie dovute a una mancanza o un difetto in un qualche sistema di riparo di DNA.

es. xeroderma pigmentoso: diverse mutazioni possono distruggere o alterare l'attività di un complesso di proteine implicate nel riparo del nucleotide. Se è presente un danno in delle proteine coinvolte nella riparazione, si avrà una estrema sensibilità ai raggi ultravioletti e ci saranno delle lesioni a livello della pelle.



Risposta al danno al DNA:

I meccanismi devono agire in un equilibrio in cui il genoma delle cellule è continuamente sottoposto a danni al DNA molto frequentemente. I

meccanismi di riparo devono quindi essere abbastanza efficaci da proteggere il genoma dal danno.

Le cellule hanno dei checkpoint del ciclo cellulare che se rilevano un presenza di danno attivano dei meccanismi per cui il ciclo cellulare viene temporaneamente arrestato, per permettere di cercare di riparare il danno. Se il danno non è correttamente riparato, le conseguenze possono essere:

- la cellula sceglie la via della apoptosi: suicidio programmato, è meglio la morte piuttosto che trasmettere la mutazione alle generazioni successive.
- la cellula va incontro a processi patologici: cancerogenesi
- invecchiamento cellulare: tutte le cellule vanno incontro a senescenza.

Tasso di mutazione: a bassa frequenza (10^{-5} / 10^{-6}) ma la frequenza dipende dal tipo di gene o dal tipo di sequenza di DNA che tende più o meno a mutare. Più recentemente, grazie al sequenziamento di interi genomi, è stato possibile andare a vedere il genoma in ogni singolo individuo e analizzare tutte le differenze tra genitori e figli. Per le mutazioni puntiformi la frequenza di mutazione è 1×10^{-8} per generazione per genoma. Ognuno di noi ha circa 60 mutazioni che non erano presenti nei genitori.

Le mutazioni puntiformi sono più frequenti quando vengono ereditate dal genoma paterno; in media ci sono circa 60 nuove mutazioni, ma le mutazioni paterne aumentano con l'età del padre. Ciò è giustificabile perché la gametogenesi avviene durante tutta la vita dell'individuo maschio, a differenza delle femmine che non hanno sempre gametogenesi.

Quali sono le conseguenze a livello funzionale delle varianti genetiche, in che modo influenzano l'attività dei geni:

Le mutazioni avvengono in modo casuale e la maggior parte non hanno un evidente effetto funzionale. E' molto difficile prevedere quali sono le conseguenze delle varianti al di fuori delle regioni codificanti. (Ci occupiamo solo delle regioni codificanti).

Per quanto riguarda le varianti che ricadono nelle porzioni codificanti, si interpreta bene il loro significato.

Gene eucariotico: a monte c'è un promotore che serve per definire l'inizio della trascrizione; l'RNA messaggero ha inizio dal promotore (5' UTR) che precede il codone AUG (codone di start). Ogni regione genica codificante (esoni) viene interrotta dagli introni che verranno poi rimossi durante lo splicing. Il promotore NON viene tradotto. Se si considerano delle varianti puntiformi all'interno delle regioni codificanti, possono avere diversi effetti:

- **varianti silenti/sinonimi**: non vanno ad alterare l'amminoacido codificato. Il codone che si è creato codifica per lo stesso amminoacido. Dato dal codice genetico ridondante. TTA diventa TTG che corrisponde comunque alla leucina.

- **variazioni missense**: altera l'amminoacido codificato. es. TTA (che codifica per la leucina) diventa TTT (che codifica la fenilalanina). L'amminoacido codificato è diverso, ha caratteristiche chimico-fisiche diverse. Questa mutazione avrà un impatto piuttosto deleterio sulla struttura della proteina. In altre situazioni, TTA diventa ATA e ci ottiene l'amminoacido isoleucina, che è simile alla leucina: si avrà comunque una variante missense ma la struttura della proteina finale non verrà modificata, le caratteristiche chimico-fisiche sono simili alla leucina (conservative)

- **nonsense**: la mutazione comporta la formazione di un codone di stop, si ha l'interruzione della traduzione. es. TTA che codifica per leucina diventa TGA che è uno dei 3 codoni di stop. Quando il ribosoma incontra questo codone, interrompe la traduzione. La conseguenza è la terminazione precoce della traduzione, si ottiene una proteina incompleta.

I 3 codoni di stop: UAA, UGA e UGA

- **frameshift**: inserzioni o delezioni. Si altera il frame, ovvero il codice di lettura in triplette, determinando un frameshift. Leggendo i codoni in maniera diversa, cambiano tutti gli amminoacidi che verranno sintetizzati ma probabilmente si incontrerà un codone di stop: la conseguenza finale è quindi l'inserimento di amminoacidi errati e la terminazione prematura della traduzione. Se ho un'aggiunta di 3 nucleotidi ho un'aggiunta di un amminoacido e non si altera il frame.

Cosa succede se ho delle varianti che ricadono a livello degli introni:

- possono non avere conseguenza: gli introni vengono eliminati durante lo splicing.

- hanno una conseguenza funzionale delle varianti che vanno ad alterare il processo dello splicing.

Durante il processo di trascrizione agisce un complesso proteico, lo spliceosoma (proteine + RNA che si legano alle giunzioni di splicing) deve riconoscere le giunzioni di splicing per effettuare un taglio al mRNA. Questa operazione deve essere molto precisa, non si devono eliminare nucleotidi codificanti. Vi sono delle sequenze che sono molto conservate e che sono importanti per lo splicing e prendono il nome di "**splice sites**": si trovano al 5' e al 3' dell'introne. Le sequenze più importanti sono GT e AG. Se c'è mutazione, l'introne non viene rimosso o lo splicing viene effettuato in modo sbagliato:

- eliminazione di un esone

- non viene eliminato un introne che dovrebbe essere rimosso

- si attivano siti di splicing alternativi che non dovrebbero essere utilizzati dando origine a esoni più lunghi o più corti.

Lo splicing è un processo flessibile, variegato, molto spesso ogni singolo gene non viene sempre processato nello stesso modo ma viene processato in maniera diversa.

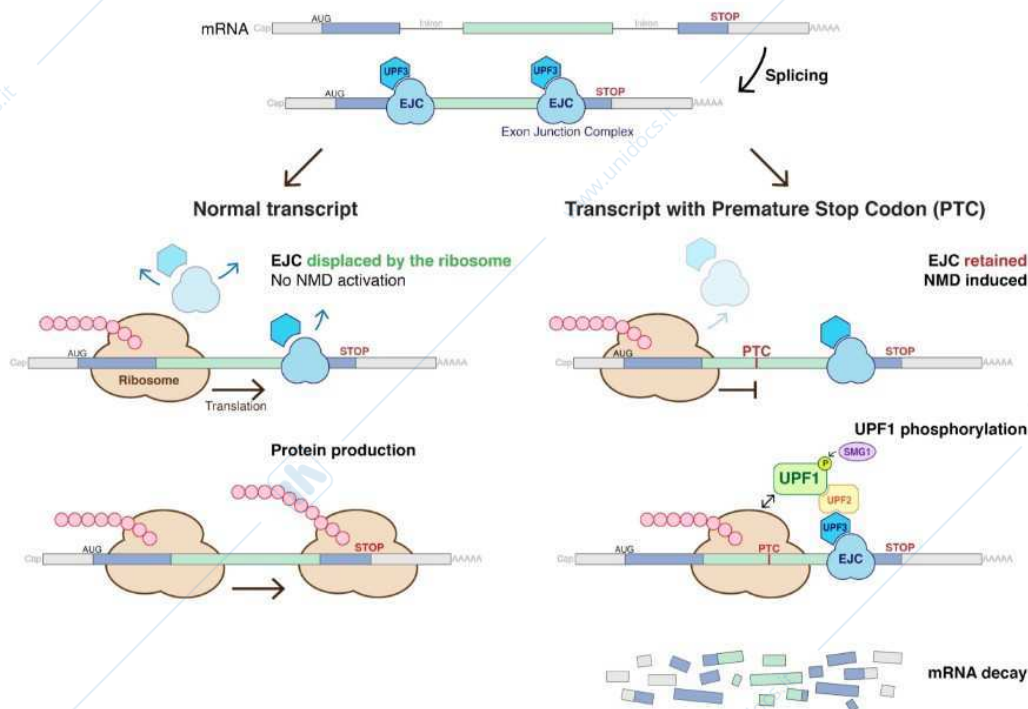
Se è presente una mutazione che altera il processo di splicing, si possono ottenere mRNA con esoni errati. Se l'introne non viene rimosso, è probabile che ci siano dei codoni di stop → traduzione precoce.

Se il trascritto prevede gli esoni 1,2 e 3 ma si elimina l'esone 2, si altera il frame.

Vari tipi di mutazione determinano la presenza prematura di un codone di stop → terminazione prematura della traduzione e la generazione di una proteina tronca che è

solitamente non funzionale ma anche dannosa per gli altri componenti cellulari e per il funzionamento della cellula. Di fatto le proteine tronche si possono ripiegare in maniera errata e possono interagire con altre proteine e andare a disturbare l'azione di altre proteine, determinando danni a livello della cellula. L'evoluzione ha quindi escogitato un meccanismo per evitare la produzione di proteine tronche:

“Non sense-Mediated decay” (NMD): tale meccanismo va a cercare di eliminare e degradare gli mRNA che contengono codoni di stop prematuri, per evitare che vengano tradotti. Questo meccanismo funziona sulla base di alcuni complessi che si legano alle regioni in cui sono stati eliminati gli introni. Ci sono dei fattori che si legano alle estremità di due esoni legati tra loro e nel momento in cui il ribosoma traduce l'mRNA, il ribosoma scalza l'EJC (fattori che si trova alle estremità): è ciò che avviene normalmente. E' quindi solo il primo ribosoma che rimuove l'EJC, tutti gli altri no perché sono già stati eliminati.



Se si presenta un codone di stop prematuro, quando il primo ribosoma legge il messaggero, incontra lo stop codon e si ferma ma a valle del codone di stop rimangono presenti gli altri EJC: si attiva un richiamo dei fattori che sono responsabili della degradazione dell'mRNA messaggero e ciò non darà origine a polipeptidi tronchi.

Quindi se si attiva il meccanismo NMD (dovuto alla presenza di un codone di stop prematuro), non si ottiene una proteina tronca perché non viene prodotta; in molti casi è la via migliore in quanto se la proteina prodotta dall'altro allele è sufficiente, il risultato fenotipico è lo stesso e la mutazione non si manifesta.

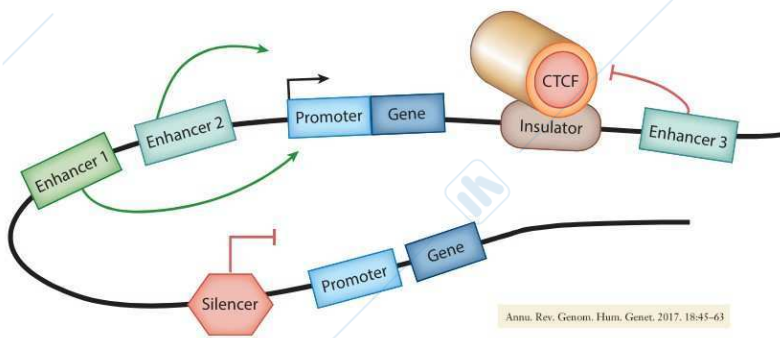
Le sostituzioni silenti sono quasi sempre neutrali, non cambia la funzione del gene

Le sostituzioni miss sense hanno un effetto variabile (nullo o minimo) oppure anche un effetto piuttosto importante perché potrebbero alterare completamente la struttura polipeptidica.

Mutazioni in regioni non codificanti:

Le predizioni degli effetti in queste regioni non è molto precisa. E' possibile andare a utilizzare delle tecniche che identificano quali sono gli elementi regolatori sparsi su tutto il genoma.

Al promotore si lega l'RNA polimerasi e altri fattori che vanno a modificare l'efficienza della trascrizione regolatore dall'enhancer e silencer che interagiscono con le proteine che si legano al promotore.



Effetti delle varianti genetiche: le mutazioni possono essere distinte in due grandi categorie per gli effetti che comportano:

- **loss of function:** distruggono o riducono la funzione del gene. Se lo distruggono si

chiamano "mutazioni nulle"; se ne riducono la funzione: **allele ipomorfo**

Quindi può essere una variante di diverso tipo ma alla fine danno il risultato è lo stesso → perdita di funzione. Le varianti strutturali eliminano completamente la porzione di un gene.

- **gain of function:** il guadagno di funzione non è in senso positivo ma è una funzione alterata, cambia la sua funzione o viene alterata, si altera il pattern di espressione. Se si presenta una nuova funzione: neomorfa

espressione ectopica: un gene viene espresso in un altro cromosoma e si altera la posizione del fenotipo.

Il guadagno di funzione si ottiene attraverso diversi meccanismi molecolari: cambiamento qualitativo del prodotto genico.

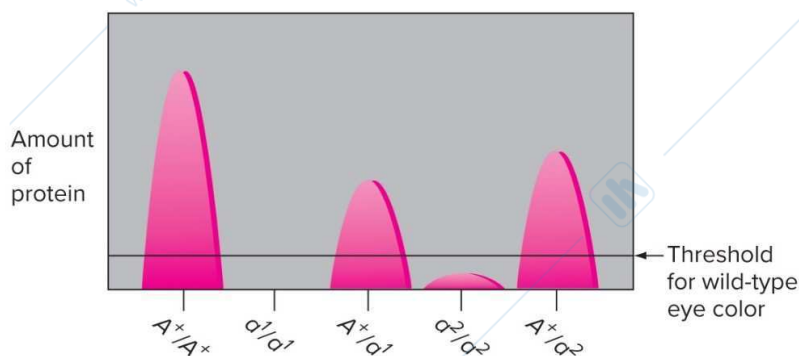
Cosa succede nelle varianti con perdita di funzione?

Spesso tali varianti risultano in condizioni recessive; se si elimina il prodotto genico, in eterozigosi c'è comunque l'altro allele che produce la proteina e, se è sufficiente, il risultato è una situazione di recessività per l'allele mutato.

Nella maggior parte delle situazioni, il fenotipo alterato si presenta in omozigosi, ovvero il prodotto genico non viene prodotto da nessuno dei due alleli.

"**aplo-sufficienza**" in eterozigosi, ho una singola copia di un allele wild-type che sintetizza proteine, l'altro gene è loss of function.

Gli effetti recessivi delle mutazioni loss of function dipendono da qual è la soglia per avere un fenotipo normale. Per esempio, per avere un occhio wild-type è sufficiente avere una certa quantità di prodotto (basta superare tale soglia: riga nera in foto). Nei wild-type tutti e due gli alleli producono la proteina di interesse e si ottiene quindi una grande quantità di prodotto.



In un omozigote nullo, non ci sarà nessuna proteina prodotta e il fenotipo sarà mutato. In eterozigosi (uno wild-type e uno nullo), si ha la sintesi della metà del prodotto genico normale che è comunque superiore alla soglia, quindi si manifesta il colore degli occhi wild-type.

Se invece si produce una certa quantità di proteina ma non abbastanza, l'allele è

ipomorfo.

La manifestazione fenotipica dipende quindi da qual è il livello soglia per avere un fenotipo wild-type.

es. in molte malattie metaboliche l'alterazione di un gene che codifica per un enzima risulta sempre in un fenotipo recessivo.

- **fenilchetonuria**: è una malattia in cui manca l'enzima che trasforma la fenilalanina in tirosina. Senza la trasformazione in tirosina, si ha un accumulo di fenilalanina che viene metabolizzata in un altro composto il quale si accumula e dà origine alla malattia. Nell'eterozigote, si ha un 50% di enzima attivo ed è sufficiente affinché la fenilalanina possa essere trasformata in tirosina e la malattia non si manifesta.

altro esempio:

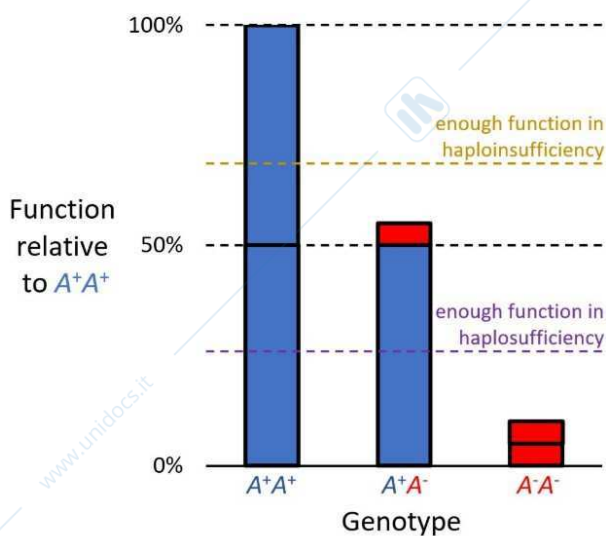
- **fibrosi cistica**: il difetto nel gene CFTR comporta una perdita di funzione ma un 50% di proteina wild-type è sufficiente.

- **anemia falciforme**: in eterozigoti i globuli rossi hanno solo una piccola quantità di struttura anomala e i sintomi della malattia non si manifestano.

Tuttavia ci sono anche degli effetti dominanti: dipende sempre da qual è la soglia per l'espressione fenotipica normale. Se una copia dell'allele wild-type è insufficiente, si ha una aploinsufficienza e nell'eterozigote si ha la comparsa di un fenotipo alterato: allele dominante.

es. il livello è maggiore del 50%. in eterozigote se si ha solo 50% non è sufficiente, quindi in eterozigosi e omozigosi si ha la comparsa del fenotipo alterato; dipende da quanto è alto il threshold.

I geni in cui si presenta aploinsufficienza, sono geni sensibili al dosaggio, perché è necessario un giusto dosaggio; se viene espresso in singola copia non va bene; anche il sovradosaggio (avere 3 o 4 copie del gene normale) è troppo.



A+ allele normale.

A- allele mutante con funzione ridotta o nulla.

- Nell'aploinsufficienza (> parte dei geni), un singolo allele normale fornisce una funzione sufficiente, quindi gli individui A+A- sono sani.
- Nell'aploinsufficienza, un singolo allele normale non fornisce una funzione sufficiente, quindi gli individui A+A- presentano una malattia genetica.

> 600 geni aploinsufficienti nell'uomo

es. esistono alcune malattie dominanti con questa caratteristica:

- **ipercolesterolemia familiare**, si elimina la sintesi del recettore LDL: avere metà di recettori non è sufficiente per un normale livello di colesterolo. In un omozigote se non ci sono proprio LDL, il fenotipo sarà ancora più severo.

- **sindrome di Turner**: bassa statura, perdita del gene SHOX che si trova nella regione pseudoautosomica di X e Y. Delezioni che rimuovono la parte terminale del cromosoma determinano tale sindrome. SHOX: gene che regola lo sviluppo.

- **perdita del gene PMP22** che codifica per una proteina coinvolta nella formazione della mielina: avere una singola copia non dà abbastanza mielinizzazione normale dando origine a tale patologia. Questo gene è quindi sensibile al dosaggio: se ho delle duplicazioni, il fenotipo risulta in un'altra patologia causata dal difetto della mielinizzazione, un aumento di dosaggio della proteina.

Conseguenze delle mutazioni gain of function:

Spesso risulta in condizioni dominanti, si introduce qualcosa di diverso nella cellula e basta quindi una singola dose.

es. molto comuni sono mutazioni di guadagno di funzione a livello di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. La caratteristica delle proteine di membrana è che devono subire un ambientamento in presenza o assenza di un ligando. Questa proteina per esempio quando viene legata da un ligando viene switchata e cambia la conformazione da OFF a ON. Possiamo avere mutazioni che rendono questo recettore sempre attivo, anche in assenza del ligando. La via di trasduzione sarà quindi sregolata e il segnale sarà sempre attivo e non potrà essere spento. Possono avere un ruolo importante nella cancerogenesi. Le mutazioni di gain of function sono più spesso missense (alterazione di un amminoacido).

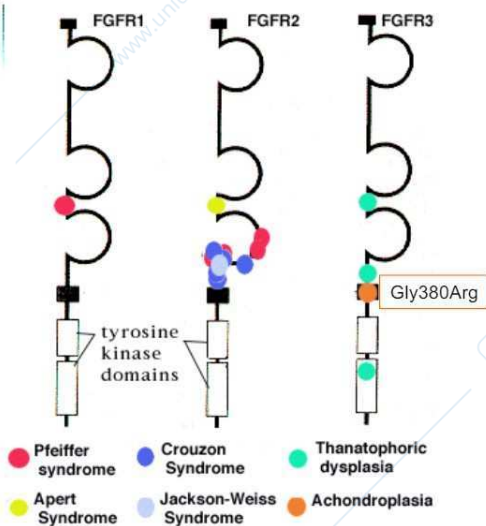
Una caratteristica è che la maggior parte delle mutazioni finiscono quasi tutte in una stessa regione: regione fondamentale per la regolazione del recettore. Se abbiamo delle varianti con perdita di funzione, le varianti possono essere sparse su tutta la lunghezza del gene.

Un altro esempio di guadagno di funzione è l'antennapedia: al posto delle antenne, crescono delle zampe (nella drosophila): è avvenuta una mutazione che ha portato il gene che porta alla formazione della zampa sotto l'enhancer dell'antenna. Dovrebbe essere espresso in cellule che diventano zampa, viene espresso nelle cellule che attivano l'occhio.

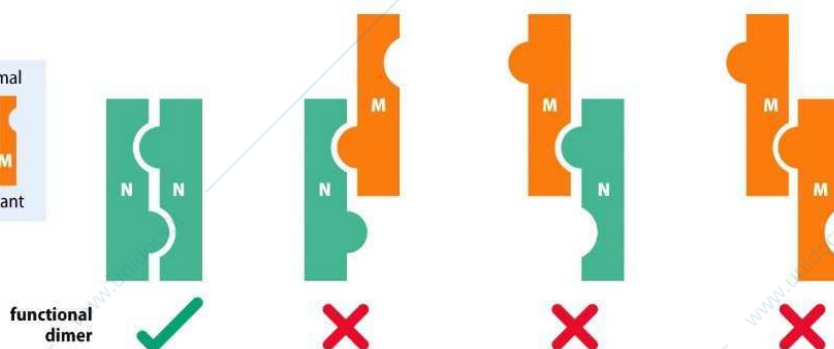
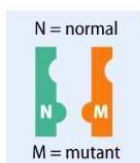
Un altro modo con cui le varianti possono determinare dei fenotipi dominanti è attraverso la situazione **"dominante negativa"**: variante

che determina un prodotto proteico alterato. Nell'eterozigote c'è sia quello normale che quello alterato e la forma alterata interagisce con la funzione normale del prodotto wild-type. Si ha quindi che l'effetto dominante negativo è dovuto al fatto che la forma mutante del prodotto genico impedisce al prodotto wild-type di funzionare correttamente: l'effetto è un fenotipo alterato in eterozigote.

es. mutazione tipica delle proteine multimeriche: molte proteine sono formate da più polipeptidi. In questo caso si ha una maggiore sensibilità agli effetti delle mutazioni dominanti negativi. Se si ha una mutazione che altera la struttura di una subunità, in una cellula di eterozigote si ha un 50% di polipeptidi normale e 50% alterate. I dimeri si possono formare nel seguente modo:



Nell'eterozigote c'è sia quello normale che quello alterato e la forma alterata interagisce con la funzione normale del prodotto wild-type. Si ha quindi che l'effetto dominante negativo è dovuto al fatto che la forma mutante del prodotto genico impedisce al prodotto wild-type di funzionare correttamente: l'effetto è un fenotipo alterato in eterozigote.



Tutte e due le subunità devono essere normali, altrimenti il dimero non si forma correttamente e non funziona. Se è presente una mutazione, si possono formare solo 1/4 di dimeri funzionanti.

Le mutazioni dominanti negative a volte hanno un effetto più deleterio rispetto a mutazioni di loss of function. es. "osteogenesi imperfetta": mutazioni sulle subunità che formano le fibre di collagene, formate da 3 tipi di catene che si devono assemblare per formare collagene. Se si ha qualche catena mutata, il collagene è alterato e il fenotipo è grave. Se un individuo ha una mutazione nello stesso gene ed è loss of function dà origine a un fenotipo meno grave perché si avrà una minore quantità di collagene che si forma ma se ne forma comunque sufficiente per dare un fenotipo meno severo.

Mutazioni recessive: si hanno alleli loss of function.

Mutazioni dominanti:

- guadagno di funzione
- aploinsufficienze
- dominanza negativa

VARIANTI STRUTTURALI:

Le varianti strutturali sono variazioni del DNA che interessano tratti di DNA più lunghi. Devono avere almeno una mutazione di 50 paia di basi.

Quando si parla di varianti strutturali, si possono suddividere in:

- varianti submicroscopiche: al di sotto del limite di risoluzione della citogenetica = < 5 megabasi
- varianti cromosomiche: > di 5 megabasi
- variazioni nel numero di cromosomi: sono le variazioni più grandi e si dividono in:
 1. aneuploidie: variazione su un solo cromosoma di un intero corredo cromosomico
 2. poliploidie: TUTTI i cromosomi sono alterati

La citogenetica si occupa di analizzare i cromosomi in metafase, attraverso varie tecniche di bandeggio che permettono di esaminare e studiarne la struttura a livello macroscopico.

All'inizio degli anni 200 sono state sviluppate delle tecniche sull'utilizzo dei microarray che permettono di studiare le varianti a un livello intermedio. (tra 1000 nucleotidi e 5 milioni)

Oggi giorno l'analisi di tutti i tipi delle varianti genomiche può essere fatta attraverso il NextGen Sequencing.

Utilizzo dei microarray:

piccoli chip sulla quale è possibile andare a disporre e sintetizzare in modo ordinato migliaia di molecole di DNA, corti frammenti di DNA che vengono attaccati in modo ordinato su un vetrino. Ogni singolo vetrino contiene migliaia di sequenze di DNA. Ci sono tante copie dello stesso frammento di DNA. Su questo vetrino si può effettuare un ibridazione; si prende il DNA test, lo si marca con un marcatore fluorescente e si fa avvenire l'ibridazione. Se vi è complementarità tra il DNA test e il microarray si vedrà la comparsa di uno spot fluorescente.

Microarray: utilizzati per molte applicazioni.

es. i livelli di espressione genica, RNA che vengono prodotti da diverse tipologie cellulari.

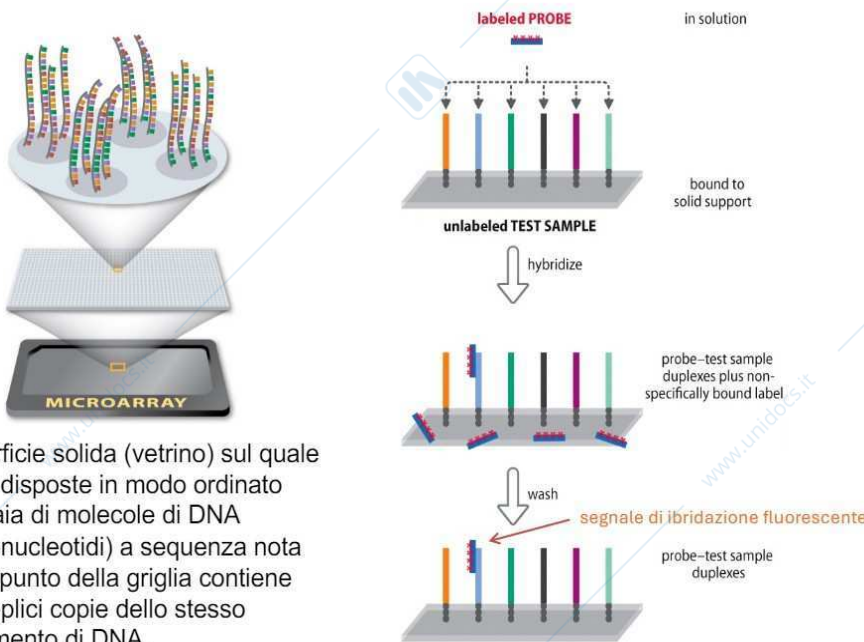
microarray: rappresenta sequenze spaziate regolarmente lungo tutti i cromosomi.

Si utilizzano i microarray per studiare le varianti del DNA: si usa l'ibridazione genomica comparativa (array cgh); in questo modo posso identificare se ci sono dei cambiamenti nel numero di copie tra un genoma di un paziente e un genoma di riferimento. Normalmente mi aspetto di trovare 2 copie di ciascun cromosoma. Si estrae il DNA del paziente e del genoma di riferimento e lo si marca con due fluorocromi diversi: si mescolano le due fonti di DNA (si devono bloccare le frequenze ripetute); se non ci

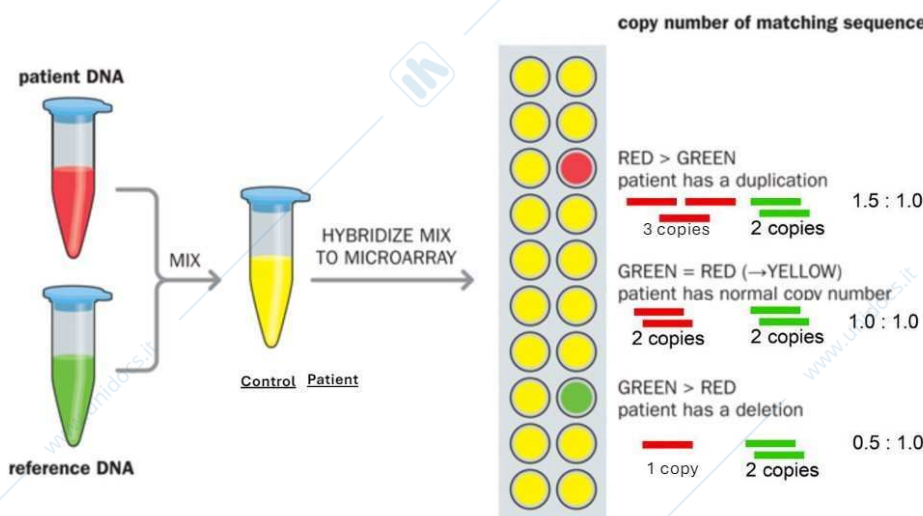
sono differenze (2 copie del paziente e 2 nel controllo) in ciascuna posizione devo comunque ottenere giallo: uguale intensità di colore.

Se invece nel paziente c'è una duplicazione di una specifica regione cromosomica, si hanno quindi 3 copie di cromosomi. Si vedrà quindi una maggiore ibridazione del rosso rispetto al verde. Se nel

paziente c'è una delezione, si vedrà maggiore verde. Si scansiona il microarray e per ogni vetrino si misura l'intensità del rosso e del verde. Si vede in quale regioni ci sono duplicazione o delezioni. Queste piccole delezioni o duplicazione possono essere di dimensioni anche più piccole.



superficie solida (vetrino) sul quale sono disposte in modo ordinato migliaia di molecole di DNA (oligonucleotidi) a sequenza nota. Ogni punto della griglia contiene molteplici copie dello stesso frammento di DNA.



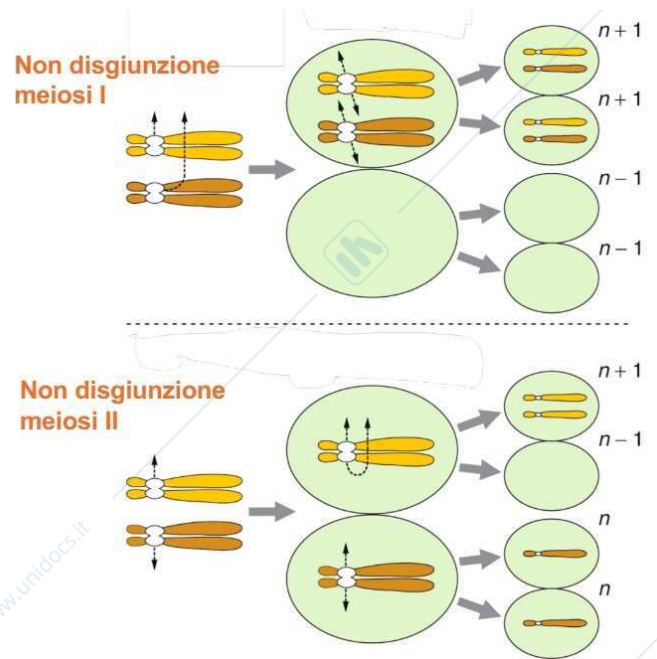
Variazione nel numero dei cromosomi:

Sono le variazioni più grandi e si suddividono in:

- **euploide**: assetto completo del numero di cromosomi (non c'è quindi nessuna variazione)
 - **aneuploidi**: varianti su un singolo cromosoma. (es. un solo cromosoma, senza la copia = monosomia, oppure trisomia = un cromosoma in più)
 - **poliploidia**: variazioni nel numero di TUTTI i cromosomi. es. 3 cromosomi della coppia 1,2,3, ecc....
- Questo tipo di situa non si osserva molto frequentemente negli animali ma soprattutto nelle piante.

Aneuploidie: queste alterazioni si originano spesso durante la meiosi e sono dovute alla non disgiunzione dei cromosomi nella prima e nella seconda divisione meiotica (o non si separano i cromosomi omologhi oppure non si separano i cromatidi fratelli). Quando un gamete contiene 2 cromosomi oppure zero e viene fecondato da un gamete normale, lo zigote avrà o trisomia o monosomia.

Questi errori di non disgiunzione possono avvenire anche durante le divisioni delle cellule somatiche (mitosi): organismo a mosaico. Tutte le cellule che derivano dalla cellula con l'errore, mostreranno tale anomalia cromosomica: cellule trisomiche o monosomiche che si propagano nell'individuo = individuo a mosaico. es. la sindrome di Turner (monosomia del cromosoma X)



Aneuploidie nell'uomo:

Se osserviamo la frequenza di tali anomalie, in realtà sono molto rare, non si osservano trisomie o monosomie se non per specifici cromosomi:

- **trisomia 21:** sindrome di Down, frequenza 1/700
- **trisomia 13 e del 18:** molto più rare e sintomi più gravi.

Non si osservano monosomie degli autosomi, sono più frequenti quelle dei cromosomi sessuali:

- monosomia X
- triplo X
- due cromosomi Y

Perché le aneuploidie non si osservano alla nascita?

Alterazioni di dosaggio di tutti i geni comportano dei gravi difetti nello sviluppo e la maggior parte delle aneuploidie non porta alla nascita dello zigote. Se si studiano i cromosomi di feti di aborti spontanei si osserva che la maggior parte riscontrano aneuploidie. In realtà la maggior parte non si vedono nemmeno, non ce ne si accorge.

Le aneuploidie dei cromosomi sessuali sono invece più tollerate.

Trisomia 21: è la trisomia più frequentemente osservata, non ha conseguenze gravi. C'è qualche sintomatologia ma gli individui affetti possono condurre una vita relativamente normale.

Sindrome di Klinefelter: doppio XX nell'individuo maschio = genotipo XXY

Se si correlano le frequenze della trisomia 21 con l'età materna, c'è una evidente correlazione con l'aumento di rischio. All'aumentare dell'età materna il rischio di avere una progenie con trisomia 21 aumenta esponenzialmente: ciò è dovuto al fatto che nella maggior parte delle trisomie 21, se si osserva l'origine dei cromosomi, le anomalie sono dovute alla prima divisione meiotica della gametogenesi materna, dovuto da errori di segregazione nella meiosi I.

Questo è dovuto al fatto che la meiosi materna si interrompe nell'ultima fase della profase I, quando i cromosomi omologhi sono legati soltanto in corrispondenza dei chiasmi. Con l'avanzare dell'età saranno utilizzate cellule che sono bloccate in questa fase da più tempo, i chiasmi saranno invecchiati e questo

determinerà una non corretta segregazione dei cromosomi omologhi e quindi aumenterà la probabilità che si verifichino fenomeni di non disgiunzione.

Varianti strutturali che interessano frammenti di DNA:

Queste alterazioni genomiche possono essere di 4 tipi:

- **delezione**: si elimina un tratto di cromosoma.

- **uplicazione**: un tratto viene duplicato, la sequenza viene ripetuta due volte. Può venire duplicato anche su un altro cromosoma.

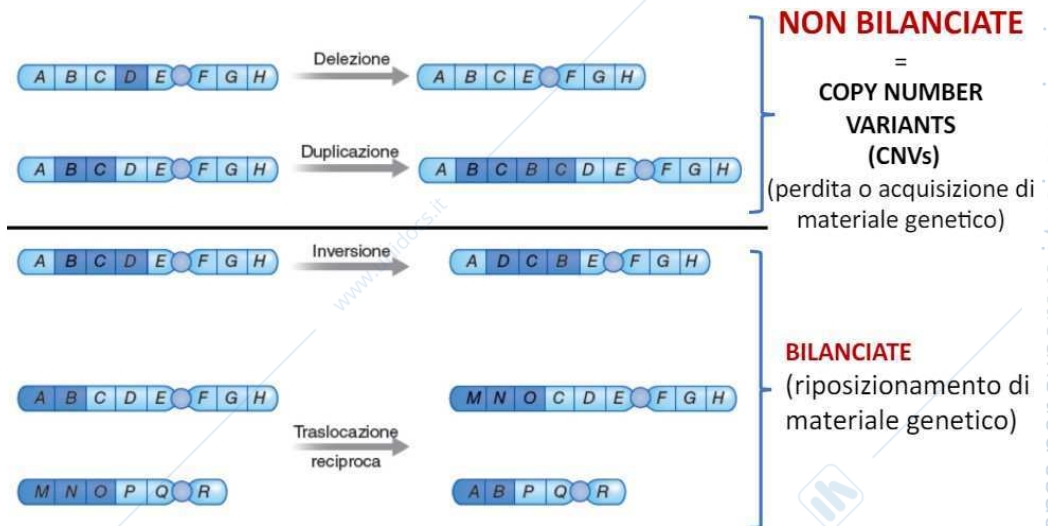
Le varianti di delezione e di duplicazione sono definite "non bilanciate" e chiamate "copy number variants" in quanto si sbilancia il numero di copie di un tratto di DNA abbastanza grande.

Le altre che non comportano l'alterazione di un dosaggio ma solo un cambiamento di posizione sono:

- **inversione**: la sequenza del cromosoma viene invertita

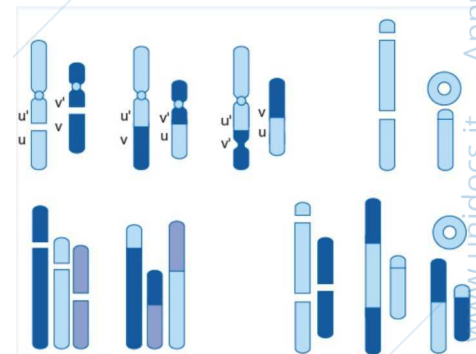
- **traslocazione**: quando 2 cromosomi si scambiano un tratto di DNA tra di loro.

E' stato riposizionato un pezzo di genoma ma non è cambiato il numero di copie.



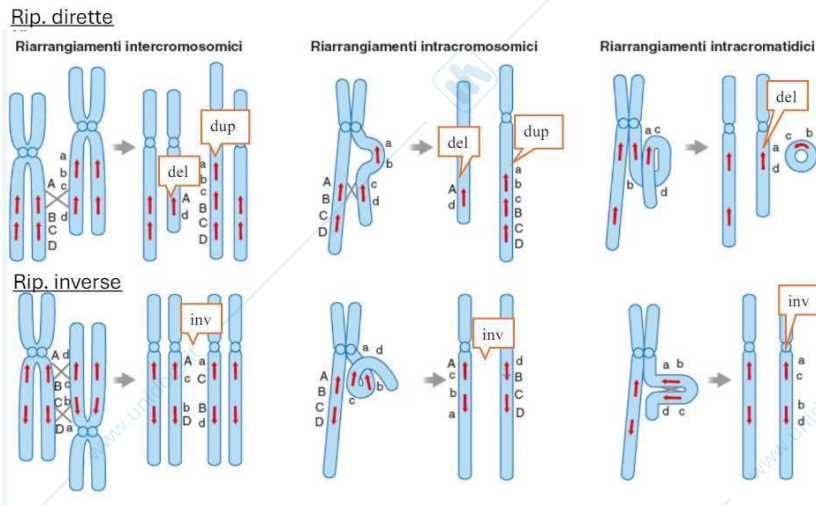
Quali sono le cause che danno origine a questi arrangiamenti?

1. **rottture cromosomiche** a doppio filamento che vengono **riparate in modo incorretto**: se una cellula subisce un danno e ci sono tante rotture, i cromosomi rotti non possono duplicarsi e generalmente la cellula muore. Tuttavia si cerca di riparare tali rotture ma non è un meccanismo tanto preciso, si commettono errori e si generano arrangiamenti.



2. ricombinazione omologa ineguale tra sequenze ripetute: avviene normalmente in modo esattamente equivalente; quando c'è un crossing over, lo scambio è sempre reciproco: l'appaiamento è in modo omologo. Potrebbero però avvenire degli errori nella ricombinazione omologa: nei genomi degli eucarioti complessi (uomo) ci sono un sacco di frequenze che sono ripetute: più del 50% del nostro

genoma è costituito da frequenze ripetute tante volte (DNA satellite) mentre alcune sono ripetute un numero limitato. Se ci sono delle sequenze ripetute, queste sequenze possono creare uno sfasamento nell'appaiamento e comportare un crossing over ineguale. Si ottengono contemporaneamente duplicazione e delezione. Può comportare tutta una serie di varianti strutturali. Può avvenire per esempio che si forma una specie di anelli su un cromatide e si perderà un pezzo di cromatide



Un esempio è stato descritto negli anni 90, studiando la charcot marie tooth: fenotipo neurologico. Non si riusciva a trovare nessuna mutazione puntiforme, fino a quando si scoprì che gli individui che avevano tale malattia, avevano una duplicazione (3 copie) di una regione cromosomica che contiene il gene PMP22 (formazione per la mielina): questo gene si trova fiancheggiato da 2 sequenze ripetute ed avvengono quindi appaiamenti errati, crossing over ineguali che danno origine a duplicazione e a delezioni del gene PMP22: se è presente una duplicazione, l'individuo è affetto da questa malattia. Se è presente la delezione, l'individuo è affetto da un'altra malattia neurologica poiché il gene PMP22 è un gene sensibile al dosaggio.

Se si va ad analizzare il genoma di tanti individui della popolazione, si può cercare di capire come sono distribuite e quanto sono frequenti le varianti strutturali: con l'introduzione dei microarray e altre tecniche, si possono studiare anche le differenze tra i tratti di DNA e quello che emerge è che le varianti strutturali sono abbastanza frequenti, soprattutto i "copy number variants (CNV)" cioè delezioni e duplicazioni che implicano un numero di copie variabile di un segmento di DNA. Ciò che si vede da tale analisi è che i CNV sono un'importante fonte di variabilità genetica e possono rappresentare polimorfismi comuni o cause di patologie. Da un recente studio, è stato visto che quasi il 10% del genoma è interessato da CNV polimorfici. Questi tipi di varianti strutturali sono cause di patologie o fenotipi alterati, es. la talassemia è una malattia in cui si ha uno sbilanciamento delle catene alfa e beta. Uno sbilanciamento della sintesi di queste catene può portare alla talassemia. L'alta talassemia è data da errori di duplicazione o delezioni del cromosoma.

Le regioni più frequentemente colpite da crossing over errati sono vicine alle zone di sequenze ripetute.

Conseguenze dei CNV:

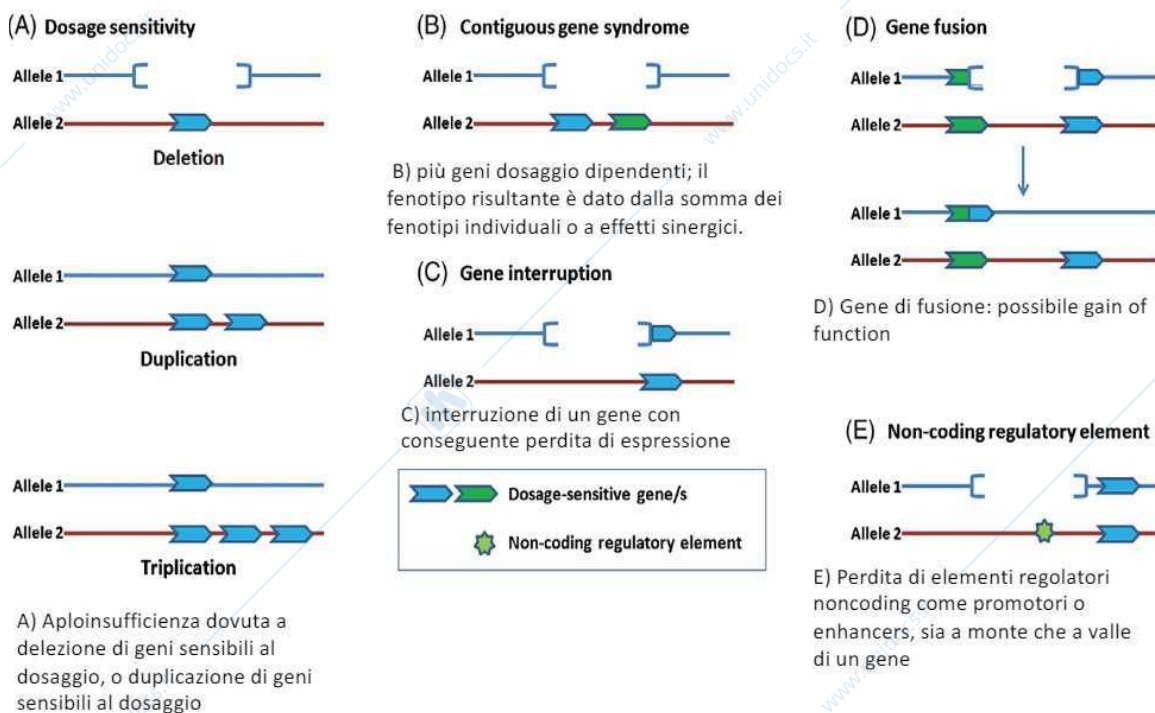
In molti casi le varianti strutturali contribuiscono a un fenotipo.

1. Se ho una delezione o duplicazione, l'effetto più probabile è che l'alterazione del fenotipo è dovuta a uno sbilanciamento del dosaggio. Molti geni sono sensibili al dosaggio, devono essere espressi nel corretto dosaggio per avere un fenotipo normale. Se un gene è aploinsufficiente, la presenza della delezione dà origine a un fenotipo con aploinsufficienza, non si ha un fenotipo normale.
- trisomia 21: dosaggio eccessivo sui geni del cromosoma 21; alcuni sono sensibili al dosaggio.

2. eliminazione di un gene: somma dei fenotipi individuali o con effetti sinergici. Una delezione può anche interrompere la porzione codificante di un gene: il fenotipo è con perdita di funzione.
3. una delezione porta in vicinanza due geni: si crea un gene ibrido o chimerico. Se si formano dei geni "fusi" il prodotto genico non è funzionale, non viene espresso. In alcuni casi si formano delle proteine ibride con funzioni anormali e creano un problema e alterazione del fenotipo = guadagno di funzione. Spesso si osserva nelle linee tumorali: si ha un'altra frequenza di varianti strutturali.
4. Una delezione potrebbe andare ad alterare le sequenze regolatorie: se ho un promotore e il promotore viene eliminato, il gene non viene più espresso.
5. se si ha una delezione e sulla copia c'è un allele recessivo, il fenotipo dell'allele recessivo si manifesta perché è stato eliminato l'altro allele: "**smascheramento di mutazioni recessive**"

Quindi:

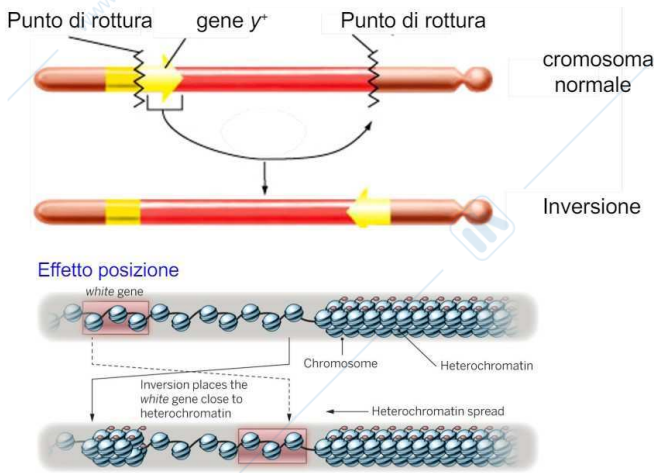
- alterazione del dosaggio
- geni di fusione
- distruggere o modificare la regolazione dell'espressione



Conseguenze dei riarrangiamenti bilanciati: (inversione o traslocazione)

Non si altera il dosaggio, la quantità rimane la stessa. Se si ha un riarrangiamento bilanciato, non comporta nessun effetto fenotipico per l'individuo portatore, tranne in alcuni casi:

- se il sito di rottura ricade proprio dove c'è un gene, si ha la perdita di funzione.
- se la rottura cromosomica altera la regolazione dell'espressione del gene
- si crea un gene chimerico o di fusione



Nel caso dell'inversione: se nel punto di rottura di inversione c'è un gene, viene persa la funzione del gene. In alcuni casi si ha un'inversione che sposta l'intera sequenza del gene e quindi altera l'espressione genica perché la cromatina ha delle regioni più o meno condensate. Se da una regione di cromatina aperta, un gene viene spostato in una regione di cromatina più compatta che non permette l'espressione genica, si altera l'espressione del gene e non si esprime come dovrebbe.

"traslocazioni": sono degli scambi fra 2 cromosomi. Le conseguenze possono essere:

- se no c'è nessuna parte funzionale che viene interrotta, non c'è nessun effetto

- se si interrompe la parte codificante si ha una perdita di funzione
- separa (?) un gene dai suoi elementi di regolazione: alterazione dell'espressione genica
- se la traslocazione implica l'unione tra due geni diversi si può formare un gene chimerico.

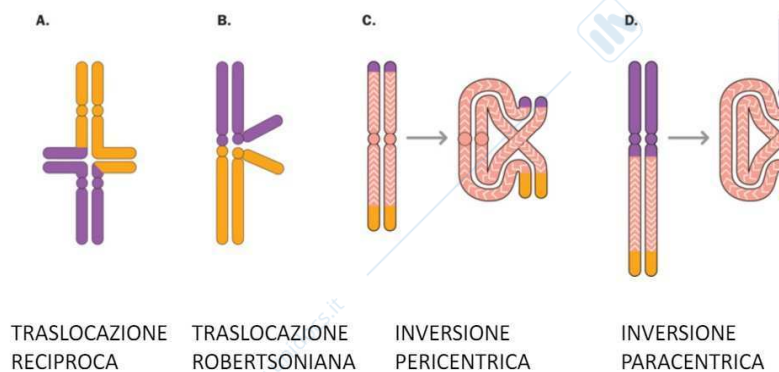
Negli organismi che hanno riarrangiamenti strutturali, non c'è un fenotipo evidente. Ciò che succede è che se un individuo è portatore di una traslocazione o di inversione il problema avviene a livello dei suoi gameti. Quando le cellule vanno incontro a meiosi, nella profase della meiosi I, i cromosomi si devono appaiare ma se sono riarrangiati tra di loro, ci saranno dei problemi nell'appaiamento; avviene una traslocazione reciproca e i cromosomi assumono una forma a croce.

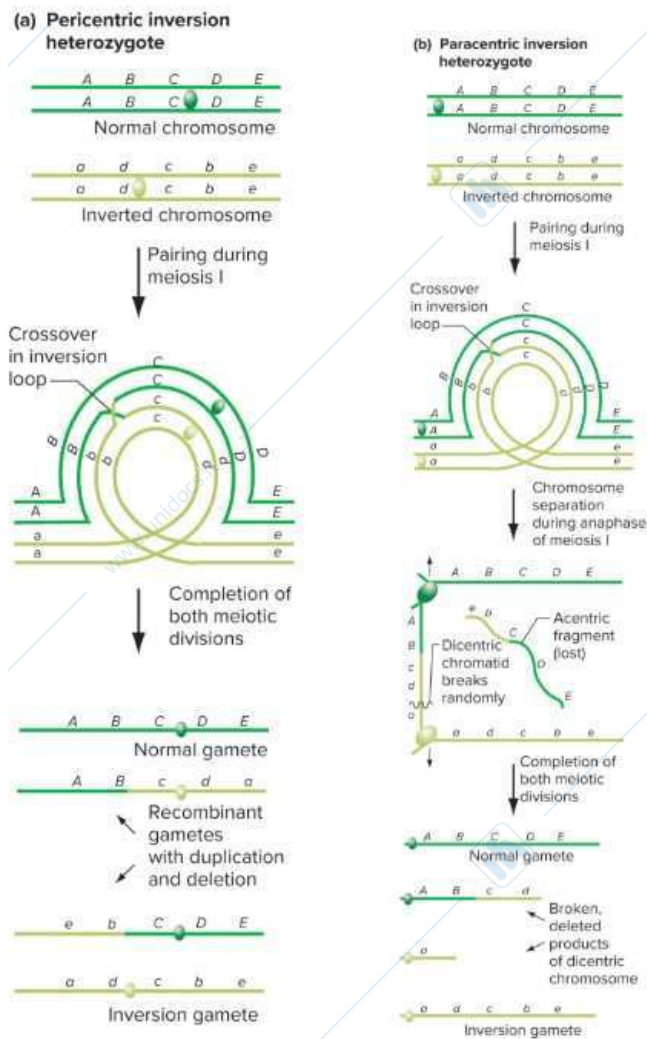
I cromosomi poi devono segregare e deve avvenire il crossing over: ci sono dei problemi.

Una possibile conseguenza dei riarrangiamenti strutturali bilanciati appare nella meiosi. Se un cromosoma porta un'inversione ha un cromosoma anormale e uno cromosoma con un tratto invertito. Per creare l'appaiamento si crea un loop fino a formare una regione di omologia. Nella regione di inversione avvengono crossing over.

Le inversioni producono effetti diversi a seconda se è pericentrica o paracentrica:

- pericentrica: la regione invertita contiene il centromero
- paracentrica: esterna al centromero.





In entrambi i casi si forma l'ansa da inversione (loop) e possono avvenire crossing over dando origine a cromatidi anomali. I due cromatidi coinvolti nel crossing over hanno delle regioni di duplicazione e delezione. Se l'inversione è paracentrica, le conseguenze sono più complicate e si creano cromosomi con due centromeri e altri senza centromeri e inoltre risultano avere regioni di delezione e duplicazione portando a zigoti non vitali. Il risultato finale sarà quindi:

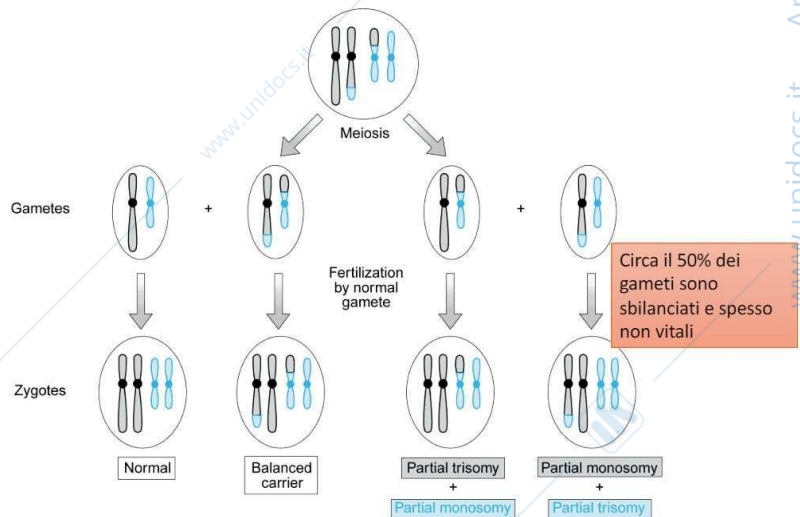
- ridotta fertilità: solo i cromatidi in cui non è avvenuto il crossing over possono "nascere"
 - soppressione di crossing-over nella regione invertita
- Si possono formare poi gameti con regioni di aneuploidia.

Cosa succede per le traslocazioni:

L'appaiamento alla meiosi avviene tramite la traslocazione reciproca (croce). Le problematiche riguardano le modalità in cui, in anafase, i centromeri si separano e i cromosomi migrano verso le cellule figlie.

Esistono quindi 4 tipologie di migrazione dei cromosomi:

- un gamete con due cromosomi normali: gamete bilanciato
- un gamete con il cromosoma traslocato di un tipo e un cromosoma traslocato dell'altro tipo: traslocazione bilanciata. Non presenta problemi fenotipici
- segregazione sbilanciata: due gameti con un



cromosoma normale di un tipo insieme al cromosoma con la traslocazione: grigio normale e azzurro con traslocazione. Questo gamete non è bilanciato, ha delle regioni di delezione e di duplicazione. La regione grigia è presente in 3 copie: parziale trisomia del pezzetto grigio e una monosomia del pezzetto blu = zigote non vitale.

Circa il 50% di gameti sono sbilanciati e possono venire eliminati durante lo sviluppo.

Risultato:

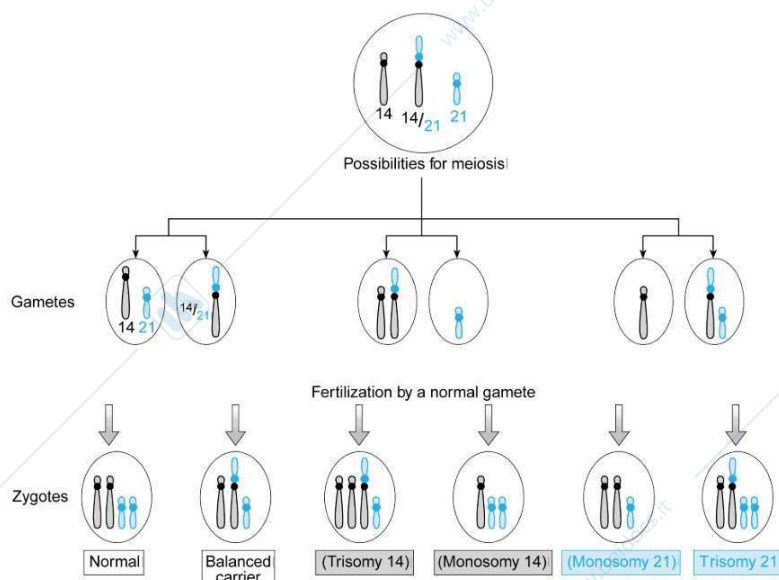
- Ridotta fertilità: in situazioni di aborti spontanei ripetuti ci si può rivolgere a una consulenza genetica, in quanto è possibile evidenziare, analizzando il cariotipo, se uno dei due genitori è portatore di una traslocazione bilanciata che dà questo problema.

Una situazione simile si ha nella traslocazione Robertsoniana: la traslocazione coinvolge 2 cromosomi acrocentrici (hanno un braccio corto e molto piccolo). Se si ha una traslocazione in questi cromosomi ha un braccio lungo di un cromosoma e un altro braccio lungo dell'altro cromosoma. I due bracci corti vengono persi, non sono importanti per la funzione. Si ha quindi un cromosoma in meno. Questa traslocazione Robertsoniana colpisce soprattutto la coppia di cromosomi 14 e 21. Questa traslocazione è bilanciata in quanto c'è una piccola perdita di materiale genetico ma non ha un'importanza funzionale e quindi il portatore non ha conseguenze fenotipiche.



Acrocentric

Cosa succede però nel momento della meiosi?



La trisomia e monosomia del 14 non sono vitali e lo zigote affetto viene quindi eliminato.

La monosomia del 21 non è vitale e viene anch'esso eliminato.

La trisomia 21 è invece vitale quindi lo zigote NON viene eliminato.

Normalmente la sindrome di down non è ereditaria perché di solito l'errore avviene durante la formazione dei gameti ed è quindi un evento sporadico (evento casuale). Nel caso della traslocazione Robertsoniana, la probabilità di avere trisomia 21 è molto maggiore, c'è un aumento di rischio ($\frac{1}{3}$ di probabilità) ed in questo caso la sindrome di down può quindi essere ereditaria

Riarrangiamenti ed evoluzione:

Queste varianti strutturali d'altro canto hanno un ruolo fondamentale nell'evoluzione. Se si esaminano i cromosomi e i genomi di specie diverse nella storia e si osservano come sono costituiti i genomi, si nota che spesso i cromosomi di specie vicine tra loro mantengono la stessa struttura (mantenendo l'ordine dei geni)

Sintenia: termine che indica che ci sono delle regioni genomiche in cui l'ordine dei geni è mantenuto in due specie, la formazione di nuove specie avviene attraverso una serie di riarrangiamenti cromosomici.

Gli eventi più importanti sono i riarrangiamenti strutturali: la presenza di riarrangiamenti strutturali può avere delle conseguenze positive ed adattive, contribuendo ad aumentare la frequenza di individui con un determinato riarrangiamento positivo che può diventare frequente.

- se si ha una delezione o traslocazione → una sequenza codificante può trovarsi vicino a elementi di regolazione che determinano un cambiamento del pattern di espressione
- se si ha una duplicazione → un organismo con duplicazione può conservare una copia del gene e l'altra copia del gene può acquisire delle varianti e sviluppare nuove funzioni: formazione di **famiglie multigeniche**. Ci sono vari geni che sono tutti originati dalla duplicazione di un gene originario ma che si duplica e accumula delle varianti
- inversioni: la soppressione del crossing over permette di mantenere l'associazione sullo stesso cromosoma di varianti che sono vantaggiose per l'organismo quando presenti contemporaneamente

Tutti questi tipi di riarrangiamento si originano casualmente e possono avere un effetto vantaggioso. Una volta che si diffondono, questi riarrangiamenti comportano comunque dei problemi e contribuiscono all'isolamento di produttivo e quindi alla speciazione (gli individui hanno tutti lo stesso tipo di cromosoma)

L'importanza evolutiva è stata evidente per le duplicazioni. Se si va ad osservare la struttura dei genomi di varie specie si vedrà che nei procarioti le sequenze ripetute sono rare, hanno un genoma compatto. Negli eucarioti ci sono un sacco di sequenze ripetute, disegnate per tutta una serie di eventi di duplicazione. Le duplicazioni possono avvenire attraverso vari meccanismi:

- duplicazione dell'intero genoma
- duplicazioni in tandem
- eventi di trasposizione: trasposoni, creano delle copie di se stessi, saltano da una parte all'altra del genoma.

geni paraloghi: geni dello stesso organismo derivanti dalla duplicazione di un gene ancestrale. Questi geni possono diversificarsi, andranno ad accumulare mutazioni che causano delle varianti utili e selezionate positivamente nel corso dell'evoluzione, dando origine a un gene con una nuova funzione.

Una famiglia genica studiata molto è quella che codifica per alfa e beta globina. Esistono diverse copie dell'alfa globina e un altro blast di geni ripetuti in tandem che codificano per la beta globina. "pseudogeni": geni che si sono generati per copia di un gene funzionale ma che hanno perso la loro funzione, hanno accumulato varianti che sono deleterie

Una variante: mioglobina. L'altra copia ha dato origine a emoglobina: serve per trasportare ossigeno dei globuli rossi

Sul cromosoma 11 ci sono diversi geni che codificano per la stessa cosa: ulteriore specializzazione

METODI PER ANALIZZARE IL DNA:

Le mappe di linkage si basano sull'analisi di frequenza di ricombinazione fra due loci che è proporzionale più o meno alla distanza che i due loci hanno fisicamente sul cromosoma. Il mezzo ideale per studiare il linkage è il reincrocio: molto difficile per un organismo come l'umano. Si sfruttano quindi i pedigree delle famiglie a disposizione: crea dei problemi perché non è possibile fare un incrocio e poi analizzare la progenie numerosa.

Quando si crea una mappa genetica è d'interesse creare delle mappe fisiche vere e proprie dove è possibile avere distanze fra geni di interesse (distanza in termini di paia di basi). L'obiettivo finale è determinare la sequenza vera e propria di un genoma.

Dalle mappe genetiche si passa quindi alle mappe fisiche. Tutto ciò è stato possibile quando sono state sviluppate le tecniche del DNA ricombinante. L'era della genetica molecolare inizia negli anni '70, grazie allo sviluppo delle tecnologie.

Tecniche fondamentali per l'analisi del DNA:

- **DNA ricombinante**

- **PCR**

Sono tecniche che servono per isolare o amplificare sequenze di DNA (si ha a disposizione un pezzetto di DNA)

- **ibridazione**: complementarità degli acidi nucleici, riconoscono specifiche sequenze di DNA

- **metodo di Sanger e Next Generation Sequencing**: tecniche per il sequenziamento del DNA.

DNA ricombinante:

Si basa sul purificare degli enzimi fondamentali per manipolare il DNA in vitro. Tali enzimi sono DNA polimerasi, nucleasi (taglia il DNA), ligasi (unisce i due filamenti) e altri enzimi per la modificazione del DNA. Si creano quindi delle molecole di DNA ricombinante: un frammento di DNA con un'origine e un frammento che ha un'altra origine. Un ruolo fondamentale sono la disponibilità di enzimi: endonucleasi o enzimi di restrizione. Sono enzimi che sono normalmente presenti nei batteri, servono per difendersi dal DNA estraneo che potrebbe invadere la cellula batterica. Questi enzimi di restrizione sono utili perché tagliano in modo specifico: si legano al DNA in corrispondenza di una sequenza specifica e in presenza di questa sequenza fanno il taglio del doppio filamento (in prossimità o in corrispondenza): sono spesso

sequenze palindromiche (sequenze con struttura simmetrica : AGCT su un filamento e TCGA sull'altro e che tagliate risultano quindi 5'-AG CT-3' e 3'-TC GA-5' "**sticky hands**": dopo il taglio c'è una sequenza a singolo filamento. I frammenti ottenuti possono essere ricuciti utilizzando delle particolari sequenze chiamate **vettori**: sono delle piccole molecole circolari che si trovano normalmente nei procarioti. Questi plasmidi possono essere utilizzati per ospitare un pezzetto di DNA esogeno.

I plasmidi vengono replicati autonomamente e possono quindi essere utilizzati come vettori per creare molecole di DNA ricombinante.

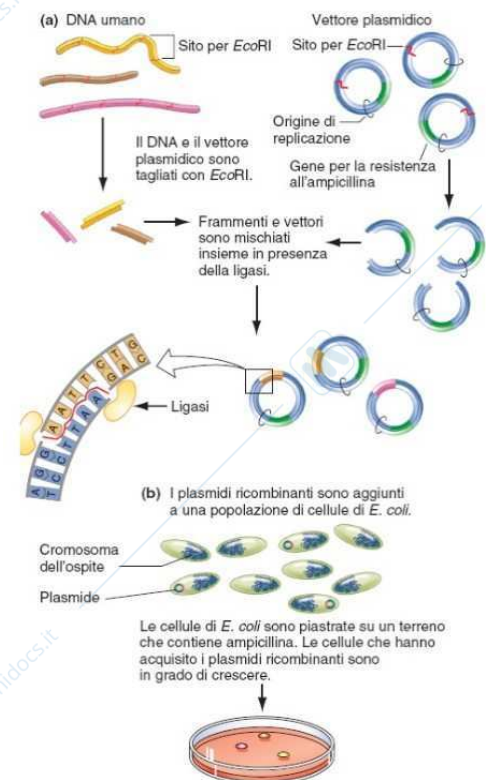
Come si fa?

Si isola del DNA da un organismo, lo si frammenta con enzimi di restrizione e allo stesso tempo si utilizza con l'enzima di restrizione il plasmide batterico. Dopodiché si mescolano fra di loro le due fonti di DNA e il plasmide. Gli enzimi di restrizione creano estremità coesive (sticky hands) e fanno sì che le estremità coesive del vettore e del DNA esogeno possano legarsi fra loro e la DNA ligasi ricuce poi la rottura a singolo filamento.

Plasmide ricombinante: con un pezzetto esogeno. Questo plasmide, con la trasformazione, può essere introdotto nella cellula batterica, ottenendo delle cellule di batteri con il plasmide ricombinante

TABELLA 2.3 ALCUNI ESEMPI DI ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Enzima	Sequenza di riconoscimento	Tipo di estremità	Sequenze alle estremità
<i>AluI</i>	5'-AGCT-3' 3'-TCGA-5'	Blunt	5'-AG CT-3' 3'-TC GA-5'
<i>Sau3AI</i>	5'-GATC-3' 3'-CTAG-5'	Sticky, sporgenza al 5'	5'- GATC-3' 3'-CTAG -5'
<i>Hinfi</i>	5'-GANTC-3' 3'-CTNAG-5'	Sticky, sporgenza al 5'	5'-G ANTC-3' 3'-CTNA G-5'
<i>BamHI</i>	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	Sticky, sporgenza al 5'	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'
<i>BsrBI</i>	5'-CCGCTC-3' 3'-GGCGAG-5'	Blunt	5'- NNNCCGTC-3' 3'- NNNGCCGAG-5'
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	Sticky, sporgenza al 5'	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'
<i>PstI</i>	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	Sticky, sporgenza al 3'	5'-CTGCA G-3' 3'-G ACGTC-5'
<i>NotI</i>	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'	Sticky, sporgenza al 5'	5'-GC GGCCGC-3' 3'-CGCCGG CG-5'
<i>BglI</i>	5'-GCCNNNNNGGC-3' 3'-CGGNNNNNCCG-5'	Sticky, sporgenza al 3'	5'-GCCNNNN NGGC-3' 3'-CGGN NNNCCG-5'



all'interno. In questo modo si possono produrre molte copie di questo plasmide all'interno della cellula batterica = clonaggio.

PCR: permette di amplificare una specifica sequenza di DNA: la differenza con il clonaggio è che per il clonaggio si trasforma una cellula ospite (es. batteri), la PCR è una reazione di amplificazione in vitro, in provetta. Nella PCR si va a sfruttare la capacità della DNA polimerasi che sequenza un tratto di DNA in provetta a partire da due primers che sono complementari al frammento di interesse.

IBRIDAZIONE DEL DNA:

Permettono di sfruttare la complementarità degli acidi nucleici. Se si ha un DNA genomico di un'intera cellula e si marca la sonda con un marcatore, si fa avvenire la denaturazione (la doppia elica si apre e diventa singola). Si mescolano i due DNA, si riabbassa la temperatura e si riformano le doppie eliche, in base alla complementarità: la sonda si associa con le sequenze ad essa complementari. Tracciando la presenza della sonda in base al marcatore si identifica la presenza di sequenza nel DNA di partenza.

ibridazione direttamente sui cromosomi: in metafase. → ibridazione in situ

ibridazione su microarray: hanno tante sequenze di DNA poste sul vetrino e si utilizza la sonda marcata per andare a identificare quali sequenze sono complementari alla sonda.

Potrebbe esser utile non andare a clonare uno specifico frammento ma creare una collezione di cloni ognuno dei quali contiene un frammento diverso che rappresentano l'intero genoma = **genoteca**

Si può frammentare il genoma, clonarlo nel plasmide, effettuare la trasformazione e ottenere diverse colonie ognuna delle quali contiene un frammento diverso: la collezione di tutti questi cloni rappresenta una library.

Sequenziamento del DNA con il metodo di Sanger:

Il metodo di Sanger si basa sul fatto che sono stati isolati gli enzimi che permettono di effettuare una sintesi in vitro della sequenza stampo di DNA. Si basa sul meccanismo di replicazione del DNA: per sintetizzare un filamento di DNA serve un filamento stampo a singolo filamento.

La DNA polimerasi usa i deossinucleotidi, legge il filamento stampo in direzione 5' 3' e va a formare un legame fosfodiesterico che unisce il gruppo OH in posizione 3' del ribosio con un gruppo fosfato del nucleotide successivo. La DNA polimerasi aggiunge in direzione 5' 3' un nucleotide per volta.

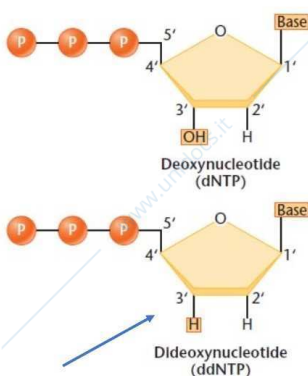
Il metodo di Sanger si basa sull'utilizzo della sintesi in vitro di un precursore che non è un normale nucleotide trifosfato in quanto gli manca un gruppo -OH in posizione 3' dello zucchero e prende il nome di "**dideossinucleotide**"

Quando la DNA polimerasi attacca un dideossinucleotide, la sintesi del DNA si ferma perché manca il gruppo -OH per formare il legame con il nucleotide successivo. Per sequenziare il DNA bisogna quindi fare 4

reazioni separate, ognuna delle quali andrà a dare le informazioni di sequenza per ciascuna delle 4 basi.

Ogni reazione contiene:

- DNA stampo
- primer di innesco: deve essere complementare alla sequenza che si vuole sintetizzare
- DNA polimerasi
- 4 nucleotidi trifosfati: servono come precursori per la sintesi del DNA



dideoxynucleotide = terminatore

In ciascuna delle 4 provette viene aggiunto ognuno dei 4 dideossinucleotidi.

Nella prima provetta si aggiunge il dideossinucleotide A

Nella seconda → dideossinucleotide T

Nella terza → dideossinucleotide C

Nella quarta → dideossinucleotide G

In ogni provetta si trovano quindi i 4 nucleotidi normali e i nucleotidi alterati (in quantità minore) che vengono chiamati **terminatori**. Il DNA viene denaturato in filamento a single strand alzando la T a 95° e da doppia elica si ottiene quindi un singolo filamento. In una seconda fase si va poi ad abbassare la T per permettere al primer di appaiarsi in modo corretto con la sequenza stampo. La DNA polimerasi, a 37°, inizia a sintetizzare il filamento di DNA, partendo dal primer e utilizzando come stampo la sequenza presente nel DNA stampo. Inizia la sintesi e i singoli nucleotidi vengono aggiunti uno dopo l'altro ma ogni tanto verrà incorporato il terminatore (dideossinucleotide) che va ad arrestare la sintesi del DNA. Poiché la DNA polimerasi in modo random incorpora un terminatore, nelle provette la DNA polimerasi sintetizza una collezione di frammenti di DNA che verranno marcati con un radioattivo che si arrestano, in questo caso, in corrispondenza di una T nel filamento stampo (perché nella prima provetta era stato inserito il dideossinucleotide A).

Si crea quindi una miscela di frammenti di dimensione diversa.

Ogni singola reazione verrà separata attraverso elettroforesi per separare i frammenti di DNA di lunghezza diversa: si caricano le 4 reazioni sul gel di poliaccrilamide: i frammenti più corti migrano più velocemente.

L'elettroforesi permette di separare frammenti che differiscono per una singola base.

Successivamente questo metodo è stato

perfezionato introducendo una variante:

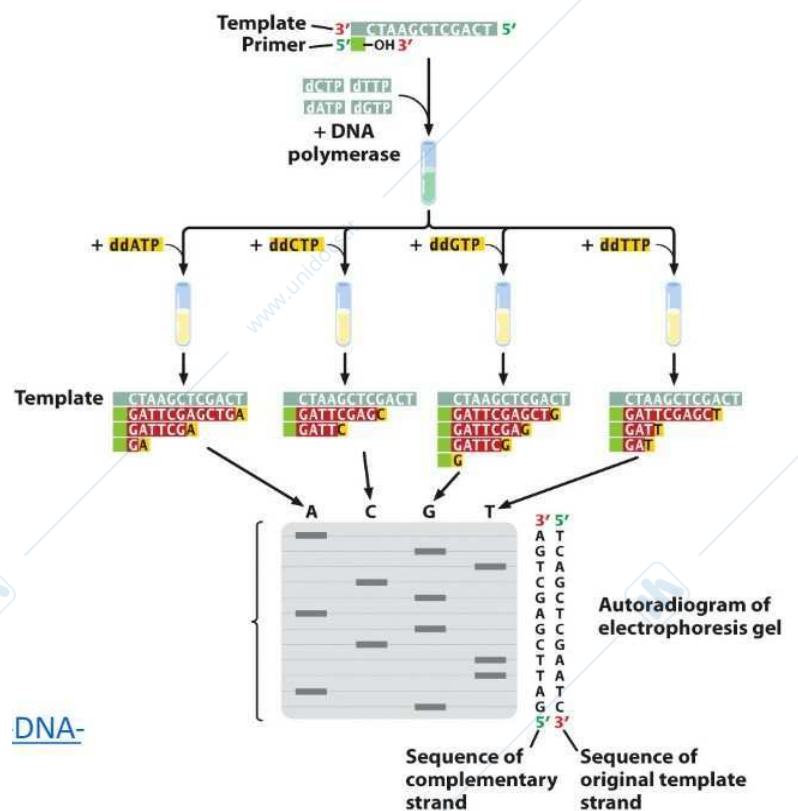
cycle sequencing.

Si fa la reazione di sequenziamento utilizzando una singola provetta e sfruttando una particolare DNA polimerasi: **taq polimerasi**. La taq polimerasi è molto resistente ad alte T e non si denatura perché è estratta da batteri termofili, con T molto alte. Si possono fare diversi cicli di sequenziamento utilizzando la TAQ polimerasi senza dover aggiungere nuova TAQ ogni volta. Al posto di marcatori radioattivi si usano i marcatori fluorescenti per marcare i dideossinucleotidi.

Ciò che è necessario è:

- filamento di DNA
- primer
- DNA polimerasi
- 4 nucleotidi normal

A questo mix si aggiungono i 4 terminatori marcati ciascuno con un fluorocromo diverso che può essere riconosciuto attraverso un laser.



Si alza la T per denaturare il DNA, poi si abbassa la T per far attaccare il primer e poi si alza di nuovo la T per la TAQ polimerasi (70°), La TAQ polimerasi inizia a sintetizzare il filamento complementare a partire dal primer. Casualmente andrà ad inserire un terminatore e la sintesi si fermerà. Ciascuna posizione specifica sarà visibile dal fluorocromo. Si fa poi un elettroforesi per separare il prodotto della reazione sul gel di acrilamide per sparare i frammenti. Alla base del gel c'è un laser che scansiona il segnale fluorescente e man mano che le bande migrano rileva e trasmette al computer un segnale fluorescente. Si ottiene una successione di bande che corrispondono ai picchi dei frammenti fluorescenti e si determina la sequenza del DNA

Limiti del metodo di Sanger:

Per motivi tecnici la reazione di sequenziamento in vitro si esaurisce, dopo circa 500 nucleotidi si esauriscono i reagenti. Nei sequenziatori più moderni si fanno circa 96 corse contemporaneamente, ci vogliono circa 4 ore. Si sequenziano circa 70 chilobasi per ogni corsa di sequenziamento. Questi limiti sono stati superati attraverso il metodo di **sequenziamento massivo parallelo**.

Inoltre è necessario sempre sapere la sequenza iniziale per poter far attaccare il primer. Se bisogna sequenziare un tratto di DNA molto grande e se ne possono sequenziare solo 500 alla volta, il lavoro sarebbe molto lungo.

Come si possono sequenziare frammenti di DNA più grossi? Tramite lo "**shotgun**": non si sequenzia frammento per frammento ma lo si frammenta in pezzetti più piccoli. Si prende l'intero genoma di un organismo e lo si frammenta in frammenti più piccoli, sequenziabili attraverso il metodo di Sanger: i frammenti tra loro devono essere generati in modo da essere parzialmente sovrapposti. Una volta sequenziati questi frammenti si ricostruisce la sequenza attraverso le regioni di sovrapposizione. Ciascun frammento lo si clona in un plasmide, ognuno dei quali contiene un inserto diverso. Si utilizza poi come primer un primer universale complementare al vettore del plasmide. Si sequenziano utilizzando sempre lo stesso primer, complementare al vettore plasmidico. Una volta ottenute le sequenze, basta leggerle e trovare gli overlap e si ricostruisce la sequenza finale. Questa strategia è stata utilizzata per ottenere la sequenza del genoma umano.

Un problema è che nel genoma degli eucarioti esistono un sacco di sequenze ripetute tante volte: se un genoma è pieno di queste sequenze, comporta un problema nel momento in cui si deve ricostruire la sequenza basandosi sugli overlap

Come si creano gli overlap?

Ci sono due metodi:

- si frammenta il DNA utilizzando metodi fisici con ultrasuoni
- si usano enzimi di restrizione ma si conduce la reazione in condizioni tali per cui l'enzima digerisce in modo parziale, non le digerisce al 100%.

Rimaneva però il problema di non riuscire a sequenziare l'intero genoma attraverso lo shotgun se si ha un genoma complesso. Si usa quindi un altro approccio: shotgun gerarchico. Prima di procedere al sequenziamento vero e proprio sono state generate delle library che contenevano inserti di grandi dimensioni e che ricoprivano tutti i cromosomi. Partendo dalle conoscenze delle mappe fisiche e genetiche del cromosoma; le mappe fisiche sono segmenti di DNA clonati (circa 100 Kb). Sono state generate dei contig: frammenti di DNA clonati che vanno a ricoprire l'intera sequenza del cromosoma. Sapendo l'ordine e la posizione sul cromosoma, posso selezionare un singolo frammento ed utilizzare lo shotgun per sequenziare questo frammento. Si assembla poi la sequenza del frammento.

Metodi di terza generazione: permettono di sequenziare filamenti di DNA molto lunghi, solo attraverso questi metodi si può sequenziare un intero cromosoma (da un telomero all'altro)

Metodo di Sanger: bisogna frammentare il DNA di partenza. Si prende ciascun frammento, lo si sequenzia e poi si fa un elettroforesi per leggere la frequenza.

Con il metodo del massivo parallelo si generano dei frammenti più piccoli del Sanger a seconda del tipo di sequenziamento. Questi frammenti vengono disposti in parallelo, immobilizzati su una superficie solida (es. su un vetrino). Il sequenziamento avviene in parallelo su tutti questi frammenti. Alla fine della reazione non si ha un singolo frammento ma se ne hanno migliaia.

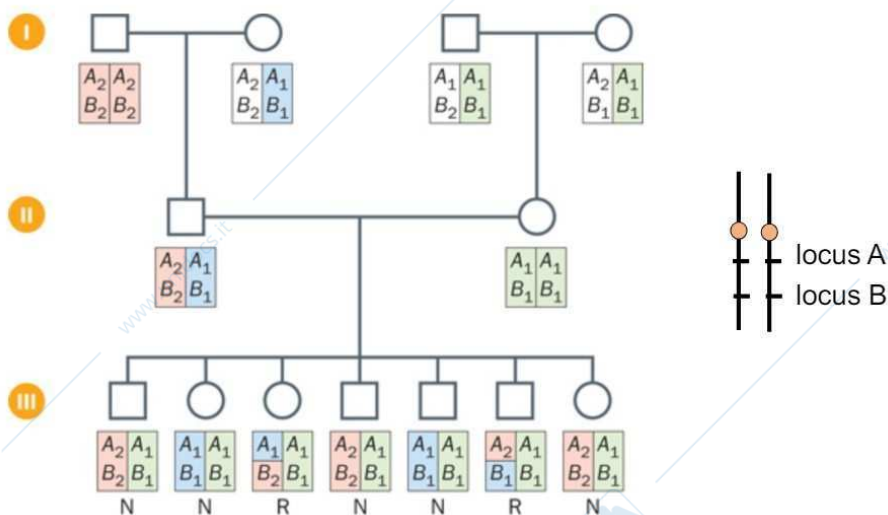
ANALISI DI LINKAGE IN PEDIGREES UMANI:

Non si possono fare incroci: si può analizzare la frequenza di ricombinazione con un test cross. I pedigree utilizzabili sono molto piccoli, il numero di figli a disposizione è molto limitato. Si cerca quindi di affrontare il mappaggio del genoma umano utilizzando dei marcatori per fare analisi di linkage delle varianti del DNA.

Nell'uomo, se si vogliono indagare i caratteri monogenici, si dovrebbero identificare i caratteri all'interno di una stessa famiglia. Normalmente però sono caratteri molto rari e trovare una famiglia in cui sono presenti 2 caratteri rari è quasi impossibile. Per fare analisi di linkage con organismi umani si è pensato di usare come marcatori i polimorfismi del DNA cioè varianti del DNA. Le varianti più frequenti sono le SNP (sostituzione di un singolo nucleotide = non hanno una conseguenza funzionale e possono essere anche polimorfiche).

Un altro tipo di variante sono i microsatelliti: ripetizioni in tandem di un piccolo numero di nucleotidi ripetuti uno dopo l'altro.

Se si riesce ad analizzare i membri di una famiglia andando a determinare il genotipo per uno specifico SNP si può vedere come quel determinato gene viene trasmesso dai genitori ai figli. Se si riescono ad analizzare i diversi marcatori e le diverse varianti del DNA, all'interno di una famiglia posso cercare di capire se tra queste varianti sono avvenuti crossing over oppure no.



Serve un doppio eterozigote (per entrambi gli alleli). In questo caso, la donna della generazione II è omozigote: è possibile vedere quali alleli da parte del padre sono stati trasmessi alla progenie. Andando a esaminare famiglie come queste, si osserva che tra questi due loci ci sono 2 ricombinanti e 5 NON ricombinanti. Sono in linkage?

Avendo esaminato solo 7 individui non è sufficiente come dato statistico: potrebbe essere un caso di quello che è successo. Andando ad esaminare altre famiglie si potrebbe capire se i due geni sono

in linkage oppure no

Sulla base di queste mappe di linkage sono stati costruiti poi i cloni: pezzi di cromosoma clonati in plasmidi e ordinati in modo da rappresentare il loro ordine sul cromosoma.

Un'altra applicazione è quella di identificare geni che causano un fenotipo di interesse, geni che causano le principali malattie monogeniche (solitamente sono rare). Alterazione di un singolo gene. Collettivamente rappresentano una grande percentuale, è necessario quindi cercare di identificare un

gene responsabile della malattia, permette di capire qual è il meccanismo molecolare che causa la malattia. Nella maggior parte dei casi, se si vuole studiare la malattia genetica, osservando le caratteristiche fenotipiche è difficile capire quale sia la causa molecolare. Come si fa quindi? Si identifica un gene che causa un fenotipo di interesse andandolo a mappare tramite l'analisi di ricombinazione e posizionandolo su una regione cromosomica. Si può studiare tale regione, identificare se ci sono dei geni noti e cercare di capire se i geni hanno mutazioni che causano un fenotipo patologico.

Per mappare un gene in una specifica regione cromosomica si sfrutta quindi l'analisi di linkage: si analizza la posizione di un gene ignoto. Se, per esempio, si riesce a scoprire che il gene di una malattia X NON ricombina mai con gli alleli di uno specifico cromosoma, significa che si è riusciti a mappare la posizione del gene ed è nelle vicinanze del marcatore.

Questo tipo di tecnica si chiama "**positional cloning**" (clonaggio posizionale) è l'approccio che permette di passare dall'osservazione della malattia al gene e a capire l'informazione di quel gene.

Precedente all'applicazione del clonaggio posizionale, si utilizzava il clonaggio funzionale: si conosceva (attraverso indagini biochimiche) quale fosse la funzione e quale proteina dovesse essere difettiva. Nel clonaggio posizionale si fa il percorso opposto: si osserva un fenotipo di una malattia, si mappa la posizione del gene sul cromosoma, lo si identifica e poi si studia la funzione del gene.

Es. Se si vuole studiare in E.coli la resistenza a un antibiotico si può prendere il genoma di E.coli, frammentarlo, clonarlo in plasmidi, si trasformano in cellule batteriche, poi si piastrano su piastre con un agente selettivo (antibiotico) e saranno in grado di crescere solo le colonie batteriche che sono resistenti all'antibiotico: si selezionano i cloni e si scopre qual è la sequenza che determina la resistenza.

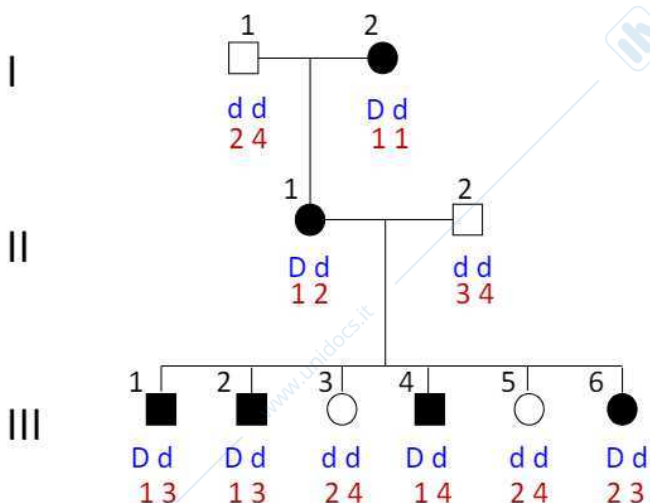
Nel caso di una malattia umana, un esempio è l'identificazione del gene che codifica per l'emofilia B: gli manca una proteina che è un fattore per la coagulazione (fattore VIII). E' stato possibile risalire al gene che codifica per questa proteina (si conosceva però già che il gene difettivo codificava per il fattore VIII).

Si può quindi partire da una o più famiglie in cui si identifica la malattia che si vuole studiare.

1. Famiglie possibilmente numerose, con tanti figli.
2. Estrarre DNA, sia degli affetti che dei sani
3. Analizzare il DNA per tutta una serie di marcatori molecolari sparsi su tutti i cromosomi.

es. pedigree con modello di ereditarietà autosomica dominante con penetranza completa.

D = allele che causa malattia

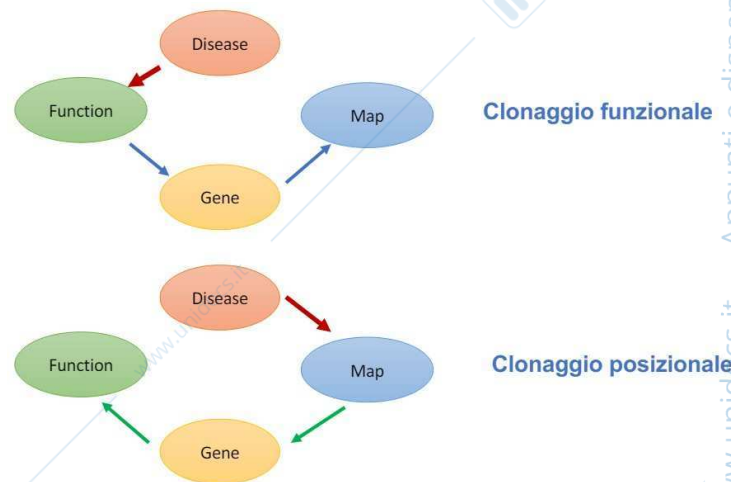


individui sani: omozigoti
 individui malati: eterozigoti

Non si sa in quale posizione sia il gene. Si analizza il marcatore (variante del DNA) del microsatellite: reazione di PCR per amplificare il frammento che contiene microsatellite: dopo la PCR si sperano i frammenti su un gel, da separare in base alla lunghezza.

Qual è la frequenza di ricombinazione?

Come identifico il crossing over?



Si identifica un doppio eterozigote (per il gene malattia e per il marcatore): si conosce anche il modo in cui gli alleli sono posti sui due cromosomi.

La donna della generazione II ha preso dal padre l'allele "d" e il marcatore n°2 e ha preso dalla madre l'allele "D" e il marcatore n°1.

Si guarda poi nella generazione successiva se i figli hanno ereditato l'allele d o D o se ci sono stati crossing over.

L'ultima femmina della generazione III ha preso l'allele "D" ma con il marcatore n°2. Ciò significa che è avvenuto crossing over: la frequenza di ricombinazione è $\frac{1}{6}$

L'analisi del pedigree umano è quindi un lavoro laborioso e complicato: da un'analisi di una singola famiglia si hanno pochi dati. Inoltre, a volte le famiglie disponibili non hanno tutte le generazioni (nonni non disponibili) oppure ci sono famiglie con poche informazioni. Per analizzare i linkage si usano quindi metodi statistici più avanzati, si cerca di trovare un'ipotesi che spieghi i dati osservati nel migliore dei modi: linkage o assortimento indipendente?

Il metodo si chiama "lod score" ed è basato sul logaritmo in base 10 del rapporto di due probabilità (probabilità di avere linkage rispetto alla probabilità di avere assortimento indipendente)

Se il risultato è >1 → si hanno più linkage, altrimenti si ha assortimento indipendente. Normalmente se si ha un risultato maggiore di 3, la probabilità è 1000 volte più alta di avere linkage piuttosto di avere assortimento indipendente.

$$\text{lod score} = \log_{10} \frac{\text{Probabilità di un certo livello di linkage}}{\text{Probabilità di assortimento indipendente}}$$

$$\text{lod score} = \log_{10} \frac{\text{Probabilità dei dati osservati ad una fraz di ricombinaz } \theta}{\text{Probabilità dei dati osservati per } \theta = 0.5}$$

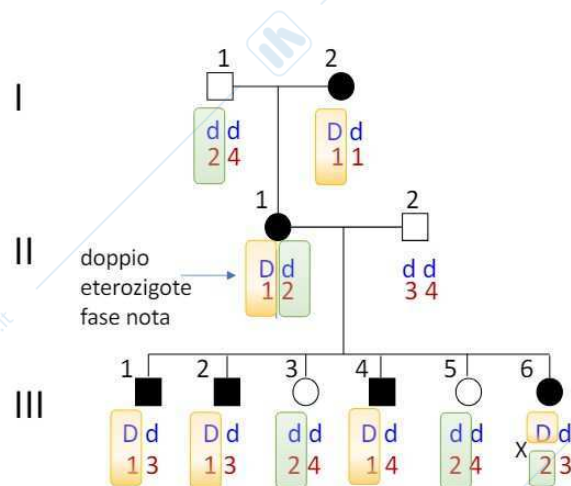
Si ha una complicazione se:

- c'è presenza di penetranza incompleta
- c'è eterogeneità genetica
- per malattie molto rare è difficile reperire famiglie

L'analisi di linkage tradizione non può quindi essere applicata a malattie genetiche complesse.

L'approccio più diretto è quello di sequenziare l'intero genoma: una scorciatoia è quello di sequenziare l'esoma = parte codificante del genoma, circa l'1,5% (20.000 geni e 180.000 esoni). Una malattia potrebbe essere dovuta anche a una mutazione nei promotori o nello splicing.

L'analisi di linkage può essere sempre utile per andare a fare un ragionamento inverso: si può sfruttare la conoscenza a scopo predittivo. Una volta che si è identificato il gene che causa la malattia si può sfruttare questa conoscenza per fare un'analisi indiretta: si stabilisce se un individuo a rischio ha ereditato il tratto cromosomico che contiene l'allele mutato. E' però necessario conoscere già qual è il gene che causa la malattia, seguendo la segregazione dei markers in stretto linkage con la mutazione, si può predire il rischio.



Si sa che vicino a questo gene ci sono varianti polimorfiche. Si analizza questa variante che si sa di essere in linkage con il gene malattia: si sa già quindi che non ricombina MAI = 0 probabilità di combinare (0 Centimorgan di distanza).

GENETICA DI POPOLAZIONE:

Si prendono in esame geni di individui che formano una popolazione.

“pool genico”: insieme di tutti gli alleli presenti in tutti i membri di una popolazione. Si può studiare come questo pool genico varia da popolazione a popolazione, anche nel corso del tempo.

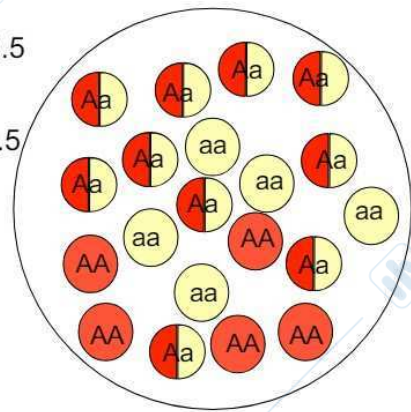
Considerando una popolazione di individui si può considerare un determinato fenotipo e studiarne le frequenze genotipiche. Analizzando un locus con solo due alleli Aa, se si considera un organismo diploide, i possibili genotipi che si possono formare sono 3 ed è possibile studiarne la frequenza. Le frequenze alleliche presentano le frequenza dei singoli alleli. Si conta il numero totale di alleli A e lo si divide per il numero totale di alleli. Per gli individui AA si moltiplicano per 2 perchè gli alleli sono due. $p + q = 1$

Freq allele A (p) = N_A / N_{tot}
 $p = (2N_{AA} + N_{Aa}) / 2(N_{AA} + N_{Aa} + N_{aa}) = (2 \times 5 + 10) / 40 = 0.5$

Freq allele a (q) = N_a / N_{tot}
 $q = (2N_{aa} + N_{Aa}) / 2(N_{AA} + N_{Aa} + N_{aa}) = (2 \times 5 + 10) / 40 = 0.5$

opp:
 $p = f(AA) + \frac{1}{2} f(Aa) = 0.25 + \frac{1}{2} 0.5 = 0.5$
 $q = f(aa) + \frac{1}{2} f(Aa) = 0.25 + \frac{1}{2} 0.5 = 0.5$

$p + q = 1$



Come variano queste frequenze?

Le frequenze descrivono il pool genico di un locus; che relazione c'è tra le frequenze alleliche e quella dei genotipi? Come variano e quali sono i fattori che determinano i cambiamenti nelle frequenze?

"equilibrio di hardy-weinberg": relazione matematica tra le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche di una popolazione. La popolazione presa in considerazione è idealizzata: ci devono essere condizioni ideali:

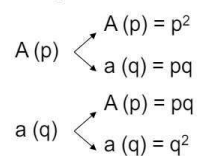
- popolazione grande per evitare variazioni casuali dovute ai piccoli numeri
- all'interno della popolazione devono essere trascurabili i cambiamenti evolutivi. I genotipi dei locus devono avere la stessa probabilità di sopravvivere e di riprodursi.
- assenza di mutazione e migrazione: eventi che determinano cambiamenti delle frequenze geniche

Se si considera una certa popolazione, si possono ricavare le frequenze genotipiche. Questi genotipi danno origine alle frequenze alleliche dei gameti possibili. Se gli individui della popolazione si incrociano tra loro in modo casuale, si definiranno le frequenze genotipiche della progenie.

Dalla frequenza dei genotipi, si possono trovare le frequenze alleliche. Dall'incrocio casuale tra un gamete maschile e uno femminile si ottiene il seguente risultato:

		gameti maschili	
		A p 0.8	a q 0.2
gameti femminili	A p 0.8	AA $p^2 = 0.64$	Aa $pq = 0.16$
	a q 0.2	Aa $pq = 0.16$	aa $q^2 = 0.4$

- Consideriamo un pool contenente tutti i possibile gameti di una popolazione
- La formazione di uno zigote deriva dall'incontro casuale tra 2 gameti



Genotipo	AA	Aa	aa
Frequenza	p^2	$2pq$	q^2

$p + q = 1$ $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Le frequenze dei genotipi saranno: p^2 , $2pq$ e q^2 . La loro somma deve essere 1.

La relazione tra frequenze alleliche e genotipiche, poste le condizioni di prima, le frequenze alleliche rimangono costanti. Dopo una singola generazione si raggiunge un equilibrio. Ovviamente quasi nessuna popolazione rispetta i requisiti di prima; se si prende in considerazione un arco temporale di millenni e con tanti individui, si notano cambiamenti e mutazioni.

Se si analizzano però tempi limitati, si può assumere che la maggioranza dei loci si trova equilibrio.

esempio: genotipi analizzati = 100

Locus biallelico: A, a

Genotipi osservati

AA	Aa	aa
5	30	65

Frequenze alleliche:

$$p = (5 \times 2) + 30 / 200 = 0.2$$

$$q = (65 \times 2) + 30 / 200 = 0.8$$

Se poi si calcolano le frequenze genotipiche attese della progenie si nota che l'equilibrio viene mantenuto. L'equilibrio di Henry vale sia per gli autosomi che per i cromosomi sessuali. Per cromosoma X si tiene in considerazione che nelle femmine ce ne sono 2, quindi le frequenze sono come l'equilibrio di Henry.

Nei maschi c'è un solo cromosoma X quindi la frequenza del genotipo è uguale alla frequenza dell'allele perché un solo cromosoma.

Nell'ambito della genetica umana può essere utile sapere qual è la frequenza dei cromosomi, per sapere la frequenza dei portatori di malattie monogeniche mendeliane. Per una malattia autosomica recessiva si può stimare la frequenza dei portatori se si conosce la frequenza della malattia, facendo uno studio epidemiologico per sapere quanti sono i casi soggetti da una determinata malattia.

esempio:

Frequenza di individui affetti 1/2000: quanti sono i portatori in questo caso?

Gli affetti hanno genotipo aa: q^2

$q^2 = 1/2000$ e con la radice quadrata stimo q

4/100 potrebbero essere portatori di una malattia recessiva.

es. fibrosi cistica: frequenza 1/2500

Per quanto riguarda una malattia legata al cromosoma X c'è differenza tra maschio e femmina.

esempio: frequenza nei maschi di daltonismo = 0.08 (8%)

qual è la frequenza delle femmine portatrici del daltonico?

$$q(d) = \text{frequenza dei maschi affetti} = 0.08$$

$$p+q=1 \Rightarrow p(D) = 1 - 0.08 = 0.92$$

$$2pq(Dd) = 2 \times 0.92 \times 0.08 = 0.15 \text{ (circa } 1/6)$$

Qual è la frequenza attesa delle femmine daltoniche?

$$q^2 = (0.08)^2 = 0.0064 \text{ (circa } 1/156)$$

esempio calcolo del rischio:

individui affetti da fibrosi cistica:

individuo II3 ha probabilità $\frac{1}{2}$ di essere portatrice.

CONDIZIONE AUTOSOMICA RECESSIV

Freq individui affetti = 1/2000

Stima freq. dei portatori?

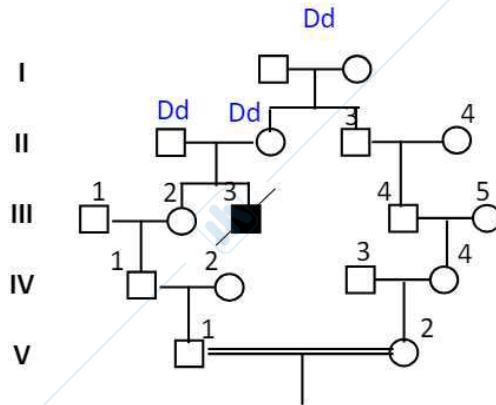
	Non affetti		Affetti
Genot	AA	Aa	aa
freq	p^2	$2pq$	q^2

$$q^2 = 1/2000 \quad q = 0.02$$

$$p = 1 - q = 0.98$$

$$2pq = 2 \times 0.98 \times 0.02 = 0.039 \approx 4/100$$

1/25 probabilità dell'uomo esterno



a) Prob che V1 e V2 siano portatori:

$$\text{III}2 = 2/3$$

$$\text{IV}1 = 2/3 \times 1/2 = 1/3$$

$$\text{V}1 = 1/3 \times 1/2 = 1/6$$

$$\text{II}3 = 1/2$$

$$\text{III}4 = 1/2 \times 1/2 = 1/4$$

$$\text{IV}4 = 1/4 \times 1/2 = 1/8$$

$$\text{V}2 = 1/8 \times 1/2 = 1/16$$

$$1/6 \times 1/16 \times 1/4 = 1/384$$

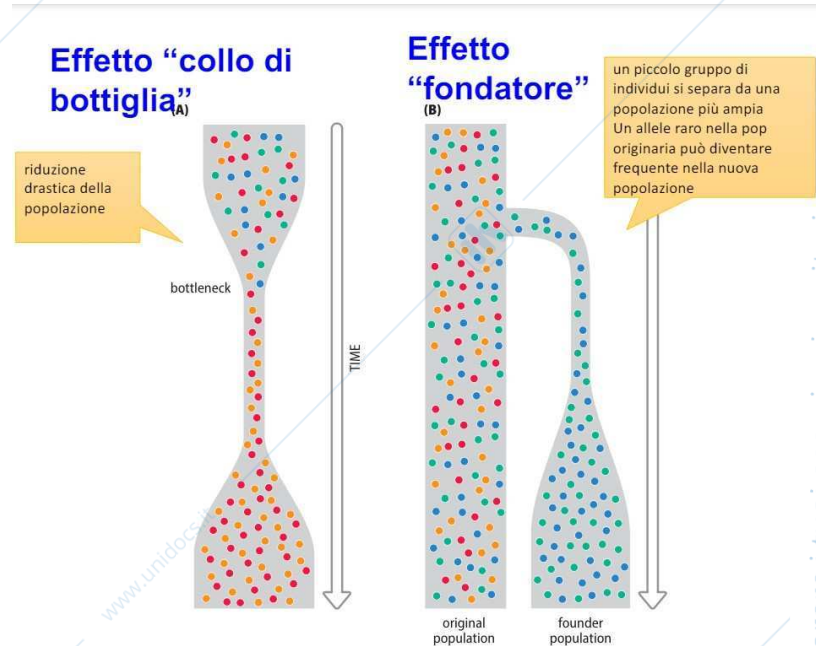
b) Sfruttiamo l'equilibrio HW per calcolare la probabilità che un individuo della popolazione sia portatore

$$1/40000 = q^2 \quad q = 1/200 \quad 2pq = 2 \times 1 \times 1/200 = 1/100$$

$$1/100 \times 1/16 \times 1/4 = 1/6400$$

Una delle situazioni in cui si alterano le condizioni sono gli incroci tra consanguinei. Il tasso di mutazione è generalmente piuttosto ridotto, a livello di un singolo nucleotide nel genoma umano la frequenza attesa è circa 10^{-8} . Se il tasso di mutazione è l'unico fattore che incide, incide quindi relativamente poco. Le mutazioni sono l'origine delle nuove varianti genetiche.

Un fattore che spesso ha effetti consistenti sul pool genico è la deriva genetica, dovuta alla limitazione della popolazione (di piccole dimensioni); i gameti trasmessi alla generazione successiva saranno sempre limitati. Se si hanno numeri piccoli, questi sono più sensibili a fluttuazioni casuali. Questi effetti, nella storia delle popolazioni, hanno sempre un impatto importante; se si prende in esame la storia delle popolazioni umane, ci sono effetti di deriva genetica avvenuti storicamente. Possono avvenire eventi chiamati "collo di bottiglia": se si ha una popolazione piuttosto grande, a un certo punto può succedere che avviene qualche evento che drasticamente riduce il numero di individui che si possono riprodurre. A un certo punto, solamente pochi passano alla generazione successiva; la popolazione nuova avrà una ridotta variabilità perché solo pochi alleli sono passati attraverso il collo della bottiglia.



"effetto fondatore": alcuni individui migrano e colonizzano un'altra regione, la popolazione si espande. Se si studia la diversità genetica delle popolazioni attuali, si riscontra che la diversità genetica in Africa è molto maggiore rispetto agli altri continenti; l'homo sapiens si è evoluto in Africa per migliaia di anni. Per 150 mila anni hanno mutato e accumulato varianti: a un certo punto, gruppi di popolazioni dall'Africa hanno migrato e hanno colonizzato altri continenti, è come se queste popolazioni rappresentassero dei sottogruppi. L'homo Sapiens si è mescolato anche con altre specie esistenti (neanderthal).

Un altro fattore importante sono i fattori selettivi: una determinata variante allelica può influenzare la capacità riproduttiva di un individuo. La selezione può essere:

- **neutrale**: se non crea variazioni
- **svantaggiosa**: se ha un effetto negativi
- **vantaggiosa**: effetto positivi

L'effetto della variante dipende dall'ambiente in cui si esprime: possono essere vantaggiose in un ambiente ma svantaggiose in un altro. La maggior parte delle varianti ha un effetto neutrale.

Gli effetti della selezione agiscono sul fenotipo. Se si considerano caratteri monogenici si possono fare delle predizioni matematiche, mentre se si considerano loci complessi, sarà più difficile riuscire a prevedere gli effetti della selezione. Se una variante allelica ha effetti fenotipici, influenza la "fitness" ovvero la capacità dell'individuo di trasmettere i propri geni alla generazione successiva.

Il coefficiente di fitness è una misura relativa.

Se un determinato genotipo ha il minor successo riproduttivo (fitness ridotta), la selezione tenderà a eliminare la presenza di questo allele; se un genotipo ha una ridotta fitness, si purifica la popolazione da questi alleli deleteri. Un allele diminuisce e, di conseguenza, l'altro aumenta.

selezione positiva:

sono diventati più frequenti gli alleli che permettono la colorazione della pelle chiara nelle popolazioni più a nord.

un effetto mediato dall'ambiente è l'intolleranza al lattosio: la lattasi (enzima che serve per digerire il lattosio) si dovrebbe silenziare dopo l'infanzia e negli adulti viene quindi spento; tuttavia, con l'instaurarsi della pastorizia, gli alleli hanno permesso di digerire il lattosio anche in età adulta.