MAPPE CROMOSOMICHE

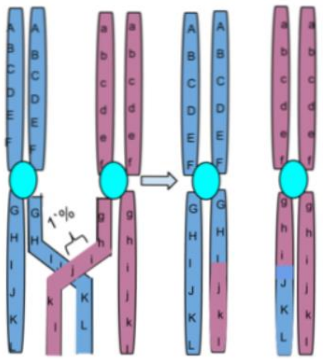
Morgan → Il gene *white* (*Drosophila* occhi bianchi) localizzato sul cromosoma X.

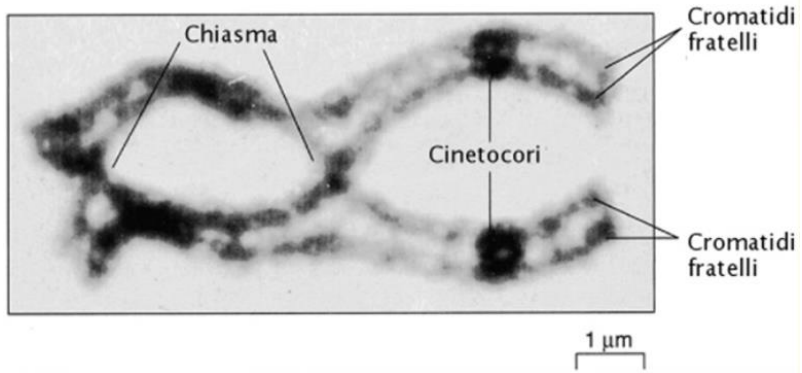
Altri geni sono localizzati sul cromosoma X, in punti particolari (*loci*), secondo una disposizione lineare (modello lineare).

Sturtevant (1911)
Dall'analisi di numerosi incroci con *Drosophila* riuscì a costruire la prima mappa cromosomica.

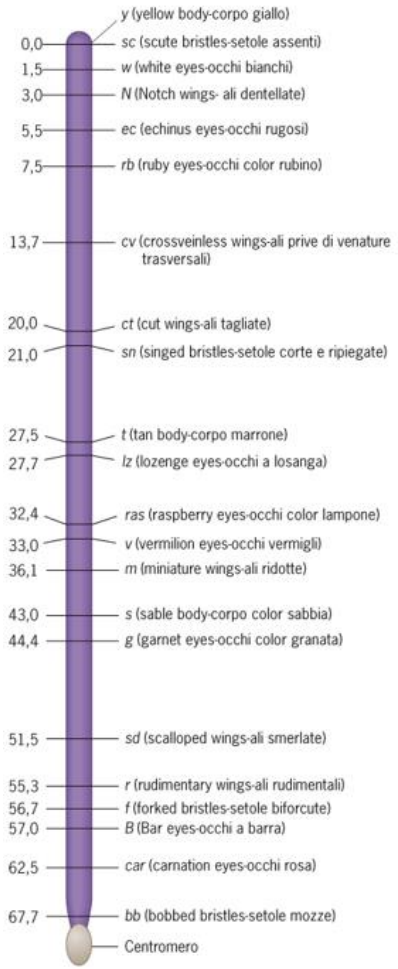
Concatenazione o associazione (linkage)
Geni presenti sullo stesso cromosoma vengono ereditati insieme.

Dati sperimentali, tuttavia, dimostravano anche che geni localizzati sullo stesso cromosoma spesso si separavano durante la meiosi (ricombinazione → scambio di segmenti tra cromosomi omologhi).





Mappa genica sul cromosoma X di *Drosophila*

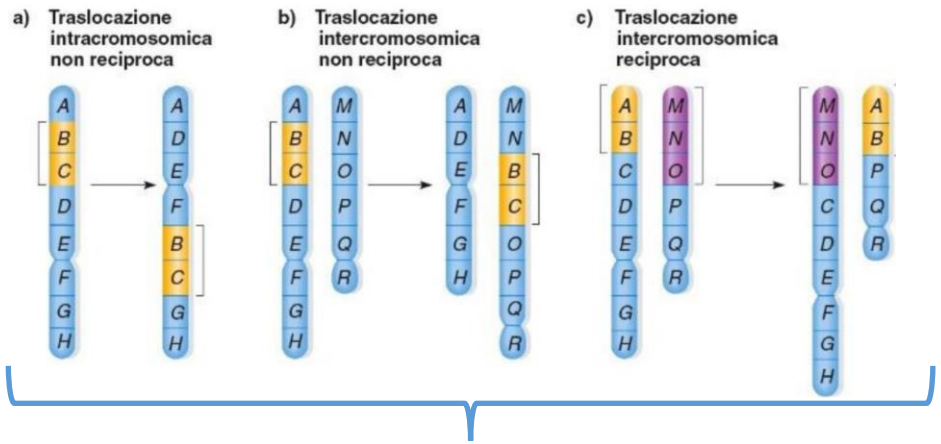


Scambio tra cromosomi confermato da osservazioni citologiche:
formazione di chiasmi in seguito a crossing over.

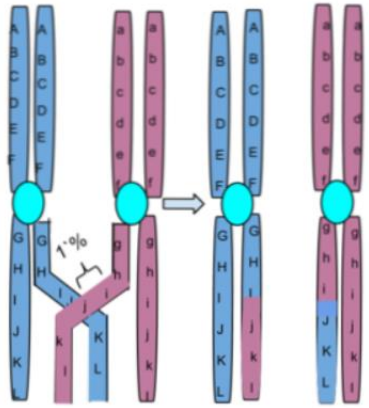
Differenza tra TRASLOCAZIONE e CROSSING OVER nello spostamento di materiale genetico

la **traslocazione** comporta lo spostamento di materiale genetico fra **cromosomi non omologhi** o all'interno **dello stesso cromosoma**.

Il ***crossing over*** comporta lo scambio di segmenti corrispondenti tra **cromosomi omologhi** durante la riproduzione sessuale.



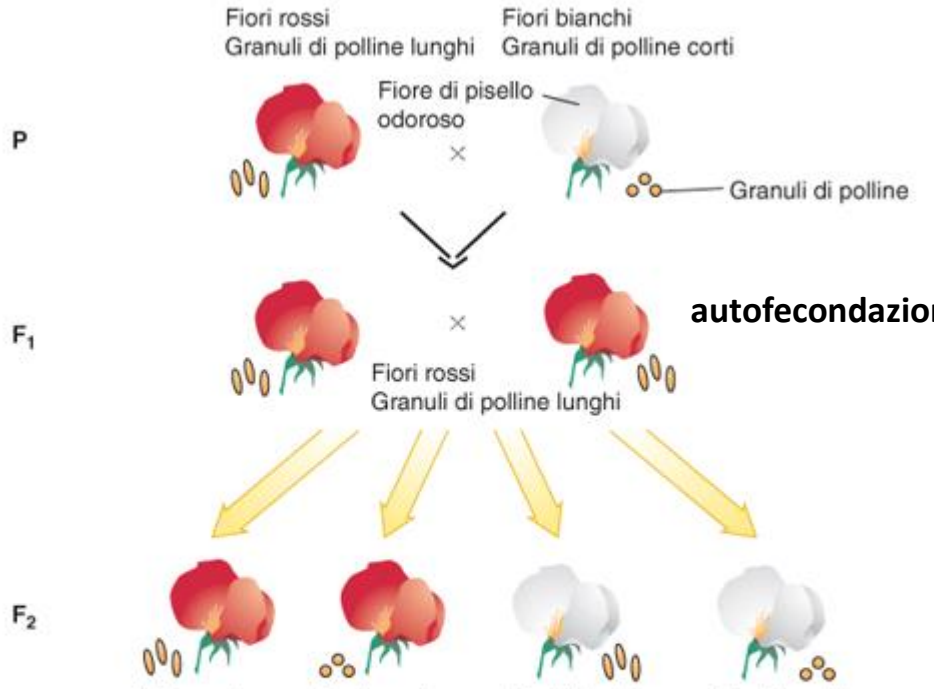
≠



- **Mutazione** (non è un processo normale),
- Anomalia cromosomica,
- Causa cambiamenti nell'informazione genetica,
- Può essere causa di gravi patologie.

- Processo normale durante la meiosi,
- **Non è una mutazione**,
- **Genera nuove combinazioni geniche!**

Prima evidenza di associazione genica → Bateson e Punnett



autofecondazione

803 → 9:3:3:1?

	Fiori rossi Granuli di polline lunghi (Parentale)	Fiori rossi Granuli di polline corti (Ricombinante)	Fiori bianchi Granuli di polline lunghi (Ricombinante)	Fiori bianchi Granuli di polline corti (Parentale)
Osservati	583	26	24	170
Attesi	451,6	150,6	150,6	50,2

← **24,3:1,1:1:7,1**

↑ ↑

Sovrarappresentazione classi parentali!

I due caratteri assortiscono in modo indipendente?

$$\chi^2_3 = \sum \frac{(\text{Oss.}-\text{Att.})^2}{\text{Att.}} = 38{,}2 + 103{,}1 + 106{,}4 + 285{,}9$$

$$= 533{,}6$$

Tavola dei valori critici di chi-quadro (χ^2) al 5%[a]

Gradi di libertà	Valore critico al 5%
1	3,841
2	5,991
3	7,815
4	9,488
5	11,070
6	12,592
7	14,067
8	15,507
9	16,919
10	18,307
15	24,996
20	31,410
25	37,652
30	43,773

[a]Da R. A. Fisher and Yates, 1943, *Statistical Table for Biological, Agricultural, and Medical Research*. Oliver and Boyd, London.

RIFIUTO IPOTESI ASSORTIMENTO INDIPENDENTE dei geni per il colore del fiore e la forma del granulo di polline!

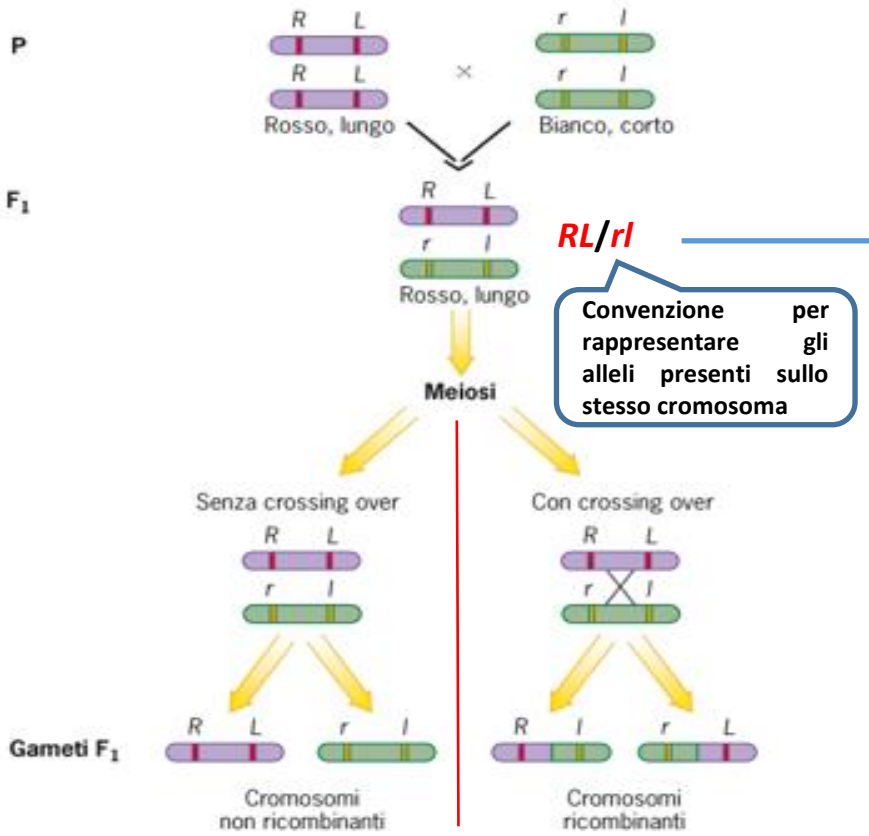
Interpretazione dei risultati

I geni per i due caratteri sono associati:

↑

posizionati sullo stesso cromosoma (concatenati).

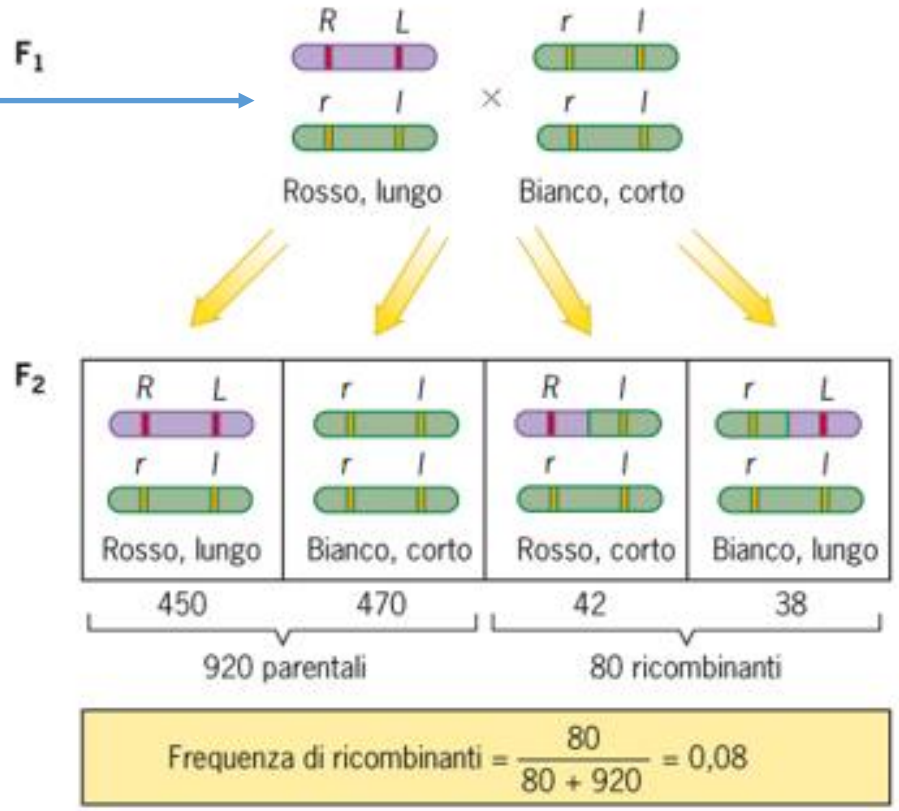
Interpretazione esperimento di Bateson-Punnet



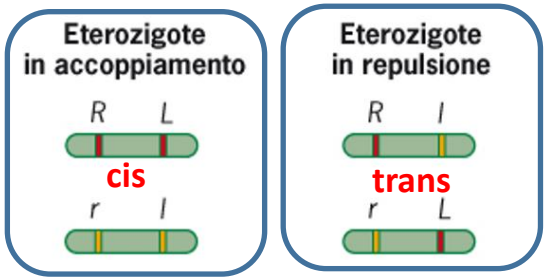
Convenzione per rappresentare gli alleli presenti sullo stesso cromosoma

Possibili eventi di ricombinazione tra due alleli (crossing over).
Frequenza di ricombinazione correlata alla distanza tra i due geni.

Reincrocio di prova per dimostrare, in modo alternativo, la concatenazione tra i due geni



Schematizzazione fase di associazione alleli negli eterozigoti (es. *Rr Ll*)



RL/rl ***Rl/rL***

la barra divide gli alleli presenti sui due cromosomi omologhi

← 1000 individui

Frequenza di ricombinazione ↔ grado di associazione tra geni

La frequenza di ricombinazione tra due geni non può superare il 50%!

50% → assortimento indipendente
<50% → geni associati

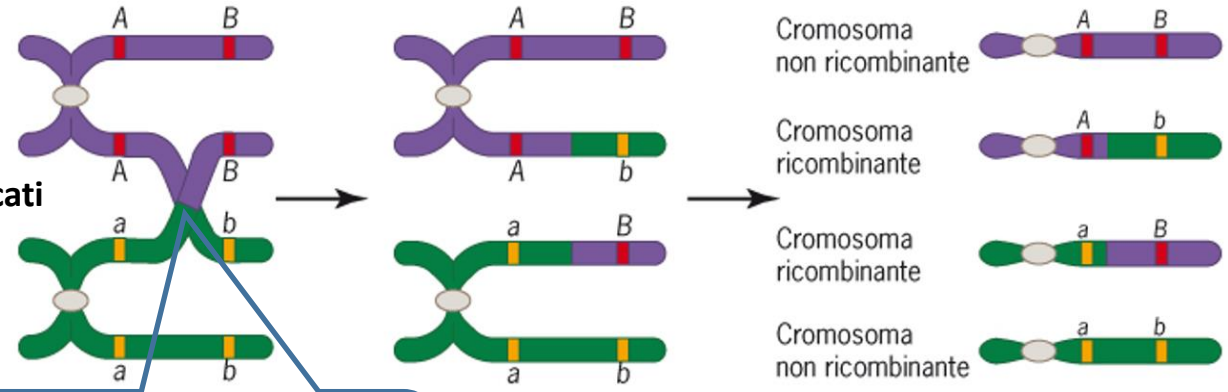
Frequenze se i geni *R* e *L* non fossero stati associati, ma indipendenti:

	rl	
RL	*RrLl*	*25%*
Rl	*Rrll*	*25%*
rL	*rrLl*	*25%*
rl	*rrll*	*25%*

50%

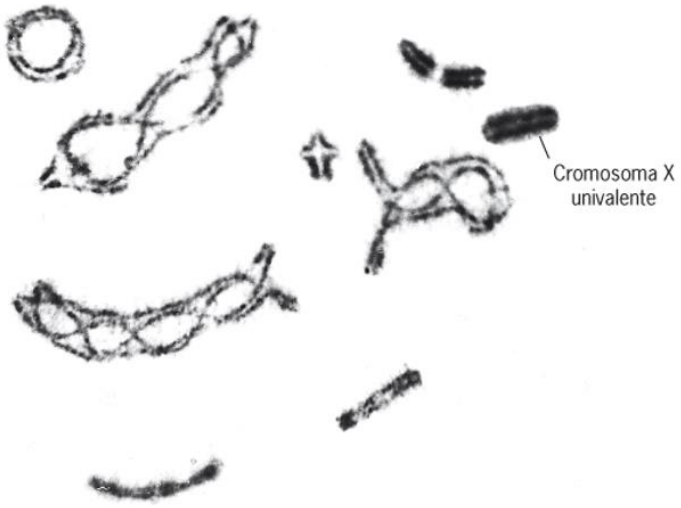
Scambio fisico tra cromosomi → gameti ricombinanti

Profase I della meiosi



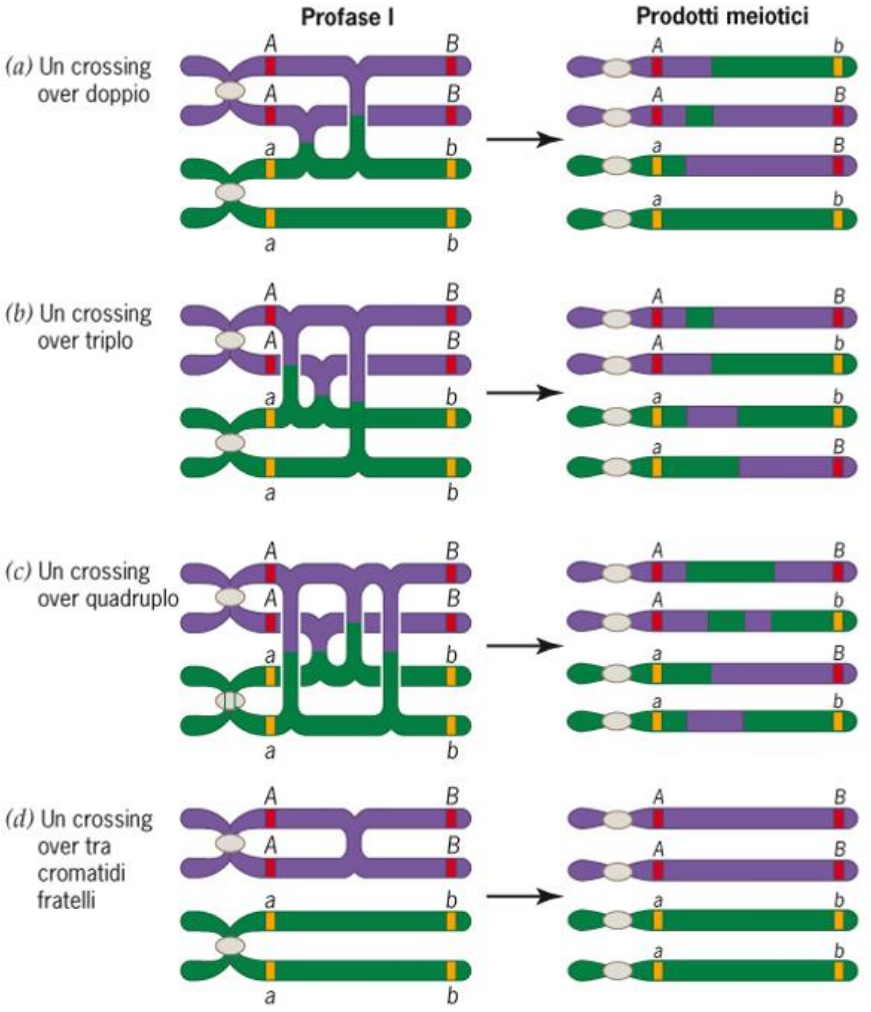
Solo due cromatidi ricombinano <u>in un determinato punto</u>, gli altri cromatidi possono ricombinare in punti diversi.

Scambi tra cromatidi fratelli non vengono rilevati!!!



La <u>rottura</u> e la <u>saldatura</u> in corrispondenza dei segmenti scambiati avviene ad opera di enzimi specifici.
Gli scambi possono essere osservati citologicamente.

Possono avvenire anche scambi multipli tra cromosomi di una tetrade



Dimostrazione correlazione CROSSING OVER (scambio fisico) – RICOMBINAZIONE

↓

Esperimento di Creighton e McClintock (1931)

Furono utilizzati due tipi di cromosoma 9 di mais con morfologia diversa (uno normale, l'altro aberrante)

2 diverse morfologie cromosoma 9

- **Normale**
- **Anormale (marcatori citologici)**
  - **protuberanza eterocromatica**
  - **frammento di cromosoma diverso (← traslocazione)**

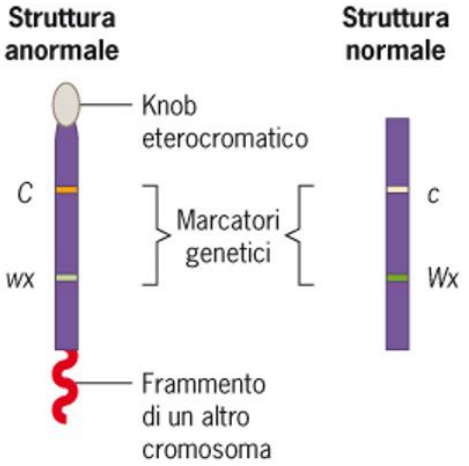
Marcatori genetici presenti sul cromosoma 9

C **→ seme colorato**

c **→ seme senza colore**

Wx **→ seme ricco di amido**

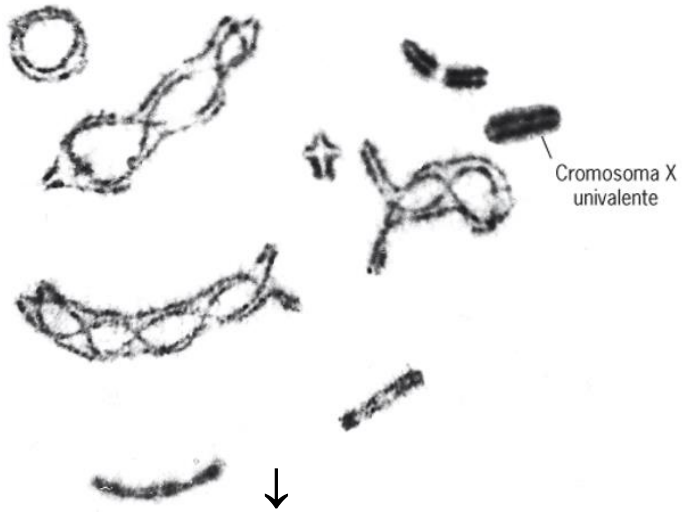
wx **→ seme ceroso**

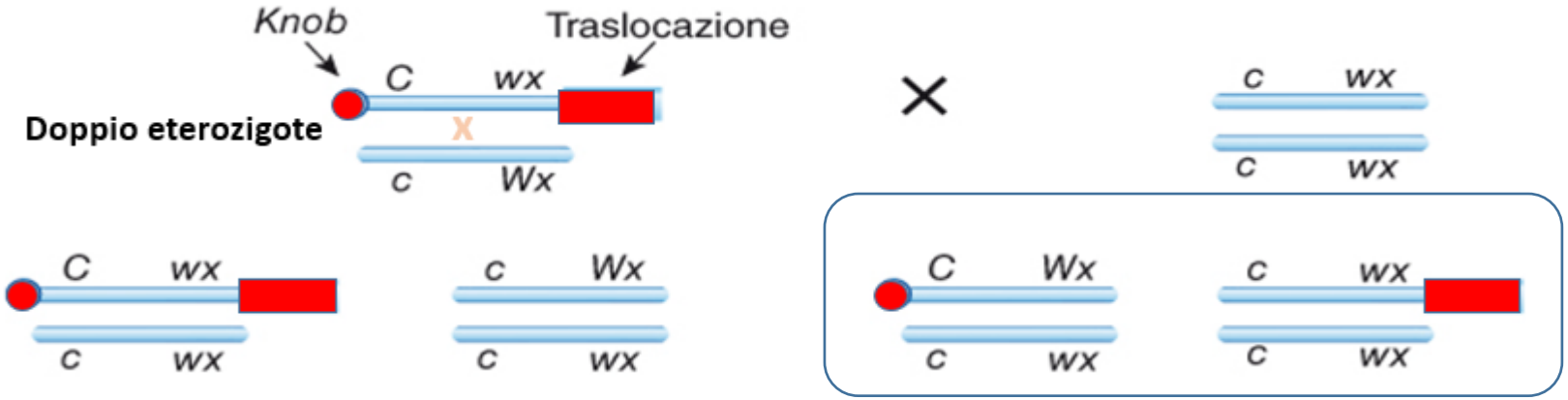


Prova citologica del crossing over

↓

osservazione chiasmi (profase meiosi I)





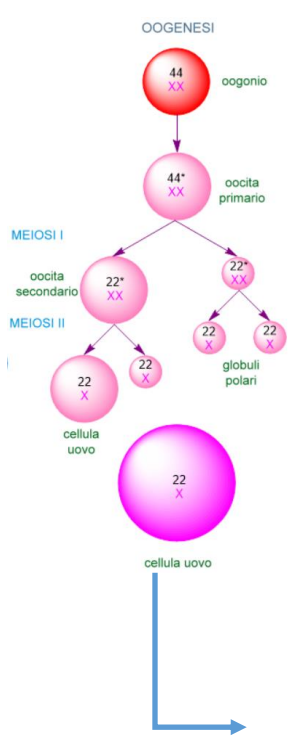
Ricombinanti con solo uno dei due marcatori citologici

I chiasmi sono tracce dei crossing over (avvenuti nella fase precoce della profase I) e potrebbero avere la funzione di mantenere insieme gli omologhi, riducendo la probabilità di eventi di non-disgiunzione durante la meiosi.

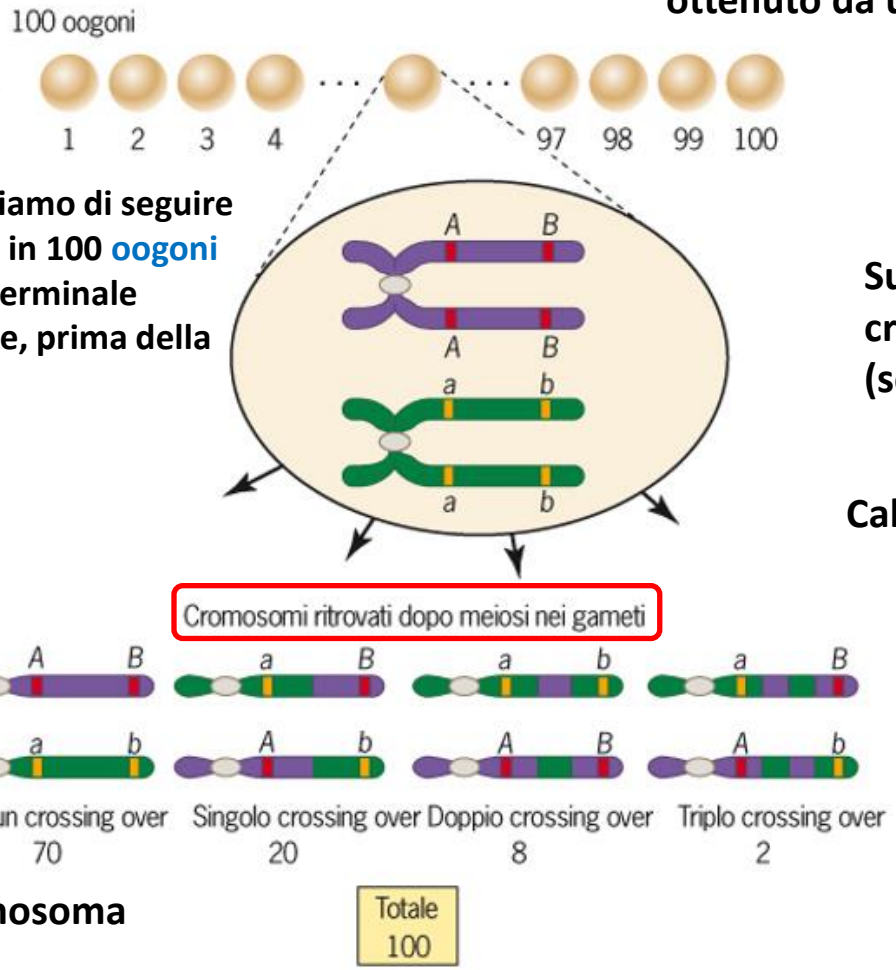
Costruzione MAPPE CROMOSOMICHE

Distanza tra due punti nella mappa ↔ numero medio di crossing over tra i due punti

Il numero di scambi viene calcolato su base statistica, pertanto è necessario considerare la media di un set di dati analitici ottenuto da un campione sufficientemente grande (popolazione).



Immaginiamo di seguire la meiosi in 100 oogoni (cellula germinale femminile, prima della meiosi)



100 gameti, ognuno con 1 cromosoma

Su una mappa genetica, la distanza tra due punti di un cromosoma corrisponde al numero medio di crossing over (scambi) che avviene tra di essi.

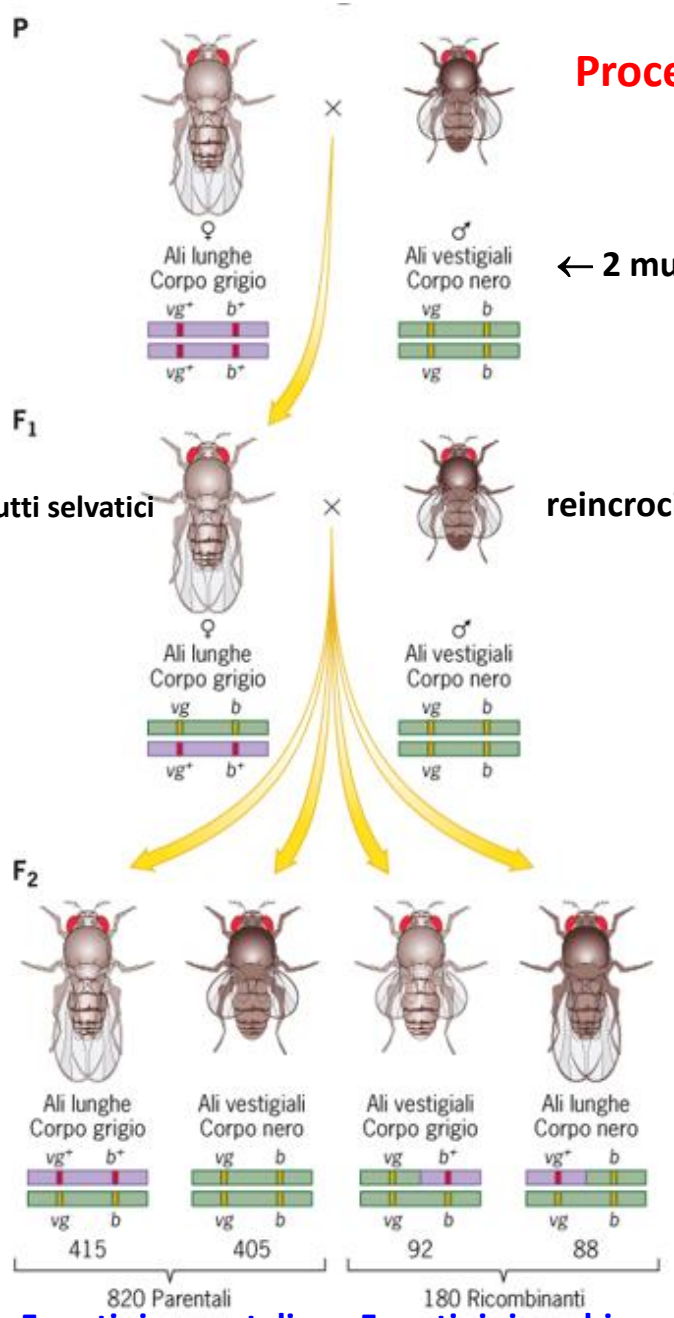
Calcolo del numero medio di scambi (crossing over) tra due geni.

Numero medio di crossing over tra *A* e *B* =

$$0\times\left(\frac{70}{100}\right)+1\times\left(\frac{20}{100}\right)+2\times\left(\frac{8}{100}\right)+3\times\left(\frac{2}{100}\right)=0{,}42$$

Numero scambi tra i due geni (*A* e *B*)

Numero medio di crossing over tra *A* e *B*



Fenotipi parentali più numerosi

Fenotipi ricombinanti meno numerosi

Procedura mappatura cromosomica per ricombinazione con reincroci a 2 punti

← 2 mutazioni autosomiche recessive

Stima del numero medio crossing over

Crossing over nei parentali (820/1000)

Crossing over nei ricombinanti (180/1000)

(0) x 0,82 + (1) x 0,18 = 0,18

18 cromosomi su 100 (18%), durante la meiosi, sono andati incontro ad un crossing over tra i geni *vg* e *b*.

***vg* e *b* sono distanti 18 unità di mappa genetica o unità centiMorgan (18 cM)**

(100 centiMorgan = 1 Morgan)

Geni associati (sullo stesso cromosoma)?

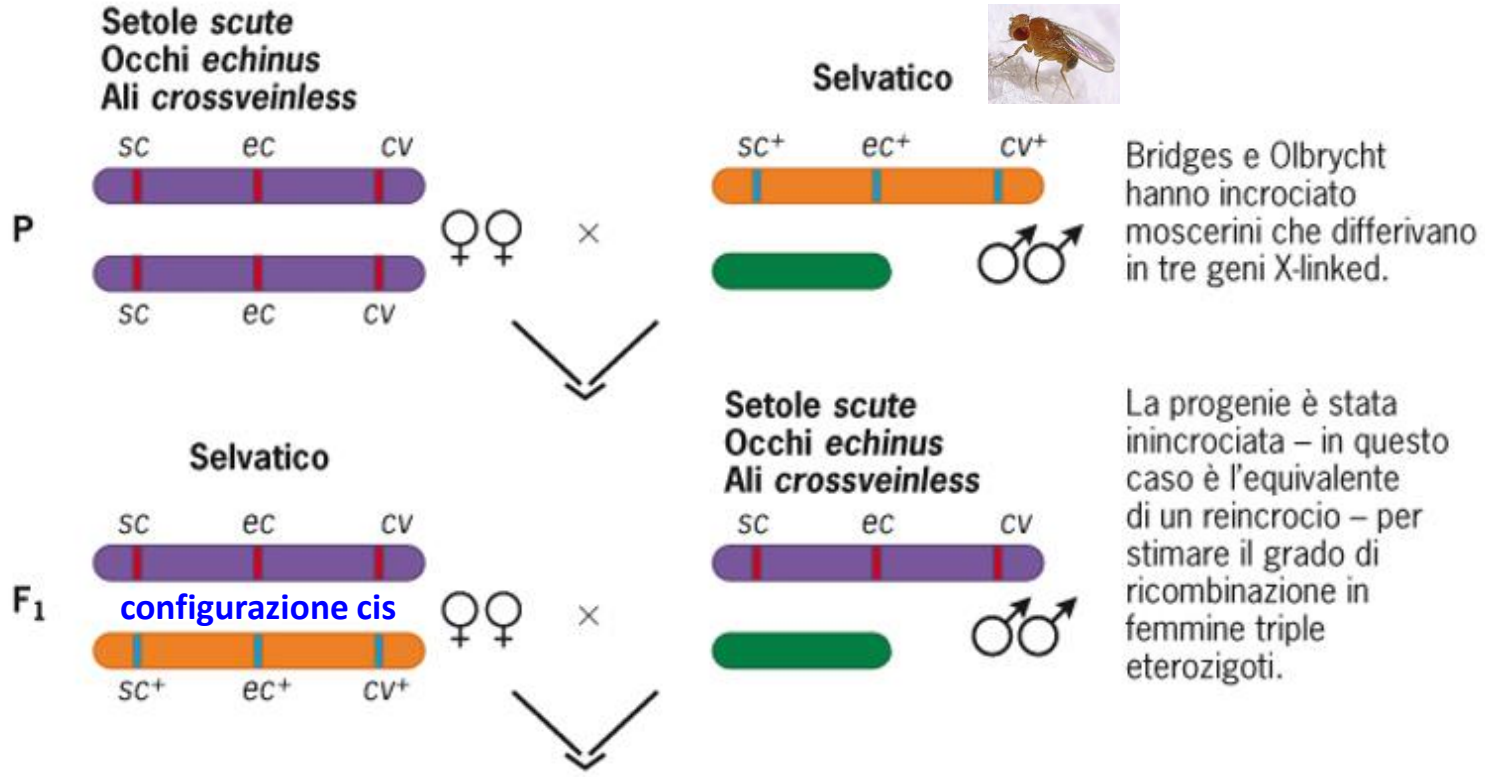
$$\text{Frequenza di ricombinazione} = \frac{180}{1.000} = 0{,}18$$

A che distanza?

Frequenza di ricombinazione <50% (0,5) → geni associati

Procedura MAPPATURA CROMOSOMICA per ricombinazione con reincroci a 3 punti

3 mutazioni recessive X-linked



Scute → senza setole
Echinus → occhi rugosi
Crossveinless → ali senza venature trasversali

- **Ordine dei geni sui cromosomi?**
- **Tipi di crossing over avvenuti?**
- **Distanza tra i geni?**

Possibili disposizioni dei geni

sc ec cv o *cv ec sc*
ec sc cv o *cv sc ec*
ec cv sc o *sc cv ec*

F_2

	Classe	Fenotipo	cromosoma X ereditato dalla madre			Numero osservato
Fenotipi parentali	1	Scute, echinus, crossveinless	sc	ec	cv	1.158
	2	Selvatico	sc+	ec+	cv+	1.455
Ricombinanti	3	Scute	sc	ec+	cv+	163
	4	Echinus, crossveinless	sc+	ec	cv	130
	5	Scute, echinus	sc	ec	cv+	192
	6	Crossveinless	sc+	ec+	cv	148
	7	Scute, crossveinless	sc	ec+	cv	1
	8	Echinus	sc+	ec	cv+	1
					Totale:	3.248

- **Individuare i fenotipi meno frequenti (hanno subito doppio crossing over)**
- **Confrontarli con i fenotipi parentali**

↓

L'allele che si è spostato, rispetto ai parentali, sarà localizzato tra gli altri due.

↓

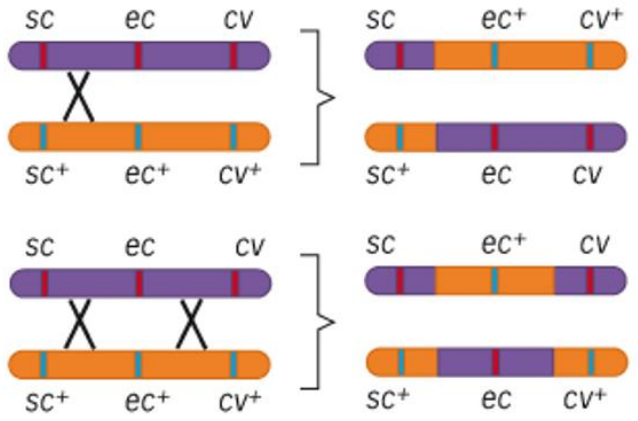
sc ec cv **Distanze tra i 3 geni? →**

Calcolo distanze tra geni

Stabilito l'ordine (*sc*-*ec*-*cv*), stimare numero medio di crossing over (singoli e doppi) tra geni

Distanza tra i geni *sc* ed *ec*

Crossing over tra *sc* ed *ec*



Classe	Numero osservato
3	163
4	130
7	1
8	1
Totale:	295

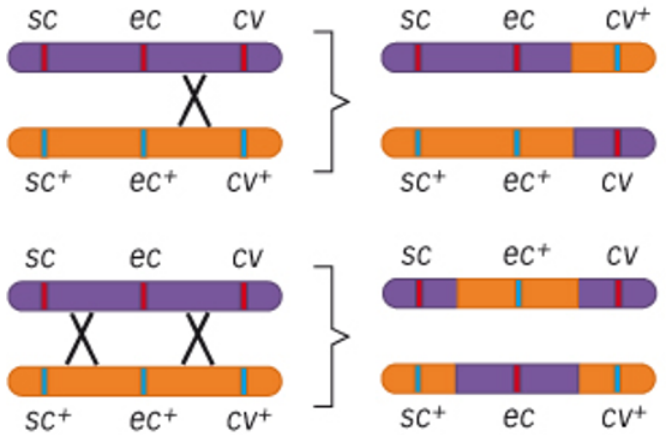
$$\text{Distanza di mappa} = \frac{295}{3.248} = 0{,}091 \text{ Morgan} = 9{,}1 \text{ centiMorgan}$$
(unità di mappa)

F_2

Classe	Fenotipo	Genotipo del cromosoma X ereditato dalla madre			Numero osservato
1	Scute, echinus, crossveinless	*sc*	*ec*	*cv*	1.158
2	Selvatico	*sc*⁺	*ec*⁺	*cv*⁺	1.455
3	Scute	*sc*	*ec*⁺	*cv*⁺	163
4	Echinus, crossveinless	*sc*⁺	*ec*	*cv*	130
5	Scute, echinus	*sc*	*ec*	*cv*⁺	192
6	Crossveinless	*sc*⁺	*ec*⁺	*cv*	148
7	Scute, crossveinless	*sc*	*ec*⁺	*cv*	1
8	Echinus	*sc*⁺	*ec*	*cv*⁺	1
				Totale:	3.248

Distanza tra i geni *ec* ed *cv*

Crossing over tra *ec* e *cv*



Classe	Numero osservato
5	192
6	148
7	1
8	1
Totale:	342

$$\text{Distanza di mappa} = \frac{342}{3.248} = 0{,}105 \text{ Morgan} = 10{,}5 \text{ centiMorgan}$$
(unità di mappa)

Calcolo distanza tra ogni coppia di geni

ricombinanti

- **Sommare le frequenze delle 4 classi (= n. di crossing over)**
- **Dividere per il totale di tutte le classi fenotipiche**

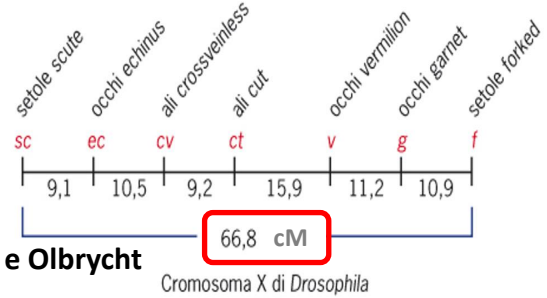
↓

Si ottiene il n. ricombinanti per ogni 100 cromosomi derivanti dalla meiosi delle ♀♀ F_1 (= unità di mappa)

Distanza tra *sc* e *cv*

9,1 cM + 10,5 cM = 19,6 cM

distanze additive

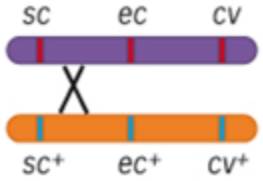


Mappa di Bridges e Olbrycht

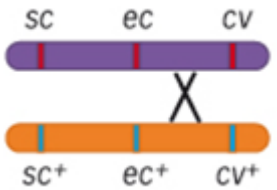
Cromosoma X di *Drosophila*

Consideriamo i geni *sc*-*ec*-*cv*

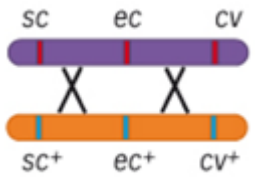
I crossing over tra i geni *sc* ed *ec* e tra *ec* e *cv* avvengono in modo indipendente?



F.R. → 0,091



F.R. → 0,105



F.R. → 0,091 x 0,105 = 0,0095
attesa

Se i due eventi fossero indipendenti, la frequenza attesa che entrambi i crossing over avvengano contemporaneamente (doppi ricombinanti) sarebbe:

0,091 x 0,105 = 0,0095 frequenza attesa doppi ricombinanti

2/3248 = 0,0006 frequenza osservata

↓

I doppi crossing over osservati sono inferiori a quelli attesi.

↓

Interferenza tra i due eventi.

L'intereferenza (*I*) può essere espressa come coefficiente di coincidenza (*c*)

$$c = \frac{frequenza\ osservata\ doppi\ crossing\ over}{frequenza\ attesa\ doppi\ crossing\ over} = 0{,}063$$

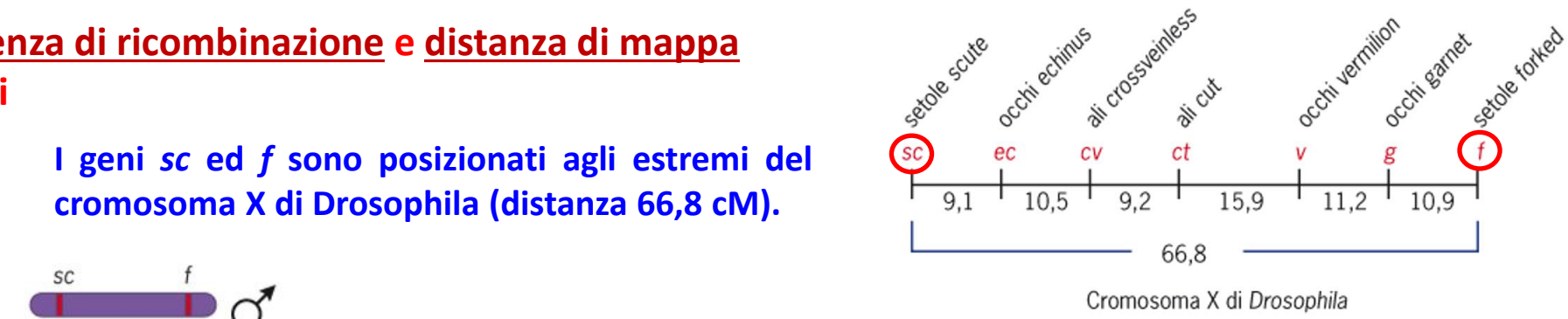
***I*= 1-*c*= 0,937**

Interferenza molto forte (prossima ad 1)

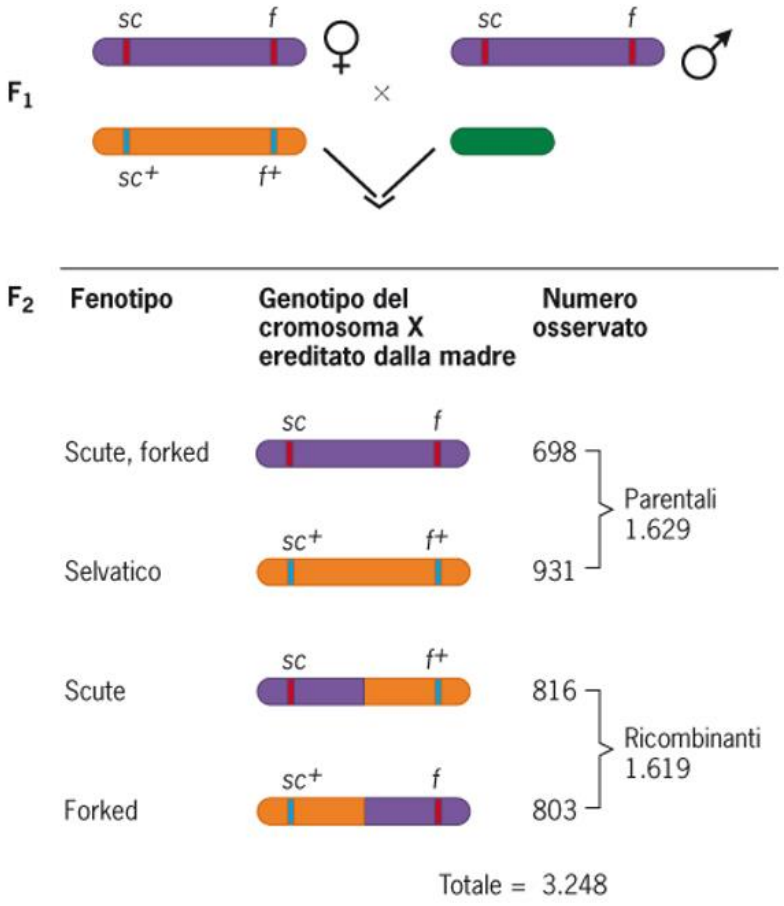
Di solito, l'interferenza risulta molto forte nel caso di distanze di mappa <20 cM. → **All'aumentare della distanza di mappa aumenta la frequenza dei doppi crossing over.**

Discrepanza tra frequenza di ricombinazione e distanza di mappa per geni molto distanti

I geni *sc* ed *f* sono posizionati agli estremi del cromosoma X di Drosophila (distanza 66,8 cM).



Cromosoma X di *Drosophila*



Calcolo della distanza mediante la frequenza di ricombinazione.

$$\text{Percentuale di ricombinazione} = \frac{1.619}{3.248} \times 100\% = 50\%$$

Distanza di mappa = 66,8 centiMorgan

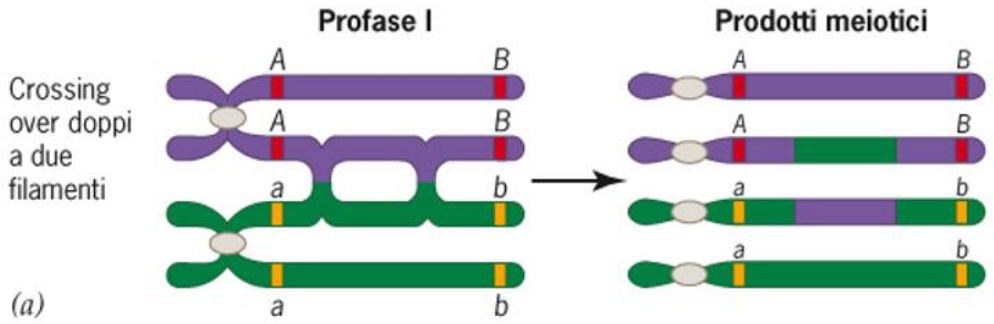
Non uguali

La frequenza di ricombinazione non coincide con la distanza di mappa (somma delle lunghezze intermedie)!

distanza di mappa > frequenza di ricombinazione

Per geni lontani non vi è correlazione tra frequenza di ricombinazione e distanza di mappa. ?

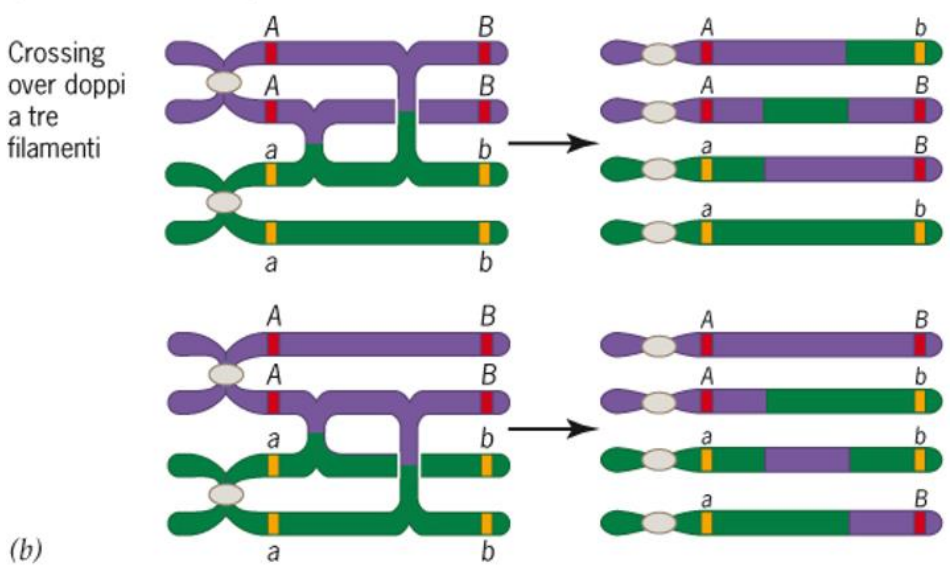
Conseguenze derivanti da crossing over doppi



In base ai marcatori fiancheggianti i doppi crossing over, non si osservano ricombinanti.

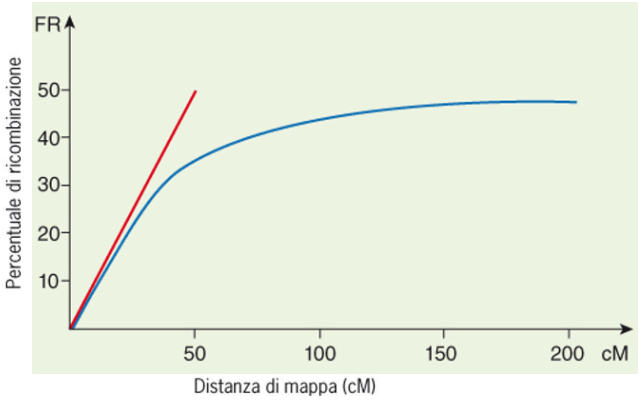
↓

Scambi doppi (o quadrupli) non contribuiscono alla frequenza di ricombinazione



si osservano il 50% di ricombinanti

Per valori >20 cM, la frequenza di ricombinazione fa sottostimare la distanza di mappa.

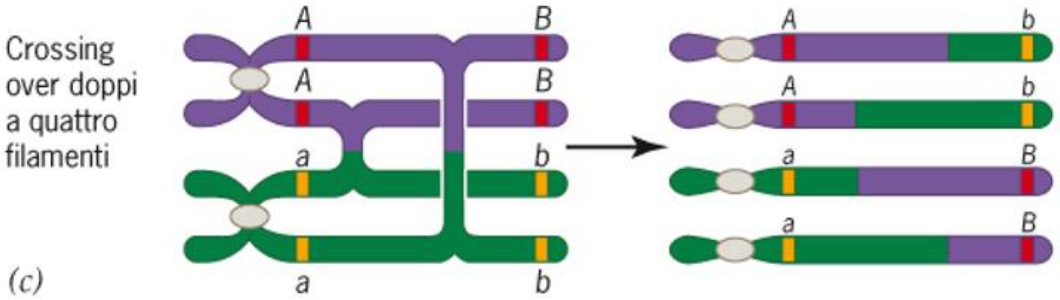


Conclusione

↓

Per geni lontani (>20 cM) non vi è correlazione tra frequenza di ricombinazione e distanza di mappa (bassa interferenza verso crossing over multipli).

Geni vicini (<20 cM) manifestano alta interferenza verso gli scambi multipli.



si osservano solo ricombinanti

Procedure costruzione MAPPE CITOGENETICHE (posizionare i geni in relazione a marcatori citologici)

Posizionamento dei geni sulla base di delezioni (o deficienze) e duplicazioni rilevabili citologicamente
alterazione di regioni cromosomiche ↔ effetto fenotipico

Localizzazione mediante delezioni

Procedimento per la mappatura citogenetica del gene *white* (*w*) sul cromosoma X (politenico) di *Drosophila*

- **Ottenere moscerini eterozigoti per una mutazione recessiva *w* e per delezioni note (*Df*) su cromosomi X diversi.**

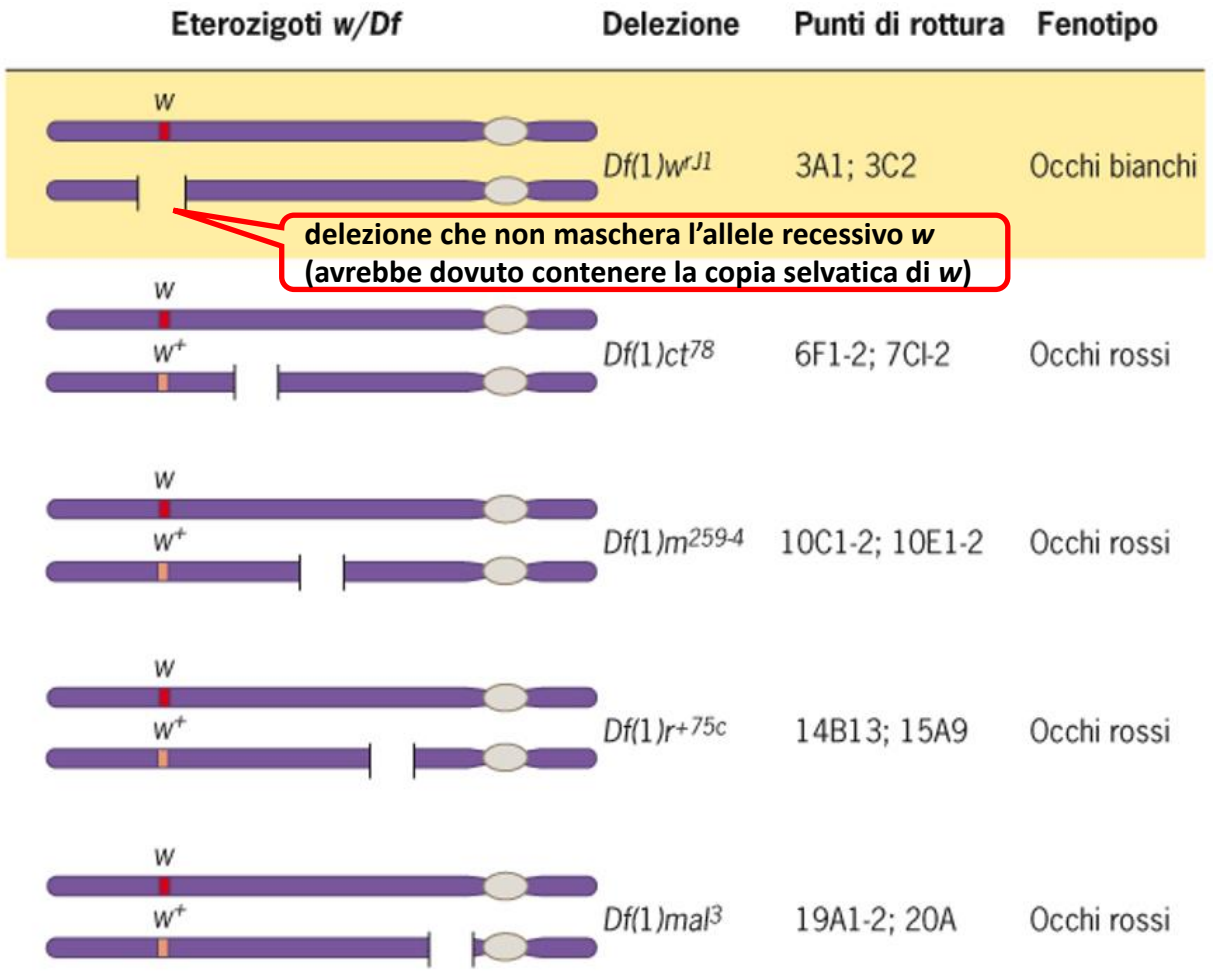
↓

w/*Df*

L'impiego di cromosomi con deficienze (*Df*) in punti diversi consente l'esatta localizzazione del gene *w*.

- **Quando viene espresso il carattere recessivo (occhi bianchi) vuol dire che le bande corrispondenti a quella particolare delezione *Df(1)w^{rJ1}* coincidono con la posizione dell'allele *w$^+$*.**

Queste diverse *Df* (deficienze) non difettano del gene *w$^+$* → l'allele recessivo resta mascherato.



Il colore dell'occhio mutante osservato con *Df(1)w^{rJ1}* indica che il gene *white* è compreso nella delezione tra i punti di rottura nelle bande 3A1 e 3C2 sul cromosoma X.

Mappatura citogenetica mediante duplicazioni

Posizionamento dei geni sul cromosoma

Questo cromosoma non è un omologo X, però ne porta un segmento che è stato oggetto di traslocazione.

Questo cromosoma non è un omologo X, però ne porta un segmento (regioni 2D; 3D) che comprende l'allele selvatico (w^+) del gene *w* che è stato oggetto di traslocazione.

Combinazioni *w*/*Dp*	Duplicazione	Punti di rottura	Fenotipo
w / —	*Dp1*	Estremità; 1E2-4	Occhi bianchi
w / w^+	*Dp2*	2D; 3D	Occhi rossi
w / —	*Dp3*	6E2; 7C4-6	Occhi bianchi
w / —	*Dp4*	9F3; 10E3-4	Occhi bianchi
w / —	*Dp5*	14B13; 15A9	Occhi bianchi

Il colore selvatico dell'occhio osservato con *Dp2* indica che il gene *white* è localizzato tra i punti di rottura della duplicazione nelle regioni 2D e 3D del cromosoma X.

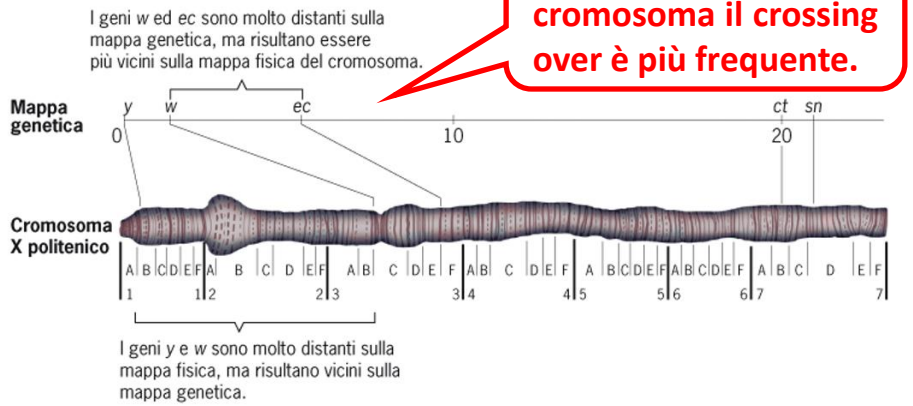
Delezione → non maschera (fa esprimere) l'allele recessivo

Duplicazione → maschera (non fa esprimere) l'allele recessivo

Ottenere moscerini con duplicazioni note (*Dp*) per un piccolo segmento di X traslocato su un altro cromosoma (autosoma).

Quando il carattere selvatico (occhi rossi) viene espresso vuol dire che quella duplicazione nota porta l'allele w^+ (*Dp2* maschera *w*) .

In alcune regioni del cromosoma il crossing over è più frequente.



La mappa per ricombinazione non fornisce la reale distanza fisica tra geni.

Pur non esistendo sempre una stretta correlazione tra mappa genetica (mappa per ricombinazione) e mappa fisica (mappa citologica) esiste, comunque, colinearità (stesso ordine dei geni).

Analisi di associazione nell'uomo

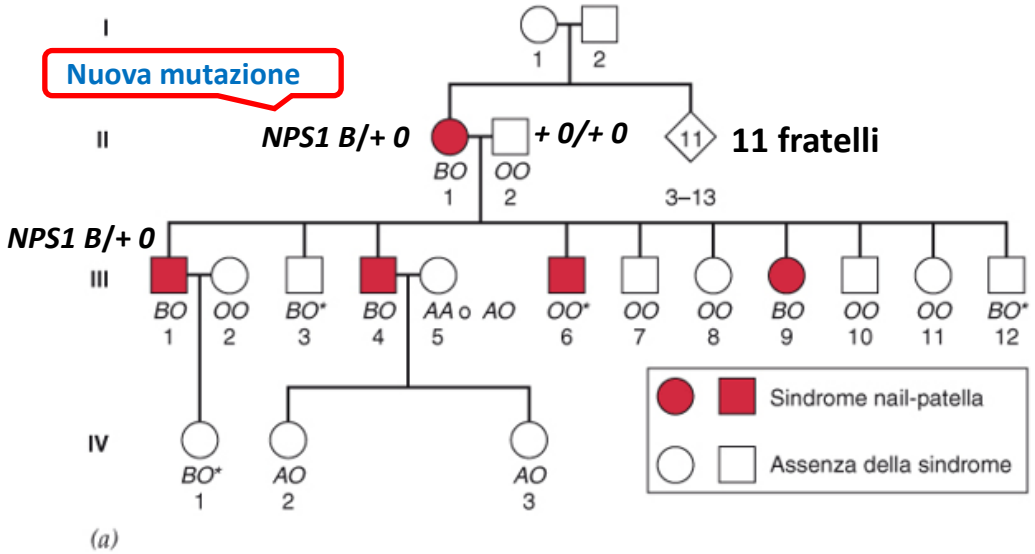
Nell'uomo, la localizzazione dei geni sui cromosomi può essere condotta anche mediante lo studio degli alberi genealogici.

Le relazioni genetiche (associazioni) legate al cromosoma X sono più semplici da individuare rispetto a quelle legate agli autosomi.

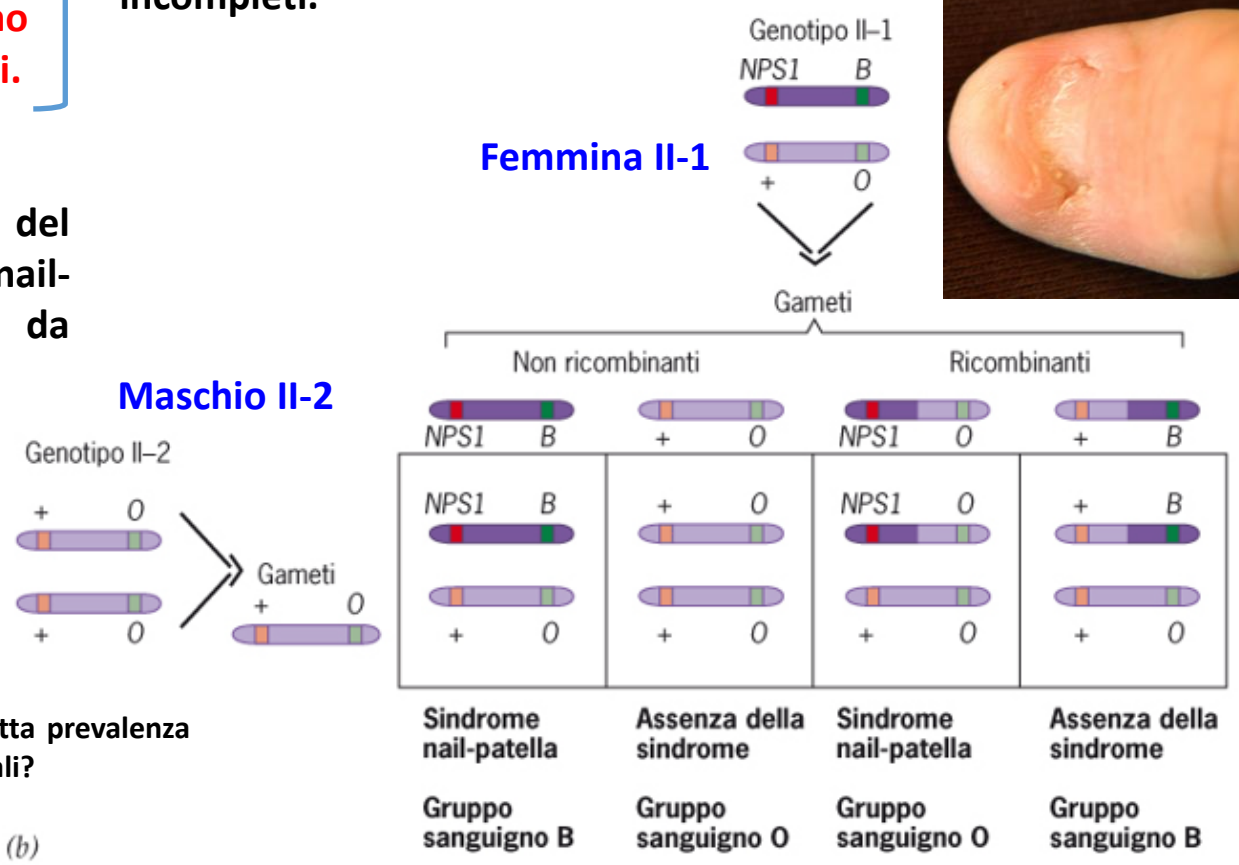
Le moderne tecniche molecolari oggi consentono la costruzione di mappe cromosomiche molto dettagliate, bypassando i limiti legati allo studio di alberi genealogici incompleti.

Esempio di relazione genetica legata agli autosomi

Renwick e Lawler (1955) studiarono la relazione tra gene del gruppo sanguigno AB0 e gene responsabile della sindrome nail-patella. Mutazione dominante autosomica, caratterizzata da malformazioni alle unghie ed alle rotule.



C'è una netta prevalenza dei parentali?



Associazione mutazione *NPS1* ed allele *B* del locus *AB0*

Loci *NPS1* e *AB0* localizzati sul braccio lungo del cromosoma 9 (locus 9q34)

Distanza loci *NPS1* e *AB0*

Ricombinanti: III-3, III-6, III-12 → 3/10 → FR = 30%

In realtà dovrebbe essere considerata anche la generazione IV

3+1/13 → FR = 31% (31 cM)

I processi di ricombinazione consentono di generare nuove combinazioni alleliche.

La ricombinazione, nel corso della meiosi, può combinare alleli vantaggiosi di geni differenti in uno stesso organismo.

Nuove combinazioni alleliche, se apportano dei vantaggi all'individuo, in termini di sopravvivenza e riproduttività, possono diffondersi nella popolazione.

Alcuni eventi possono sopprimere la ricombinazione!

Formazione di un cromosomi dicentrico e acentrico aneuploidi con perdita di vitalità. In questo caso i prodotti della ricombinazione tra cromosomi invertiti vengono persi.

I processi riarrangiamenti cromosomici, soprattutto le delezioni, possono annullare il rimescolamento legato alla ricombinazione.

Tratti di cromosomi con punti di rottura, in eterozigosi, dovuti ai processi di riarrangiamento possono essere causa di problemi di appaiamento.
Le inversioni, in particolare sono causa di riduzione della frequenza di ricombinazione.

Inversione in eterozigosi

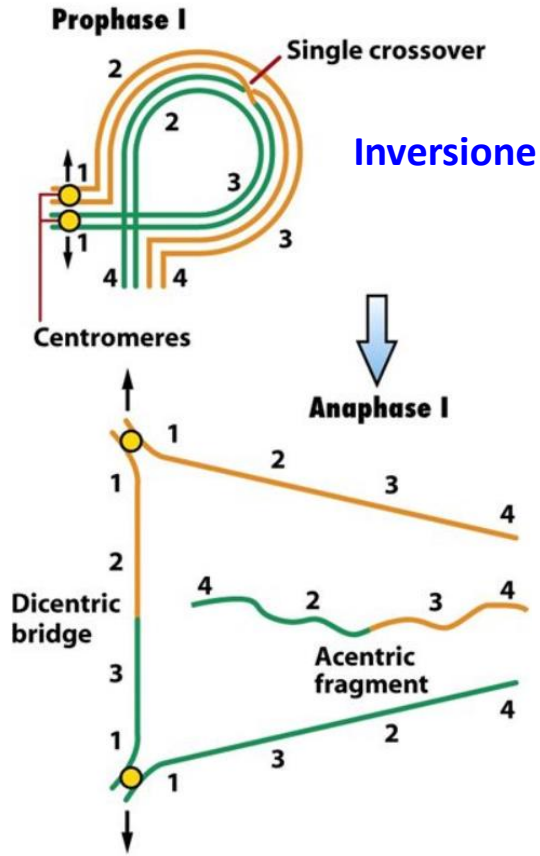


Figure 7-26 Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons