

Lezione 1

Testo consigliato: Plant genes, genomes and genetics

A. thailiana genoma semplice, diploide

mutageno causa solo il danno, poi subentrano meccanismi di riparazione DNA che fissano una determinata mutazione sul DNA.

abbiamo punto di fine e inizio trascrizione (negli eucarioti determinato da apparato che addiziona una coda poliadenilata; nel sito di inizio abbiamo il capping, con legame 5'-5')

3 eventi trascrizionali negli eucarioti: inizio, allungamento, terminazione. Sull'inizio della trascrizione abbiamo la maggior parte della massa di articoli nell'ambito della trascrizione.

Legame progressivo di allungamento è di un nucleotide all'estremità 3', con il proprio carbonio al 5'. (incorporazione del 5' al precedente 3' OH). Questo si applica sia a RNA che a DNA, con la differenza che il primo utilizza un ribonucleotide, mentre il secondo deossiribonucleotide.

DNA è interrotto, ovvero su di esso avviene lo splicing. Il trascritto primario, collineare all'informazione del DNA, viene assemblato, tramite lo spliceosoma, nell'mRNA.

Seq stop (UAG, UAA, UGA); di inizio (AUG)

coda poly-A è marcatore del mRNA che consente il transito nel citoplasma

Bisogna aggiungere la regione del promotore, e possiamo usare la regione solamente codificante, più la terminazione.

Enzima che trascrive il gene è detto RNA polimerasi II. Ma trascrive solo geni di tipo II (esoni intervallati da introni).

Per la transgenesi devo inserire un finto esone e un finto introne, seguite dalla sequenza codificante (i primi due vengono eliminati dallo spliceosoma). In base al promotore possiamo regolare la produzione di trascritto.

lo svolgimento dei nucleosomi è soggetto al controllo di circa 7-800 diverse proteine, influenzando la trascrizione dei geni in termini epigenetici (non riguardando TF e promotore).

single cell transcriptome: insieme di tutti i geni trascritti da una cellula.

Digressione

C. elegans: nematode organismo modello (1mm). Su di esso si sono effettuati esperimenti sul dsRNA come silencer per alcuni geni, silenziamenti che si conservano di generazione in generazione.

mentalità statica vs dinamica (Carol Dweck, growth vs fixed mindset)

Tassonomia di Bloom: livelli di conoscenza acquisibili.

Genetica pavese top

Gene e allele

Prodotto di trascrizione di una sequenza di DNA che è funzionale (svolge un compito: es. produzione clorofilla, produzione enzima), viene detto gene.

Un gene può avere, talvolta, può avere carattere dominante o recessivo.

L'allele è una delle possibile variante di un gene. In un genoma vi possono essere più alleli per uno stesso locus, dove con locus intendiamo la posizione fisica in un cromosoma in cui riscontriamo il gene.

Dominanza e recessività

Adottiamo come esempio P. sativum degli esperimenti mendeliani. Uno dei caratteri era il colore del seme (giallo/verde). Mendel aveva preventivamente generato delle linee pure: derivanti da successive autofecondazioni, con singoli caratteri non variabili in tutti i membri della progenie (in questo caso linea pura per quel determinato carattere).

Se il giallo è il carattere dominante, il 100% della progenie (individui derivanti dall'incrocio P1 (giallo) x P2 (verde)) avrà semi gialli.

La conclusione è che vi sono due alleli per ciascun carattere, e la presenza di un solo allele dominante sull'altro è sufficiente per mostrare il solo carattere dominante.

Possiamo anche ottenere gerarchie di dominanza (es. rosso dominante sul giallo, ma giallo dominante sul verde: vale la proprietà transitiva, dunque il rosso domina sul verde; tuttavia se il verde domina sul giallo? non possiamo, presumo, desumere nulla)

Dominanza è **gain-of-function** -> introduciamo una nuova funzione (nella mutazione che rende dominante un allele) in termini di prodotti genici che fa sì che si silenzii il fenotipo espresso tipicamente dal genotipo omozigote recessivo. Una delezione completa di un gene è al contrario sempre una loss-of-function. Esempio un se muto un gene che codifica per chinasi e tale chinasi non espleta più il suo compito, allora ho una loss-of-function.

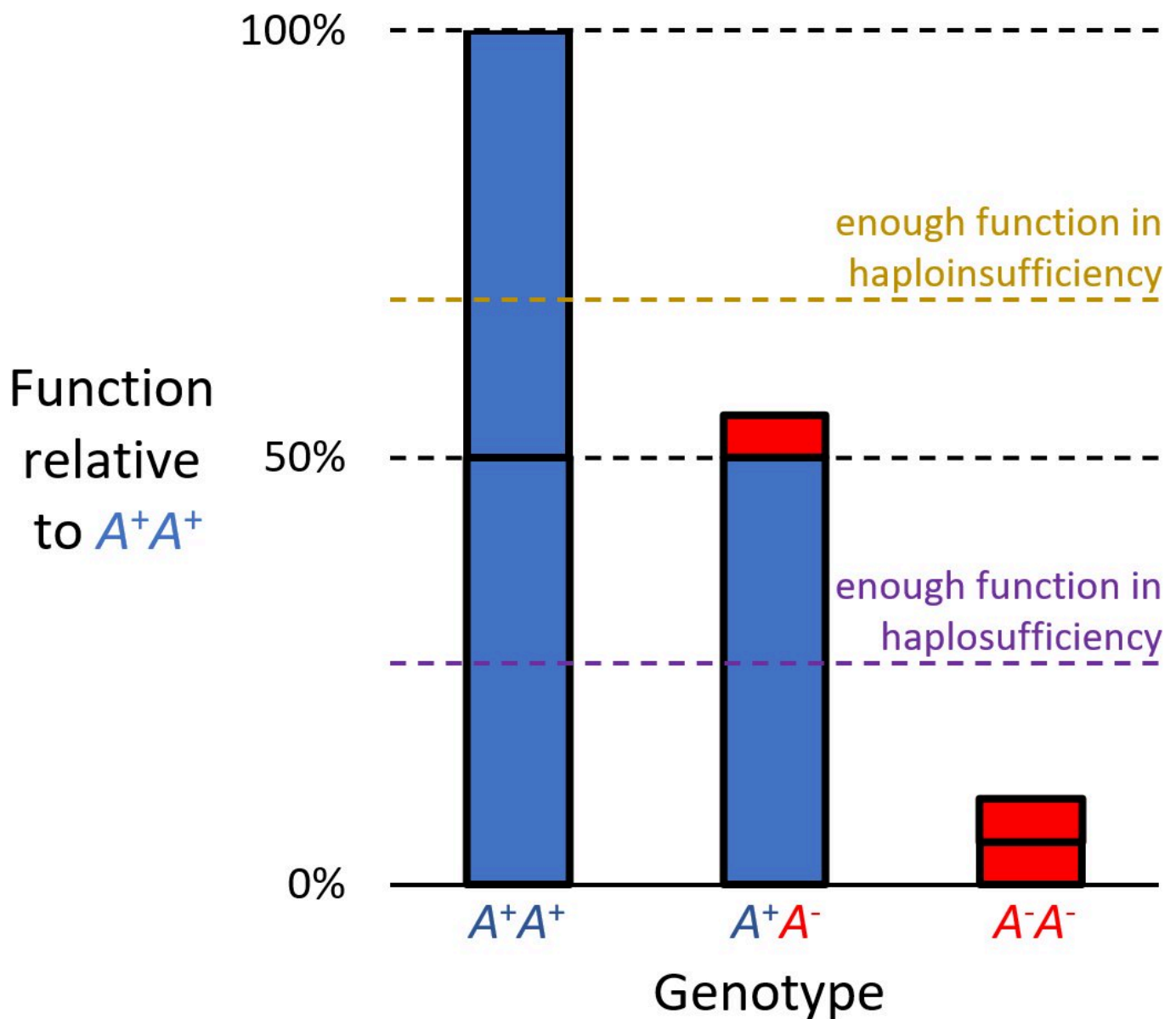
Codominanza

NB: se fenotipo rosso è codominante con giallo, entrambi i fenotipi devono comparire nell'individuo che presenta entrambi gli alleli (magari strisce rosse e gialle). Entrambi i fenotipi hanno una loro "dominanza".

Penetranza o dominanza incompleta nel caso in cui vi è commistione (es. colore intermedio)

Aploinsufficienza

Immagine da [wiki](#) per sopperire alla mancanza momentanea delle slide di Perini



Consideriamo esemplari di *A. thaliana* con un determinato locus in cui si sono effettuate e appurate mutazioni. La serie allelica comprende gli alleli: wild-type, ref4-4 e ref4-3; il gene presente al locus in questione regola la crescita e dimensione delle foglie in *A. thaliana*. Supponiamo di generare progenie eterozigote, con un allele wild-type e un'altro mutato (ref4-4 o ref4-3). Confrontiamo il quantitativo di prodotto genico (che potrebbe per esempio essere un ormone) associato a questo gene e ottenuto dagli individui eterozigoti recanti un allele mutato, impiegando come riferimento il livello ottenuto dall'omozigote wild-type:

- notiamo come il livello di prodotto ottenuto in dall'individuo recante la coppia allelica wt/ref4-4 mostra un livello accettabile (sufficiente, dato dalla somma di un contributo sostanziale di wt e minimo di ref4-4) per garantire l'espressione del fenotipo selvatico, e dunque possiamo affermare che in questo contesto l'allele wt è aplosufficiente. In questo caso wt mostra un rapporto di dominanza (la loss-of-function avviene soltanto in presenza di omozigosi del mutante, ossia il fenotipo associato a essa è recessivo).

- nel caso di ref4-3, invece, il livello di prodotto genico esaminato nell'eterozigote si attesta a un livello più basso (in quanto ref4-3 contribuisce ancora di meno alla produzione di prodotto), e tale livello non è sufficiente per osservare il fenotipo wild-type. In questo caso abbiamo aploinsufficienza (di wt): si tratta di una condizione in cui una mutazione loss-of-function è a carattere dominante (riguarda sia gli eterozigoti wt/ref4-3, sia gli omozigoti ref4-3/ref4-3).
- gene ref4-4 si può dire che è recessivo: quando è in eterozigosi il wild-type garantisce almeno il 70% circa del prodotto, che a sua volta è sufficiente per garantire fenotipo dominante. ref4-3 produce talmente poco prodotto, che il 50% del prodotto del wild-type non è sufficiente a garantire il fenotipo dominante. si parla di dominanza per aploinsufficienza. (genera fenotipo dominante ma per perdita di funzione -> devo determinare il prodotto e il suo dosaggio)

aploinsufficienza: un solo allele non è sufficiente per garantire il fenotipo dell'allele dominante.

Dominanza negativa

è un'altra loss of function.

esempio di ligando che si lega a recettore di membrana che attiva cascata di segnalazione.

fosforilazione crociata: necessaria l'interazione tra i due monomeri, che si fosforilano a vicenda e di conseguenza innescano la cascata di segnalazione.

funzione gene (funzionamento recettore) è data da interazione dei prodotti dei due alleli. Recettore funziona solo in funzione della sua interazione in forma dimerica. wt-wt funziona; wildtype-mutato non funziona, in quanto entrambi i domini di fosforilazione crociata devono combaciare; mutato-mutato non funziona; mutato-wildtype non funziona; 3/4 non funzionano. Il prodotto va visto come la dimerizzazione di entrambi e quindi le probabilità non rispecchiano un gene tradizionale. **Formazione di dimeri o multimeri possono essere suggeriti da rapporti di segregazione di questo tipo, senza conoscere la biochimica coinvolta.**

Mutazione genica e variante genica

Variante genica è una delle forme che può assumere l'allele selvatico e che risulta fissata nella popolazione: fissiamo una soglia arbitraria dell'1%. Invece se avviene una mutazione sporadica/casuale, essa spesso incide minimamente e non si fissa nella popolazione (non raggiunge la soglia, perché magari conferisce una bassa fitness agli individui che la presentano). In questo caso si parla di semplice mutazione genica.

Chiacchiere: Principio di "Anfisen": folding proteine sulla base della struttura primaria (es. Alfafold)

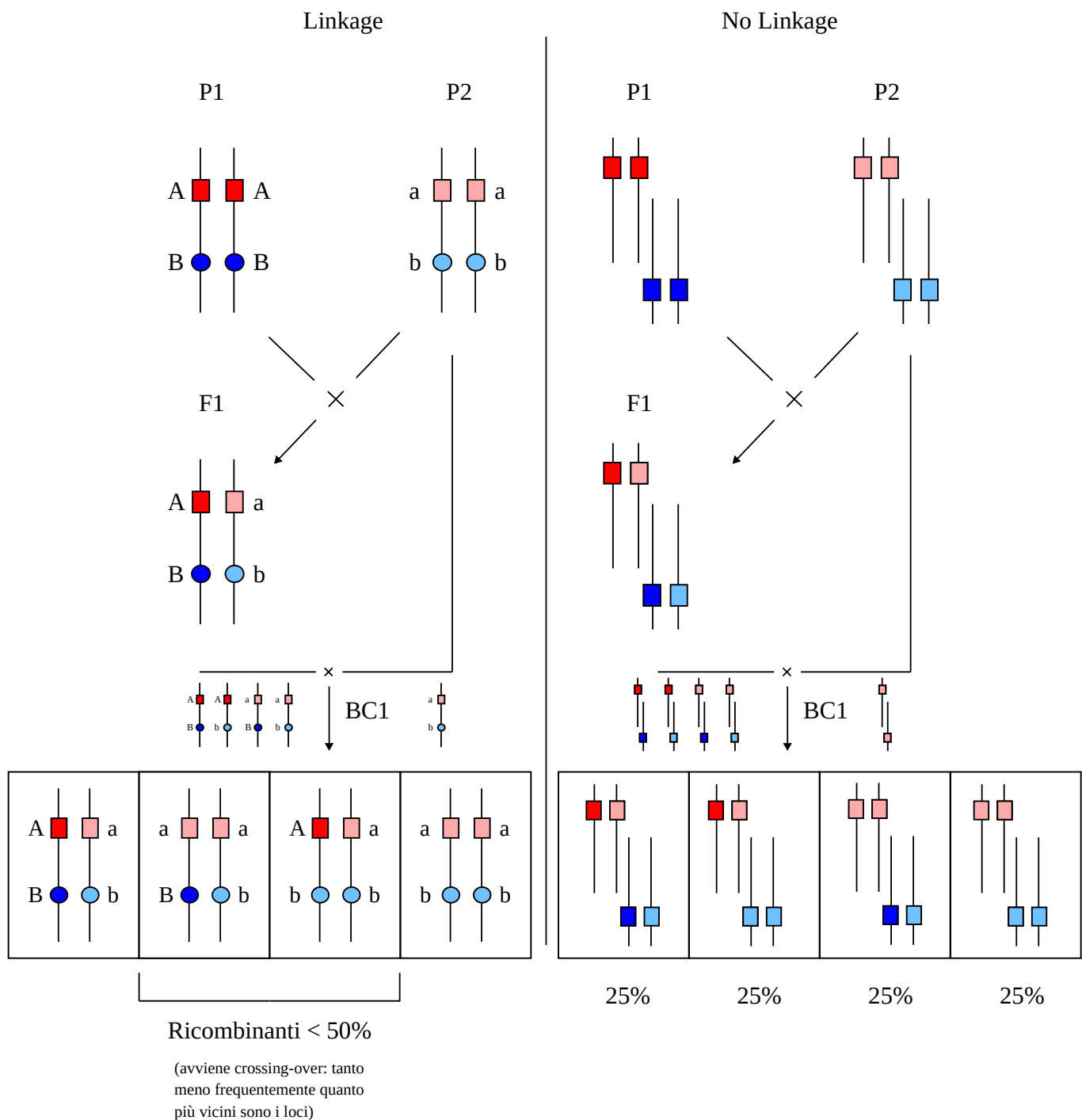
Mappe

Mappa fisica: definizione al singolo nucleotide del genoma

Mappa genetica: prime mappe in ordine cronologico (Morgan et al. i primi), che sulla base dei ricombinazione di marcatori fisici polimorfici (possiamo distinguere). Possiamo analizzare il numero di ricombinanti e sulla base della loro frequenza possiamo creare tale. Mitosi garantisce che non vi sia scambio tra cromatidi. Nella meiosi invece no (è d'obbligo almeno uno scambio per coppia di cromosomi): meiosi I è dove avviene il crossing-over, nella meiosi II avviene una successiva riduzione (dimezzamento). Prima segregazione fa confluire i due cromatidi fratelli materni e i due paterni in due cellule distinte, nella mitosi invece la segregazione fa confluire un materno e un paterno.

L'una sta all'altra come una mappa geografica di maps e la mappa geografica medievale

marcatore polimorfico: si tratta di un gene che possiede che, se presente in due alleli diversi per ciascun cromosoma omologo, ciascuno risulterà distinguibile con mezzi fisici, molecolari o biochimici (ossia riusciamo a distinguere la condizione di omozigosi da quella di eterozigosi). Supponiamo di averne due su due cromosomi diversi. La loro segregazione sarà indipendente per la 2nd legge di Mendel (segr. indipendente caratteri). I 4 cromatidi identici sono i tetravalenti (i due appartenenti a ciascun genitore sono detti divalenti). Viceversa, supponiamo alternativamente che tali marcatori mostrino associazione (sono presenti sullo stesso cromosoma, e non segregano indipendentemente, seguendo la seconda legge di Mendel), e di avere due parentali P1 e P2 in omozigosi per entrambi questi geni (e ciascun parentale possiede solo alleli dominanti o solo recessivi).



Ora invochiamo gli appunti di Salvi, in quanto la spiegazione di Perini puzza.

Qualora non vi sia linkage cromosomico, il reincrocio ($AaBb \times aabb$) di F1 con P2 (omozigote recessivo per entrambi i caratteri) darebbe luogo a un rapporto tra i fenotipi 1:1:1:1, ma dal momento che tra i due loci c'è linkage (ossia sono presenti sullo stesso cromosoma), il rapporto conseguente al reincrocio (che possiamo rappresentare come $ABab \times abab$) avrà **una maggiore rappresentanza dei fenotipi parentali rispetto a quelli ricombinanti** (che non scompaiono del tutto a causa della presenza di crossing-over). Quanto più la ricombinazione è frequente, tanto più sono distanti i loci dei geni considerati. Per valutare tale distanza, Morgan introduce l'unità di mappa, poi nota come centiMorgan. $cM = FR\ 100 = (\text{numero di individui ricombinanti})/(\text{totale individui})\ 100$, (es. $1cM = 1\%$ di ricombinanti sul totale della progenie di

reincrocio) dove con individui intendiamo rappresentanti BC1 (dove il genotipo è associato a un ben determinato fenotipo: questo era l'unico metodo disponibile al tempo di Morgan), oppure gameti della F1 (su cui però bisogna fare un'analisi molecolare, per accertarsi della ripartizione degli alleli). Una distanza di 1cM tra due geni indica che tali geni segregano ricombinando soltanto nell'1% dei casi (1% dei gameti prodotti). Per calcolare la distanza in cM ci avvaliamo di test a due punti (se confrontiamo due geni - o meglio marker morfologici, in quanto devono essere fenotipicamente rilevabili), oppure a 3 punti, se confrontiamo contemporaneamente 3 geni. I test a tre punti sono di assai più difficile esecuzione, ma garantiscono un'affidabilità maggiore e consentono, soprattutto, di valutare la **disposizione reciproca di tali geni** (il loro ordine relativo nella lunghezza del cromosoma).

Esempio test a tre punti tra due parentali con genotipo omozigote dominante ABCABC (uso questa notazione in quanto ABC si trovano sullo stesso cromosoma) e l'altro con genotipo omozigote recessivo abcabc. Da un reincrocio (BC1) dell'ibrido F1 con P2 (parentale recessivo), otteniamo:

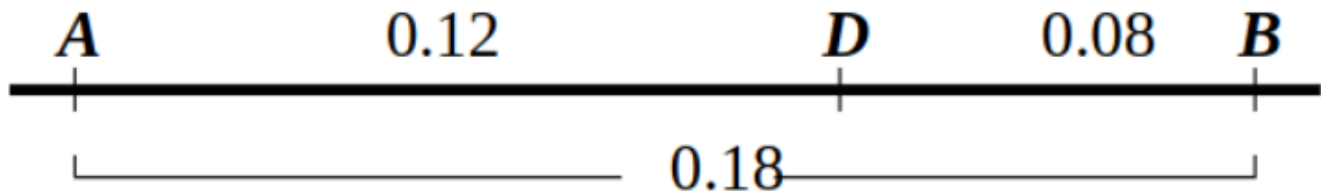
| Gamete prodotto dall'F1 | Genotipo BC1 | Numero di individui osservati |
|-------------------------|---------------|-------------------------------|
| <i>ABD</i> | <i>AaBbDd</i> | 40 |
| <i>ABd</i> | <i>AaBbdd</i> | 0 |
| <i>AbD</i> | <i>AabbDd</i> | 4 |
| <i>Abd</i> | <i>Aabbdd</i> | 7 |
| <i>aBD</i> | <i>aaBbDd</i> | 4 |
| <i>aBd</i> | <i>aaBbdd</i> | 3 |
| <i>abD</i> | <i>aabbDd</i> | 1 |
| <i>abd</i> | <i>aabbdd</i> | 41 |

$$FR (A-B) = (4+7+4+3)/100 = 0.18 (= 18 \text{ u.m.})$$

$$FR (A-D) = (0+7+4+1)/100 = 0.12 (= 12 \text{ u.m.})$$

$$FR (B-D) = (0+4+3+1)/100 = 0.08 (= 8 \text{ u.m.})$$

Si procede poi all'ordinamento: valore tra i loci maggiore suggerirà i loci disposti agli estremi (in questo caso A e B), mentre il locus intermedio (in questo caso D) avrà FR inferiore con quelli disposti agli estremi.



L'importante è l'ordine, non la distanza fisica, ai fini di questi esperimenti: una regione potrebbe falsificare le frequenze in quanto è più o meno sottoposta a ricombinazione. Nella regione dei centromeri le ricombinazioni sono più rare. Anche nelle sequenze telomeriche. Più i geni sono distanti nel cromosoma, più ricombinano facilmente -> per valori vicini a 50cM non distinguiamo, per due geni a quella distanza, segregazione da crossing-over, per lo meno non con analisi fenotipiche (in quanto 50cM si traduce). NB: in realtà è un discorso approssimativo, perché alle distanze tra i loci vengono applicate delle funzioni correttive, chiamate funzioni di mappa (vedi per es. funzione di Haldane o di Kosambi), che rendono additive le distanze tra i vari geni (ossia $d(A-B) + d(B-C) = d(A-C)$, se la disposizione spaziale è $A \rightarrow B \rightarrow C$): questo non è garantito con il semplice calcolo delle frequenze di ricombinazione (perché intervengono altri fenomeni, come appunto la probabilità più o meno alta che in una determinata regione del cromosoma avvenga crossing over, e la possibilità che avvengano crossing-over multipli: tanto maggiore quanto è maggiore la distanza tra i loci considerati; i crossing over multipli tendono a far sottostimare il numero dei ricombinanti, perché magari il gamete considerato è davvero ricombinante, ma ricombina in un segmento tra i due geni considerati e dunque non è visibile analizzando il fenotipo di questi due geni -> questa è una delle motivazioni alla base dell'introduzione dei test a 3 punti)

Allele selvatico è designazione impropria: si tratta di un riferimento che scegliamo per convenzione per poter confrontare altri alleli mutati.

Complementazione

Per approfondimenti su procedure laboratoriali di questo tipo, vedi [wiki](#).

Si tratta di un test per il numero di geni coinvolti in un determinato fenomeno riconducibile a fattori di tipo genetico.

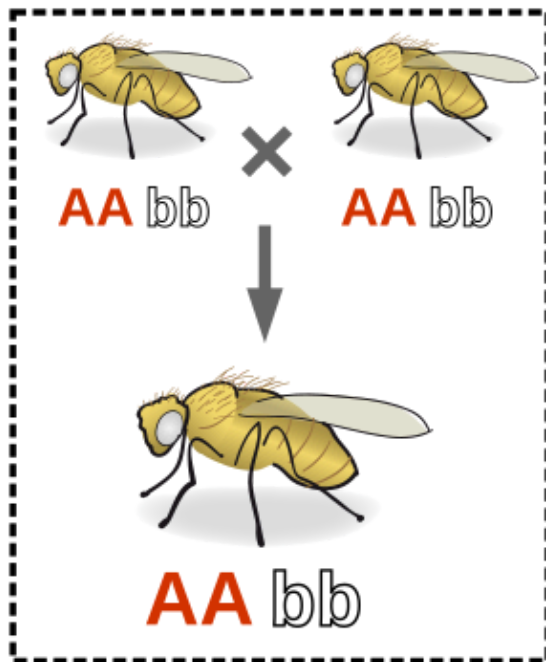
Supponiamo di sottoporre *A. thaliana* a un protocollo di crescita in vitro, in cui il letto di coltura sia privo di un aminoacido (sia essa la leucina): in condizioni normali (ossia con piante wild-type) ciò non è un problema, in quanto le piante, a differenza dell'uomo, posseggono vie anaboliche per ogni aminoacido proteinogenico. Ci poniamo la seguente domanda: quanti

geni e dunque prodotti genici servono per produrre la leucina? Supponiamo che sia un processo multistep che coinvolge più enzimi e prodotti intermedi. Per scoprire i geni coinvolti, irradio o sottopongo a sost. mutagenica il seme di *A. thaliana* (o meglio ancora i suoi gameti). Se la mutazione impatta uno di questi geni, e la mutazione è knock-out (rimozione completa della funzionalità del gene) la leucina non verrà prodotta affatto, e dunque *A. thaliana* mutata, crescerà nel suddetto terreno di crescita deficitario in leucina, crescerà malforme (otteniamo un marker fenotipico). Supponiamo di trovare 10 mutanti (indipendenti, ossia eventi di mutazione diversi), che solitamente vengono indicati come Leu^- , ossia che se piantati in substrato senza leucina non sono in grado di produrla endogenamente. supponiamo di aver fatto mutagenesi a saturazione (ossia si sono impattati tutti i possibili geni coinvolti nella sua sintesi). Si effettua un test di complementazione per capire quanti, in questo caso da 1 a 10, sono gli step della via metabolica in questione.

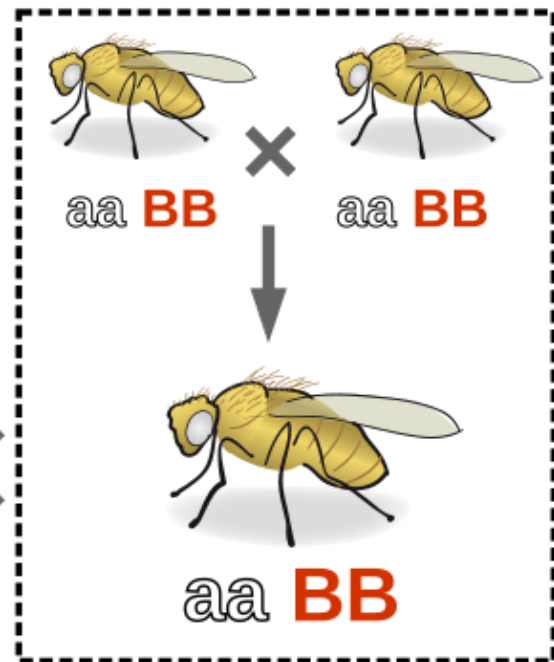
Scegliamo due di questi mutanti, x e y saranno gli alleli oggetto di mutazione. $+/+$, $y/+$, $x/+$, y/x i possibili incroci tra due mutanti ($x/+$ e $y/+$), con + indichiamo un allele wild-type. l'esemplare y/x risulta con fenotipo mutante se i due geni non complementano (ossia se le relative mutazioni targettizzano lo stesso locus genico in entrambi gli alleli mutati) -> abbiamo 25% di frequenza di mutazione (in quanto nel resto dei casi - $+/+$, $y/+$, $x/+$ - abbiamo almeno un allele selvatico, dunque funzionante, per ciascun enzima coinvolto); se invece y/x non è mutante, la mutazione riguarda due geni che complementano (ossia il target delle due mutazioni sono due geni associati a due enzimi della via metabolica diversi, che dunque possiederanno un allele superstite wild-type in qualche tratto del genoma). Eseguo tutte le combinazioni tra i vari mutanti: 1:1, 1:2, 1:3, ... magari 1:2 non complementano, 1:3 sì. Dunque 1 e 3 sono mutazioni sullo stesso gene, 2 su un gene diverso. Eseguendo tutte le combinazioni, scopriamo il numero di geni coinvolti.

Esempio chiarificatore da [wiki](#) sulla complementazione:

White-Eye Strain 1



White-Eye Strain 2



$Aa\ Bb$

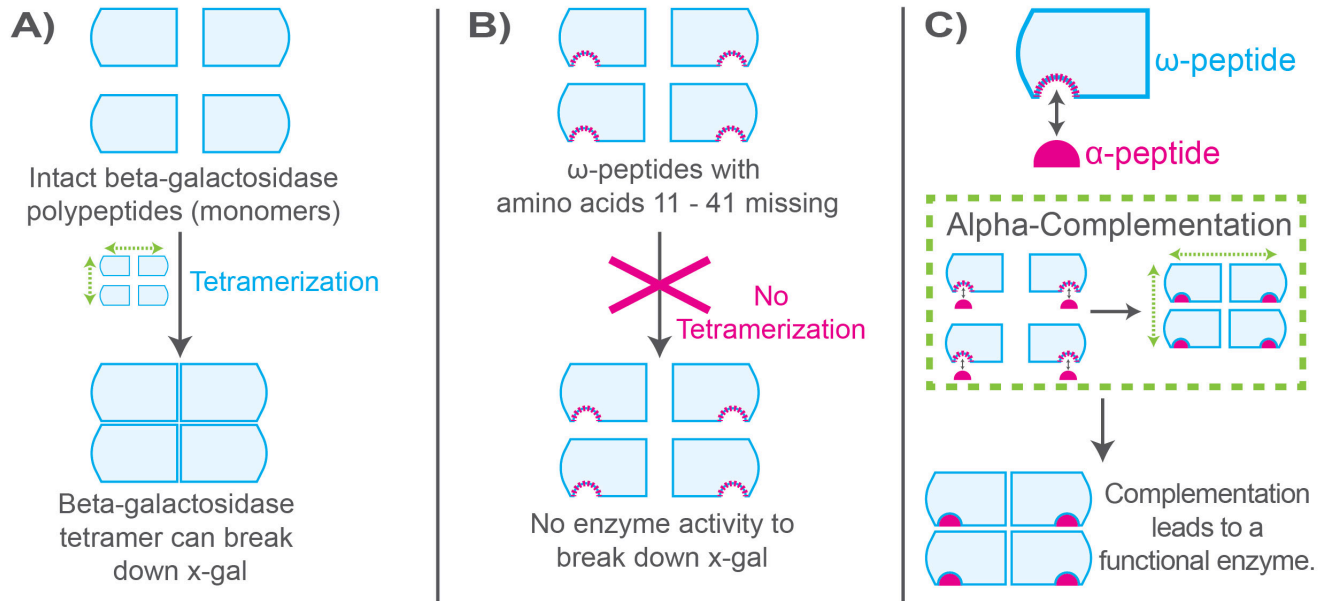


Hybrid Red-Eye Strain

Esempio di complementazione genetica. Due ceppi di mosche hanno gli occhi bianchi a causa di due diverse mutazioni autosomiche recessive che interrompono una singola via metabolica di produzione del pigmento in due punti diversi. Le mosche del ceppo 1 hanno mutazioni complementari a quelle del ceppo 2, perché quando vengono incrociate la prole (ibrido finale) è in grado di completare l'intera via metabolica e quindi ha gli occhi rossi. Una mosca del ceppo 1 non è complementare a un'altra mosca del ceppo 1 perché entrambe sono omozigoti per mutazioni che interessano lo stesso punto della via, quindi la loro prole avrà gli occhi bianchi.

Un altro celebre esempio di complementazione è la cosiddetta alfa-complementazione della beta-galattosidasi (si tratta di un enzima polimerico e formato da più prodotti genici - nella

fattispecie peptidi):



Qui sopra credit: <https://goldbio.com/articles/article/explain-alpha-complementation-and-blue-white-screening-like-im-10>