

Capito 14-MAPPE GENETICHE NEGLI EUCARIOTI

Le mappe genetiche servono per capire le posizioni dei geni sui cromosomi, qual è la loro sequenza e la distanza tra gli uni e gli altri. Questa mappa è diversa dalla mappa fisica, la quale rappresenta la sequenza di basi di ogni cromosoma, ed è l'informazione più completa su genoma.

La mappa genetica precede l'arrivo di tecnologie che hanno permesso di fare le mappe fisiche.

Le mappe genetiche sono anche chiamate mappe di associazione, o di linkage.

Quante mappe ci permettono di capire la posizione dei geni sui cromosomi, la distanza tra essi e quindi quali sono associati agli stessi cromosomi e quali no.

I geni localizzati su cromosomi diversi (esempio A e B) segregano in modo indipendente durante la meiosi. Invece, i geni che sono localizzati sullo stesso cromosoma vengono ereditati insieme (es. B e C nel cromosoma arancione).

I geni che non segregano indipendentemente perché localizzati sullo stesso cromosoma mostrano associazione (linkage), e sono chiamati geni associati. Essi costituiscono un gruppo di associazione.

Non sempre però gli alleli vengono ereditati come erano nel genitore (bc o BC come nell'immagine), perché tra cromosomi omologhi ci può essere

ricombinazione allelica, durante la meiosi 1 nel crossing over. La ricombinazione genetica è un processo di scambio reciproco di segmenti cromatidici tra copie di cromosomi omologhi. Questo scambio avviene per effetto del crossing-over tra geni associati (sullo stesso cromosoma), e porta a nuove combinazioni alleliche e allora, a nuove combinazioni di caratteri fenotipici. Si formano così cromosomi ricombinanti.

Se avviene la ricombinazione, al posto di due gameti, avremo 4 tipi di gameti (in questo caso considerando due geni).

Tutte queste conoscenze, assieme alle varianti genetiche, o polimorfismi genetici, ci servono per costruire le mappe genetiche. I polimorfismi genetici possono essere dentro geni, e quindi sono *marcatori genici*, oppure essere in regioni di DNA non codificanti, e quindi sono *marcatori di DNA* (tipo STR).

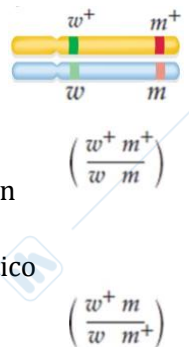
Per mappe genetiche si intende l'analisi di fenotipi ricombinanti, frutto del crossing-over tra geni associati, e comprende anche la sequenza e relazione tra i diversi geni.

Rappresentazione dei geni sui cromosomi

Un individuo doppio eterozigote per i geni w e m, i quali si trovano sullo stesso cromosoma:

$$\left(\frac{w^+ m^+}{w m} \right) \text{ oppure } \left(\frac{w^+ m}{w m^+} \right)$$

- Disposizione in accoppiamento o configurazione cis: I due alleli selvatici si trovano su un cromosoma omologo e i due alleli mutanti sull'altro.
- Disposizione in repulsione o configurazione trans: Ciascun omologo porta l'allele selvatico di un gene e l'allele mutante dell'altro.



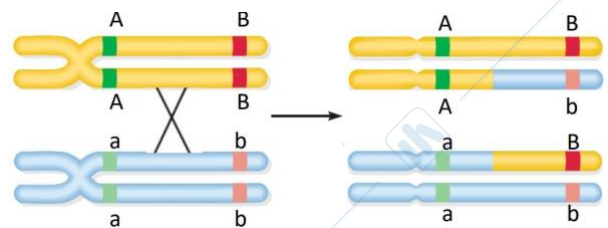
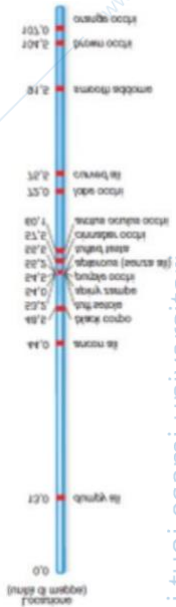
Il primi studi sull'associazione genetica: gli esperimenti di Morgan con Drosophila

Morgan studia due geni legati al cromosoma X di Drosophila:

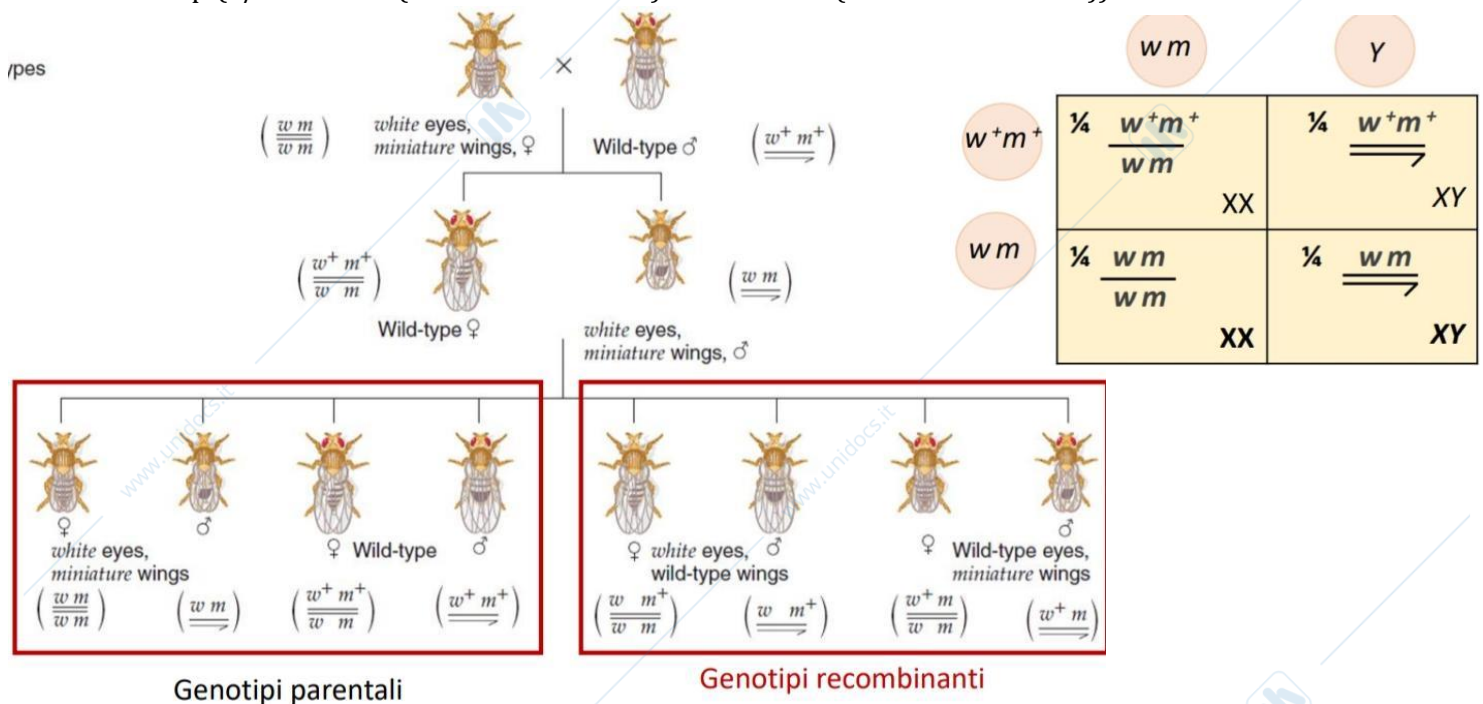
- gene w: (allele w: occhio bianco, allele w+: occhi rossi)
- gene m: (allele m: ali ridotte, allele m+: ali normali)

Questi esperimenti ci permisero di capire se due geni erano su cromosomi diversi o uguali.

NB: nel maschio, se si rappresentano geni su cromosomi sessuali, avendo solo un X si scrive solo il genotipo di quello, e sotto niente.



Se non ci fosse ricombinazione e fossero geni non associati (su cromosomi diversi), come si vede nel quadrato giallo, la femmina darebbe due genotipi ($W^+ M^+ O WM$), e il maschio, avendo un solo cromosoma x, offrirebbe quell'unico genotipo. F2 in questo modo presenterebbe 4 genotipi diversi, e 2 fenotipi (1/2 selvatico (maschio e femmina) e 1/2 mutante (maschio e femmina)).



Invece, oltre ai fenotipi aspettati in F2, come già detto, si trovano fenotipi ricombinanti (occhi rossi ali piccole, occhi bianchi ali normali), mai visti nelle generazioni precedenti. Questo ci fa pensare che questi due geni siano associati allo stesso cromosoma.

Con la ricombinazione infatti si hanno nuovi genotipi, dove i genotipi ricombinanti sono meno di quelli parentali. Da ciò si nota la differenza tra ricombinazione di geni e geni che segregano Indipendenti (perché su cromosomi diversi).

Perché?

Nella drosophila, nei maschi tra cromosoma x e y non c'è il crossing over, e quindi non c'è ricombinazione.

Quindi tutti i fenotipi ricombinanti, di geni associati al cromosoma x, deriveranno esclusivamente dalla ricombinazione di essi nella madre.

Nell'F1 non sono presenti nuovi fenotipi in quanto la mamma è doppia omozigote, e quindi anche se ci fosse ricombinazione non cambierebbe nulla.

La femmina di F1, invece, è eterozigote, quindi facendo ricombinazione può offrire fenotipi e genotipi diversi. Ciò si nota in F2.

Quanto più due geni sono vicini sul cromosoma, meno probabile è che accada tra di loro il processo di crossing-over e tanto più tendono a rimanere insieme durante la meiosi: tali geni tenderanno a segregare insieme durante la meiosi, quindi non assordiscono indipendentemente. Questo porterà alla produzione di un minor numero di progenie ricombinante rispetto al 50% attesi da una segregazione indipendente.

Invece, se i geni si trovano su cromosomi diversi, segregano Indipendenti e quindi il fenotipo parentale è in uguale % a quello ricombinante, perché la probabilità delle loro segregazione è uguale.

Negli esperimenti di Morgan circa il 36% presentava fenotipi ricombinanti.

Più i geni sono vicini sul cromosoma, più vicina è la percentuale di fenotipi ricombinanti e parentali.

COSTRUIRE MAPPE GENETICHE

1. Come rilevare l'associazione tra i geni: Incrocio di prova

Morgan usa incroci tra linee pure, studiando due geni associati al cromosoma x, così da ottenere una

femmina eterozigote e un maschio emizigote. Facendo l'incrocio di F1 è quindi come fare il reicrocio, o incrocio di prova (test cross).

Quando ho un individuo di cui non conosco il genotipo, faccio l'incrocio che mostra fenotipo recessivo, e quindi è per forza omozigote recessivo.

Prendo due geni di cui voglio sapere se sono associati o meno. Facendo l'incrocio di questi due soggetti, se c'è la segregazione indipendente dei due caratteri, la progenie avrà 4 genotipi.

In caso di associazione, gli alleli non segregano in modo indipendente, e quindi, come già visto, ci sono fenotipi

ricombinanti. È importante avere l'individuo omozigote recessivo, perché così abbiamo almeno un soggetto che anche facendo ricombinazione non mostra nuovi genotipi, e quindi non da alleli diversi che potrebbero "incasinare" i risultati.

Questo, attraverso la frequenza di ricombinazione tra i geni, vista tramite la % dei fenotipi ricombinanti, ci permette di prevedere la distanza tra due geni sul cromosoma.

Esempio:

In Drosophila il gene B è un gene autosomico che determina il colore del corpo:

Allele b+: corpo grigio

Allele b: corpo nero

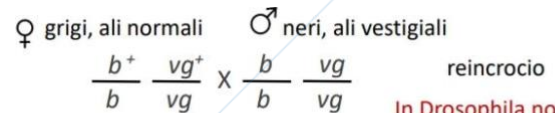
Il gene VG è un gene autosomico che determina la forma delle ali:

Allele vg+: ali normali

Allele vg: ali vestigiali

Faccio il reicrocio:

(I numeri nella foto sono sbagliati, perché la maggior probabilità sono i fenotipi paterni)



In Drosophila non avviene ricombinazione nei maschi.

progenie:	283	grigi, ali normali
	1294	grigi, ali vestigiali
	1418	Neri, ali normali
	241	Neri, ali vestigiali
Totale:	3236	moscerini

Ipotesi nulla: "I geni B e VG non sono associati"

Se non fossero associati i genotipi sarebbero $\frac{1}{4}$.

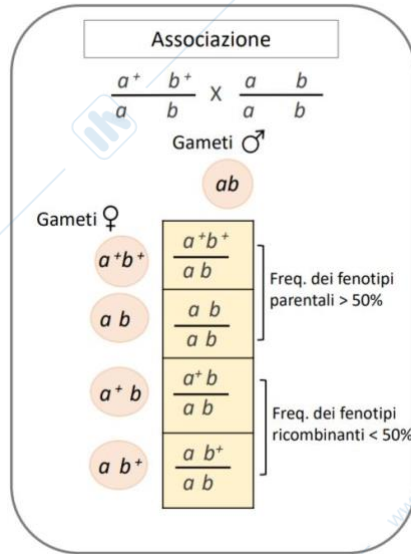
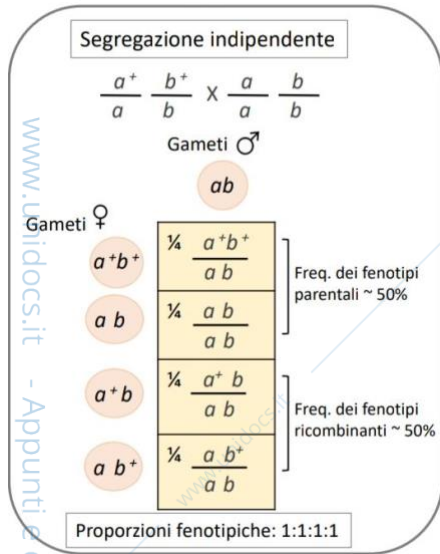
Per capire se i dati sperimentali sono dati al caso, e se le frequenze osservate si discostano tanto da quelle attese, si calcola X^2 (chi quadrato).

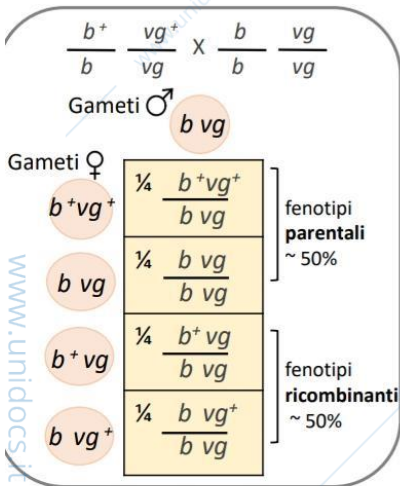
Una volta fatto ciò, devo confrontare il risultato, ovvero 1479, con la tabella di probabilità di chi quadrato e i gradi di libertà. In questo caso i gradi di libertà sono 1 (ricombinate (1)+ parentale(1)-1).

Nella tabella non si vede nemmeno questo valore, quindi si deve rifiutare il pensiero che i risultati siano dati al caso.

L'ipotesi nulla di assortimento indipendente tra i geni B e VG viene scartata (la probabilità che la differenza tra i valori attesi e osservati sia dovuta al caso è minore dal 1 per 1000 ($P < 0,001$)).

Sappiamo quindi che sono geni associati.





$$X^2 = \sum \frac{(foss - fatt)^2}{fatt}$$

$$X^2 = 1479$$

$$g.l = 1$$

Tabella 10.5 Probabilità di chi-quadrato

df	Probabilità									
	0,95	0,90	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,004	0,016	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,10	0,21	0,71	1,39	2,41	3,22	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,42	2,37	3,67	4,64	6,25	7,82	11,35	16,27
4	0,71	1,06	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47
5	1,15	1,61	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52
6	1,64	2,20	3,83	5,35	7,23	8,56	10,65	12,59	16,81	22,46
7	2,17	2,83	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32
8	2,73	3,49	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,13
9	3,33	4,17	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88
10	3,94	4,87	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59
11	4,58	5,58	8,15	10,34	12,90	14,63	17,28	19,68	24,73	31,26
12	5,23	6,30	9,03	11,34	14,01	15,81	18,55	21,03	26,22	32,91
13	5,89	7,04	9,93	12,34	15,12	16,99	19,81	22,36	27,69	34,53
14	6,57	7,79	10,82	13,34	16,22	18,15	21,06	23,69	29,14	36,12
15	7,26	8,55	11,72	14,34	17,32	19,31	22,31	25,00	30,58	37,70
20	10,85	12,44	16,27	19,34	22,78	25,04	28,41	31,41	37,57	45,32
25	14,61	16,47	20,87	24,34	28,17	30,68	34,38	37,65	44,31	52,62
30	18,49	20,60	25,51	29,34	33,53	36,25	40,26	43,77	50,89	59,70
50	34,76	37,69	44,31	49,34	54,72	58,16	63,17	67,51	76,15	86,66

Accettare | Rifiutare al livello di 0,05

Fonte: Estratto dalla Tabella IV in Statistical Tables for Biological, Agricultural, and Medical Research of Fisher e Yates, 6° ed., 1974, Ri-stampato per gent. conc. di Addison Wesley Longman Ltd.

Fenotipi	N.oss.	N.att.	D (oss-att)	d ²	d ² /att
Parentali	2712	1618	1094	1196836	739,7
Ricombinanti	524	1618	-1094	1196836	739,7
Totali	3236	3236			1479,4

2.La frequenza di ricombinazione tra i geni viene usata come misura della distanza tra loro

La distanza tra due geni viene misurata in unità di mapa o centimorgan (cM). Una unità di mapa (oppure 1 cM) corrisponde a una percentuale di ricombinazione del 1%.

Quanto più elevata è la frequenza di eventi di crossing-over tra due geni, tanto più essi sono distanti tra loro.

Esempio di mappa genetica per tre geni di Drosophila:

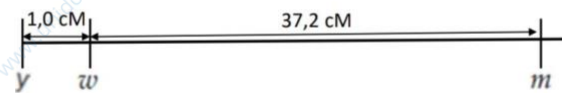
- w: occhi bianchi,
- m: ali ridotte
- y: corpo giallo.

Calcolo della frequenza di ricombinazione per gli incroci:

$$\left(\frac{w^+ m^+}{w m}\right) \times \left(\frac{w m}{w m}\right) \text{ 32\% fenotipi ricombinanti}$$

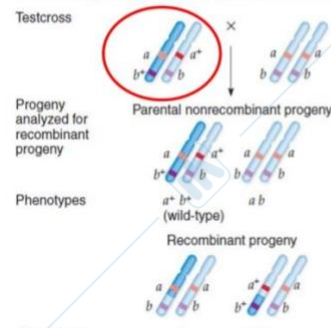
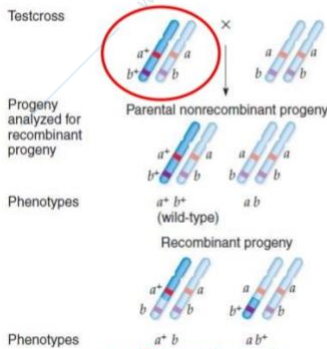
$$\left(\frac{w^+ y^+}{w y}\right) \times \left(\frac{w y}{w y}\right) \text{ 1\% fenotipi ricombinanti}$$

$$\left(\frac{m^+ y^+}{m y}\right) \times \left(\frac{m y}{m y}\right) \text{ 33\% fenotipi ricombinanti}$$



Mappatura dei geni mediante reincroci di prova a due punti.

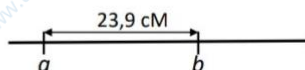
Il reincrocio di prova è anche informativo in quanto alla configurazione dei geni mediante nei cromsomi.



configurazione cis

configurazione trans

180	$a^+ b$	$\frac{\text{num. dei ricombinanti}}{\text{num. totale della progenie}} \times 100 = \text{freq. di ricombinazione} = \text{unità di mapa}$
680	$a^+ b^+$	
521	$a b$	
199	$a b^+$	
Totale:	1580	$\frac{180 + 199}{1580} \times 100 = 23,9\% = 23,9 \text{ um} (= 23,9 \text{ cM})$



Mappatura dei geni con il reincrocio a tre punti

Se due geni sono distanti, tra di loro possono avvenire molti crossing over, e quindi può essere che la frequenza di ricombinazione sia alta, vicino a 50%. Quindi in quasi casi, per capire se questi geni sono sullo stesso cromosoma o no, vengono analizzati moltissimi geni e campioni per calcolare il chi quadro. Ciò implica però un lavoro molto lungo. Per capire se a e b, i quali hanno una frequenza di ricombinazione molto alta, si trovano sullo stesso cromosoma, si può includere un terzo marcatore o gene, c.

Posso fare quindi mappe di a e c, e di b e c, e se entrambi di trovano sullo stesso cromosoma vuol dire che anche a e b sono sullo stesso cromosoma.

Nel reicrocio a tre punti vengono studiati tutti e tre i geni contemporaneamente.

Esempio

Incrocio in un frutto di un eterozigote per i tre caratteri e un omozigote per i tre caratteri. Facendo il reicrocio ci aspettiamo 2^3 fenotipi, ovvero 8.

P+: colore giallo del frutto

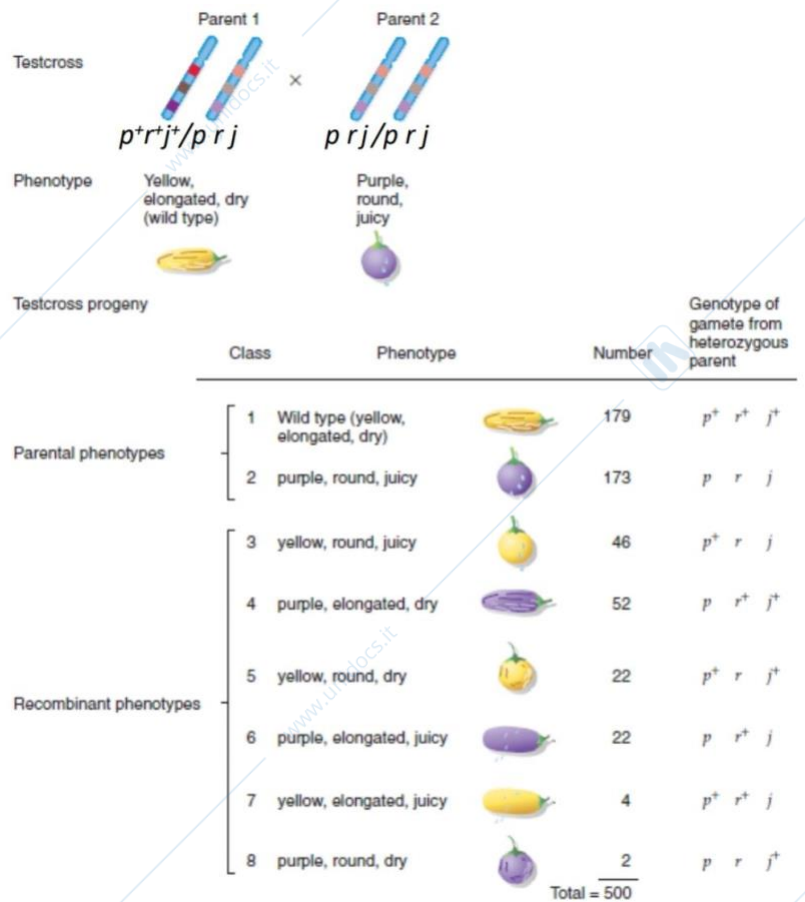
p: colore viola del frutto

r+: forma allungata del frutto

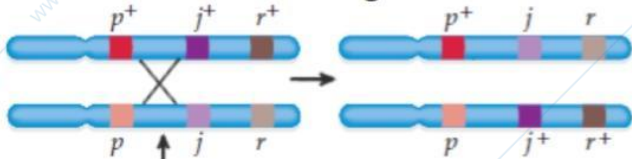
r: forma rotonda del frutto

j+: frutto secco

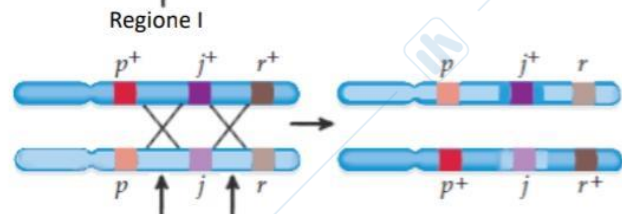
j: frutto succoso



1. Stabilire l'ordine dei geni:



Un singolo *crossing-over*



Il doppio *crossing-over* è meno frequente che il *crossing-over* singolo e porta a la configurazione in cui l'allele selvatico j^+ è in mezzo a gli alleli recessivi p e r

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

Total = 500

Parentali, senza *crossing-over*

Ricombinanti sigolo *crossing-over* regione I

Ricombinanti sigolo *crossing-over* regione II

Ricombinanti doppio *crossing-over*

2. Calcolare le frequenze di ricombinazione tra i geni:

$$\frac{p^+ j^+ r^+}{p j r} \times \frac{p j r}{p j r}$$

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

Total = 500

Parentali, senza *crossing-over*

Ricombinanti sigolo *crossing-over* regione I

Ricombinanti sigolo *crossing-over* regione II

Ricombinanti doppio *crossing-over*

La frequenza di ricombinazione puo essere calcolata per due geni alla volta:

Distanza tra p e j : tutti i ricombinanti in regione I (tutte le combinazioni $p^+ j$ e $p j^+$: classi 3, 4, 7 e 8)

$$\text{Frequenza di ricombinazione tra } p \text{ e } j = \frac{(46 + 52) + (4+2)}{500} \times 100 = 20,8\%$$

Distanza tra j e r : tutti i ricombinanti in regione II (tutte le combinazioni $j^+ r$ e $j r^+$: classi 5, 6, 7 e 8)

$$\text{Frequenza di ricombinazione tra } p \text{ e } j = \frac{(22 + 22) + (4+2)}{500} \times 100 = 10,0\%$$

