

CORSO DI GENETICA

COSTRUZIONE DI MAPPE GENICHE

Roberto Mengentili
Università di Urbino "Carlo Bo"

Rapporto fenotipico tra diibridi

Mendel

$AaBb \times AaBb$

↓

A-B-	9
A-bb	3
aaB-	3
aabb	1

Frequenza dei gameti: 1:1:1:1

Colore fiore : porpora (P) o rosso (p)
Forma del granello di polline:
allungato (L) o rotondo (I)

$PPLL \times ppII$



$PpLl \times PpLl$



4831 porpora allungato ($P-L-$)

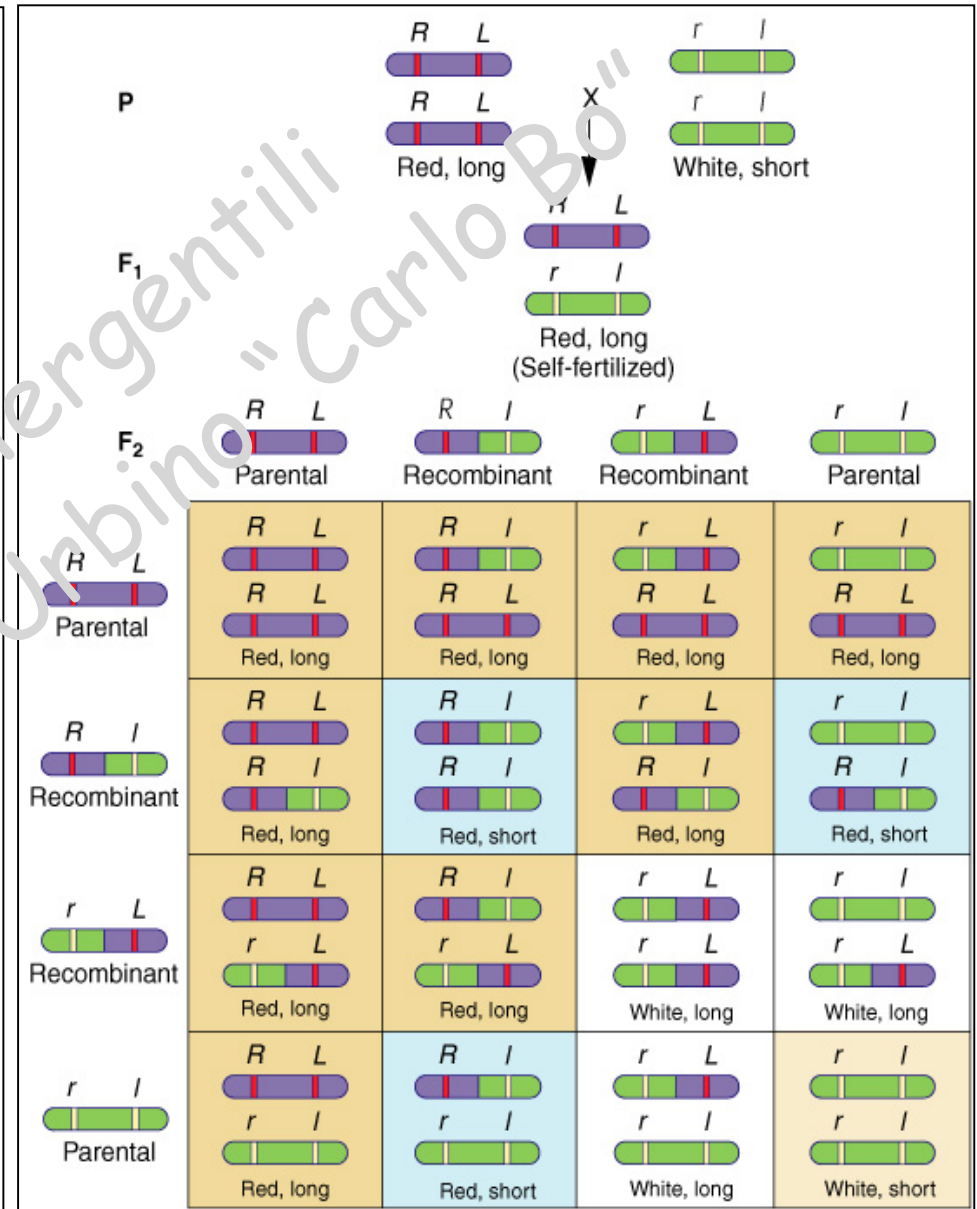
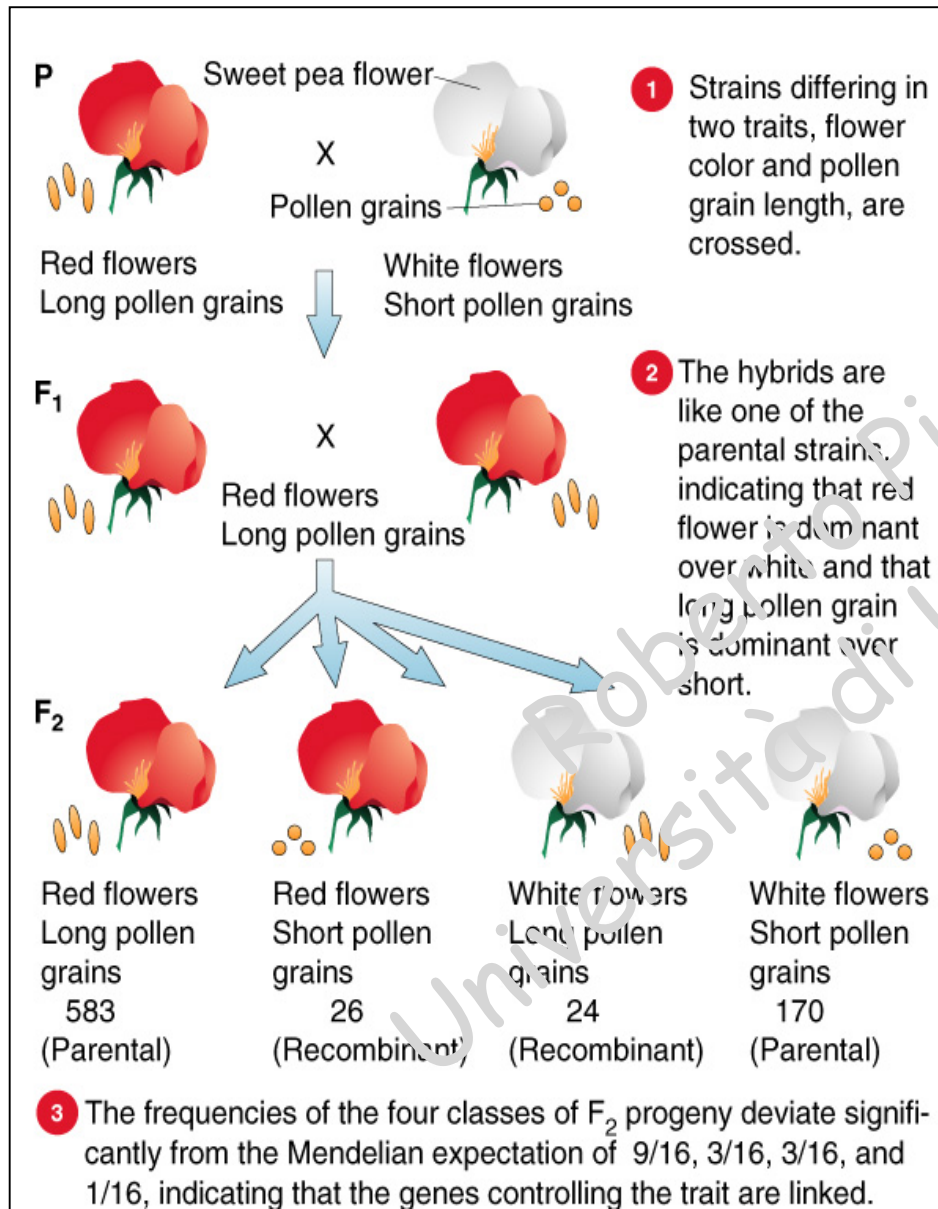
390 porpora rotondo ($P-II$)

393 rosso allungato ($ppL-$)

1338 rosso rotondo ($ppII$)

Anche Bateson e Punnett (1905) lavorarono sul *Pisum sativum* di Mendel, ma con altri caratteri...

Gli esperimenti di Bateson e Punnett



Accoppiamento (*coupling*)

Tendenza dei doppi dominanti e dei doppi recessivi a rimanere insieme nei gameti.



Reginald Crundall Punnett



William Bateson, 1922.

Ancora Morgan...

Colore dell'occhio:
 porpora (pr) o
 rosso (pr^+)
 Ali: vestigiali (vg)
 o lunghe (vg^+)

$$pr^-pr^- \quad vg^-vg^- \times pr^+pr^+ \quad vg^+vg^+$$



$$pr^-pr^+ \quad vg^-vg^+ \times pr^-pr^- \quad vg^-vg^- \quad F_1$$

$pr^+ \quad vg^+$	1339
$pr^- \quad vg^-$	1195
$pr^+ \quad vg^-$	151
$pr^- \quad vg^+$	154
	<hr/>
Totale	2839

I due dominanti e i due recessivi stanno in accoppiamento.

Se ciascuno dei genitori è omozigote per un recessivo i rapporti cambiano:

$$pr^+ pr^+ \quad vg^- vg^- \quad \times \quad pr^- pr^- \quad vg^+ vg^+$$

↓

$$pr^- pr^+ \quad vg^- vg^+ \quad \times \quad pr^- pr^- \quad vg^- vg^- \quad F_1$$

$pr^+ \quad vg^+$	157
$pr^- \quad vg^-$	146
$pr^+ \quad vg^-$	965
$pr^- \quad vg^+$	<u>1067</u>
Totale	2335

I due dominanti e i due recessivi stanno in **repulsione**.

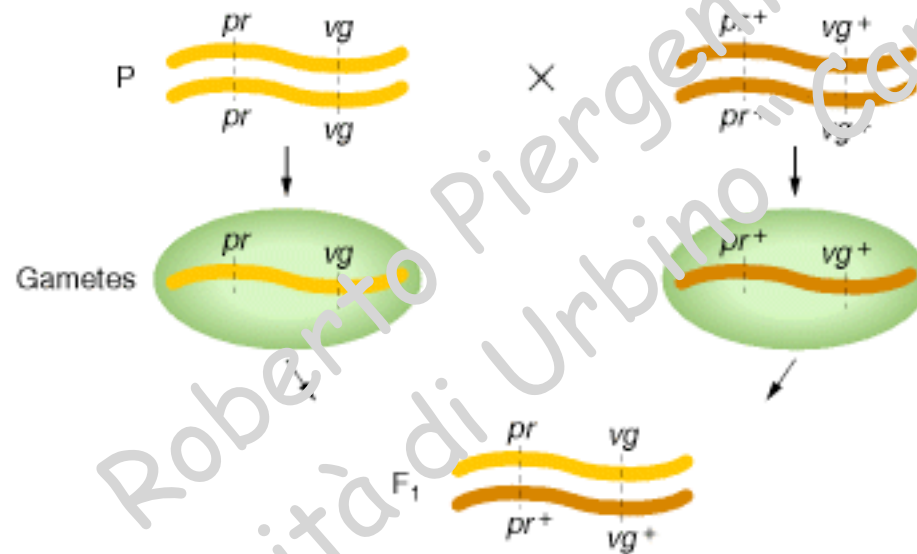
Ricombinanti

Anche in questi esperimenti era possibile recuperare i fenotipi ricombinanti, quelli cioè in cui i geni si erano **riassortiti**, ma la loro frequenza rispetto ai parentali non era più 50%, bensì molto meno.

Morgani intuì che i due geni *pr* e *vg* fossero localizzati **sullo stesso cromosoma**.

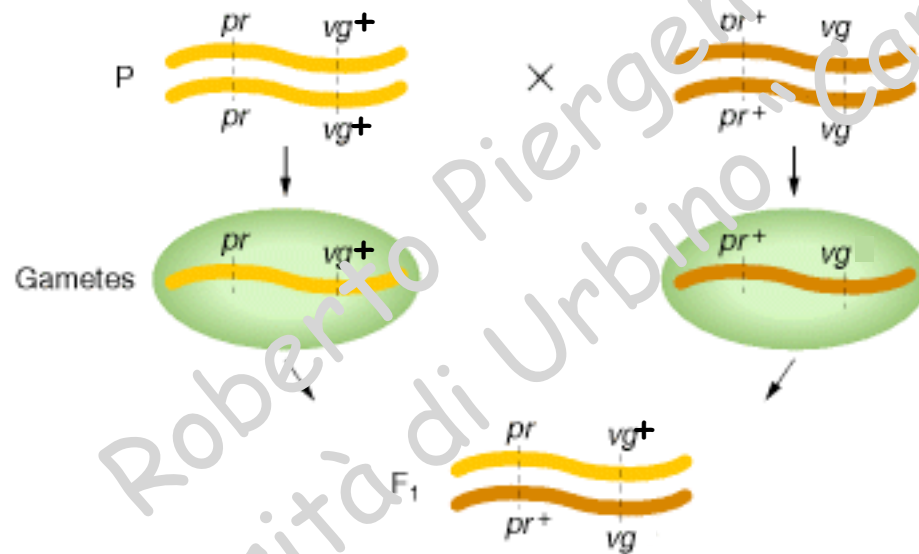
A seconda della disposizione degli alleli (accoppiamento o repulsione) i genitori trasmettono o cromosomi con pr^+vg^+ e $prvg$, oppure cromosomi con pr^+vg e $prvg^+$ con frequenza diversa da quanto atteso in base agli esperimenti di Mendel.

Accoppiamento (coupling)



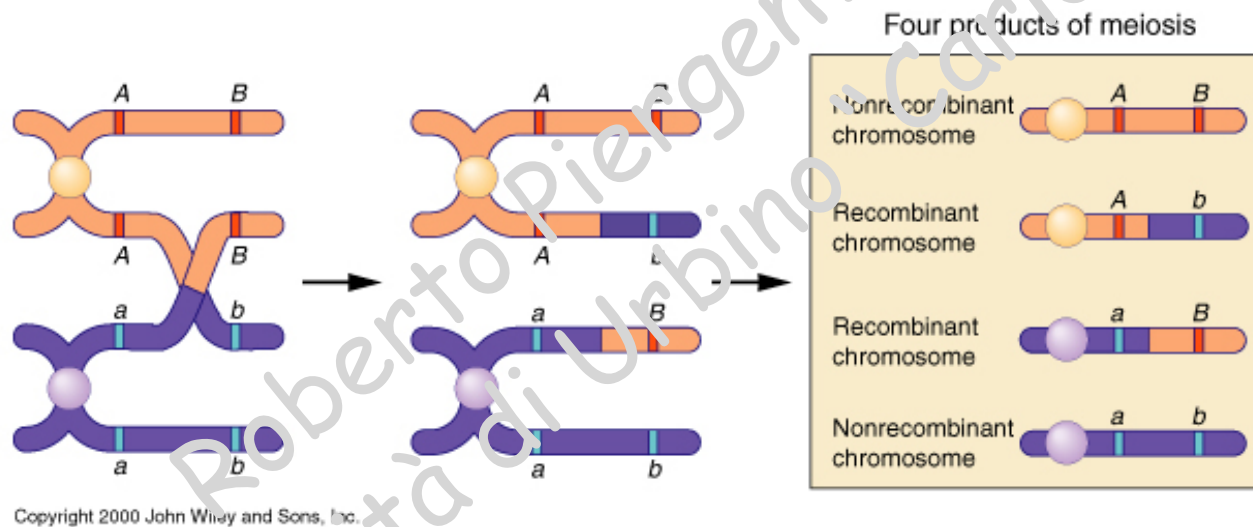
I gameti più frequenti formati dagli individui F₁ saranno *pr⁺vg⁺* e *pr⁻vg⁻*.

Repulsione (repulsion)



I gameti più frequenti formati dagli individui F₁ saranno $pr^+ vg^-$ e $pr^- vg^+$.

Come si originano le classi meno frequenti?



Le classi meno frequenti si originano in seguito a *crossing over*, cioè in seguito a uno **scambio fisico** tra i due omologhi.

I cromosomi identici a quelli dei genitori vengono chiamati **parentali**; quelli diversi dai genitori vengono chiamati **ricombinanti**.

Il *crossing over* avviene in profase di meiosi I

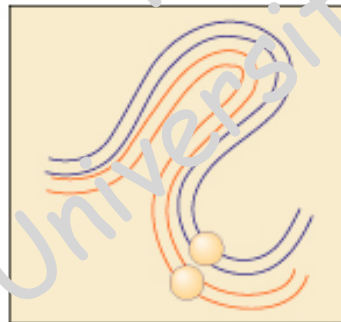
Leptonema

- Chromosomes are already duplicated.
- Synaptonemal complex begins to appear.



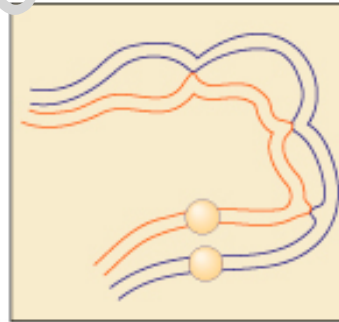
Zygonema

- Pairing is initiated.
- Synaptonemal complex develops more fully.



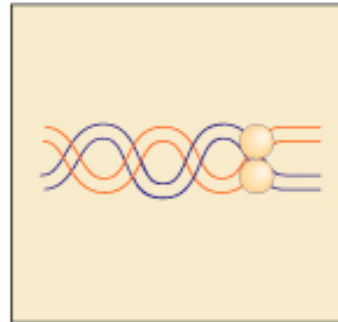
Pachynema

- Pairing is completed.
- Chromosomes thicken.
- Crossing over occurs.



Diplonema

- Repulsion between homologs begins.
- Chiasmata are clearly visible.
- Chromosomes are held together at chiasmata and centromere.

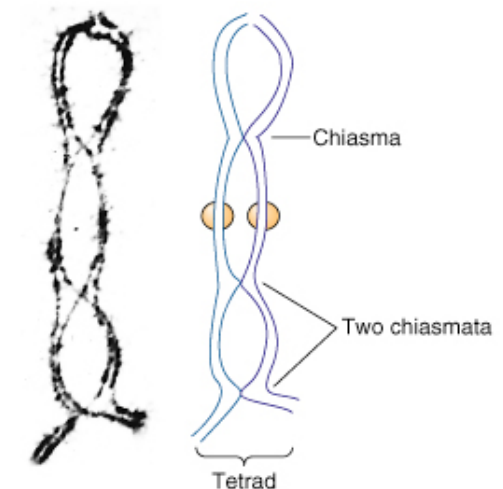
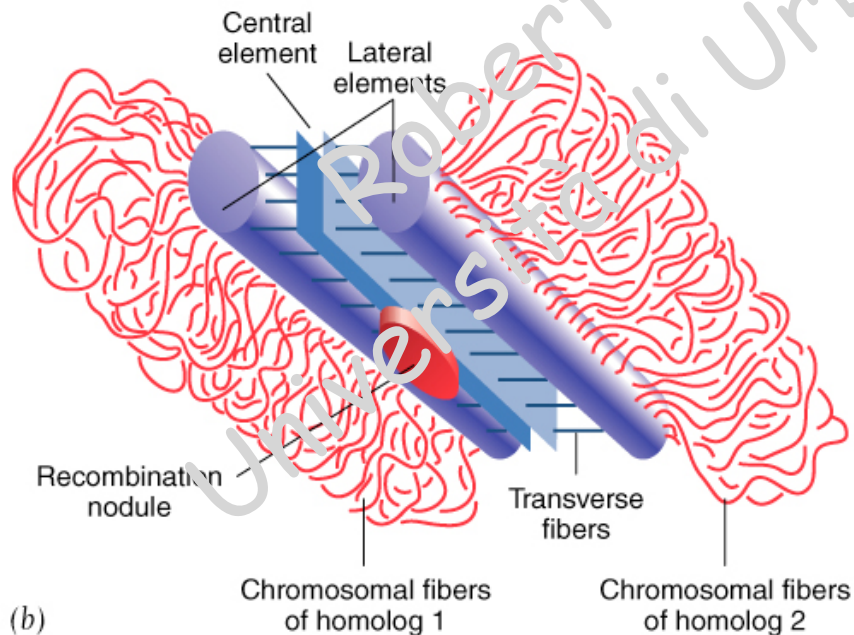
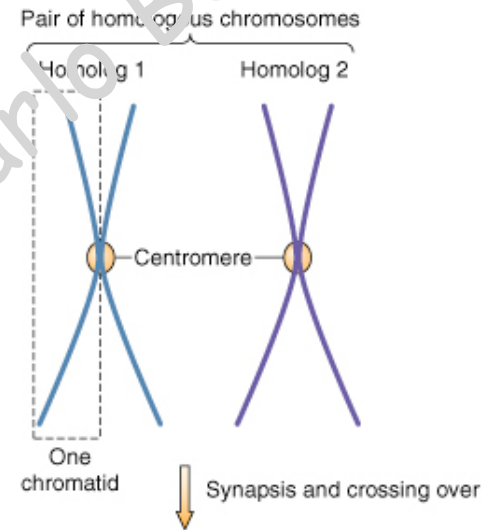


Diakinesis

- Maximum chromosome thickening occurs.
- Chiasmata disappear.
- Chromosomes move to equatorial plane.



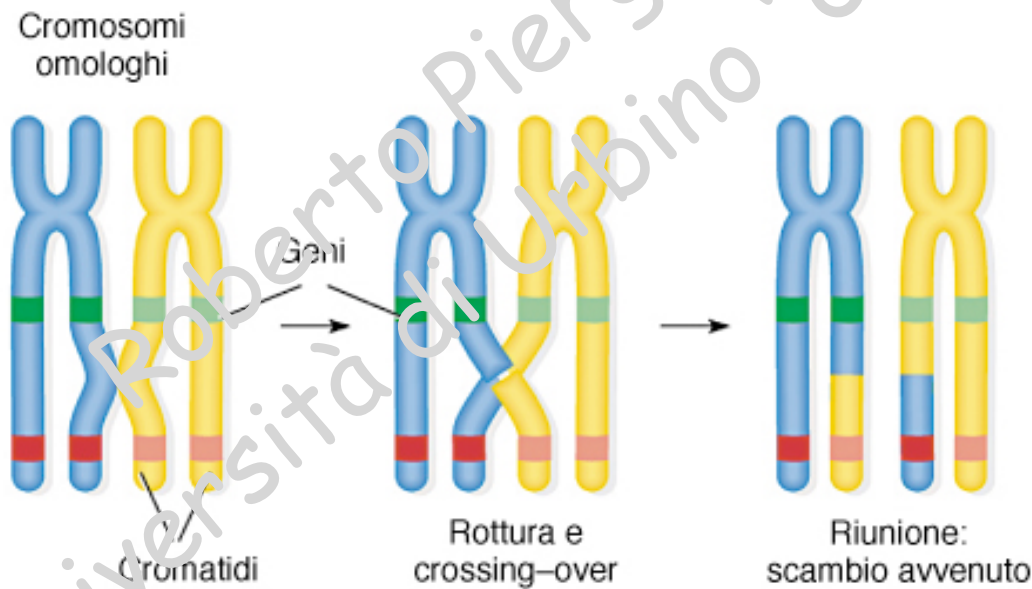
I chiasmi sono la manifestazione visibile del *crossing over*



Il *crossing over*

Figura 13.2

Meccanismo del crossing-over. Schema molto semplificato di un crossing-over tra due cromatidi non fratelli durante la profase meiotica, che dà origine a combinazioni ricombinanti (non parentali) dei geni concatenati.



Questo è l'unico momento in cui i due cromatidi fratelli sono diversi!

Associazione genica

I geni che si trovano sullo stesso cromosoma vengono definiti associati o concatenati.

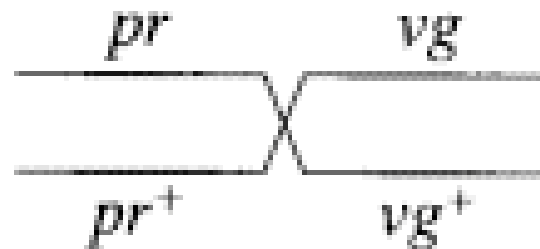
pr^-	vg^-
pr^+	vg^+

accoppiamento



pr^-	vg^+
pr^+	vg^-

repulsione



Il *crossing over* è un evento comunque raro, quindi solo una parte degli omologhi ricombina; questo spiega perché prevalgono i cromosomi parentali.

Il test cross

L'incrocio con l'omozigote recessivo (test cross) consente di analizzare la meiosi di un solo genitore.

$$pr^-pr^- \quad vg^-vg^- \times pr^+pr^+ \quad vg^+vg^+$$



F₁

$$pr^-pr^+ \quad vg^-vg^+ \times pr^-pr^- \quad vg^-vg^-$$

$$pr^+ \quad vg^+ \quad 1339$$

$$pr^- \quad vg^- \quad 1195$$

$$pr^+ \quad vg^- \quad 151$$

$$pr^- \quad vg^+ \quad 154$$

$$\text{Totale} \quad 2839$$

Associazione genica

I ricombinanti si possono generare quindi:

- ✓ in conseguenza dell'assortimento indipendente
- ✓ in seguito a *crossing over*

Geni indipendenti e geni associati

AaBbx aabb	AB	25%	AaBbx aabb	AB	35%
	Ab	25%		Ab	15%
A e B sono geni indipendenti	aB	25%	A e B sono geni associati	aB	15%
	ab	25%		ab	35%

L'associazione dei geni sull'X

P $y^- w^+ / y^- w^+ \times y^+ w^- / Y$

F1

$y^- w^+ / y^+ w^- \times y^- w^+ / Y$

non serve il reincrocio con
l'omozigote recessivo

si considera solo la
progenie maschile

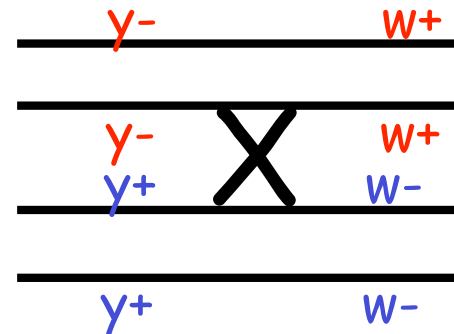
maschi:

$y^- w^-$ 43 ricombinanti

$y^+ w^-$ 2146 parentali

$y^- w^+$ 2302 parentali

$y^+ w^+$ 22 ricombinanti

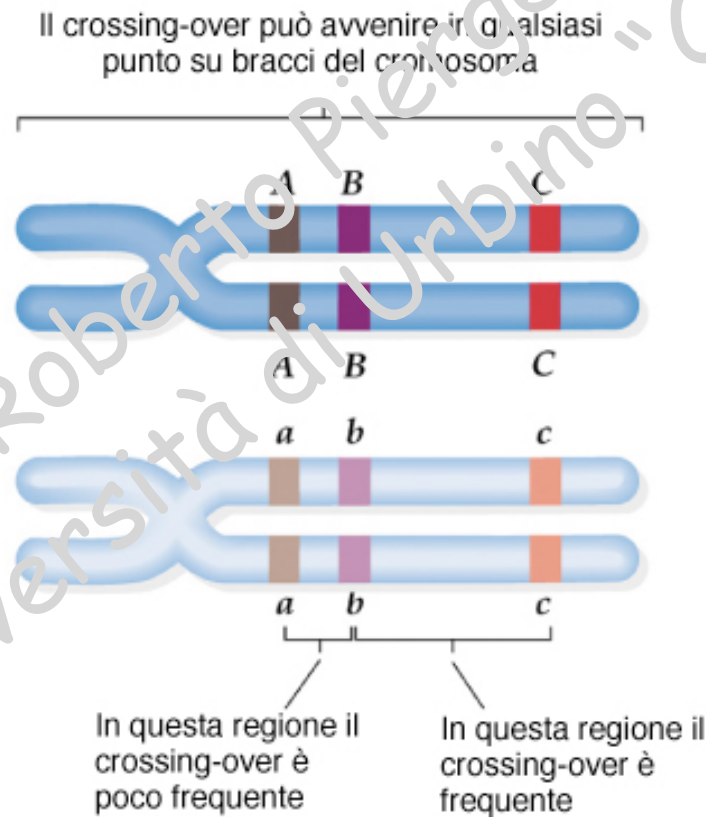


La distanza di mappa

Morgan osservò che le frequenze dei ricombinanti variavano per differenti coppie di geni considerati; dedusse pertanto che la frequenza dei ricombinanti riflettesse l'effettiva distanza dei geni.

Figura 13.6

Relazione tra crossing-over e distanza di mappa. Quanto più due geni sono distanti, tanto maggiore è il numero di possibili siti per il crossing-over. Quindi, la probabilità che un crossing-over avvenga tra i geni *A* e *B* è molto inferiore a quella tra i geni *B* e *C*. La frequenza di ricombinazione può fornire informazioni sulla distanza genetica relativa tra due geni concatenati.



Definizione della distanza di mappa

Sturtevant elaborò un metodo per calcolare la distanza dei geni associati: propose di utilizzare la percentuale di ricombinanti come indice della distanza tra due coppie di geni in una mappa genetica.

La distanza di mappa viene misurata in unità di mappa (um) o centimorgan (cM).

Una unità di mappa corrisponde ad una frequenza di ricombinazione dell'1%.



A. H. Sturtevant

Calcolo della distanza di mappa

Distanza di mappa = frequenza di ricombinazione X 100

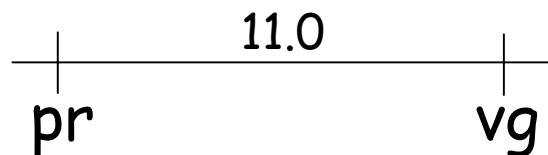
Frequenza di ricombinazione = $\frac{\text{numero dei ricombinanti}}{\text{numero totale della progenie}}$

Esempio di calcolo della distanza di mappa

$$pr^- vg^- / pr^+ vg^+ \quad \times \quad pr^- vg^- / pr^- vg^-$$

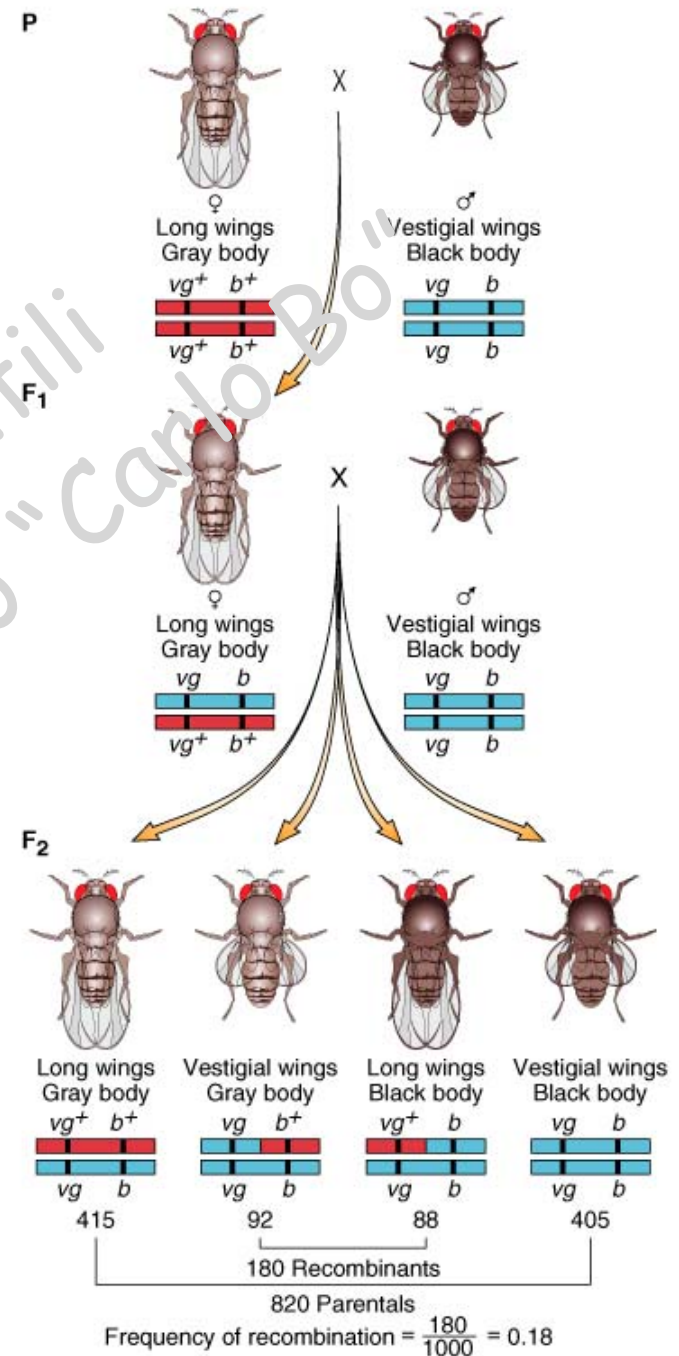
$pr^- vg^- / pr^- vg^-$	165	parentali
$pr^+ vg^+ / pr^- vg^-$	191	
$pr^- vg^+ / pr^- vg^-$	23	ricombinanti
$pr^+ vg^- / pr^- vg^-$	21	
	400	

$$d_{pr/vg} = (23+21)/400 \times 100 = 0.11 \times 100 = 11 \text{ um}$$



La mappa è la percentuale di ricombinanti

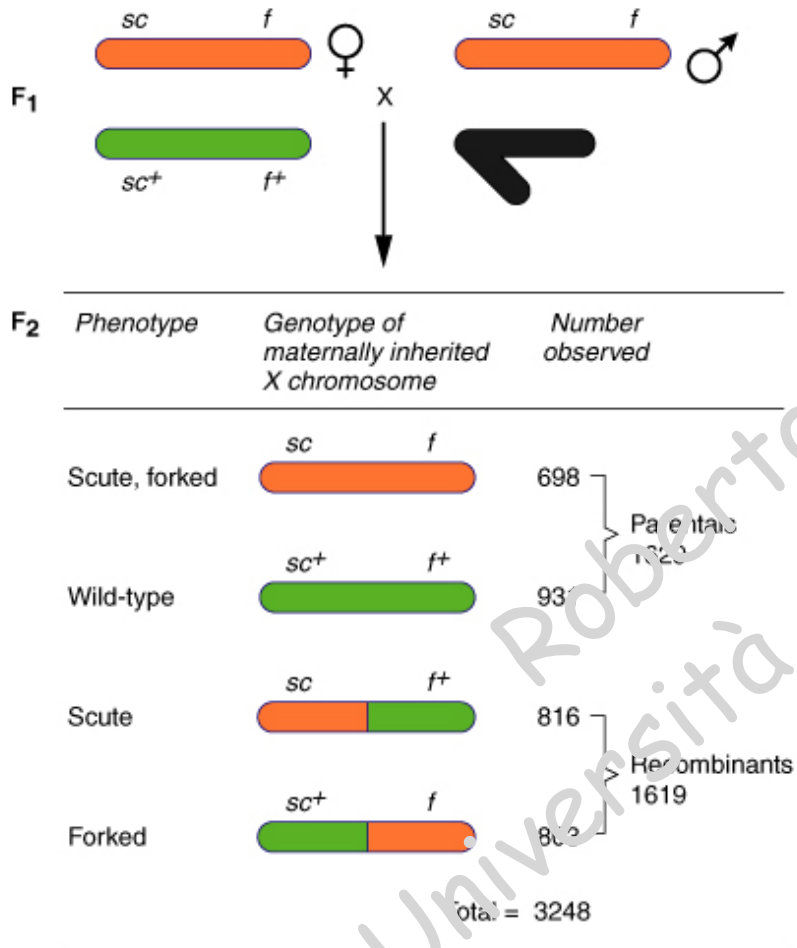
Una unità di mappa corrisponde alla frequenza di ricombinazione dell'uno per cento; nell'esempio a lato, significa che il 18% della progenie sarà ricombinante, ovvero che i ricombinanti saranno per il 9% vg^+, b^- e per il 9% vg^-, b^+ . Analogamente, i parentali (82%) saranno per il 41% vg^+, b^+ e per il 41% vg^-, b^- .



Associazione a due punti

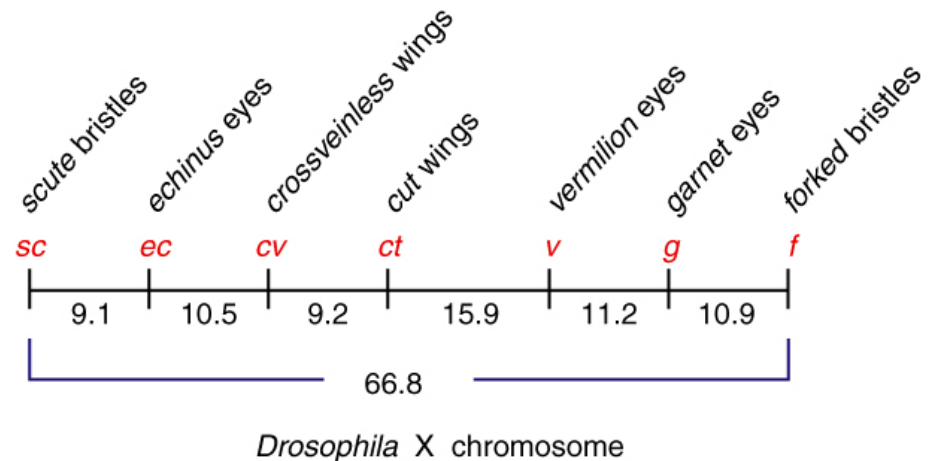
Se in un reincrocio si osserva una frequenza di ricombinazione del **50%**, si può inferire che i due geni assortiscono in modo indipendente. Questo è dovuto o a geni effettivamente indipendenti, o a geni associati, ma così distanti tra loro che la probabilità che avvenga almeno un *crossing over* tra loro, ad ogni meiosi, è molto elevata.

Mappe sull'X



Percent recombination = $\frac{1619}{3248} \times 100\% = 50\%$ Not equal
 Map distance = 66.8 centiMorgans

Le mappe sul cromosoma X sono del tutto simili a quelle autosomiche, soltanto per il reincrocio si usa il maschio **emizigote**.

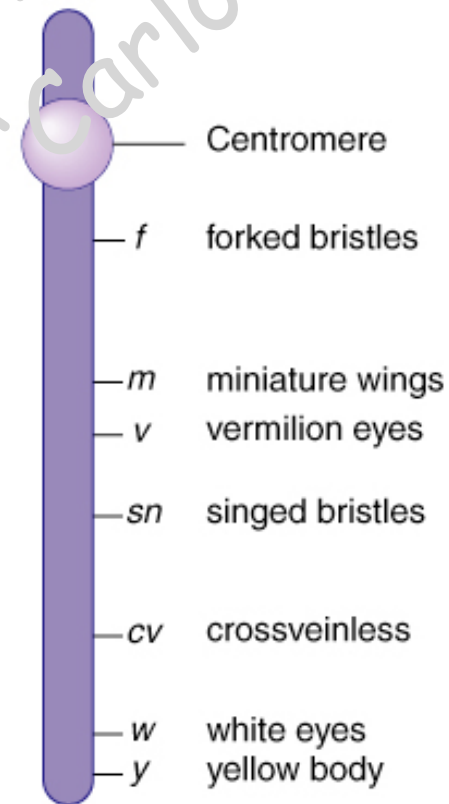


Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Notare che la **somma** delle mappe **parziali** può essere superiore a 50cM!

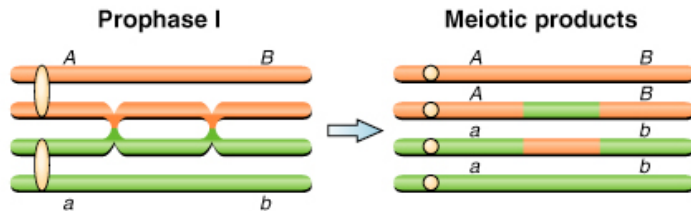
Mappa di geni a coppie

Considerando i geni a due a due, è possibile costruire mappe di associazione con le posizioni **relative** dei geni. Esistono però metodi più veloci...

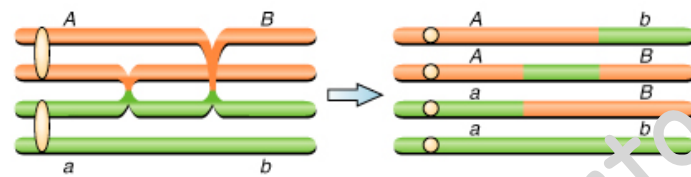


Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

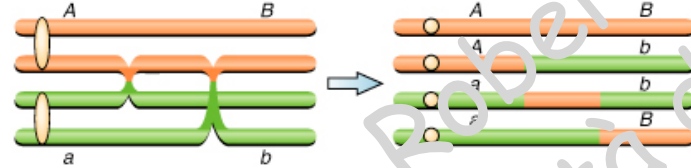
I *crossing over* multipli



(a) Two-strand double crossovers produce all parental chromosomes.

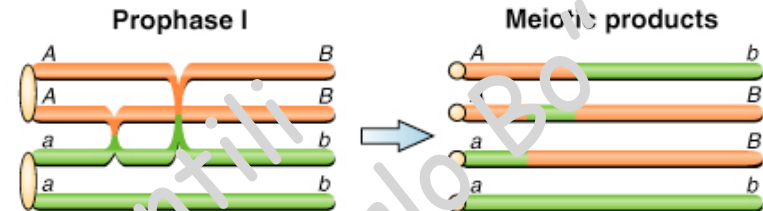


(b) Three-strand double crossovers produce half parental, half recombinant chromosomes.

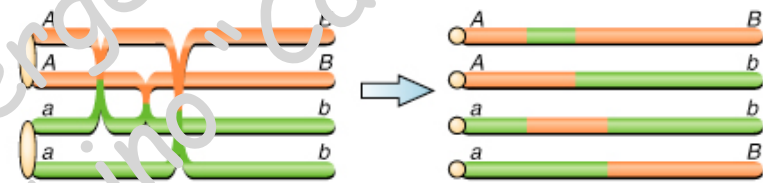


(c) Four-strand double crossovers produce all recombinant chromosomes.

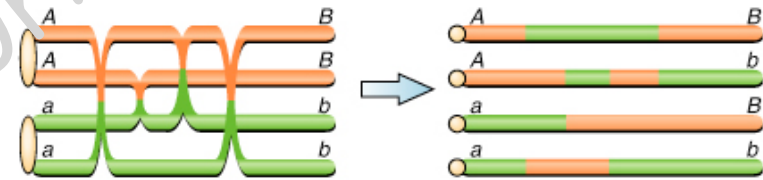
Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.



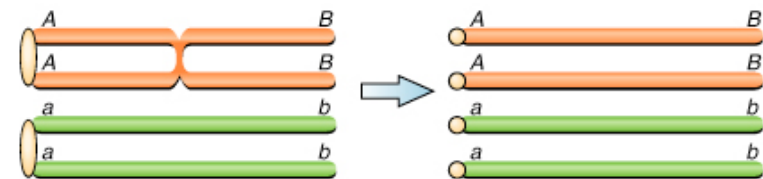
(a) A double crossover



(b) A triple crossover



(c) A quadruple crossover



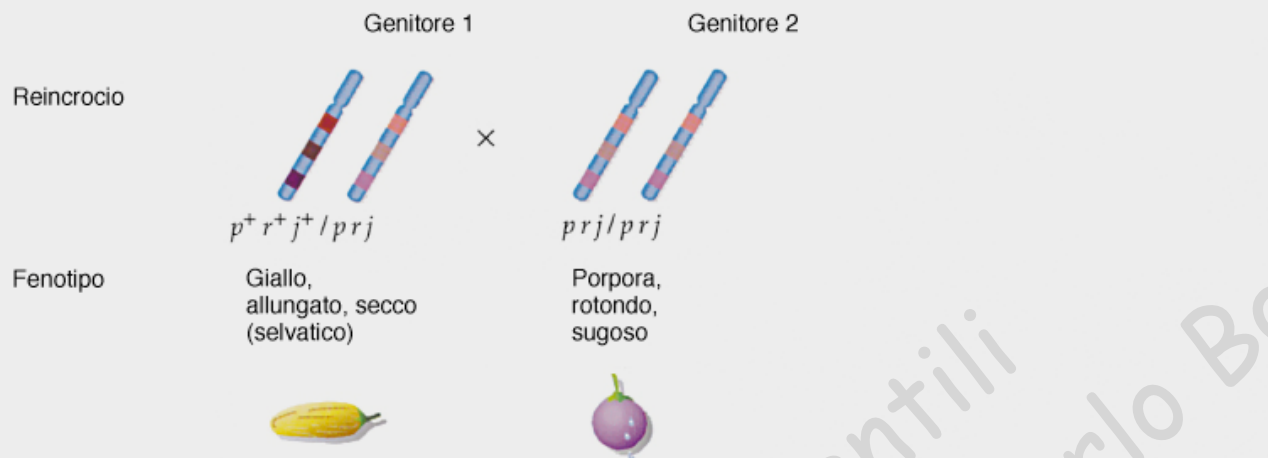
(d) A crossover between sister chromatids

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Maggiore è il numero dei crossing over, minore è la probabilità che avvengano!

Il saggio a tre punti

Il saggio a tre punti permette di determinare l'ordine di tre geni sul cromosoma e le distanze di mappa.



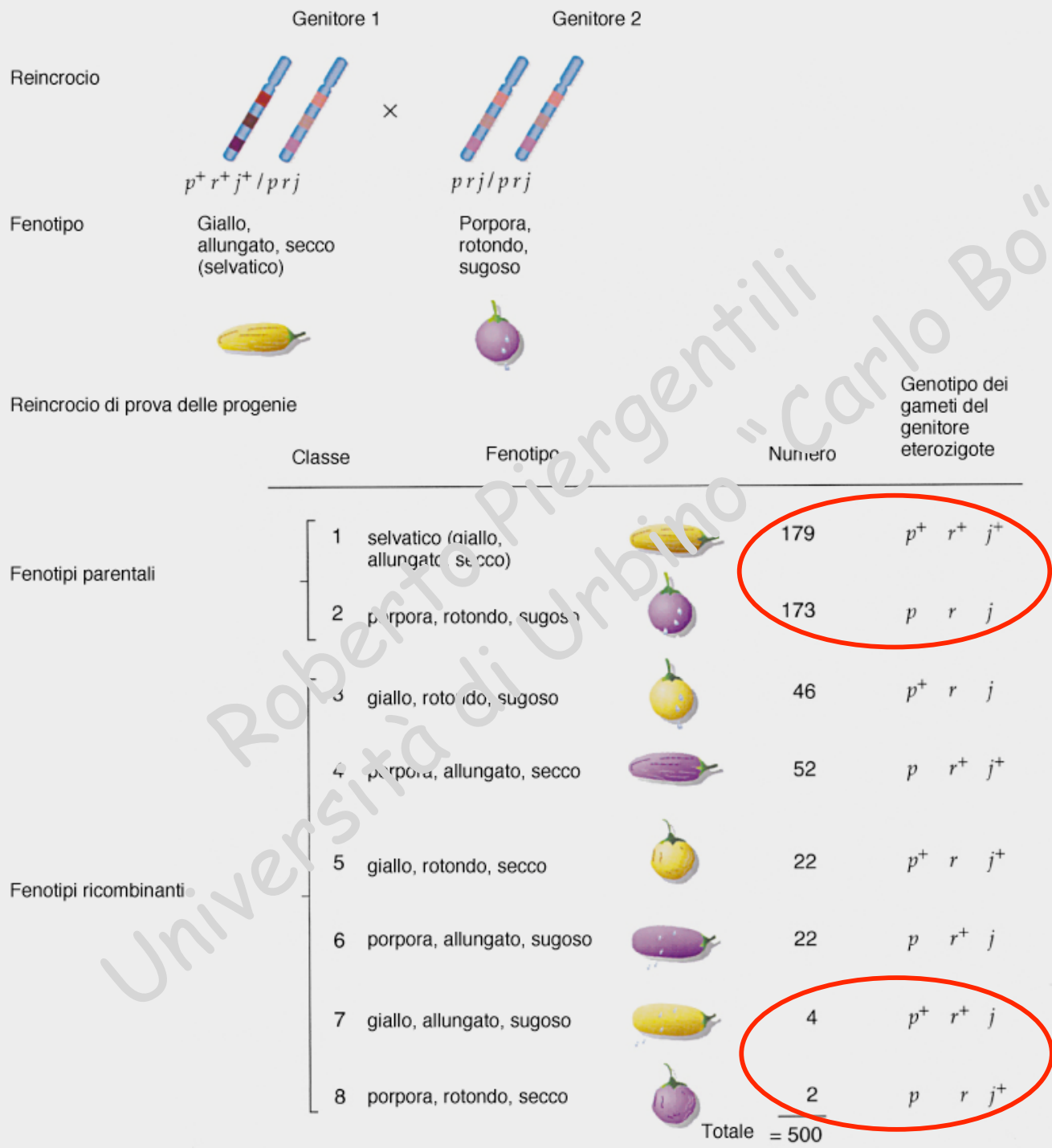
Reincrocio di prova delle progenie

Classe	Fenotipo	Numero	Genotipo dei gameti del genitore eterozigote
Fenotipi parentali	1 selvatico (giallo, allungato, secco)	179	$p^+ r^+ j^+$
	2 porpora, rotondo, sugoso	173	$p r j$
	3 giallo, rotondo, sugoso	46	$p^+ r j$
	4 porpora, allungato, secco	52	$p r^+ j^+$
Fenotipi ricombinanti	5 giallo, rotondo, secco	22	$p^+ r j^+$
	6 porpora, allungato, sugoso	22	$p r^+ j$
	7 giallo, allungato, sugoso	4	$p^+ r^+ j$
	8 porpora, rotondo, secco	2	$p r j^+$
		Totale = 500	

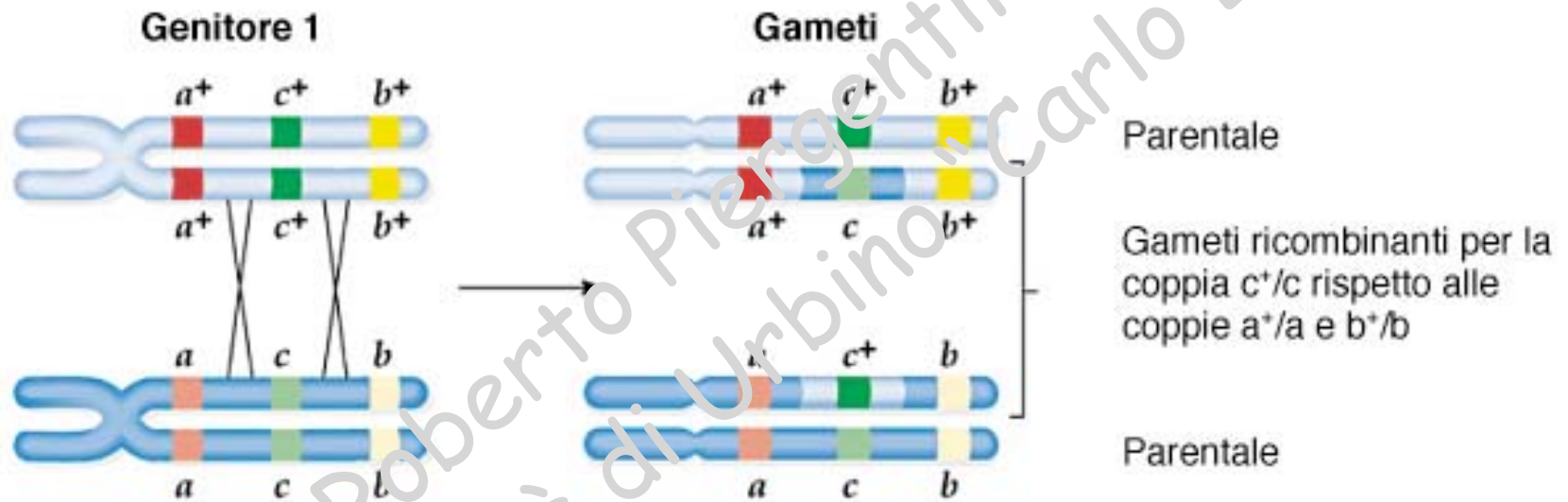
Stabilire l'ordine dei geni

Come si stabilisce l'ordine dei geni?

1. Determinare la disposizione degli alleli nei genitori esaminando le classi **parentali** (quelle che mostrano frequenza più alta);
2. identificare le classi di progenie derivanti da **doppi crossing over** (quelle che mostrano frequenza più bassa);
3. stabilire l'ordine dei geni sul cromosoma in base alla disposizione degli alleli nelle classi dei doppi *crossing over*, paragonati ai parentali.

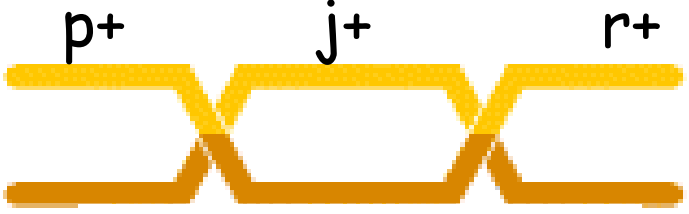
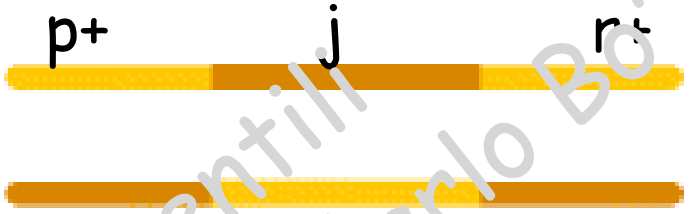
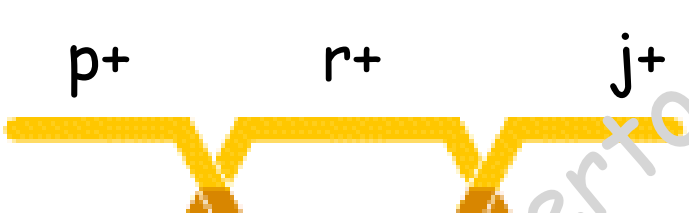

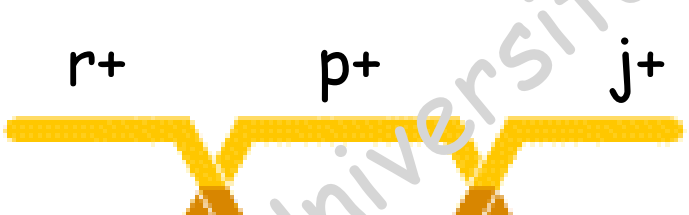
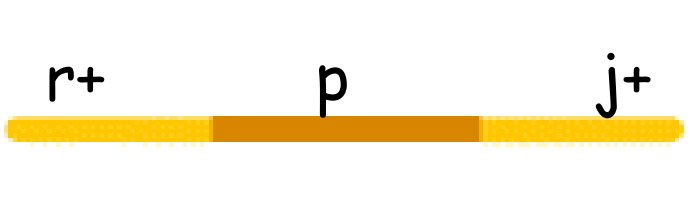


Che cos'è un doppio *crossing over*?



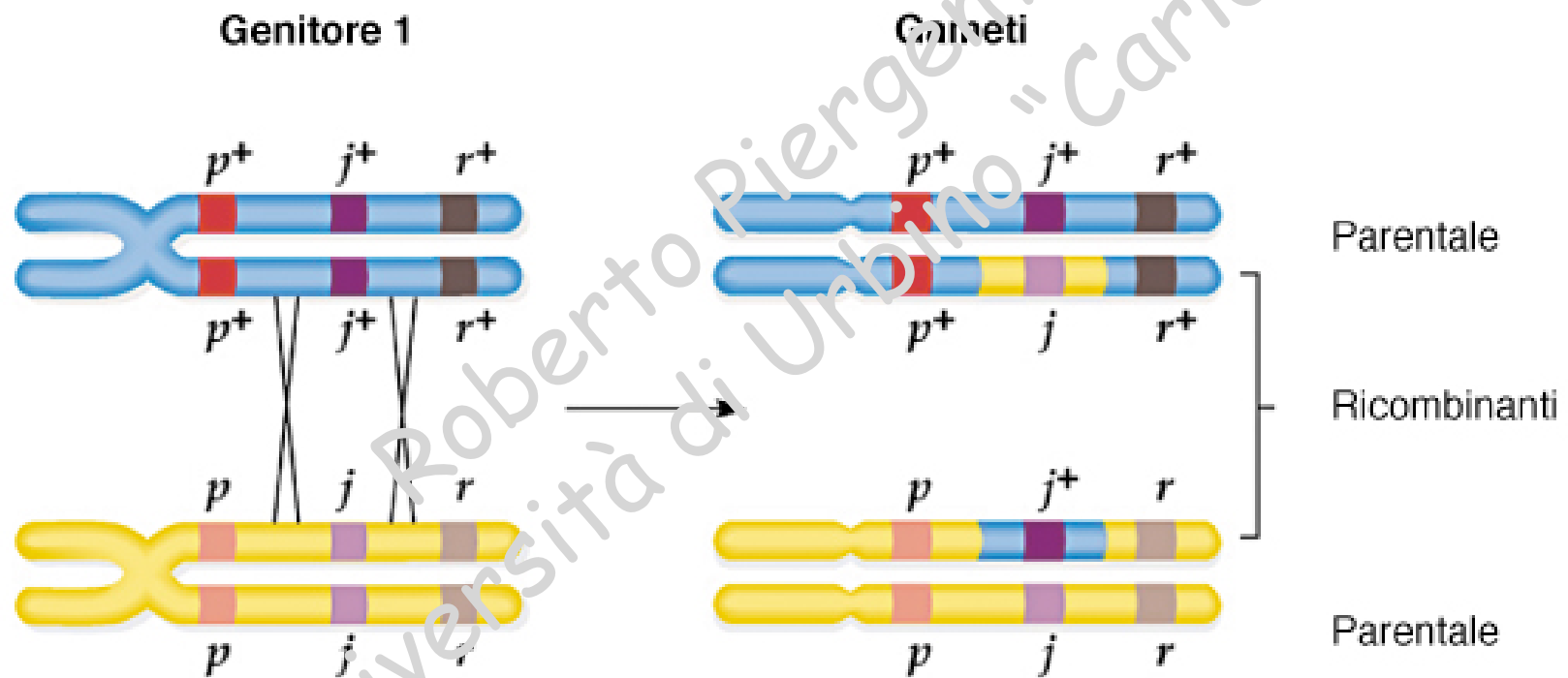
Conseguenze di un doppio *crossing-over* in un triplo eterozigote per tre geni concatenati. Nel doppio *crossing-over*, la coppia di alleli centrali viene scambiata rispetto alle due coppie di alleli esterni.

L'esame dei doppi *crossing over* permette di dedurre quale gene si trova **in mezzo**: il gene in mezzo si sposta!

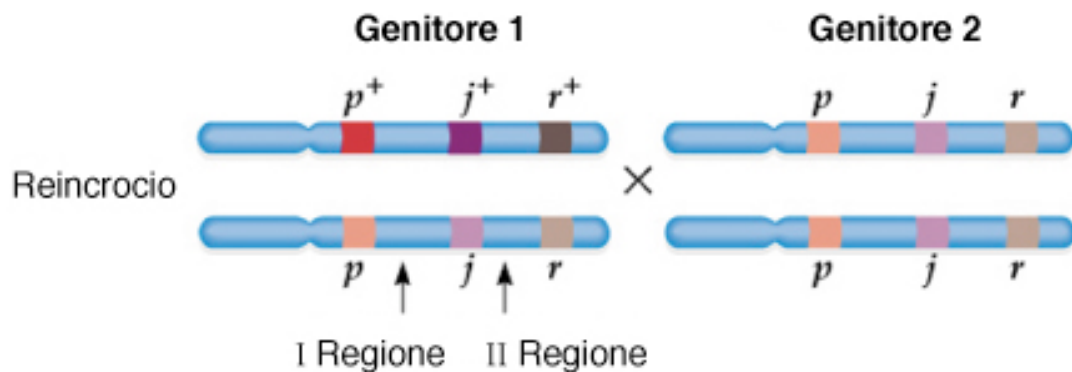
possibile ordine genico	cromatidi doppi ricombinanti
<p>p+ j+ r+</p>  <p>p j r</p>	<p>p+ j r+</p>  <p>p j+ r</p>
<p>p+ r+ j+</p>  <p>p r j</p>	<p>p+ r j+</p>  <p>p r+ j</p>
<p>r+ p+ j+</p>  <p>r p j</p>	<p>r+ p j+</p>  <p>r p+ j</p>



L'ordine dei geni



Doppio crossing-over nel genitore eterozigote



Progenie del reincrocio di prova

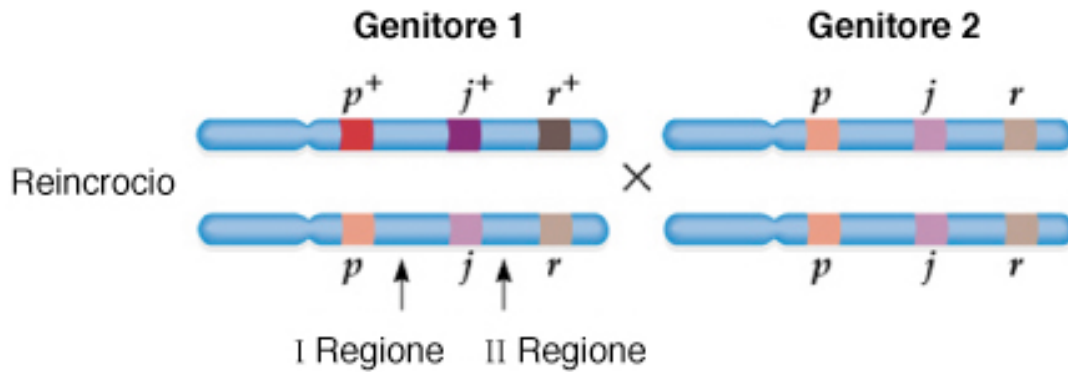
Classe	Genotipo dei gameti del genitore eterozigote	Numero	Origine
1	$p^+ \quad j^+ \quad r^+$	179	Parentali, nessun crossing-over
2	$p \quad j \quad r$	173	
3	$p^+ \quad j \quad r$	52	Ricombinanti, singolo crossing-over nella I regione
4	$p \quad j^+ \quad r^+$	46	
5	$p^+ \quad j^+ \quad r$	22	Ricombinanti, singolo crossing-over nella II regione
6	$p \quad j \quad r^+$	22	
7	$p^+ \quad j \quad r^+$	4	Ricombinanti, doppio crossing-over
8	$p \quad j^+ \quad r$	2	
Totale =		500	

Calcolo delle distanze di mappa

$$d_{p-j} = \frac{(52+46+4+2)}{500} \times 100 = 20,8 \text{ um}$$

$$d_{j-r} = \frac{(22+22+4+2)}{500} \times 100 = 10 \text{ um}$$

$$d_{p-r} \text{ attesa: } 20,8+10=30,8$$



Calcolo della
distanza tra p
ed r ignorando j

Progenie del reincrocio di prova

Classe	Genotipo dei gameti del genitore eterozigote	Numero	Origine
1	$p^+ j^+ r^+$	179	Parentali, nessun crossing-over
2	$p j r$	173	
3	$p^+ j r$	52	Ricombinanti, singolo crossing-over nella I regione
4	$p j^+ r^+$	46	
5	$p^+ j^+ r$	22	Ricombinanti, singolo crossing-over nella II regione
6	$p j r^+$	22	
7	$p^+ j r^+$	4	Ricombinanti, doppio crossing-over
8	$p j^+ r$	2	
		Totale = 500	

~~$$d_{p-j} = \frac{(52+46+22+22) \times 100}{500} = 28,4\mu\text{m}$$~~

$$d_{p-j} = \frac{(52+46+22+22+4+2+4+2) \times 100}{500}$$



30,8μm (20,8+10)

bisogna aggiungere due
volte i doppi scambi

Interferenza e coefficiente di coincidenza

In alcuni casi la frequenza dei doppi scambi osservata è inferiore a quella attesa. Questo perché a volte, per vari motivi (struttura tridimensionale del cromosoma, ingombro dei complessi proteici coinvolti nella ricombinazione, ecc.) l'avvenire di un *crossing over* in una zona cromosomica **interferisce** con il fatto che esso avvenga anche nelle zone immediatamente adiacenti; posso quindi misurare quanto dati attesi e osservati **coincidano**.

Interferenza (I) = 1 - coefficiente di coincidenza

Coefficiente di coincidenza (cc) = $\frac{\text{frequenza dei doppi scambi osservati}}{\text{frequenza dei doppi scambi attesi}}$

Quindi

- doppi scambi osservati = attesi

$$c.c. = 1 \longrightarrow I = 0$$

- doppi scambi osservati < attesi

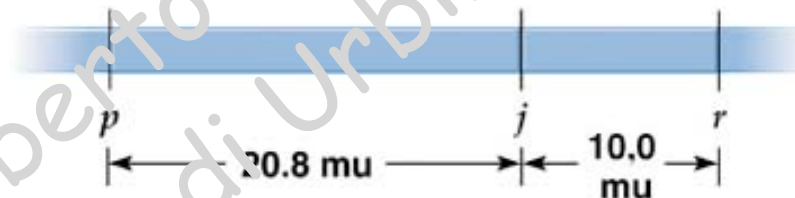
$$c.c. < 1 \longrightarrow I > 0$$

Calcolo della frequenza dei doppi scambi attesi

distanza di mappa della regione I \times distanza di mappa regione II

100 100

es:



Doppi scambi attesi: $0.208 \times 0.100 = 0.0208$

Doppi scambi osservati: $6/500 = 0.012$

$$cc = 0.012 / 0.0208 = 0.577$$

$$I = 1 - 0.577 = 0.423$$

NB: avrei ottenuto lo stesso risultato anche facendo il rapporto tra numeri anziché tra percentuali.

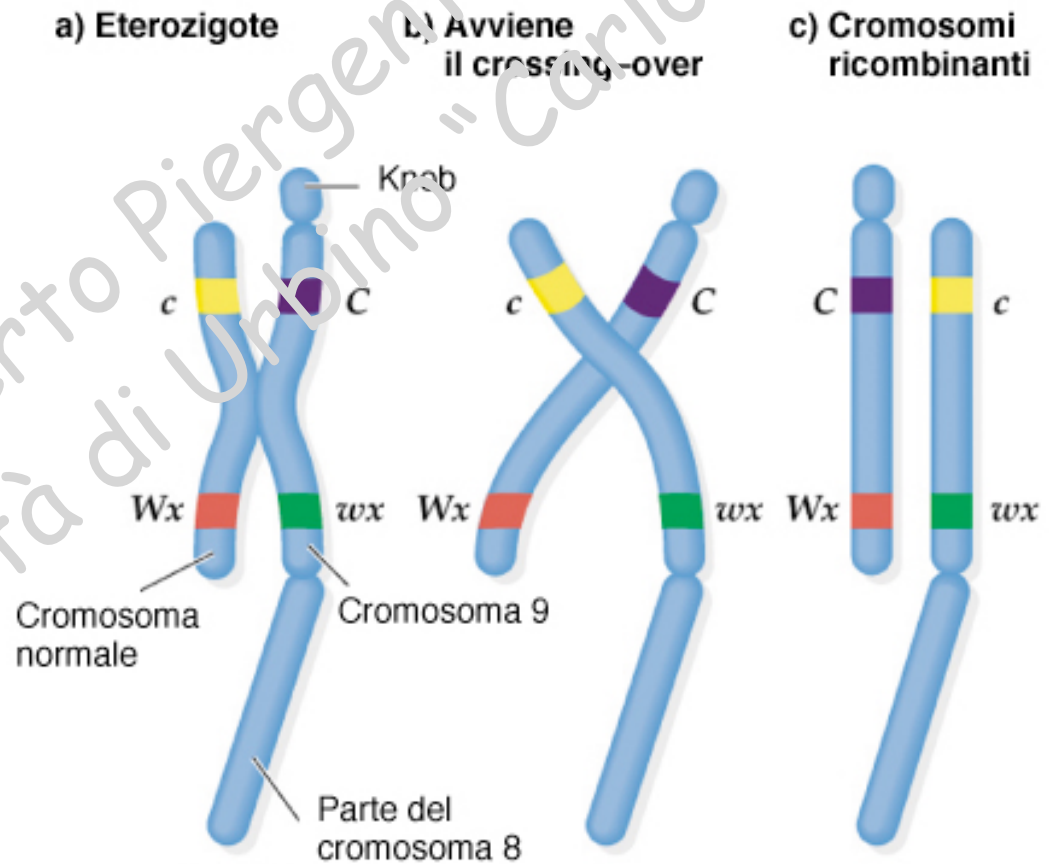
Creighton e McClintock (1931)



Barbara McClintock e Harriet Creighton

Figura 13.3

Dimostrazione dell'associazione tra ricombinazione genica e scambio cromosomico nel granturco. (a) Costituzione fisica e genetica dei due cromosomi nell'eterozigote; (b) avviene il crossing-over; (c) costituzione fisica e genetica dei cromosomi ricombinanti.

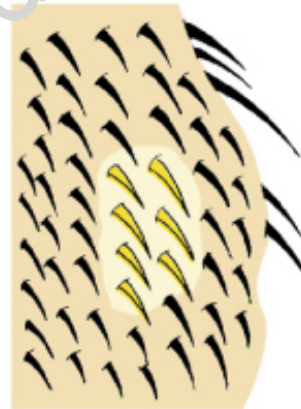


La ricombinazione mitotica

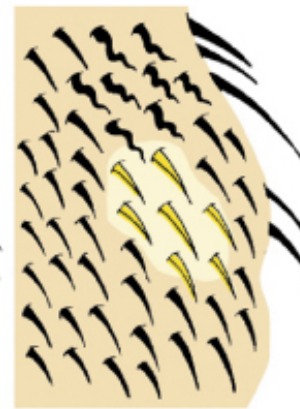


Nel 1936 Curt Stern, lavorando su *Drosophila*, si accorse che anche i cromosomi mitotici, occasionalmente, possono ricombinare, anche se in cellule mitotiche di norma non c'è appaiamento tra omologhi.

a) Singola macchia gialla



b) Macchie gemelle



c) Singola macchia singed

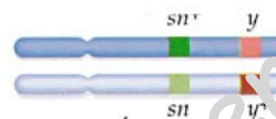


Il sistema analizzato da Stern

Figura 13.23

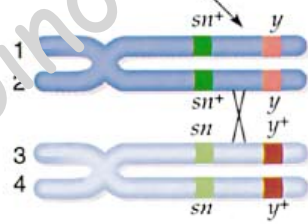
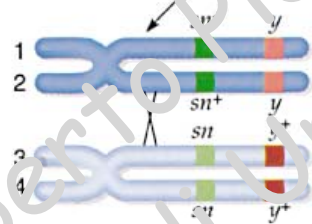
Produzione, mediante crossing-over mitotico di macchie gemelle e della singola macchia gialla mostrate in Figura 13.22.

Diploide selvatico eterozigote per *y* ed *sn*

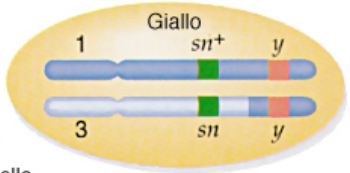
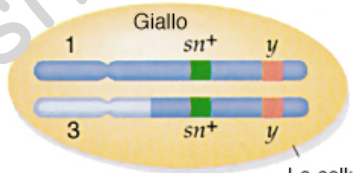


Crossing-over mitotico fra il centromero ed il locus *sn*

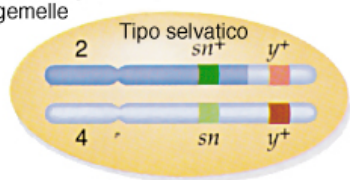
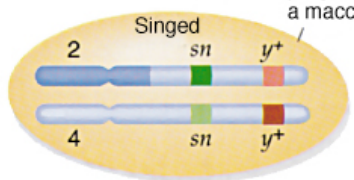
Crossing-over mitotico fra i loci *sn* e *y*



Segregazione dei cromatidi 1 e 3 in uno dei nuclei figli e dei cromatidi 2 e 4 nell'altro nucleo figlio



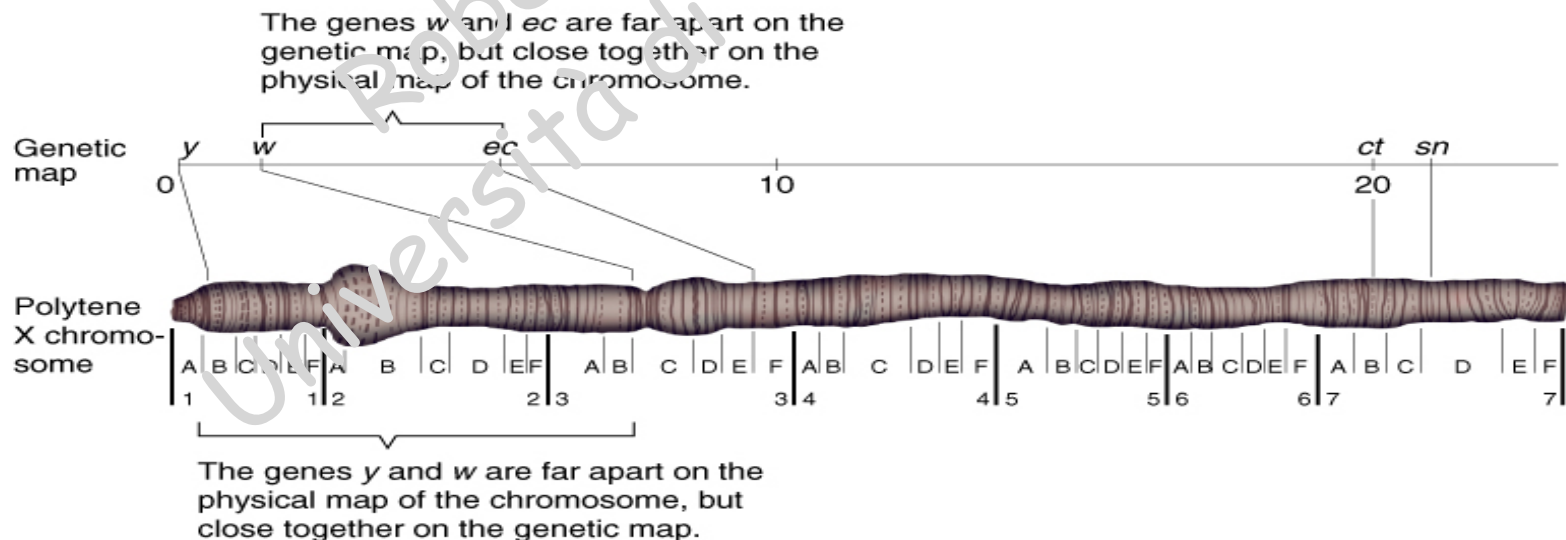
Le cellule della progenie danno luogo a singole macchie gialle



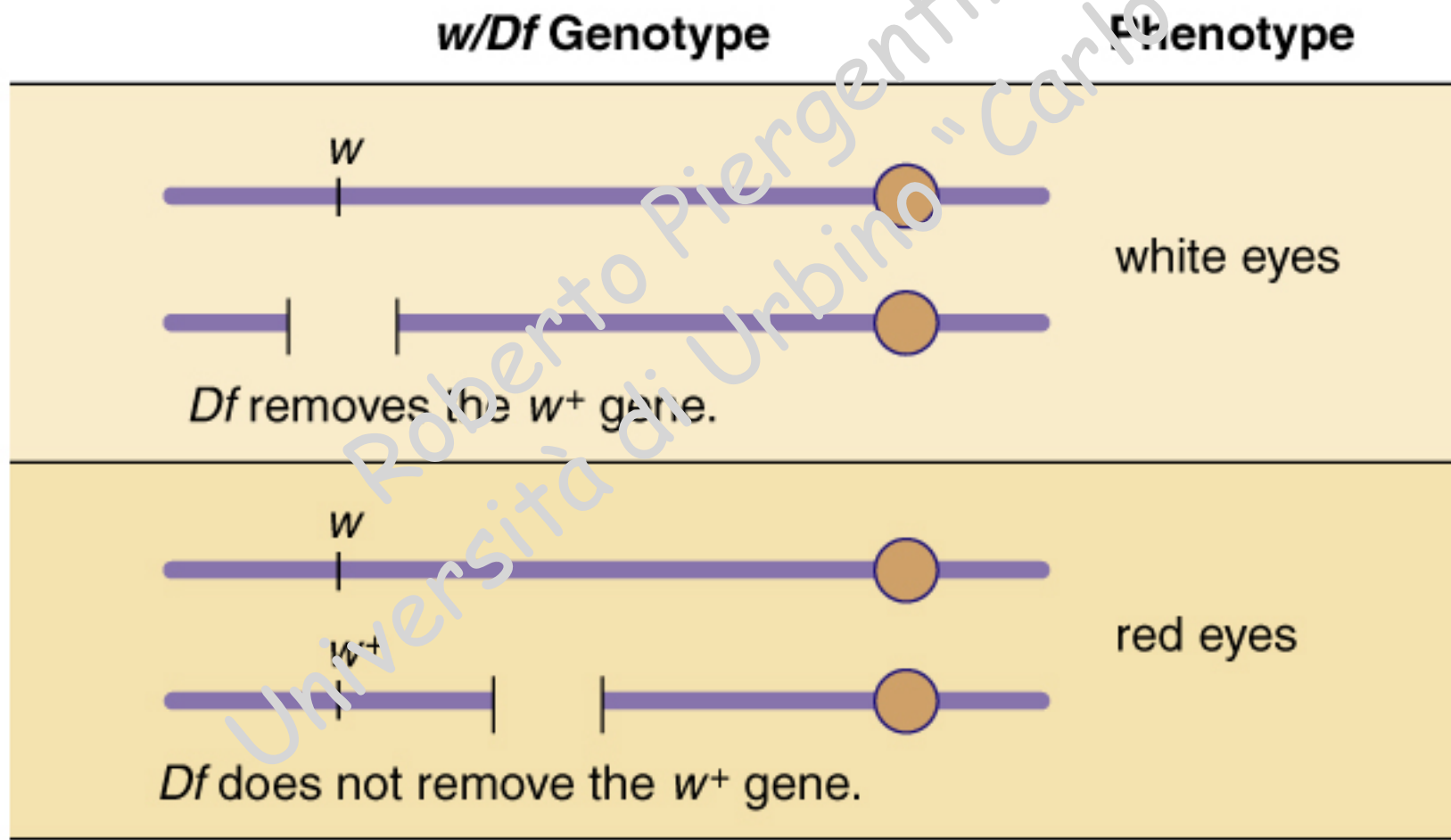
Le cellule della progenie danno luogo a macchie gemelle

La mappa per delezione

Alcuni cromosomi possono perdere parte della loro informazione e quindi essere deleti. Se la delezione è sufficientemente grande, è possibile valutarne l'estensione a livello cromosomico ed eventualmente mapparla in base a parametri prefissati (per es., il bandeggio naturale dei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*). In questo caso è possibile paragonare mappa statistica (genetica) e mappa citologica. Come?



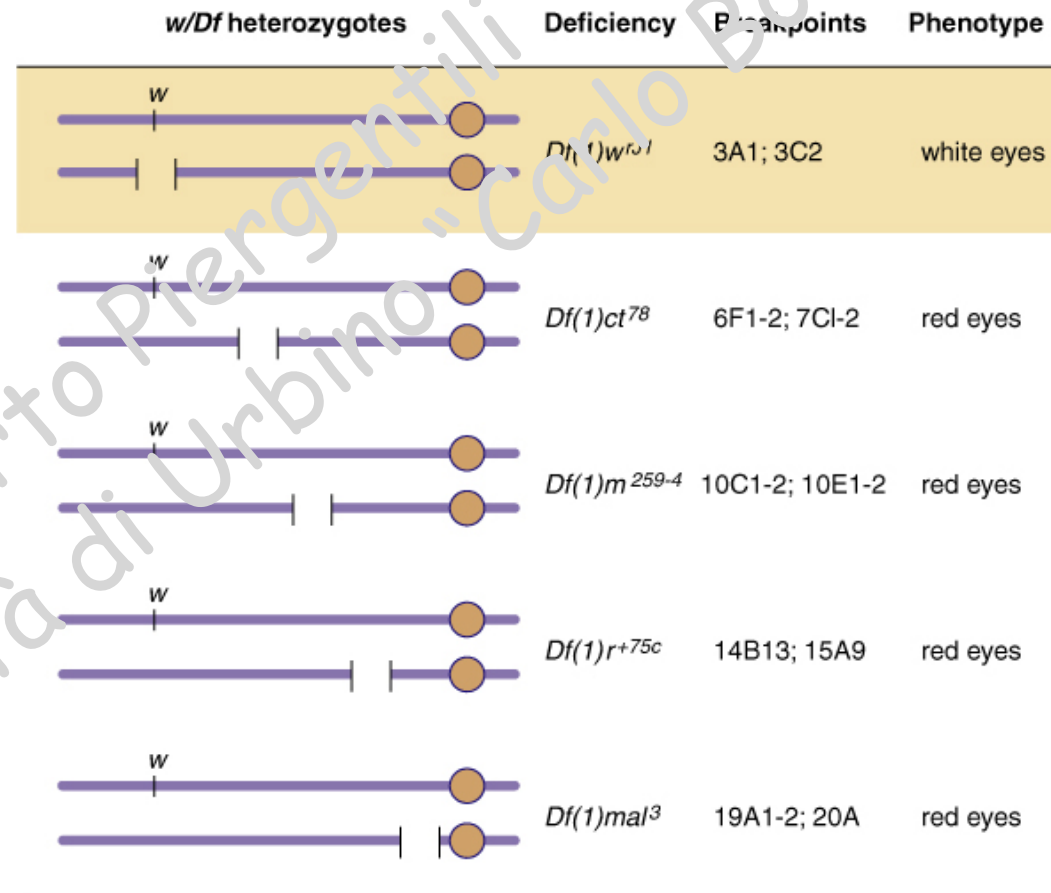
La complementazione su delezione



La mappa per delezione

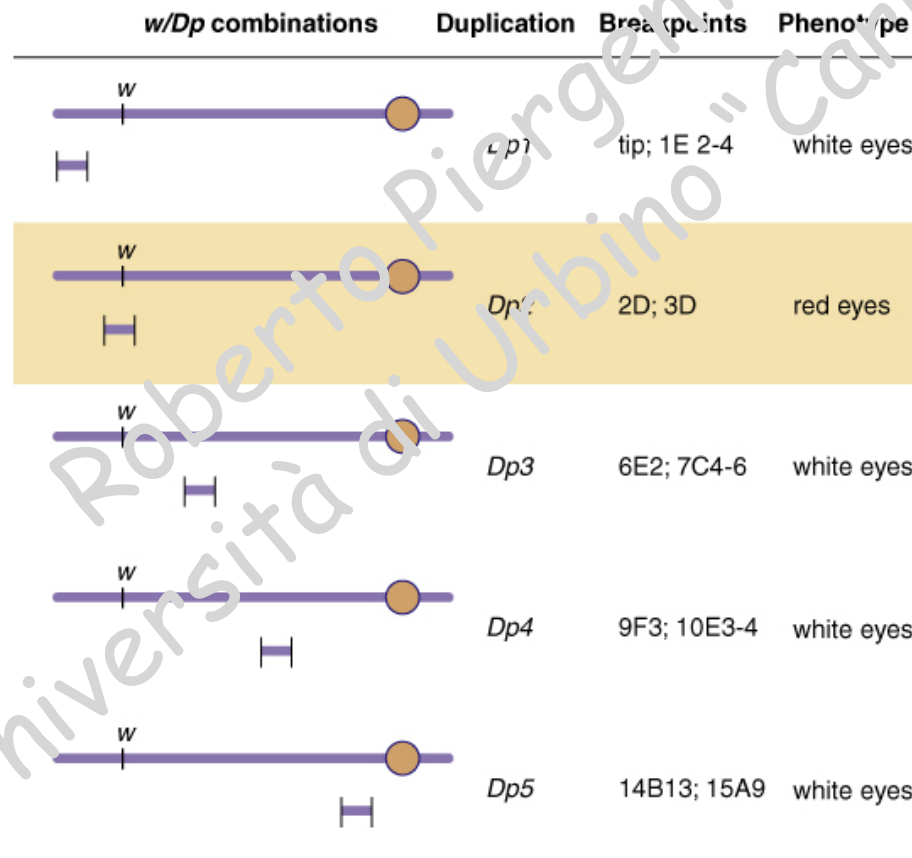
Test di complementazione con cromosomi deleti, di cui è nota l'estensione di ciascuna delezione a livello citologico, danno la possibilità di mappare un gene.

Nell'esempio a lato, ciò ha reso possibile mappare il gene *white* di *Drosophila* in posizione 3A1-3C2 della mappa citologica.



The mutant eye color observed with *Df(1)w^{rJ1}* indicates that the *white* gene is between the deficiency breakpoints in bands 3A1 and 3C2 on the X chromosome.

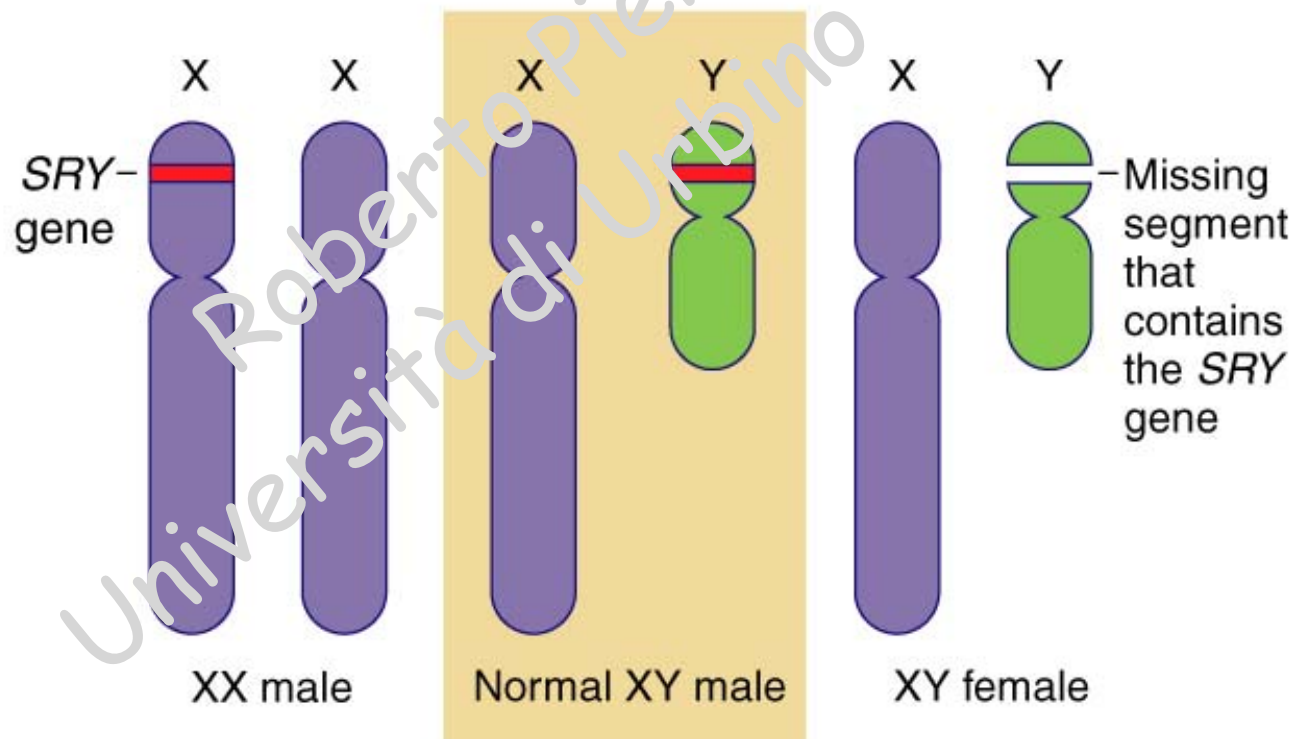
La mappa per duplicazione funziona in maniera analoga



The wild-type eye color observed with *Dp2* indicates that the *white* gene is between the duplication breakpoints in regions 2D and 3D on the X chromosome.

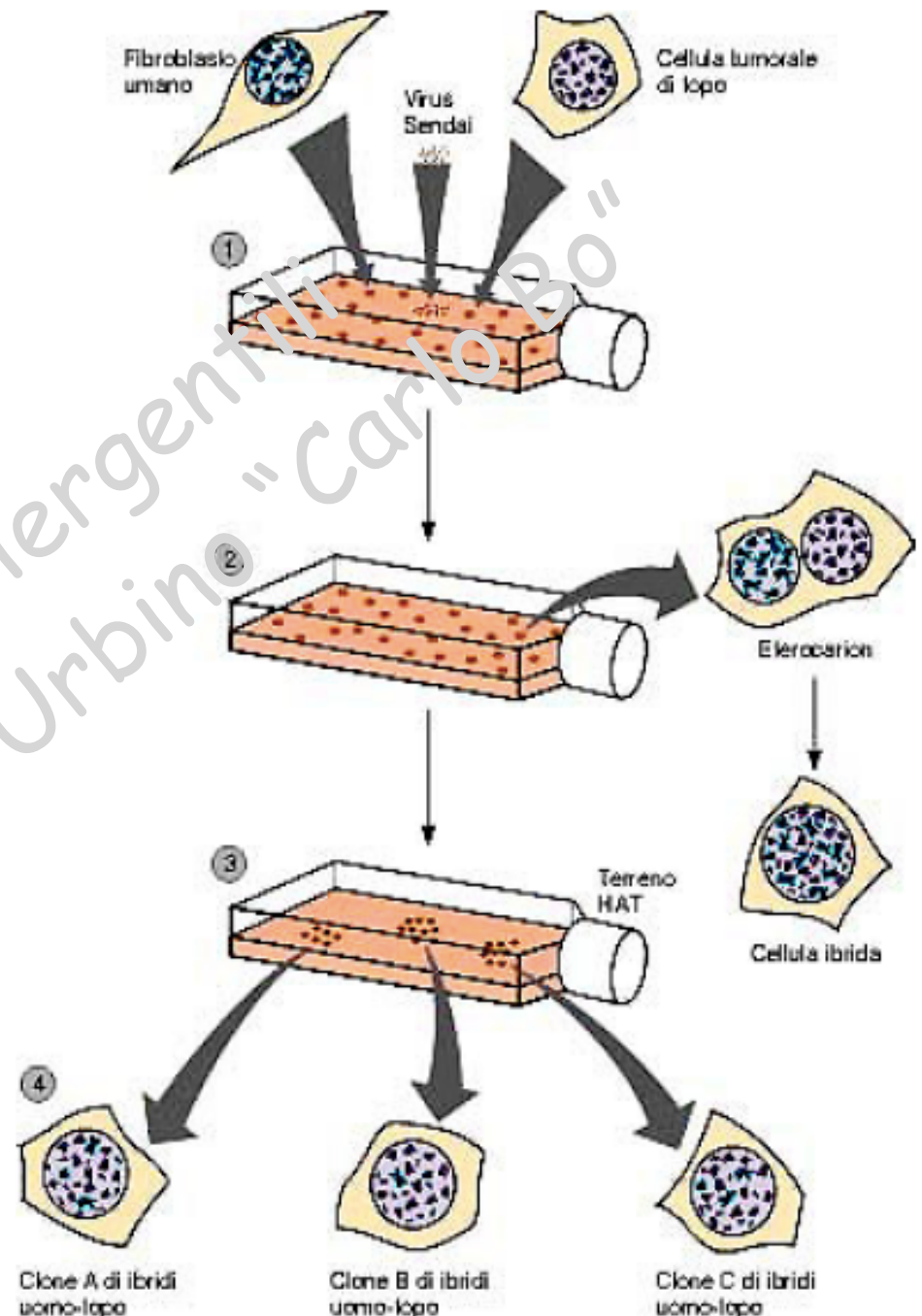
Mappa dei cromosomi umani

Poiché (per ovvie ragioni) è complicato fare una mappa genetica dei cromosomi umani, la mappa citologica (e quella molecolare) rappresentano dei buoni strumenti per mappare i geni sui cromosomi.



Altre tecniche di mappatura: gli ibridomi

Mediante vari mezzi (per esempio il virus Sendai) si induce la fusione tra cellule di topo e uomo. Gli ibridi ottenuti (ibridomi) vengono seminati su terreno selettivo; le cellule di topo perdono progressivamente i cromosomi umani fino a mantenere almeno quello per cui sono selezionate.



La mappa

Linea ibrida	Cromosomi umani negli ibridi																				Prodotto genico negli ibridi			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	22	X
1		+							+			+					+						+	
2			+								+													-
3		+													+					+				-
4					+		+		+		+						+		+					+
5	+								+	+			+					+						+
6		+																+						-

Se il prodotto genico in una linea ibrida non è presente, **tutti** i cromosomi presenti in quella linea non contengono il gene di interesse; se invece una linea contiene il gene di interesse, allora **almeno uno** dei cromosomi presenti in essa contiene il gene. Dal confronto dei dati, è possibile mappare il gene su un cromosoma (o su parte di esso, se si usano frammenti ottenuti ad esempio con i raggi X). In questo caso il gene è sul cromosoma numero 9!

(cioè quello con lo stesso schema dell'ultima colonna...)