

# Genetica

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

Github: <https://github.com/giacThePhantom/Genetica>

22 gennaio 2021

# Indice

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduzione</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1      | Il DNA come base molecolare dell'ereditarietà . . . . .                          | 5         |
| 1.1.1    | Isolamento del DNA . . . . .   | 6         |
| 1.1.2    | Caratterizzazione chimica e prima teorizzazione della struttura . . . . .        | 6         |
| 1.1.3    | Determinazione del rapporto tra le basi . . . . .                                | 6         |
| 1.1.4    | Studi del pneumococco . . . . .  | 6         |
| 1.1.5    | Studi dei batteriofagi . . . . .   | 7         |
| 1.1.6    | Alternative al DNA a doppio filamento . . . . .                                  | 7         |
| 1.2      | La rivoluzione del DNA . . . . .   | 8         |
| 1.2.1    | Leggere il DNA . . . . .   | 8         |
| 1.2.2    | Contare il DNA . . . . .   | 8         |
| 1.2.3    | Scrivere il DNA . . . . .  | 8         |
| 1.2.4    | Interazioni gene e ambiente . . . . .  | 10        |
| <b>2</b> | <b>Mitosi e meiosi</b>   | <b>12</b> |
| 2.1      | Riproduzione cellulare . . . . .   | 12        |
| 2.1.1    | Riproduzione procariote . . . . .  | 12        |
| 2.1.2    | Riproduzione eucariote . . . . .   | 12        |
| 2.2      | Cromosomi . . . . .  | 12        |
| 2.2.1    | Struttura . . . . .  | 13        |
| 2.3      | Ciclo cellulare e mitosi . . . . .   | 13        |
| 2.3.1    | Ciclo cellulare . . . . .  | 13        |
| 2.3.2    | Mitosi . . . . .   | 14        |
| 2.4      | Eventi drammatici nella mitosi . . . . .   | 15        |
| 2.4.1    | Rotture del DNA e polverizzazione dei cromosomi da errori nella mitosi . . . . . | 15        |
| 2.4.2    | Cromotripsi causata dal danno del DNA nei micronuclei . . . . .                  | 17        |
| 2.4.3    | Endoreplicazione, la poliploidia con uno scopo . . . . .                         | 18        |
| 2.5      | La riproduzione sessuata - Meiosi . . . . .                                      | 19        |
| 2.5.1    | Meiosi <b>I</b> . . . . .  | 19        |
| 2.5.2    | Intercinesi . . . . .  | 20        |
| 2.5.3    | Meiosi <b>II</b> . . . . .   | 20        |
| 2.5.4    | Confronto con mitosi . . . . .   | 21        |
| 2.5.5    | Fonti di variazione genetica nella meiosi . . . . .                              | 21        |
| 2.5.6    | La meiosi nel ciclo vitale di animali e piante . . . . .                         | 22        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>3</b> | <b>Mendel</b>   | <b>24</b> |
| 3.1      | Vita . . . . .  | 24        |
| 3.1.1    | Esperimenti . . . . .   | 24        |
| 3.1.2    | Il successo . . . . .   | 24        |
| 3.2      | Definizioni . . . . .   | 25        |
| 3.3      | Segregazione e dominanza - incroci monoibridi . . . . .   | 25        |
| 3.3.1    | Esperimento di Mendel . . . . .   | 25        |
| 3.3.2    | Interpretazione dei risultati . . . . .   | 26        |
| 3.3.3    | Principi determinati . . . . .  | 26        |
| 3.3.4    | Pathway molecolare per la forma dei semi . . . . .  | 27        |
| 3.3.5    | Predizione degli esiti degli incroci genetici . . . . .   | 27        |
| 3.3.6    | Testcross - incrocio di controllo . . . . .   | 27        |
| 3.3.7    | Simboli della genetica . . . . .  | 28        |
| 3.4      | Incroci diibridi - il principio dell'assortimento indipendente . . . . .                              | 28        |
| 3.4.1    | Incroci diibridi . . . . .  | 28        |
| 3.4.2    | Il principio dell'assortimento indipendente . . . . .   | 28        |
| 3.4.3    | Relazione tra principio dell'assortimento indipendente e meiosi . . . . .                             | 29        |
| 3.4.4    | Applicazione della probabilità - diagrammi ramificati . . . . .                                       | 29        |
| 3.5      | Effetto del caso su rapporti attesi . . . . .   | 29        |
| 3.5.1    | Test del chi-quadro della bontà di adattamento . . . . .  | 29        |
| 3.6      | Esempi di tratti mendeliani nell'uomo . . . . .   | 30        |
| 3.6.1    | Definizioni . . . . .   | 30        |
| 3.6.2    | Beta-Talassemia . . . . .   | 30        |
| 3.6.3    | Anemia falciforme . . . . .   | 33        |
| <b>4</b> | <b>Estensione dell'analisi genetica mendeliana</b>  | <b>35</b> |
| 4.1      | Pathway genetici . . . . .  | 35        |
| 4.1.1    | Lievito gemmante <i>S. cerevisiae</i> e <i>Neurospora crassa</i> . . . . .                            | 35        |
| 4.2      | Fattori addizionali su un singolo locus . . . . .   | 37        |
| 4.2.1    | Tipi di dominanza . . . . .   | 37        |
| 4.2.2    | Penetranza ed espressività . . . . .  | 39        |
| 4.2.3    | Penetranza . . . . .  | 39        |
| 4.2.4    | Espressività . . . . .  | 39        |
| 4.2.5    | Alleli letali . . . . .   | 40        |
| 4.3      | Interazioni geniche e rapporti mendeliani modificati . . . . .  | 42        |
| 4.3.1    | Interazione genica che produce nuovi fenotipi . . . . .   | 42        |
| 4.3.2    | Fenocopia . . . . .   | 44        |
| 4.3.3    | Interazione genica con epistasi . . . . .   | 44        |
| 4.3.4    | Ridondanza genica . . . . .   | 47        |
| 4.3.5    | Interazione genetica dominante . . . . .  | 48        |
| 4.3.6    | Sovradominanza o vantaggio dell'eterozigote . . . . .   | 48        |
| 4.3.7    | Un soppressore extragenico può cancellare gli effetti fenotipici di una mutazione                     | 48        |
| 4.3.8    | La complementazione - determinare se le mutazioni sono sullo stesso locus o su loci diversi . . . . . | 48        |
| 4.3.9    | <i>Drosophila</i> . . . . .   | 49        |
| 4.3.10   | Analisi di complementazione . . . . .   | 49        |
| 4.4      | Influenza del sesso su trasmissione ed espressione dei geni . . . . .                                 | 49        |
| 4.4.1    | Caratteri influenzati dal sesso . . . . .   | 49        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.4.2    | Caratteri limitati dal sesso . . . . .   | 50        |
| 4.4.3    | Eredità extranucleare - citoplasmatica . . . . .   | 50        |
| 4.4.4    | Effetto genetico materno . . . . .   | 51        |
| 4.4.5    | Imprinting genomico . . . . .  | 52        |
| 4.5      | Anticipazione . . . . .  | 52        |
| 4.6      | Fattori ambientali . . . . .   | 53        |
| 4.6.1    | Effetti ambientali sul fenotipo . . . . .  | 53        |
| 4.6.2    | Eredità delle caratteristiche continue . . . . .   | 53        |
| 4.6.3    | Pleiotropia . . . . .  | 53        |
| 4.6.4    | Probabilità . . . . .  | 54        |
| <b>5</b> | <b>Pedigree</b> . . . . .  | <b>56</b> |
| 5.1      | Simboli dei pedigree . . . . .   | 56        |
| 5.2      | Analisi del pedigree . . . . .   | 57        |
| 5.2.1    | I caratteri autosomici recessivi . . . . .   | 57        |
| 5.2.2    | Caratteri autosomici dominanti . . . . .   | 57        |
| 5.2.3    | Caratteri recessivi legati al cromosoma <b>X</b> . . . . .   | 57        |
| 5.2.4    | Caratteri dominanti legati al cromosoma <b>X</b> . . . . .   | 57        |
| 5.2.5    | Caratteri legati al cromosoma <b>Y</b> . . . . .   | 58        |
| 5.3      | Esempi . . . . .   | 58        |
| 5.3.1    | Fibrosi cistica . . . . .  | 58        |
| 5.3.2    | Sindrome di Marfan . . . . .   | 58        |
| 5.3.3    | Fenilchetonuria <i>PKU</i> . . . . .   | 58        |
| 5.3.4    | Piebaldisimo . . . . .   | 59        |
| 5.3.5    | Incapacità di sentire l'amaro . . . . .  | 59        |
| 5.3.6    | Famiglia cinese colpita da corea di Huntington . . . . .   | 59        |
| 5.3.7    | Complementazione genica nell'uomo - sordità . . . . .  | 60        |
| 5.3.8    | Sindrome di Beckwith-Wiedemann . . . . .   | 60        |
| <b>6</b> | <b>Determinazione del sesso ed eredità legata ad esso</b> . . . . .  | <b>61</b> |
| 6.1      | Teoria cromosomica dell'eredità . . . . .  | 61        |
| 6.1.1    | Scoperta dei cromosomi . . . . .   | 61        |
| 6.1.2    | Indipendenza dei cromosomi . . . . .   | 61        |
| 6.1.3    | Relazione tra il comportamento dei cromosomi e l'eredità dei caratteri secondo Mendel . . . . .                        | 62        |
| 6.2      | Esclusione del <i>mtDNA</i> paterno . . . . .  | 62        |
| 6.2.1    | <i>OXPHOS</i> . . . . .  | 62        |
| 6.2.2    | Endonucleasi mitocondriale <i>G</i> . . . . .  | 62        |
| 6.2.3    | Eteroplasmia del <i>mtDNA</i> nel topo è geneticamente instabile e causa cognizione e comportamento alterati . . . . . | 63        |
| 6.3      | Sistemi di determinazione del sesso . . . . .  | 63        |
| 6.3.1    | I sistemi cromosomici di determinazione del sesso . . . . .  | 63        |
| 6.3.2    | Determinazione genica del sesso . . . . .  | 64        |
| 6.3.3    | Determinazione del sesso legata all'ambiente . . . . .   | 64        |
| 6.3.4    | Determinazione del sesso nella <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .  | 65        |
| 6.3.5    | La determinazione del sesso nell'uomo . . . . .  | 65        |
| 6.4      | Le caratteristiche legate al sesso sono determinate da geni presenti su cromosomi sessuali . . . . .                   | 67        |
| 6.4.1    | Occhi bianchi legati al cromosoma <b>X</b> nella <i>Drosophila</i> . . . . .   | 67        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 6.4.2    | Meccanismo di non-disgiunzione e teoria cromosomica dell'ereditarietà . . . .  | 67        |
| 6.4.3    | Daltonismo legato al cromosoma <b>X</b> nell'uomo . . . . .  | 68        |
| 6.4.4    | Caratteri legati al cromosoma <b>Z</b> . . . . .   | 68        |
| 6.4.5    | Caratteri legati al cromosoma <b>Y</b> . . . . .   | 68        |
| 6.5      | La compensazione del dosaggio genico uniforma i livelli di proteina prodotti dai geni <b>X</b> -linked e dai geni autosomici . . . . . | 69        |
| 6.5.1    | Possibili meccanismi di compensazione . . . . .  | 69        |
| 6.5.2    | Ipotesi di Lyon . . . . .  | 71        |
| 6.5.3    | Meccanismo dell'inattivazione casuale del cromosoma <b>X</b> . . . . .   | 71        |
| 6.5.4    | Escapes . . . . .  | 73        |
| <b>7</b> | <b>Il linkage, la ricombinazione e mappatura del gene eucariote</b>  | <b>74</b> |
| 7.1      | Citogenetica - Bandeggio e mappatura fisica dei cromosomi . . . . .  | 74        |
| 7.1.1    | Tipi di bandeggio . . . . .  | 74        |
| 7.1.2    | Categorizzazione dei cromosomi . . . . .   | 74        |
| 7.1.3    | Strutture dei cromosomi . . . . .  | 75        |
| 7.1.4    | Cromosomi politenici di <i>Drosophila</i> . . . . .  | 75        |
| 7.1.5    | Ibridazione in situ con sonde fluorescenti . . . . .   | 75        |
| 7.1.6    | Mappatura per delezione . . . . .  | 76        |

# Capitolo 1

## Introduzione

Si intende per genetica lo studio della trasmissione dell'informazione genetica da genitori a figli, come questa viene organizzata e decodificata per portare ad un fenotipo rilevante. Si considera la sua organizzazione, divisione, frammentazione utilizzo e modifica nel corso delle varie divisioni di cellule somatiche o germinali. Il DNA svolge il fondamentale ruolo di contenere e permettere la decodifica di informazioni essenziali per la vita. Si indica con mutazione *de novo* una mutazione che accade durante l'osservazione di un sistema. Il soggetto di studio della genetica sono sistemi modello animali o cellulari utilizzati in quanto più semplici da coltivare e studiare. Lo studio si svolge sulle correlazioni genotipo-fenotipo, analisi dei pedigree e loro ricostruzione per capire da dove viene il rischio di portare un fenotipo. L'utilizzo dei sistemi modello per lo studio di patologie o eventi caratteristici dell'uomo è legittimato dal fatto che l'uomo e il sistema modello sono imparentati tra di loro. I modelli sono pertanto predittivi di fenomeni e dell'effetto di mutazioni nella specie umana. I sistemi modello si dividono in:

- Unicellulari con vita coloniale.
- Pluricellulari complessi.
- Pluricellulari semplici (poche cellule).

### 1.1 Il DNA come base molecolare dell'ereditarietà

Nei primi anni 50 si tentava di determinare quale molecola contenesse il materiale genetico. Per determinarla si sono evidenziate alcune sue caratteristiche:

- Deve contenere informazioni complesse e variegata in modo da essere in grado di dare origine alle molteplici forme viventi: generare ovvero fenotipi diversi.
- Deve essere capace di subire modificazioni permanenti o mutazioni.
- Deve essere presente in tutte le forme viventi.
- Deve trovarsi nel nucleo e far parte dei cromosomi.
- Deve essere stabile e capace di replicazione fedele.
- Deve essere in grado di esprimersi, definire e codificare un fenotipo.

Fino all'inizio degli anni 50 si riteneva che fossero le proteine queste molecole in quanto possedevano la complessità di sequenza e funzione necessaria alle caratteristiche elencate. Il tardi-

vo riconoscimento del DNA si deve alla mancanza di conoscenze precise sulla sua composizione e struttura.

### 1.1.1 Isolamento del DNA

Il DNA viene scoperto tra il 1868 e il 1869 da Miescher, medico sperimentale che durante il suo studio a Tübingen si dedica a esplorare il nucleo delle cellule. Per farlo utilizza bende usate piene di pus, materiale di scarto da cui isola prima le cellule e il loro nucleo. Le bende vengono lavate in acqua, una soluzione di solfato di magnesio consente l'estrazione del nucleo da cui vengono rimossi i lipidi con acqua ed etere. Utilizzando acidi blandi si nota la formazione di un precipitato che può essere risospeso usando una soluzione lievemente alcalina. Attraverso saggi alla fiamma Miescher nota come sia presente molto fosforo e lo zolfo sia assente. Miescher riesce pertanto ad isolare una nuova molecola che chiama nucleina. Utilizzando pepsina determina che non è una proteina. I suoi colleghi successivamente confermano il risultato estraendo la nucleina da eritrociti nucleati di pesce confermando la sua natura pervasiva. Un altro ricercatore nel 1889 segue il protocollo e ritiene di aver isolato una sottocomponente della nucleina che chiama acido nucleico. Successivamente Miescher riconferma l'esperimento con lo sperma di salmone isolando da esso la nucleina e la sua presenza in cellula germinali fa sorgere domande sul suo ruolo nell'ereditarietà.

### 1.1.2 Caratterizzazione chimica e prima teorizzazione della struttura

Albrecht Kossel determina che la nucleina è composta da basi azotate, zucchero e fosfato e nella prima decade del 900 Levene e Steudel studiano la struttura della macromolecola e il primo propone una struttura a tetranucleotidi, il DNA come una macromolecola formata da tetrameri contenenti le quattro basi legate tra di loro poste una sopra l'altra. Questo modello viene ampiamente accettato ma l'omogeneità della struttura rende improbabile che questa possa codificare informazioni complesse e pertanto prevale l'idea che il DNA abbia una funzione principalmente strutturale e non si occupi di trasferire le informazioni.

### 1.1.3 Determinazione del rapporto tra le basi

Chargaff, biochimico, studia il DNA utilizzando cromatografia su carta: prendendo il DNA da diverse sorgenti passa alla cromatografia le molecole caratterizzando il rapporto quantitativo relativo tra le componenti e nota come le basi siano in percentuali diverse (rapporti variabili tra gli organismi), pertanto la struttura a tetranucleotide non può essere quella corretta, riscoprendo il valore del DNA.

### 1.1.4 Studi del pneumococco

#### 1.1.4.1 Griffith

Griffith nel 1928 studia a Londra il comportamento del pneumococco e ne osserva due tipi, un primo liscio di tipo *IIIS* (formano una sovrastruttura di zuccheri) e uno rugoso di tipo *IIR*. La forma *IIIS* è aggressiva e in grado di infettare topi con la polmonite. Successivamente compone un esperimento con tre beute di controllo e una di studio. Nella prima beuta fa crescere dei batteri di tipo *IIIS* virulenti e li fa crescere, iniettandoli poi nel topo nota come questo soffre e muore, nel suo sangue si trova crescita batterica. Nella prima beuta fa crescere batteri di tipo *IIR* non virulento, iniettandoli poi nel topo questo non soffre e non si trovano batteri nel suo sangue. Nella terza beuta pone i batteri virulenti e li lisa attraverso il calore: iniettando nel topo i corpi cellulari questo non soffre e non si trovano batteri nel suo sangue. Nella quarta beuta mischia i batteri non virulenti di tipo *IIR* con il

lisato di *IIIS*, mettendoli in coltura e iniettando il topo questo soffre e muore e si trova il batterio di tipo *IIIS* nel suo sangue. Griffith scopre pertanto un principio trasformante, una caratteristica permanente che pertanto non è dovuta al trasferimento della capsula ma che è diventato patrimonio dei batteri. Non riesce a determinare la natura chimica del principio.

### 1.1.4.2 Dawson e Sia

Dawson e Sia ripetono l'esperimento di Griffith senza iniettare le cellule ma mischiando il lisato *IIIS* e *IIR* in coltura e piastrando le cellule sulle piastra di coltura e determinano che il fenomeno è esterno al topo: la cocoltura è sufficiente per far comparire colonie *IIR* virulente. Si ha la conferma del principio trasformante.

### 1.1.4.3 Avery

Nel 1944 nel laboratorio diretto da Avery al Rockefeller Institute viene svolto un esperimento per determinare la molecola responsabile del principio trasformante. Si fanno crescere i batteri virulenti in coltura e li si uccide. Il lisato viene diviso in tre provette separate nelle quali vengono introdotte rispettivamente RNAasi, proteasi e DNAasi. Mischiando i lisati con *IIR* si osserva quando si ottiene la manifestazione fenotipica del principio trasformante: soltanto il lisato trattato con DNAasi non dimostra il passaggio di informazione e pertanto la molecola trasformante è il DNA.

## 1.1.5 Studi dei batteriofagi

La phage church in particolare Hershey e Chase, un gruppo di microbiologi appassionato alla ricerca dei batteriofagi, entità visibili al tempo solo indirettamente osservando la loro capacità di uccidere batteri, sviluppa un esperimento per visualizzare la molecola responsabile del passaggio genico. Per farlo si sfrutta il fatto che la molecola è ricca di fosforo ma mancante zolfo, elemento presente invece nelle proteine. Pertanto si usa un terreno contenente un isotopo radioattivo dello zolfo dove vengono fatti crescere i batteri e infettati con il batteriofago *T2* in modo da avere una progenie di fagi marcata. Recuperando i fagi radioattivi e infettando cellule di *E. coli* non radioattive le si fa infettare, si separano con un frullatore e si centrifuga per ottenere un pellet di cellule batteriche. Osservando dove si trova la radioattività si nota come questa rimane nel surnatante e non è nei batteri che hanno subito l'infezione: questi successivamente subiscono lisi e la progenie fagica non è radioattiva. Si conclude che le macromolecole marcate con lo zolfo non sono importanti per produrre progenie fagica. Si ripete l'esperimento con fosforo radioattivo e si nota come la radioattività in questo caso si trova nel pellet e non nel surnatante: il tracciante informa che molto probabilmente il DNA è entrato nel batterio e la popolazione di fagi da esso derivante è parzialmente radioattiva. Unendo i due risultati si determina che le proteine non partecipano all'infezione mentre l'acido nucleico viene trasmesso nei batteri e riproposto nella progenie: l'elemento importante per la produzione di nuovi fagi è il DNA e non le proteine che avranno ruolo di rivestimento, di formare il capsido che rimane fuori dalla cellula. Le proteine hanno pertanto la funzione primaria di proteggere e trasportare il materiale genetico.

## 1.1.6 Alternative al DNA a doppio filamento

Fraenkel-Conrat e Singer studiando il virus del mosaico del tabacco notano come questo sia formato da una struttura proteica molto regolare che forma un barilotto contenente una singola molecola di RNA. Si trovano due varianti del virus A e B e si riesce a smontare e rimontare i virus in provetta in modo da scambiare il capsido tra una popolazione A e una B. Gli ibridi chimerici ora vengono



utilizzati per infettare delle foglie e studiando la progenie si determina che il tipo è determinato dall'RNA e non dalle proteine. Per questo tipo di virus è l'RNA la molecola della vita. Gierer e Shramm completano e confermano gli esperimenti notando come l'evoluzione ramificandosi ha scelto diverse strategie per la molecola della vita: DNA a filamento singolo (ssDNA) e doppio (dsDNA) o RNA a filamento singolo (ssRNA) e doppio (dsRNA).

## 1.2 La rivoluzione del DNA

Si intende per rivoluzione del DNA la capacità di leggere, contare e scrivere il DNA iniziata con il nuovo millennio.

### 1.2.1 Leggere il DNA

La tecnica di lettura del DNA viene scoperta da Sanger (da cui prende il nome) che inventa e migliora metodi per leggere il DNA: dei nucleotidi modificati in 3' in modo che blocchino la sintesi da parte della DNA polimerasi quando vengono aggiunti alla catena nascente e accoppiandoli con fluorocromi si può ricostruire la sequenza del DNA in modo lineare in quanto i colori permettono di determinare la posizione delle basi. Questo processo è veloce ed automatizzabile. Il metodo Sanger accoppiato con la reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di scegliere un segmento di DNA e crearne moltissime copie in modo da aumentare il segnale e la capacità di riconoscerne la sequenza. All'inizio del 2000 si annuncia il primo draft del genoma umano ottenuto dallo studio del DNA di diversi individui. Il genoma umano è composto da 3 200 000 000 di basi. Ora si necessita di decodificarlo andando a perseguire la funzione del gene. Lo sviluppo tecnologico ha abbassato drasticamente i costi di sequenziamento rendendo meno importanti lo studio del modello e dei pedigree e la ricerca dei tratti rari. Sono nati genome browser, repository contenenti informazioni generali sul genoma dell'uomo e di altri organismi.

### 1.2.2 Contare il DNA

Il next generation sequencing permette di contare ed annotare informazioni sul DNA, diventa uno strumento quantitativo per capire come l'informazione viene usata e decodificata. Si osserva come alcuni frammenti si sono spostati, la scomparsa di un frammento e le sequenze invertite (inversioni). Grazie alla sua lettura e quantificazione si capisce la struttura della cromatina, capire i punti di inizio di trascrizione da parte dell'RNA polimerasi, tentando di capire l'organizzazione del genoma, numerando i geni e separando la frazione codificante da quella non funzionale e ingombrante. Si noti come la trascrizione genera plasticità in quanto ci sono molte possibilità di splicing alternativo e siti di poliadenilazione diversi. Si nota come studiando il genoma umano invece dei teorizzati 100 000 geni le analisi iniziali ne hanno trovati 35 000 e quel numero è stato diminuito fino a 21 000 e molti geni codificano solo per RNA e non per proteine come prodotto finale.

### 1.2.3 Scrivere il DNA

#### 1.2.3.1 Terapia genica

Un esempio di terapia genica è l'ingegnerizzazione delle cellule T citotossiche per l'eradicazione della leucemia. Lo studio utilizza metodi per convertire i linfociti T citotossici di un paziente in modo che siano riprogrammati (ingegnerizzati) per trasformarli in killer specifici della leucemia aumentando l'aspettativa di vita. La conversione avviene grazie a DNA ricombinante riarrangiando frammenti e

costruendo un vettore lentivirale in modo che esprima un antigene chimerico che riconosca e distrugga le cellule leucemiche. Nell'antigene chimerico si trova una molecola transmembrana con un dominio extracellulare a singola catena in grado di riconoscere un antigene specifico delle cellule leucemiche, un dominio transmembrana che la ancora e un dominio citoplasmatico che va ad attivare vie di segnalazione che permettono la sopravvivenza e la proliferazione della cellula solo in presenza di cellule leucemiche. L'ingegnerizzazione del linfocita avviene grazie ad un virus formato dal capsido di un virus HIV per proteggere l'RNA e una chimera di funzioni di geni umani, un sistema di segnalazione del woodchuck, del genoma bovino, resistenza alla penicillina e un punto di origine di replicazione. Tutti questi elementi uniti sono necessari per creare il vettore ingegnerizzante. Un ulteriore esempio di terapia genica si utilizza per curare casi di combined immunodeficiency, malattia che causa un anormale rischio di infezione a causa della disattivazione del gene per l'adenosina deaminasi. Infettando le cellule con un virus disattivato contenente il gene selvatico difettivo nel genoma del paziente. L'utilizzo dei virus presentava però dei problemi in quanto possibile causa di patologie tumorali e leucemie e viene pertanto sostituito con la tecnica CRISPR/Cas9.

### 1.2.3.2 Clonaggio

Si intende per clonaggio sia il clonaggio posizionale di un gene, che coinvolge identificazione progressiva di un gene su un cromosoma attraverso tecniche di mappatura sempre più fini sia la produzione di animali transgenici sia la selezione di linee con tratti fenotipici interessanti e il loro incrocio per produrre elementi di interesse biologici. Nel 1996 viene clonata la pecora Dolly prendendo una cellula somatica da una ghiandola mammaria di un adulto riprogrammandola parzialmente in modo che diventi sorgente di informazione per una cellula germinale. Per determinare la buona uscita dell'esperimento l'impianto dello zigote è stato fatto in una madre surrogata con caratteristiche fenotipiche diverse. Si nota come Dolly presenta caratteristiche della cellula somatica riprogrammata.

### 1.2.3.3 Editing genomico

Si definisce editing genomico il processo di modificare genomi sito specificamente attraverso enzimi. Uno degli enzimi utilizzati è il complesso CRISPR/Cas9. L'enzima Cas9 è una DNA endonucleasi che naturalmente funziona come difesa nei batteri per DNA invasore. Possiede due siti attivi che rompono un filamento di una molecola di DNA a doppio filamento. L'enzima è guidato al target da una molecola di RNA che riconosce le sequenze di rottura PAM (protospacer adjacent motif). Cas9 crea pertanto rotture sito specifiche che possono essere riparate attraverso unione non omologa o ricombinazione omologa. Durante la ricombinazione omologa l'aggiunta del DNA donatore permette l'inserzione di una sequenza aggiuntiva al sito di rottura permettendo l'ingegnerizzazione del genoma. Un vantaggio rispetto alle altre tecniche di CRISPR/Cas9 è che la correzione è sito specifica e permette così una più alta frequenza di correzione del fenotipo. Inoltre rispetto alle altre tecniche non aggiunge un gene funzionale o parzialmente funzionale insieme al gene difettivo ma va a rimuoverlo.

**1.2.3.3.1 Prevenzione della distrofia muscolare nei topi attraverso editing del DNA germinale mediato da CRISPR/Cas9** La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia genetica legata al cromosoma X. È determinata da una mutazione nel gene che codifica la distrofina. È caratterizzata da una progressiva debolezza muscolare e una prospettiva di vita ridotta. Si utilizza editing genomico mediato da clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 (CRISPR/Cas9) per correggere il gene della distrofina mutato nella linea germinale del topo *mdx*. Si nota come si produce una popolazione di animali in cui i geni corretti *Dmd* vanno variano tra il 2% e il 100%. Che supera l'efficienza della reazione di editing, suggerendo un vantaggio

selettivo per le cellule corrette. Il topo *mdx* presenta una mutazione nonsense nell'esone 23 del gene *Dmd* (da *TAA* a *CAG*): si inietta Cas9, sgRNA (single-guide RNA) e uno stampo di HDR (homology directed repair) nello zigote del topo per correggere la mutazione nella linea germinale. Il posizionamento del sgRNA è permesso dalla presenza della sequenza PAM *GGC* nelle vicinanze. CRISPR/Cas9 corregge la mutazione durante lo sviluppo embrionale del topo.

**1.2.3.3.2 Utilizzo in medicina** L'editing genomico nella linea germinale non è correntemente possibile negli umani. Nonostante questo in linea di principio può essere utilizzato in cellule postnatali in vivo superando difficoltà tecnologiche: per dirigere le componenti verso le cellule somatiche appropriate si può utilizzare il virus adeno-associato (AAV). Gli effetti a lungo termine devono essere ancora valutati da studi preclinici in grandi modelli di malattia. Può venire utilizzato per l'inattivazione del retrovirus endogeno porcino nei maiali per permettere gli xenotrapianti con gli umani o ancora per attivare un promotore che combatta l'obesità causata da aploinsufficienza andando a colpire la copia funzionale del gene rimanente attraverso attivazione mediata da CRISPR (CRISPRa) in maniera specifica al tessuto.

### 1.2.3.4 Biologia sintetica

Si intende per biologia sintetica il processo di ricerca volto a creare un genoma sintetizzato completamente in laboratorio. Un primo esperimento ha coinvolto il design, la sintesi e l'assemblaggio del materiale genetico di *M. mycoides* e il suo trapianto in cellule di *M. caprocolum* a cui era stato rimosso il DNA. L'unico DNA presente era pertanto quello sintetizzato in laboratorio che conteneva sequenze "watermark". Le nuove cellule possedevano le proprietà fenotipiche attese ed erano capaci di replicazione autonoma continua. Si è pertanto capaci di creare in laboratorio un genoma partendo da una prima fase di progettazione al computer. Il passo successivo è quello di analisi del genoma: ora che è possibile progettarne uno da zero è possibile eliminare geni o loro combinazioni in modo da osservare quali sono a creare le condizioni minime necessarie alla vita permettendo un loro studio accurato in un genoma minimo. Inoltre si ottiene in questo modo un genoma piccolo e versatile per investigare altre funzioni della vita senza che questo diventi troppo grande e non permetta più la propria trasmissione alla progenie. Un ulteriore esperimento ha preso un lievito con un genoma più grande e 16 cromosomi che sono stati fusi in un'unica molecola circolare a cui sono stati introdotti elementi di ricombinazione per determinare l'importanza della posizione dei geni, la relazione tra topografia dei geni e loro livelli di trascrizione o processamento in traduzione. Il lievito così modificato non è resiliente come quello fisiologico in quanto più suscettibile a errori di trasmissione, ma si è scoperto che altre organizzazioni non precludono la possibilità della vita.

## 1.2.4 Interazioni gene e ambiente

Lo studio dei geni è complicato dalle interazioni tra geni e ambiente. Si intende per ambiente la competizione tra cellule diverse o, in organismi complessi, dalla loro cooperazione e interazione nelle varie nicchie dei microambienti tissutali. L'interazione tra le cellule come quelle umane con la comunità microbiche e virali con cui convivono aumenta il livello di complessità introducendo espressioni specifiche per lo stato ambientale.

**1.2.4.0.1 L'attivazione ambientale e genetica di un asse di segnalazione BDNF/Leptina causa remissione ed inibizione del cancro** Il cancro è influenzato dall'ambiente ma questo ruolo non rimane definito. Si nota come topi che vivono in un ambiente arricchito (EE - enriched environment) mostrano ridotta crescita tumorale e aumentata remissione. Il siero degli animali

tenuti nell'EE inibisce la crescita del tumore in vitro e presenta livelli più bassi di leptina. Il fattore neurotrofico ipotalamico derivato dal cervello (BDNF) è stato selettivamente sovra regolato dall'EE e la sua superespressione ha ridotto il carico tumorale. Si nota come il melanoma *B16* rappresentante al giorno 17 presenta  $10^5$  cellule per topo. L'EE ha indotto una completa resistenza al tumore in un sottoinsieme di topi e tutti i topi di controllo presentano tumori visibili. Il risultato dell'esperimento mostra che vivere in un EE porta a un'inibizione significativa della crescita del cancro. Il meccanismo dell'attivazione dell'asse HSA e l'induzione dell'espressione ipotalamica di BDNF in risposta a stimoli ambientali porta all'attivazione simatoneurale che attiva gli adipociti b-ARs inibendo l'espressione e il rilascio della leptina.

## Capitolo 2

# Mitosi e meiosi

### 2.1 Riproduzione cellulare

Affinchè una cellula si riproduca con successo:

- Le sue informazioni genetiche devono essere copiate.
- Le copie di queste informazioni devono essere separate le une dalle altre.
- La cellula deve dividersi.

#### 2.1.1 Riproduzione procariote

Il processo di replicazione del cromosoma batterico circolare e di divisione cellulare viene detto scissione binaria. La replicazione inizia in un *Ori* (origine di replicazione). Le origini dei due cromosomi si allontanano verso gli estremi opposti della cellula. In alcuni batteri proteine fissano i cromosomi alla membrana plasmatica alle estremità opposte. Tra i cromosomi si forma una nuova parete cellulare che porta allo sviluppo di due cellule. In condizioni ottimali può avvenire anche ogni *20min*.

#### 2.1.2 Riproduzione eucariote

Anche la riproduzione della cellula eucariote richiede che si verifichino processi di replicazione del DNA, separazione e divisione nel citoplasma delle copie. Il nucleo possiede una struttura interna detta matrice nucleare costituita da fibre proteiche che mantengono relazioni spaziali precise tra i componenti nucleari.

### 2.2 Cromosomi

Negli eucarioti il genoma è organizzato in cromosomi, molecole di DNA che in determinati momenti del ciclo cellulare si presentano altamente conservati e ben visibili. Ogni specie contiene un numero caratteristico di cromosomi (umani 46). A causa della riproduzione sessuata sono presenti due serie di cromosomi: una ereditata dal genitore di sesso femminile e l'altra da quello maschile. Ogni cromosoma possiede pertanto un cromosoma corrispondente nell'altra con cui forma una coppia omologa. I due cromosomi di una coppia omologa hanno struttura simile e trasporta informazioni

## 2.3. CICLO CELLULARE E MITOSI

---

relative alla stessa serie di tratti ereditari. Copie di geni su cromosomi omologhi sono dette alleli. Costituiscono un'eccezione i cromosomi sessuali. Si dice ploidia il numero di serie di informazioni genetiche che una cellula possiede.

- Si dicono diploidi le cellule con due serie di informazioni.
- Si dicono aploidi le cellule con un'unica serie di informazioni.
- Si dicono poliploidi le cellule che contengono più serie di informazioni.

Il cromosoma può essere costituito da un singolo cromatide (una molecola di DNA) o da due cromatidi fratelli (due molecole di DNA).

### 2.2.1 Struttura

Essendo i cromosomi molto lunghi si rende necessario compattarli intorno alle proteine istoniche fino a costruire un cromosoma a forma di bastoncello. Nel corso della vita della cellula i cromosomi sono troppo esili per essere osservati, ma dopo la divisione cellulare si condensano fino a formare strutture osservabili.

#### 2.2.1.1 Centromero

Il centromero è il punto di attacco dei microtubuli del fuso, i filamenti responsabili del movimento del cromosoma durante la divisione cellulare. Ha l'aspetto di una strozzatura e prima della divisione si forma in esso una struttura multi-proteica detta cinetocore a cui si saldano i microtubuli del fuso. La posizione del centromero permette di classificare i cromosomi in metacentrici, submetacentrici, acrocentrici e telocentrici.

#### 2.2.1.2 Telomeri

I telomeri costituiscono la regione terminale, proteggono e stabilizzano le terminazioni lineari dei cromosomi. Garantiscono la stabilità del cromosoma e limitano la divisione cellulare. Hanno un ruolo importante nella senescenza e insorgenza del cancro.

#### 2.2.1.3 Origini di replicazione

Le origini di replicazione sono i siti in cui ha inizio la sintesi del DNA. Quando ogni cromosoma si replica produce una copia di sé stesso, un cromatidio fratello che gli rimane unito a livello del centromero.

## 2.3 Ciclo cellulare e mitosi

### 2.3.1 Ciclo cellulare

Il ciclo vitale di una cellula si divide in due grandi parti: l'interfase in cui la cellula cresce e la fase *M* in cui avviene la divisione nucleare e cellulare.

### 2.3.1.1 Interfase

L'interfase è il periodo di crescita e sviluppo compreso tra divisioni cellulari. Viene a sua volta divisa in varie fasi:

- Fase  $G_1$ : la cellula si accresce e può decidere se entrare in  $G_0$  o fase di quiescenza o raggiungere il checkpoint  $G_1/S$ . Una volta superato il checkpoint la cellula è programmata per dividersi.
- Fase  $S$ : viene duplicato il DNA.
- Fase  $G_2$ : la cellula si prepara per la mitosi. Questa continua fino a che si raggiunge il checkpoint  $G_2/M$ , dopo il quale la cellula può dividersi.

### 2.3.1.2 Fase M

Nella fase  $M$  avvengono la mitosi e la citocinesi, ovvero la divisione cellulare che darà origine a due cellule figlie che rientrano nella fase  $G_1$ .

## 2.3.2 Mitosi

La mitosi è il processo di divisione cellulare che garantisce la conservazione e la distribuzione dello stesso numero di cromosomi da una cellula madre alle due cellule figlie. Il materiale cromosomico raddoppia una volta e la cellula si divide una volta.

### 2.3.2.1 Fasi della mitosi

**2.3.2.1.1 Interfase** Durante l'interfase è presente la membrana nucleare e i cromosomi sono in forma rilassata, entrano nel nucleo della cellula i centrosomi.

**2.3.2.1.2 Profase** La profase inizia quando i lunghi filamenti di cromatina cominciano a condensarsi attraverso processi di spiralizzazione in cui i cromosomi diventano più corti e più spessi. Ogni cromosoma replicato durante la fase  $S$  precedente consiste di una coppia di cromatidi fratelli. Ogni cromatide contiene un centromero. Si forma inoltre il fuso mitotico, nelle cellule animali a partire da una coppia di centrosomi che migrano alle estremità della cellula. I centrosomi contengono il centriolo costituito da microtubuli.

**2.3.2.1.3 Prometafase** Nella prometafase la membrana nucleare si disgrega e i microtubuli del fuso entrano in contatto con i cromosomi: ogni cromosoma si fissa a microtubuli che provengono da poli opposti del fuso: un microtubulo proveniente dal centrosoma si fissa al cinetocore di uno dei cromatidi fratelli, mentre il microtubulo proveniente dall'altro centrosoma si fissa a quello rimasto libero. Questa disposizione viene detta biorientamento cromosomico.

**2.3.2.1.4 Metafase** Nella metafase i cromosomi si allineano sulla piastra metafasica, il piano equatoriale della cellula, situata tra i due centrosomi. Ora un checkpoint di assemblaggio del fuso mitotico garantisce che ogni cromosoma si allineato sulla piastra e assicurato alle fibre dei poli opposti del fuso. Il passaggio da questo checkpoint dipende dalla tensione generata sul cinetocore quando i due cromatidi vengono tirati in direzioni opposti.

**2.3.2.1.5 Anafase** Durante l'anafase i cromatidi fratelli si separano muovendosi verso i poli opposti. Proteine dette motori molecolari rimuovono tubulina dal fuso in modo da generare forze che trascinano il cromosoma verso i poli.

**2.3.2.1.6 Telofase** Durante la telofase i cromosomi giungono ai poli del fuso, si ricostituisce la membrana nucleare e i cromosomi subiscono un rilassamento.

### 2.3.2.2 Attivazione della fase M

I responsabili dell'inizio della fase *M* in una cellula sono il *MPF* (fattore di promotore della fase *M*) e la *ciclina B*.

**2.3.2.2.1 Fase  $G_1$**  All'inizio della fase  $G_1$  i livelli di *MPF* e di *ciclina B* sono praticamente nulli. La cellula comincia a sintetizzare *ciclina B*.

**2.3.2.2.2 Fase S** Durante la fase *S* i livelli aumentati di *ciclina B* si combinano con *CDK* (chinasi ciclina-dipendente), producendo un aumento di *MPF* inattivo.

**2.3.2.2.3 Fase  $G_2$**  Durante la fase  $G_2$  dell'interfase si accumula *ciclina B*. Verso la fine della  $G_2$  l'*MPF* (fattore promotore della fase *M*) viene attivato attraverso fosforilazione da fattori di attivazione determinando la frammentazione dell'involucro nucleare, la condensazione dei cromosomi, l'assemblaggio del fuso e tutti gli altri fenomeni associati alla fase *M*. È pertanto il livello critico di *MPF* attivo a causare la progressione della cellula attraverso il punto di controllo  $G_2/M$  e l'ingresso in mitosi.

**2.3.2.2.4 Metafase** Verso la fine della metafase la degradazione della *ciclina B* riduce la quantità di *MPF* attivo provocando l'anafase, la telofase, la cinetochinesi e l'interfase.

## 2.4 Eventi drammatici nella mitosi

### 2.4.1 Rotture del DNA e polverizzazione dei cromosomi da errori nella mitosi

In questo studio si tenta di identificare un meccanismo in cui errori nella segregazione dei cromosomi durante la mitosi genera rotture del DNA attraverso la formazione dei micronuclei. I micronuclei si formano quando errori mitotici producono cromosomi lagging. Studiandoli si nota come subiscono una replicazione del DNA asincrona e difettiva risultando in danno al DNA e spesso frammentazione del cromosoma nel micronucleo. Il destino dei micronuclei è vario: possono persistere per molte generazioni o essere ridistribuiti in nuclei figli, pertanto la segregazione errata può portare a mutazioni e riarrangiamenti del cromosoma che possono integrarsi nel genoma. La polverizzazione dei cromosomi nei micronuclei può essere anche la causa del fenomeno di cromotripsia, dove cromosomi o loro braccia subiscono massive rotture del DNA e riarrangiamenti. Due modelli animali dove l'errore di segregazione risulta in sviluppo tumorale mostrano eventi di cromotripsia. I micronuclei si formano dai cromosomi in ritardo nell'anafase o da frammenti di cromosomi acentrici. Non si conosce precisamente la composizione e proprietà funzionali dei micronuclei ma mostrano molte somiglianze con il nucleo. Diversi studi danno risposte diverse al fatto che i micronuclei siano attivi



trascrizionalmente, replicano il DNA o abbiano una normale risposta al danno. Il fato ultimo del cromosoma intrappolato nei micronuclei rimane poco chiaro.

### 2.4.1.1 Esperimento

Per determinare se i micronuclei appena formati sviluppino danni al DNA si generano micronuclei in cellule sincronizzate e li si traccia attraverso il ciclo cellulare.

**2.4.1.1.1 Sincronizzazione** Come primo approccio di sincronizzazione i micronuclei sono stati generati da cellule *U2OS* trasformate dal rilascio di depolimerizzazione dei microtubuli indotta dal nocodazolo. Inoltre in quanto l'aneuploidia può causare un arresto del ciclo cellulare causato da *p53* questa è stata silenziata da interferenza a RNA (RANi) in modo da permettere di monitorare il destino delle cellule a fasi successive del ciclo cellulare. Un altro metodo indipendente per generare i micronuclei avviene attraverso una linea cellulare umana *HT1080* che porta un cromosoma umano artificiale *HAC* con un cinetocoro che può essere condizionalmente inattivato. In questo sistema l'assemblaggio del cinetocoro sull'*HAC* è bloccata dal lavaggio di dossiciclina dal medium in modo che *HAC* sia inabile di attaccarsi al fuso mitotico ed è lasciata indietro durante l'anafase riformandosi come micronucleo.

**2.4.1.1.2 Osservazione dei micronuclei** Presi insieme i micronuclei non presentano significativo danno al DNA durante  $G_1$  ma una grande frazione lo acquisisce durante la fase *S*, danno che persiste in  $G_2$ . Per determinare se l'acquisizione del danno richiede la replicazione del DNA le cellule micronucleate sincronizzate sono state rilasciate in un medio contenente timidina per bloccare la replicazione del DNA. Si nota come il blocco della replicazione abolisce l'acquisizione del danno al DNA dimostrando che le rotture nei micronuclei avvengono in una maniera dipendente dalla replicazione. Per l'osservazione del danno si rilasciano le cellule sincronizzate in un medium con e in uno senza con  $2mM$  timidina. Le cellule sono state colorate per *TUNEL* (verde) e *ciclina B1* (rosso). In un'altra osservazione le cellule vengono marcate con *bromodeossiuridina* (*BrdU*), riconoscibile con un anticorpo e mostra la sintesi del DNA. Si nota come il micronucleo si colora di rosso in un momento successivo, confermando l'ipotesi che il danno al DNA venga acquisito a causa di un ritardo nella sintesi del DNA al suo interno rispetto ai cromosomi nei nuclei.

**2.4.1.1.3 Rotture cromosomiche** Successivamente si procede per testare la predizione che replicazione anormale del DNA nei micronuclei può generare rotture cromosomiche. Si preparano dalle cellule non trasformate del primo ciclo cellulare dopo il rilascio del nocodazolo o dai controlli trattati con *DMSO*. Si nota come il 7.6% dei cromosomi esibisce cromosomi che appaiono frammentati colorati attraverso *DAPI*. Il meccanismo di polverizzazione coinvolge compattamento di cromosomi parzialmente replicati indotto dall'attività di *CDK* e viene detto compattazione cromosomica prematura.

**2.4.1.1.4 Il destino dei cromosomi nei micronuclei** Le aberrazioni cromosomi acquisite nei micronuclei possono essere reincorporate nel genoma. La maggior parte dei micronuclei sono stabilmente mantenuti durante l'interfase e nonostante alcuni micronuclei possono essere estrusi non ne sono stati individuati dall'esperimento. I micronuclei non erano degradati, non co-localizzano con i lisosomi e non si fondono con il nucleo primario, ma dopo la rottura della membrana nucleare alcuni micronuclei possono unirsi ad altri cromosomi mitotici ed essere distribuiti alle cellule figlie. Si mostra pertanto come i micronuclei persistono in diverse generazioni e che il cromosoma contenuto in esso può essere segregato nei nuclei delle cellule figlie. Pertanto riarrangiamenti del DNA e mutazioni

nei micronuclei possono essere incorporati nel genoma di una cellula. Questo meccanismo potrebbe giustificare il fenomeno della cromotripsia.

**2.4.1.1.5 Cromotripsia** La cromotripsia è stata scoperta sequenziando il genoma delle cellule tumorali ed è definita da cambi del numero di copie del DNA in piccola scala e riarrangiamenti intracromosomiali ristretti a un singolo cromosoma o a un suo braccio. Sono stati proposti due modelli non esclusivi per la cromotripsia:

- La frammentazione di un cromosoma seguita da riunione attraverso unione di terminazioni non omologhe.
- La replicazione del DNA aberrante risultante in stalli della forcella e cambio di stampo o replicazione indotta da rotture e mediata da micro-omologie.

### 2.4.2 Cromotripsia causata dal danno del DNA nei micronuclei

La cromotripsia è caratterizzata da riarrangiamenti genomici estensivi e un pattern oscillante di numero di copie di DNA ristretti a uno o più cromosomi. Il meccanismo non è conosciuto ma potrebbe essere causato dall'isolamento di un cromosoma nei micronuclei. Nell'esperimento si dimostra come il meccanismo della cromotripsia può coinvolgere la frammentazione e il riasssemblaggio di un singolo cromatide da un micronucleo. Studi del genoma del cancro mostrano come esistano eventi di mutazione che generano mutazioni tutte in una volta durante un singolo ciclo cellulare. Un esempio di questo è la cromotripsia, dove avviene un pattern unico di riarrangiamenti raggruppati coinvolgendo uno o pochi cromosomi. Si dimostra attraverso imaging di singole cellule con analisi "Look-Seq" come la formazione di micronuclei può generare uno spettro di riarrangiamenti cromosomiali complesso, fornendo la prova per un meccanismo che porta alla cromotripsia.

#### 2.4.2.1 Strategia look-seq

Per determinare le conseguenze genomiche del danno al DNA nei micronuclei si prendono cellule non trasformate *RPE-1* sincronizzate dal rilascio di nocodazolo e poste in piastre a pozzetti. Si identificano i pozzetti contenenti una singola cellula micronucleata. Attraverso imaging delle cellule in vivo si identificano le cellule dove la membrana micronucleare si è rotta dopo l'inizio della fase *S*. Questi esperimenti sono stati utilizzando dopo attraverso eliminazione di *p53* attraverso *siRNA*. Dopo una divisione della cellula micronucleata si selezionano le figlie senza micronuclei indicando che il cromosoma micronucleare è stato reincorporato nel nucleo primario. Le cellule sono state selezionate in quanto la rottura disattiva processi di replicazione e trascrizione del DNA. Le cellule figlie sono state successivamente separate, amplificate (multistrand displacement amplification, *MDA*), sequenziate ed analizzate indipendentemente.

#### 2.4.2.2 Destino dei cromosomi

**2.4.2.2.1 Caso 1** Il cromosoma in ritardo viene correttamente segregato ma partizionato in un micronucleo in una cellula figlia. Il cromosoma in esse viene sotto replicato e segregato risultando in un rapporto tra le figlie di questa di 2 : 1.

**2.4.2.2.2 Caso 2** Il cromosoma in ritardo è mal segregato in un micronucleo in una cellula figlia. Il cromosoma è sotto replicato e segregato asimmetricamente, risultando in un rapporto tra le figlie di questa di 3 : 2.

### 2.4.2.3 Conclusioni

La segregazione mitotica errata può essere altamente mutagenica, con importanti implicazioni per come questi errori e le aneuploidie potrebbero aver contribuito al cancro o altre malattie umane. La cromotripsia è presente in una piccola percentuale di cancro umani e altri disordini congenitali, ma il tasso di cromotripsia è probabilmente più alto in quanto la maggior parte di questi eventi compromettono il fitness cellulare e potrebbero essere individuati solo da un'analisi unicellulare. I micronuclei potrebbero pertanto essere un'importante fonte di variabilità genetica.

### 2.4.3 Endoreplicazione, la poliploidia con uno scopo

Si nota come un aspetto interessante della diversità dei tipi cellulari è che molte cellule negli organismi diploidi sono poliploidi. Questo evento si dice endoploidia ed è essenziale per il normale sviluppo e fisiologia di molti diversi organismi. Si studiano come sia piante ed animali usino varianti del ciclo cellulare o endoreplicazioni risultando in cellule poliploidi che supportano specifici aspetti dello sviluppo. L'endoploidia può inoltre avvenire in risposta a certi stress fisiologici e come può portare allo sviluppo di tumori. I fattori che contribuiscono all'endoreplicazione sono stress esterno, crescita e differenziazione. Può essere indotta inoltre per creare una catastrofe mitotica alle cellule tumorali che causa endomitosi e sopravvivenza della cellula e una de poliploidizzazione che porta a una proliferazione mitotica.

#### 2.4.3.1 Meccanismi di endoreplicazione

**2.4.3.1.1 Endociti** Gli endocicli sono definiti come cicli cellulari consistenti di una fase *S* e *G* senza la divisione cellulare. Le cellule endociclianti non entrano in mitosi: non condensano i cromosomi e non rompono la membrana nucleare. I tricomi sorgono dalle cellule poliploidi che possono essere trovate sulla superficie di tessuti di piante.

**2.4.3.1.2 Rereplicazione** La rereplicazione risulta da regolazione aberrante in cui la sintesi del DNA è iniziata multiple volte a origini di replicazione individuali durante una singola fase *S*. Questo risulta in una crescita del contenuto del DNA.

**2.4.3.1.3 Endomitosi** Durante l'endomitosi le cellule entrano in mitosi e iniziano a condensare i cromosomi senza segregarli ma invece rientrando in uno stato simile a *G*<sub>1</sub> e dopo la fase *S*. I megacariociti usano endomitosi durante la maturazione portando a una struttura nucleare globulata da cui gemmano coaguli che promuovono trombociti.

#### 2.4.3.2 Esempi di tessuti endociclianti

**2.4.3.2.1 Embrione vegetale** Un embrione vegetale consiste di una capsula del seme che copre l'endosperma e circonda e fornisce nutrienti per i cotiledoni crescenti e per l'ipocotile dell'embrione. Le cellule sospensore sorgono dalla divisione asimmetrica dell'uovo fertilizzato e connettono l'embrione all'endosperma.

**2.4.3.2.2 Ovarie della Drosophila** Le ovarie della *Drosophila* consistono di 12 – 15 ovaroli che contengono una serie di camere uovo in sviluppo. Il germarium porta le cellule staminali della linea germinale e somatiche che si differenziano in cellule infermiere e oociti e in cellule del follicolo rispettivamente. Le seconde fanno endocicli durante l'oogenesi in risposta a segnalazione di Notch che sottoregola gli stimolatori della mitosi e attiva i suoi inibitori.

**2.4.3.2.3 TGC dei roditori** Le *TGC* dei roditori sono altamente poliploidi e facilitano l'impiantamento dell'embrione contribuendo all'invasione della parete uterina.

**2.4.3.2.4 Ipocotile** L'ipocotile vegetale subisce endocicli per crescere rapidamente al di sopra del suolo. L'endoreplicazione si ferma una volta che la pianta raggiunge il sole.

### 2.4.3.3 Regolazione dell'endociclo della *Drosophila*

Un complesso vettore di controlli assicura l'unicità della replicazione durante la progressione endociclica. I fattori principali sono indicati nell'immagine in rosso quando inattivi e in verde quando attivi rispettivamente nella fase *S* e *G*. Il controllo di *CycE/Cdk2* forma il nucleo della regolazione endociclica: insieme a *CycE* hanno attività bassa durante la fase *G* quando *APC/C<sup>fzr/cdh1</sup>* reprime l'accumulo di *Geminin* permettendo la formazione di *pre-RC*. La stimolazione da parte di *E2F* della trascrizione *CycE* porta all'attivazione di *CycE/Cdk2* e l'iniziazione della replicazione del DNA che causa la distruzione di *E2F1*. *CycE/Cdk2* reprime la formazione di *pre-RC* e inattiva *APC/C<sup>fzr/cdh1</sup>* che permette un accumulo di *Geminin* che inibisce la formazione di *pre-RC*.

### 2.4.3.4 Varianti dell'endociclo

Poliploidia somatica può accadere da abbreviazioni del ciclo cellulare, in cui diverse fasi del ciclo sono saltate o causano l'uscita dal ciclo cellulare.

### 2.4.3.5 Il modello della soglia a *CDK*

Questo modello è stato proposto per la fissione del lievito e poi esteso alle cellule animali si proponeva come l'iniziazione della fase *S* ed *M* sono causate da diverse soglie di attività della chinasi dipendente da ciclina *CDK*. Questa viene attivata durante la fase *S* da cicline di tipo *E* od *A* e per la fase *M* di tipo *A* o *B* complessate rispettivamente con *CDK2* e *CDK1*. Nelle cellule endociclianti la soglia per la fase *S* è periodicamente raggiunta, mentre durante la mitosi si trova un basso livello di *CDK*.

## 2.5 La riproduzione sessuata - Meiosi

Gli organismi superiori si riproducono mediante l'unione di due cellule sessuali specializzate i gameti (aploidi) che si uniscono a formare un'unica cellula: lo zigote (diploide). I gameti sono prodotti nelle gonadi (testicolo e ovaio) a partire dalle cellule germinali. Se i gameti avessero lo stesso numero di cromosomi delle cellule del genitore che lo produce allora lo zigote avrebbe un numero doppio di cromosomi, raddoppiamento che si verificherebbe ad ogni generazione. Il mantenimento del numero costante di cromosomi è assicurato da un processo di divisione cellulare "riduzionale" detto meiosi. Durante la meiosi una cellula diploide va incontro a 2 divisioni cellulari (prima e seconda divisione meiotica) producendo potenzialmente 4 cellule aploidi. Successivamente avviene il mescolamento delle informazioni geniche dai due genitori durante la fecondazione. Anche la meiosi è preceduta da un'interfase che comprende le fasi *G*<sub>1</sub>, *S* e *G*<sub>2</sub>. La prima delle due divisioni si dice riduzionale, mentre la seconda equazionale. La seconda divisione meiotica è analoga a quella della mitosi a parte per il numero di cromosomi che è già stato dimezzato.

### 2.5.1 Meiosi 1

Durante la prima meiosi i membri di ogni coppia di cromosomi omologhi prima si uniscono e poi si separano e vengono distribuiti in nuclei distinti (divisione riduzionale).

### 2.5.1.1 Profase I

La profase viene divisa a sua volta in cinque fasi.

**2.5.1.1.1 Leptotene** I cromosomi si contraggono e diventano visibili.

**2.5.1.1.2 Zigotene** I cromosomi continuano a condensarsi, gli omologhi si appaiano e inizia la sinapsi, un legame stretto tra le coppie. Ogni coppia di cromosomi omologhi sinaptici è costituita da quattro cromatidi e detta bivalente o tetrade.

**2.5.1.1.3 Pachitene** I cromosomi si accorciano e addensano. Tra i cromosomi omologhi si forma il complesso sinaptonemale tripartito. Inizia il crossing-over.

**2.5.1.1.4 Diplotene** I centromeri dei cromosomi appaiati si separano e i due omologhi rimangono uniti nel chiasma, risultato del crossing-over.

**2.5.1.1.5 Diacinesi** Si dissolve la membrana nucleare e si forma il fuso.

### 2.5.1.2 Metafase I

Le coppie di cromosomi omologhi si allineano lungo la piastra metafasica.

### 2.5.1.3 Anafase I

I cromosomi omologhi si separano muovendosi verso i poli opposti. I cromatidi fratelli restano attaccati e si spostano insieme.

### 2.5.1.4 Telofase I

I cromosomi giungono ai poli del fuso e il citoplasma si divide.

## 2.5.2 Intercinesi

Il periodo tra meiosi I e II si dice intercinesi. In questa fase si riforma la membrana nucleare intorno ai cromosomi in ogni polo, il fuso si disgrega e i cromosomi si distendono.

## 2.5.3 Meiosi II

Durante la seconda meiosi i cromatidi che costituiscono ciascun cromosoma omologo si separano e vengono distribuiti ai nuclei delle cellule figlie (divisione equazionale). Si producono così alla fine quattro cellule aploidi.

### 2.5.3.1 Profase II

I cromosomi si condensano nuovamente, si forma il fuso e si disgrega la membrana nucleare.

### 2.5.3.2 Metafase II

I singoli cromosomi si allineano lungo la piastra equatoriale.

### 2.5.3.3 Anafase II

I cromatidi fratelli si separano spostandosi verso i poli opposti.

### 2.5.3.4 Telofase II

I cromosomi giungono ai poli del fuso e il citoplasma si divide.

## 2.5.4 Confronto con mitosi

I processi di base della meiosi sono simili a quelli della mitosi a netto di:

- La meiosi comporta 2 successive divisioni nucleari e citoplasmatica con potenziale produzione di 4 cellule.
- Nonostante le due divisioni il DNA subisce una sola duplicazione durante l'interfase che precede la divisione meiotica.
- Ognuna delle 4 cellule prodotte contiene un numero aploide di cromosomi, un solo esemplare di ogni coppia di omologhi.
- Durante la meiosi l'informazione genetica che proviene da entrambi i genitori viene mescolata in maniera casuale in modo che ogni cellula possieda una combinazione di geni potenzialmente unica.
- Nella metafase I della meiosi le coppie omologhe si allineano, mentre nella mitosi sono i singoli cromosomi a disporsi sulla piastra metafasica. Nella metafase I della meiosi i cromosomi appaiati si separano e migrano possiede due cromatidi uniti al centromero, mentre nell'anafase della mitosi i cromatidi fratelli si dividono e i cromsomi che si muovono sono costituiti da un unico cromatidio.

## 2.5.5 Fonti di variazione genetica nella meiosi

### 2.5.5.1 Crossing-over

Il fenomeno di crossing-over è l'evento di ricombinazione meiotica. Durante la meiosi un'induzione programmata di rotture a doppio strand di DNA (*DSB*) che porta allo scambio di materiale tra cromosomi omologhi. Questi scambi portano ad un aumento della diversità genomica e sono essenziali per la segregazione corretta alla prima divisione meiotica. Si trova un controllo molecolare della distribuzione dei *DSB* meiotici in mammiferi da un gene che si evolve rapidamente contenente un dominio contenente *PR*: *PRDM9*. I siti di rottura sono determinati e si trovano altre molecole che si occupano dei processi di riparazione che hanno permesso di delineare i cammini di ricombinazione che portano a crossover e non-crossover con ruoli diversi nell'evoluzione genomica.

**2.5.5.1.1 Organizzazione dei cromosomi e citologia durante la profase meiotica I** La profase meiotica I si divide in leptotene, zigotene, pachitene e diplotene. Si nota l'organizzazione dei cromosomi durante le varie fasi attraverso due cromatidi fratelli. La ricombinazione meiotica inizia con la formazione di *DSB* durante il leptonema ed è completata prima della fine del pachynema. La sinapsi è iniziata durante il zygonema durante il quale entrambe le terminazioni dei cromosomi sono attaccate alla membrana nucleare. La transizione da leptonema a zygonema viene detto stage a bouquet in cui i telomeri si raggruppano lungo un polo nucleare.

**2.5.5.1.2 Meccanismo di crossing over** Il crossing over inizia con una *DSB* ad un sito specifico individuato da *PRDM9* che media la rottura e recluta *SPO11* che permette la ricombinazione meiotica. Alla fine si trova un cromatide separato con rottura asimmetrica che compie una strand invasion. A seguito dell'invasione si possono trovare due intermedi: uno di crossover e uno di non crossover. Il primo viene risolto andando a sostituire nei due cromatidi fratelli la sequenza successiva alla rottura, il secondo un gene del cromatide non rotto si trova su quello che è stato rotto. L'evento di crossover può essere individuato unicamente se differiscono in marcatori genetici.

**2.5.5.1.3 Modello del ruolo di *PRDM9* nella localizzazione meiotica di *DSB*** La proteina PR domain binding 9 si lega a un motivo di DNA specifico attraverso vettori di zinc finger *C2H2*. In seguito il dominio *PR/SET* promuove la trimetilazione della lisina 4 sull'istone *H3* sui nucleosomi adiacenti. La Krüppel-associated box *KRAB* potrebbe portare interazioni con altre proteine. Questi passi e altri permettono il reclutamento del macchinario di *DSB* insieme alla proteina di ricombinazione meiotica *SPO11*.

**2.5.5.1.3.1 Struttura e funzione di *PRDM9*** La proteina *PRDM9* è un iston-metiltrasferasi che consiste di tre regioni principali: una *N* terminale che contiene un dominio Krüppel-associated box *KRAB* e un dominio repressore *SSX SSXRD*, poi si trova un dominio *PR/SET* circondato da una *pre-SET* zinc knuckle e un *post-SET* zinc finger. Si trova un lungo vettore di zinc finger *C2H2* *C* terminale. Si trovano diverse varianti della proteina che è in grado di evolvere rapidamente. Il dominio *PR/SET* è circondato da zinc knuckle e finger in quanto potrebbero contribuire al legame con substrato e cofattore o essere coinvolti con l'interazione di altre proteine.

**2.5.5.1.4 *PRDM9* organizza gli hotspot dei nucleosomi e limita la migrazione delle giunzioni di Holliday** Nei mammiferi la ricombinazione genica durante la meiosi è limitata a un piccolo insieme di regioni di 1-2 kilobasi dette hotspots. La loro locazione è determinata dai domini di zinc finger di *PRDM9* che lega il DNA e trimetila l'istone *H3*. Questo prepara ad una *DSB* e scambio reciproco di DNA tra cromatidi formando giunzioni di Holliday. Si nota come il legame con *PRDM9* riorganizza i nucleosomi in pattern simmetrici creando una regione estesa senza nucleosomi. Queste regioni sono centrate da un motivo legante a *PRDM9*. Si nota anche come *DSB* si trovi al centro di queste regioni. Pertanto combinando questi risultati si trova che il crossing-over è ristretto a regioni marcate da *H3K4me3*.

### 2.5.5.2 La separazione casuale dei cromosomi omologhi

Un altro meccanismo della meiosi che contribuisce alla variazione genetica è la distribuzione casuale dei cromosomi in anafase *I*: ogni coppia di omologhi si allinea e separa casualmente, pertanto i cromosomi vengono divisi nelle cellule figlie indipendentemente dalla loro origine paterna o materna. Questo processo viene anche detto assortimento indipendente.

## 2.5.6 La meiosi nel ciclo vitale di animali e piante

### 2.5.6.1 Animali

**2.5.6.1.1 Maschio** La produzione dei gameti nell'animale maschio si dice spermatogenesi e avviene nei testicoli. Le cellule germinali primordiali si dividono per via mitotica producendo spermatogoni, cellule diploidi che possono compiere diversi cicli di mitosi o iniziare la meiosi. La cellula ora viene detta spermatocita primario che completa la meiosi *I* producendo due spermatociti secondari aploidi che entrano in meiosi *II* producendo due spermatidi aploidi.

**2.5.6.1.2 Femmina** La produzione dei gameti nell'animale femmina si dice oogenesi. Nelle ovaie le cellule germinali primordiali si dividono per produrre gli oogoni che possono subire cicli ripetuti di mitosi o entrare in meiosi. Quando lo fanno vengono detti oociti primari che si dividono. Nell'oogenesi la citocinesi è diseguale: gran parte del citoplasma viene localizzato in una delle due cellule aploidi, l'oocita secondario, mentre l'altro ora corpo polare può ancora dividersi o non farlo. L'oocita secondario completa la meiosi II con citocinesi diseguale formando l'ovulo e il secondo corpo polare. Solo l'ovulo può essere fecondato mentre i corpi polari si dissolvono. Nei mammiferi inoltre la formazione dei gameti può avvenire solo per pochi anni. L'oogenesi inizia prima della nascita e quando si dà origine agli oociti primari la meiosi si interrompe. Dopo l'ovulazione i livelli ormonali stimolano uno o più oociti primari a riprendere la meiosi e la seconda divisione meiotica viene rinviata fino al contatto con lo spermatozoo.

### 2.5.6.2 Piante

Molte piante possiedono un ciclo di vita che alterna tra due fasi distinte che corrispondono a generazioni diverse: una fase a sporofito diploide e una a gametofito aploide. Lo sporofito produce spore aploidi attraverso meiosi mentre il gametofito gameti aploidi attraverso mitosi. Questo ciclo vitale viene anche detto alternanza di generazione i prodotti della meiosi sono detti spore che subiscono diverse divisioni mitotiche per produrre i gameti. Nelle angiosperme lo sporofito è la parte visibile della pianta mentre il gametofito è formato da poche cellule aploidi nello sporofito. Il fiore contiene le strutture riproduttive. Lo stame contiene i microsporociti che va incontro a meiosi per produrre microspore aploidi. Le microspore subiscono mitosi per produrre un granulo pollinico immaturo e uno di questi fornisce le istruzioni per la crescita di un tubulo pollinico, mentre l'altro o nucleo generativo si divide per produrre due cellule spermatiche. Insieme formano il gamete maschile. L'ovario invece contiene i megasporociti, cellule diploidi che durante la mitosi producono 4 megaspore aploidi di cui solo 1 sopravvive. Questa si divide mitoticamente per tre volte creando il gametofito femminile o sacco embrionale. Quando cellula uovo e le cellule spermatiche si uniscono costituiscono un endosperma triploide.



## Capitolo 3

# Mendel

### 3.1 Vita

Mendel nasce in Moravia, ora parte della Repubblica Ceca. Nonostante le origini contadine riceve un'istruzione e viene ammesso nel 1843 al monastero di Brno. Dopo aver terminato gli studi viene ordinato sacerdote e insegnante. Dal 1851 al 1853 frequenta l'università di Vienna dove acquisisce la conoscenza del metodo scientifico che applica agli esperimenti di genetica. Dopo il periodo a Vienna torna a Brno dove comincia il lavoro sperimentale, che avviene dal 1856 al 1863. Successivamente viene ordinato abate e le responsabilità gli impediscono con il continuare gli esperimenti, che vengono pubblicati nel 1866 che rimangono ignorati fino al 1900 quando Hugo de Vries, Erich Von Tschermak-Seysenegg e Carl Correns cominciano a condurre indipendentemente esperimenti simili e ponendo l'attenzione sul lavoro pionieristico di Mendel.

#### 3.1.1 Esperimenti

Gli esperimenti di Mendel vengono svolti utilizzando come organismo modello il *pisum sativo*, la pianta modello. Dopo aver passato 2 anni per selezionare le linee pure (omozigoti per ogni carattere che aveva scelto di osservare) seleziona 7 caratteristiche:

- Colore del seme.
- Forma del seme.
- Colore del baccello.
- Forma del baccello.
- Colore del fiore.
- Posizione del fiore.
- Altezza del fusto.

2 Nonostante per i piselli la norma sia l'autofecondazione Mendel è capace di aprire i germogli prima dello sviluppo delle antere rimuovendole e cospargendo lo stigma con il polline prelevato da altre di altre piante.

#### 3.1.2 Il successo

L'approccio di Mendel si determina efficace grazie a diversi motivi. Il *pisum sativo* offriva vantaggi per la ricerca scientifica: era facile da coltivare, completa una generazione in una stagione e ne erano presente molte varietà che ne costituivano linee pure. Si concentra inoltre su caratteristiche

facilmente osservabili e che non mostravano eccessiva variabilità. Infine oltre a limitarsi a descrivere i risultati formula delle ipotesi fondate su essi per poi verificarle con ulteriori incroci.

## 3.2 Definizioni

- **Gene:** fattore ereditario (regione del DNA) che contribuisce a determinare una caratteristica dell'organismo.
- **Allele:** una delle due o più forme alternative di un gene.
- **Locus:** posizione specifica occupata da un allele su un cromosoma.
- **Genotipo:** serie di alleli posseduta da un individuo.
- **Eterozigote:** individuo che possiede due alleli diversi in un certo locus.
- **Omozigote:** individuo che possiede due alleli identici in un certo locus.
- **Fenotipo:** aspetto o manifestazione di una caratteristica.
- **Carattere:** attributo o proprietà posseduta da un individuo.

## 3.3 Segregazione e dominanza - incroci monoibridi

### 3.3.1 Esperimento di Mendel

#### 3.3.1.1 Generazione parentale

Mendel inizia il suo lavoro con gli incroci monoibridi, fra parentali che differiscono per un singolo carattere. In un esperimento incrocia una pianta di pisello di una linea pura per la caratteristica dei semi lisci con un'altra per i semi rugosi. Questa generazione viene detta parentale  $P$ .

#### 3.3.1.2 Prima generazione filiale

Studiando progenie di  $P$  o generazione  $F_1$  (prima generazione filiale) si nota come esprime solo uno dei fenotipi di  $P$ : tutti i semi di  $F_1$  erano lisci. Anche con incroci reciproci tutti i semi di  $F_1$  rimangono lisci.

#### 3.3.1.3 Seconda generazione filiale

Successivamente Mendel permette alle piante di autofecondarsi e produrre una seconda generazione filiale  $F_2$ . In questa emergono tutte le caratteristiche della generazione  $P$ . Si nota inoltre come le due caratteristiche stanno in rapporto 3 : 1:  $\frac{3}{4}$  presentano semi lisci e  $\frac{1}{4}$  rugosi.

#### 3.3.1.4 Conclusione

Ripetendo poi incroci monoibridi per tutte e 7 le caratteristiche nota come tutti gli  $F_1$  sono simili solo a 1 dei genitori, mentre entrambi i caratteri parentali compaiono in  $F_2$  con un rapporto di 3 : 1.

#### 3.3.1.5 Terza generazione filiale

**3.3.1.5.1  $F_2$  con semi rugosi** Le piante generate da piante di  $F_2$  con i semi rugosi  $rr$  producevano una  $F_3$  in cui tutte le piante mostravano semi rugosi.

#### 3.3.1.5.2 $F_2$ con semi lisci

**3.3.1.5.2.1 Eterozigoti**  $\frac{2}{3}$  delle piante con semi lisci quando autofecondate producono sia semi lisci sia semi rugosi in  $F_3$ .

**3.3.1.5.2.2 Omozigoti**  $\frac{1}{3}$  delle piante con semi lisci quando autofecondate producono unicamente semi lisci.

### 3.3.2 Interpretazione dei risultati

#### 3.3.2.1 Alleli

Nonostante le piante  $F_1$  mostrassero il fenotipo di un solo genitore esse devono ereditare i fattori genetici da tutti e due i genitori, dal momento che trasmettevano entrambi i fenotipi alla generazione  $F_2$ . La presenza di entrambi i semi può essere spiegata unicamente solo se la  $F_1$  possiede tutti e due i fattori genetici ereditati da  $P$ . Ciascuna pianta ibrida deve pertanto possedere i due fattori genetici che codificano un carattere. Questi fattori genetici sono detti alleli sono rappresentati da lettere dell'alfabeto  $R$  per l'allele dei semi lisci e  $r$  per i semi rugosi. Pertanto  $RR$  per la pianta in  $P$  con i semi lisci e  $rr$  per quella con i semi rugosi.

#### 3.3.2.2 Separazione degli alleli

Due alleli di ogni pianta si separano quando si formano i gameti e un allele si colloca in ciascun gamete. Quando i due gameti si fondono per diventare uno zigote gli alleli di origine diversa si uniscono per produrre il genotipo di una progenie. Pertanto le piante di  $F_1$  avevano tutte un genotipo  $Rr$ .

#### 3.3.2.3 Relazione di dominanza

Essendo per Mendel  $F_1 Rr$  ma mostrando essa solo il carattere codificato dall'allele rotondo Mendel chiama dominanti questi caratteri che si presentano non modificati nella progenie eterozigote  $F_1$  e recessivi quelli che scompaiono in essa. Gli alleli relativi ai caratteri dominanti vengono indicati con lettere maiuscole, mentre quelli recessivi con lettere minuscole.

#### 3.3.2.4 Separazione equiprobabile

I due alleli di una singola pianta si separano e si presentano nella stessa probabilità nei gameti: piante di  $F_1$  producevano i gameti, metà di questi riceve l'allele  $R$  e l'altra metà quello  $r$ . I gameti poi si appaiano per produrre  $RR$ ,  $Rr$  e  $rr$ .

### 3.3.3 Principi determinati

#### 3.3.3.1 Principio della segregazione - prima legge di Mendel

Ogni organismo diploide possiede due allelo per ogni carattere particolare, uno ereditato dal genitore materno e uno da quello paterno. Questi segregano quando formano i gameti e ciascun gamete contiene un allele. I due alleli segregano nei due gameti in proporzioni uguali.

**3.3.3.1.1 Incroci genetici e meiosi** Agli inizi del 900 si formula la teoria cromosomica dell'ereditarietà, secondo cui i geni sono localizzati sui cromosomi. Ogni coppia omologa di cromosomi è costituita da uno paterno e uno materno, inoltre queste coppie segregano indipendentemente nei gameti. I due alleli di un genotipo si trovano su cromosomi diversi ma omologhi. Nella fase *S* della meiosi ogni cromosoma si replica producendo due copie di ogni allele su un cromatidio. I cromosomi omologhi segregano nell'anafase *I* separando gli alleli diversi. Nell'anafase *II* i cromatidi si separano in modo che ogni gamete è portatore di un solo allele per ogni locus.

#### 3.3.3.2 Dominanza

Quando due differenti alleli sono presenti in un genotipo solo il carattere codificato da uno di essi, detto allel dominante si osserva poi nel fenotipo.

#### 3.3.4 Pathway molecolare per la forma dei semi

Analizzando i fattori genetici dei piselli si è riuscito a determinare la loro natura molecolare. Gli alleli corrispondono a sequenze specifiche di DNA. Il locus che determina il seme liscio o grinzoso si trova sul cromosoma 5 del pisello e codifica una proteina isoforma 1 dell'enzima dell'amido ramificato *SBEI*. L'allele *R* che produce semi lisci codifica per una sua forma funzionale, che converte una forma lineare dell'amido in una ramificata, mentre l'allele *r* ne produce una non funzionale e determina un accumulo di saccarosio nel pisello *rr*. A causa della grande quantità di saccarosio il seme assorbe acqua e si gonfia. Durante la maturazione l'acqua viene persa e appaiono corrugati. Un singolo allele *R* riesce a produrre abbastanza *SBEI* per ottenere amido ramificato. L'allele *r* contiene 800 paia di basi in più che alterano la sequenza codificante e sembra provenire da un elemento trasponibile.

#### 3.3.5 Predizione degli esiti degli incroci genetici

##### 3.3.5.1 Quadrato di Punnet

**3.3.5.1.1 Incrocio di Mendel** Si prenda in considerazione un incrocio tra due varietà di piselli che differiscono per altezza: quelli alti *T* erano dominanti su quelli bassi *t*. Verifica la teoria incrociando una pianta da  $F_1$  eterozigote con la varietà parentale bassa omozigote. Questo viene detto reincrocio. Si nota come secondo il principio di segregazione i due alleli di ciascun genitore si separano e uno di essi passa in un gamete, pertanto i gameti della pianta bassa ricevono tutti *t*, mentre quelli di una pianta eterozigote ricevono equamente *T* e *t*.

**3.3.5.1.2 Costruzione** Un quadrato di Punnet si costruisce disegnando una griglia, mettendo i gameti prodotti da un genitore sul margine superiore e quelli prodotti dall'altro sul lato sinistro. Ogni zigote contiene un allele proveniente da ciascun gamete corrispondente e determina il genotipo della progenie. È inoltre utile scrivere il fenotipo espresso da ciascun genotipo. Contando i fenotipi è possibile determinare in che rapporto compaiono nella progenie.

#### 3.3.6 Testcross - incrocio di controllo

Il testcross è un modo per analizzare gli incroci: un individuo con genotipo sconosciuto viene incrociato con un altro omozigote recessivo per il carattere considerato. In questo modo si può determinare il genotipo del primo individuo.

#### 3.3.6.1 Altezza delle piante di pisello

Considerando una pianta di pisello alta per la quale non si hanno informazioni sui parenti. Essendo l'altezza dominante la pianta può essere  $TT$  o  $Tt$ . Si può determinare il genotipo effettuando un incrocio di controllo: se la pianta fosse omozigote nella progenie si notano piante tutte alte (eterozigoti), se invece è eterozigote metà progenie è alta (eterozigote) e metà bassa (omozigote recessiva).

#### 3.3.7 Simboli della genetica

Non esiste un sistema universale per definire i simboli che indicano i diversi alleli.

##### 3.3.7.1 Piante

Nelle piante le lettere minuscole indicano spesso alleli recessivi mentre le maiuscole dominanti. Si possono trovare due o tre lettere per indicare un singolo allele.

##### 3.3.7.2 Animali

L'allele più comune viene detto allele selvatico o wild type in quanto si trova normalmente in natura e viene indicato dal segno  $+$ . Le lettere vengono scelte basandosi sul fenotipo raro del mutante. Si possono aggiungere sovrascritti o sottoscritti per distinguere i geni che producono uno stesso fenotipo. Una barra obliqua può essere usata per distinguere gli alleli presenti in uno stesso genotipo, si separa con uno spazio in caso di genotipi relativi a più di un locus. Un underscore accanto al genotipo indica che è possibile qualsiasi allele.

### 3.4 Incroci diibridi - il principio dell'assortimento indipendente

#### 3.4.1 Incroci diibridi

Mendel incrocia varietà di piselli che differiscono per due caratteristiche in un incrocio diibrido: era in possesso di una varietà omozigote di piselli con semi lisci e gialli e un'altra con semi rugosi e verdi. Incrociando le due varietà i semi di  $F_1$  risultano lisci e gialli. Autofecondando  $F_1$  si ottiene una  $F_2$  con semi:

- Lisci e gialli  $\frac{9}{16}$ .
- Rugosi e gialli  $\frac{3}{16}$ .
- Lisci e verdi  $\frac{3}{16}$ .
- Rugosi e verdi  $\frac{1}{16}$ .

#### 3.4.2 Il principio dell'assortimento indipendente

Compiendo incroci diibridi per varie coppie di caratteri Mendel ottiene sempre un rapporto vicino a  $9 : 3 : 3 : 1$  in  $F_2$ . Questo rapporto assume un senso in relazione alla segregazione e alla dominanza aggiungendo un terzo principio: il principio di assortimento indipendente o seconda legge di Mendel: alleli in loci differenti si separano in modo indipendente l'uno dall'altro. Questo è un'estensione del principio della segregazione: la separazione di alleli è indipendente rispetto a quella degli alleli presenti in altri loci.

#### 3.4.2.1 Risultati di Mendel

Ogni pianta possiede due alleli che codificano per ogni carattere, pertanto la generazione  $P$  doveva avere individui  $RR YY$  e  $rr yy$ . Gli alleli di ciascun locus si separano e ogni allele passa in un gamete. I gameti prodotti da un individuo in  $P$  sono  $R y$  mentre dall'altro  $r y$ . Pertanto in  $F_1$  tutti gli individui hanno genotipo  $Rr Yy$ . Autofecondando ora  $F_1$  gli alleli si separavano e diventa importante il principio dell'assortimento indipendente, producendo in  $F_2$  individui con genotipo:

- |                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| • $RR YY$ lisci gialli. | • $Rr yy$ lisci verdi.   |
| • $RR Yy$ lisci gialli. | • $rr YY$ rugosi gialli. |
| • $RR yy$ lisci verdi.  | • $rr Yy$ rugosi gialli. |
| • $Rr YY$ lisci gialli. | • $rr yy$ rugosi verdi.  |
| • $Rr Yy$ lisci gialli. |                          |

Si nota inoltre la comparsa di combinazioni di caratteri non presente nelle generazioni parentali. Le varie combinazioni stanno in rapporto  $9 : 3 : 3 : 1$ .

#### 3.4.3 Relazione tra principio dell'assortimento indipendente e meiosi

Il principio dell'assortimento indipendente si applica a caratteri collocati su cromosomi diversi in quanto si basa sul loro comportamento durante la meiosi: ogni coppia di cromosomi omologhi si separa in modo indipendente da ogni altra nell'anafase  $I$ , perciò i geni collocati su coppie diverse di omologhi subiscono assortimento indipendente. Se invece si trovano sullo stesso cromosoma si spostano insieme e a meno di crossing-over si trovano sullo stesso gamete.

#### 3.4.4 Applicazione della probabilità - diagrammi ramificati

Essendo la separazione di geni su due loci indipendente un incrocio diibrido può essere scomposto in due incroci monoibridi che avvengono in sequenza. I diagrammi ramificati rappresentano un modo pratico per organizzare tutte le combinazioni di caratteri. Nella prima colonna si inseriscono le proporzioni relativi a un carattere, mentre in quelle successive si collocano le proporzioni relative al secondo per ogni elemento della colonna precedente unendole poi con dei rami. Moltiplicando ora le probabilità di un cammino si ottiene quella totale della combinazione di caratteri particolare.

### 3.5 Effetto del caso su rapporti attesi

Essendo gli eventi che portano alla generazione di un genotipo casuali si necessita di prendere in considerazione popolazioni di grandezza sufficiente in modo da ridurre l'errore.

#### 3.5.1 Test del chi-quadro della bontà di adattamento

Il test del chi-quadro della bontà di adattamento fornisce informazioni sulla misura in cui i valori osservati concordano con quelli attesi. È un metodo statistico che determina la probabilità che la differenza tra valori osservati e attesi sia dovuta al caso, ovvero la probabilità che il caso possa produrre da solo lo scostamento. L'ipotesi che solo il caso sia responsabile di una differenza fra valori osservati e attesi è detta ipotesi nulla. Maggiore la probabilità del chi-quadro maggiore la sicurezza

sul ruolo del caso come fattore di errore. Questo test prende in considerazione i valori assoluti delle osservazioni e dei valori attesi.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{osservati} - \text{attesi})^2}{\text{attesi}}$$

Successivamente si deve determinare la probabilità associata ai valori di chi-quadro, che corrisponde alla probabilità che la differenza tra valori osservati e attesi sia dovuta al caso. Si deve pertanto confrontare un valore del chi-quadro e i valori teorici con gli stessi gradi di libertà. Questi gradi rappresentano il numero di modi in cui le classi attese sono libere di variare. Per questo tipo di test son pari a  $n - 1$ , dove  $n$  è il numero di fenotipi diversi attesi. Osservando pertanto la riga dei gradi di libertà e la colonna dei valori di chi-quadro, ottenendo la probabilità. Molti scienziati adottano il valore 0.05 come soglia limite: se la probabilità è maggiore o uguale ad esso accettano l'ipotesi che il caso sia responsabile della differenza. Se è minore si assumono che esiste una differenza significativa: un fattore diverso dal caso è responsabile delle differenze tra valori osservati e attesi.

## 3.6 Esempi di tratti mendeliani nell'uomo

### 3.6.1 Definizioni

- Ogni cromosoma è costituito da una successione lineare di geni o loci.
- Ogni coppia di cromosomi contiene gli stessi geni nello stesso ordine ma non necessariamente in forma identica.
- Il locus è la posizione occupata da un gene su un cromosoma.
- Gli alleli sono forme diverse di uno stesso gene.
- Il genotipo è la costituzione genetica di un individuo, è riferito sia ad un singolo gene che al loro insieme.
- Il fenotipo è la manifestazione fisica di un carattere genetico che dipende dal genotipo specifico e dalla sua interazione con l'ambiente.
- Un carattere è una caratteristica di un organismo rilevabile con un qualsiasi mezzo di indagine.

### 3.6.2 Beta-Talassemia

La beta-talassemia può essere causata da mutazioni in omozigosi o eterozigosi-composta nel gene della beta-globina 11p15. Può originarsi dalla delezione dell'intero cluster di geni della beta-globina o delle sequenze 5' dal cluster o regione di controllo del locus beta.

#### 3.6.2.1 Descrizione

La beta-talassemia è caratterizzata da una produzione ridotta dell'emoglobina  $A$  ( $HbA$ ,  $\alpha - 2/\beta - 2$ ), che risulta in sintesi ridotta delle catene di beta-globina rispetto a quelle di alfa-globina causando uno sbilanciamento e eritropoiesi anormale. Il disordine è clinicamente eterogeneo. L'assenza di beta-globina causa beta-zero-talassemia, mentre ridotte quantità di beta-globina individuabile causa beta-più-talassemia. La beta-talassemia si divide in talassemia maggiore (dipendente dalle trasfusioni), intermedia e minore (asintomatica). La diversità fenotipica riflette l'eterogeneità delle mutazioni al locus  $HBB$ , l'azione di molti modificatori secondari e terziari e un grande intervallo di fattori ambientali.

#### 3.6.2.2 Caratteristiche cliniche

**3.6.2.2.1 Talassemia maggiore** Infanti affetti da talassemia maggiore non si sviluppano correttamente e sono pallidi con problemi di diarrea, irritabilità, numerosi episodi di febbre e allargamento dell'addome causato da splenomegalia. Attraverso trasfusioni crescita e sviluppo sono normali fino a 10 o 11 anni, successivamente gli individui sviluppano rischi legati al sovraccarico di ferro imposto dalle trasfusioni.

**3.6.2.2.2 Talassemia intermedia** Pazienti con la talassemia intermedia subiscono effetti eterogenei: pallore, allargamento di ittero, fegato e milza, cambi scheletrici da moderati a severi, ulcere nelle gambe, masse extramidollari di midollo eritroide, una tendenza a sviluppare osteopenia e osteoporosi. Le trasfusioni non sono richieste e il sovraccarico di ferro accade principalmente dal suo assorbimento aumentato causato da eritropoiesi inefficace.

**3.6.2.2.3 Talassemia minore** I portatori di beta-talassemia sono clinicamente asintomatici.

**3.6.2.2.4 Caratteristiche geniche** La coeredità di alfa-talassemia con omozigote beta-talassemia risulta in un miglioramento della beta-talassemia. Inoltre la beta-talassemia eterozigote è associata con manifestazioni cliniche severe quando coereditata con un gene di alfa-globina in più: in ognuno dei 5 casi un cromosoma 16 trasportava 3 geni di alfa-globina. Lo stesso aggravamento si trova con loci alfa triplicati (esempio di interazione genica).

#### 3.6.2.3 Cluster genici della globina

Esistono diversi geni della globina, prodotti durante diversi stadi della vita di un individuo. Questi si trovano raggruppati in cluster su diversi cromosomi:

**3.6.2.3.1 Cromosoma 11** Globina epsilon  $\epsilon$ , gamma  $\gamma$  G e A a formare *Hb F*, delta  $\delta$  a formare *Hb A<sub>2</sub>* e beta  $\beta$  a formare *Hb A*.

**3.6.2.3.2 Cromosoma 16** Globina zeta  $\zeta$  2, zeta  $\zeta$  1, alfa  $\alpha$  2 e alfa  $\alpha$  1.

**3.6.2.3.3 Composizione emoglobina** L'emoglobina è un tetramero formato da due subunità proveniente dal cromosoma 11 e due dal cromosoma 16. La composizione varia in base allo stato di sviluppo:

- Embrionica:  $\zeta\zeta\epsilon\epsilon$ ,  $\alpha\alpha\epsilon\epsilon$  o  $\zeta\zeta\gamma\gamma$ .
- Fetale:  $\alpha\alpha\gamma\gamma$  (*HbF*).
- Postnatale:  $\alpha\alpha\delta\delta$  (*HbA<sub>2</sub>*) o  $\alpha\alpha\beta\beta$  (*HbA*).

**3.6.2.3.4 Formazione del cluster genico** Probabilmente il gene cluster si è originato da un gene primordiale della globina che si è duplicato formando nel cromosoma 22 il gene della mioglobina e un gene precursore della  $\alpha/\beta$ -globina. Quest'ultimo si è poi duplicato e diviso nel gene primordiale della  $\alpha$ -globina e della  $\beta$ -globina. Questi due poi sono successivamente andati incontro a duplicazioni multiple che hanno portato la formazione dei cluster genici rispettivamente nei cromosomi 16 e 11.



#### 3.6.2.4 Gestione clinica

**3.6.2.4.1 Trattamento con 5-azacitidina** Nel 1982 la beta-più-talassemia è stata trattata in un uomo di 42 anni con 5-azacitidina. Si è registrato un aumento di concentrazione di emoglobina. Si nota l'ipometilazione della  $\gamma$ -globina e della  $\epsilon$ -globina oltre a un aumento di mRNA per  $\gamma$ -globina.

**3.6.2.4.2 Trapianto di midollo** Lo studio di pazienti a cui era stato svolto il trapianto del midollo *BMT* per la cura della talassemia. Il midollo allogenico proveniente da donatori *HLA*-identici e i pazienti avevano  $\beta$ -talassemia ed erano sotto i 16 anni. Conclusero che il trapianto di midollo offriva un'alta probabilità di sopravvivenza senza complicazioni se il recipiente non soffriva di epatomegalia o di fibrosi portale.

**3.6.2.4.3 Terapia genica** La terapia genica per la  $\beta$ -talassemia è difficile in quanto richiede produzione massiva di emoglobina in maniera specifica al lignaggio e dalla mancanza di vantaggio selettivo per le cellule staminali ematopoietiche corrette. In ogni caso dopo la terapia un paziente è diventato indipendente dalle trasfusioni e la maggior parte dei benefici deriva da un clone cellulare a base mieloide dominante. Viene suggerito che la dominanza clonale che accompagna l'efficacia può essere coincidentale e stocastica o il risultato da un'espansione di una cellula benigna causata dalla mal-regolazione del gene *HMG2* in cellule staminali o progenitrici.

**3.6.2.4.3.1 Background** La disponibilità dei donatori e i rischi del trapianto limitano il suo uso nei pazienti, pertanto dopo aver stabilito che il trasferimento lentivirale di un gene di  $\beta$ -globina marcato potrebbe sostituire la trasfusione di pazienti affetti da  $\beta$ -talassemia si vuole valutare la sicurezza ed efficacia della terapia genica nei pazienti.

**3.6.2.4.3.2 Metodi** Nello studio si ottengono cellule mobilizzate autologhe *CD34+* da pazienti e si trasducono le cellule in vivo con il vettore LentiGlobin *BB305* che codifica l'emoglobina adulta *HbA* con una sostituzione amminoacida. Le cellule sono state reinfuse nel paziente. Si monitorano poi gli effetti avversi, l'integrazione del vettore e i livelli di replicazione del lentivirus.

**3.6.2.4.3.3 Risultati** Dopo un intervallo di 26 mesi tutti i pazienti tranne uno hanno smesso di ricevere trasfusioni e i livelli di emoglobina erano vicini al normale. La terapia genica ha pertanto eliminato la necessità di trasfusioni a lungo termine senza eventi avversi importanti.

**3.6.2.4.4 Trattamento con CRISPR** *CTX001* è una terapia in ex vivo in cui cellule autologhe sono raccolte dal paziente, CRISPR applica poi la tecnologia di editing genomico alle cellule per fare un cambio genetico progettato per aumentare l'aumento di livelli di emoglobina fetale. Le cellule sono poi reinfuse e dovrebbero produrre cellule di globuli rossi con emoglobina fetale nel paziente superando le deficienze di emoglobina. L'edit di CRISPR crea una delezione in *BCL11A* che codifica un fattore di trascrizione che altrimenti reprime la sintesi di emoglobina fetale. Questa terapia è efficace anche contro l'anemia falciforme.

#### 3.6.2.5 Genetica della popolazione

La  $\beta$ -talassemia è uno dei disordini recessivi e autosomiali più comuni. È prevalente nelle popolazioni di mediterraneo, medio oriente, transcaucaso, Asia centrale, subcontinente indiano e l'est. È comune in popolazioni di discendenza africana.

### 3.6.3 Anemia falciforme

#### 3.6.3.1 Descrizione

L'anemia falciforme è una malattia multisistema associata con episodi di malattia acuta e danno agli organi progressivo. La polimerizzazione dell'emoglobina che porta alla rigidità dell'eritrocita e all'occlusione dei vasi è centrale nella fisiopatologia della malattia. La causa più comune è una variante di *HbS* con la malattia di emoglobina *SS* prevalente negli africani.

#### 3.6.3.2 Caratteristiche cliniche

L'anemia falciforme comporta tosse, sudore notturno, dolori nelle gambe e nelle articolazioni, dolori addominali, poco appetito e fatica. Si mostra una correlazione tra tensione dell'ossigeno e la forma a falce dei globuli rossi. La forma diventa più pronunciata con bassa pressione dell'ossigeno e le grandi aggregazioni delle cellule viste nei capillari e negli organi riflettono una bassa tensione dell'ossigeno che porta alla morte. I pazienti che esprimono  $\gamma$ -globina tra il 10 e il 20% del livello di globina a falce hanno migliorato le prognosi cliniche. La sindrome di anemia falciforme prodotta da Antille *HbS* ha un fenotipo più severo rispetto a quella prodotta da *HbS*. Gli eterozigoti umani per *HbS* hanno globuli rossi che contengono il 40% *HbS* ma non esibiscono sintomi clinici, mentre gli eterozigoti per Antille *HbS* esibiscono sintomi clinici simili agli omozigoti. Questo in quanto *HbS* Antille è meno solubile e favorisce deossigenazione e polimerizzazione di Antille *HbS*. Gli eventi sono dovuti alla polimerizzazione della *d* deossiemoglobina *S* quando i globuli rossi trasportano ossigeno. La cellule a falce possono bloccarsi nei capillari e causare dolori. Possono inoltre lisarsi e l'emoglobina legare ossido nitrico *NO* causando vasocostrizione. Possono inoltre essere fagocitate dai macrofagi causando anemia grave. Possono inoltre aderire all'endotelio causando infiammazione associata con leucocitosi neutrofila. La formazione di *HbS* è dovuta a una mutazione puntiforme di *GAG* in *GUG* che sostituisce un acido glutammico con una valina. In caso di genotipo *HbA/HbA* si ha un fenotipo normale, con *HbA/HbS* non si manifesta a livello clinico ma si trovano alcuni globuli rossi falciformi visibili, *HbS/HbS* presenta anemia grave con globuli rossi a falce.

#### 3.6.3.3 Gestione clinica

**3.6.3.3.1 Terapia genica** La terapia genica per l'anemia falciforme coinvolge una singola infusione di midollo autologo derivato dalle cellule emopoietiche staminali *HSC CD34+* trasdotte con un vettore lentivirale contenente un ansa di RNA con target *BCL11A*. Questa terapia abbassa l'espressione di *BCL11A* che normalmente reprime la produzione di emoglobina fetale.

**3.6.3.3.2 CRISPR per combattere l'anemia falciforme** I ricercatori hanno mostrato del successo nel correggere la mutazione nei topi, ma l'applicazione umana è lontana anni, l'efficienza del processo è bassa per usi pratici.

**3.6.3.3.3 Serendipity** L'uso di idrossiurea per la prevenzione dell'avvenimento di infarti in bambini affetti da anemia falciforme può essere utilizzata nei paesi in via di sviluppo in quanto i costi di cura sono contenuti. L'uso di idrossiurea è associato con eventi avversi come neutropenia se utilizzata ad alte dosi. L'utilizzo di idrossiurea causa un aumento della concentrazione intracellulare di emoglobina fetale *HbF* che interferisce con la formazione del polimero di deossiemoglobina *S* e riduce la conta neutrofila riducendo lo stato di infiammazione cronico.

**3.6.3.3.1 meccanismo di azione dell'idrossiurea** L'obiettivo dell'idrossiurea è l'enzima ribonucleotide riduttasi e agisce come un radicale libero per i gruppi tirosile dell'enzima, essenziale per la sintesi di DNA. La sua inibizione causa un arresto nella fase *S* del ciclo cellulare. L'efficacia nel trattamento dell'anemia falciforme è associata all'abilità di aumentare i livelli di emoglobina fetale che diminuisce la concentrazione di *HbS* diminuendo la polimerizzazione dell'emoglobina anormale. Il meccanismo non è chiaro e potrebbe essere citotossica per i precursori eritroidi tardivi, un effetto che porta al reclutamento di precursori primordiali con una capacità maggiore di produrre *HbF*. Un altro meccanismo è che potrebbe riprogrammare i precursori tardivi per fargli produrre *HbF*. Alternativamente potrebbe interrompere i fattori di trascrizione che si legano a regioni promotrici intorno ai geni di globina alterando il rapporto tra *HbA* e *HbF*.

#### 3.6.3.4 Resistenza alla malaria

Le cellule infettate da *falciparum malaria* sviluppano gobbe sulla superficie che le portano ad attaccarsi all'endotelio di capillari come quelli nel cervello. In questi siti avviene la falcificazione a causa della bassa concentrazione di ossigeno. Perforazione della membrana dei parassiti come risultato di stress fisico avviene con perdita di potassio. Inoltre la cellula infetta è più acida, aumentando il tasso di falcificazione. I parassiti intraeritrocitici si sviluppano più lentamente in eritrociti *HbF* che pertanto fornisce protezione dalla *plasmodium falciparum malaria* ritardando la crescita del parassita. Il meccanismo coinvolge la resistenza alla digestione da emoglobinasie malariali basata sulla super stabilità del tetramero *HbF*.

## Capitolo 4

# Estensione dell'analisi genetica mendeliana

Se il genetista classico si occupava di analizzare il fenotipo degli organismi che studiava quello moderno si occupa di studiare i meccanismi allelici come la dominanza, la recessività e le loro interazioni come il mascheramento. La cellula verrà considerata come una rete globale di interazione genica. Le interazioni tra i geni vengono studiati attraverso somiglianze fenotipiche tra i mutanti che permettono di aggregare i geni secondo la loro funzione. Per fare questo uno studio analizza il *Saccharomyces cerevisiae* costruendo 23 milioni di doppi mutanti e identificando 550 000 interazioni positive e 350 000 negative. I geni vengono poi raggruppati per funzione in un metagenoma che evidenzia come i geni essenziali sono densamente connessi.

### 4.1 Pathway genetici

Si nota pertanto come i geni non lavorano in modo isolato: nascono delle interazioni complicate dalle diversità tra gli alleli. Le collaborazioni tra i geni che portano alla creazione dei pathway possono essere di tipi diversi:

- Pathway biosintetici: geni che producono pathway di enzimi che portano alla sintesi di un composto molecolare.
- Pathway di trasduzione del segnale: geni che apportano piccole modifiche a molecole permettendo il loro trasporto e localizzazione creando vie di segnalazione.
- Pathway di sviluppo: geni che influenzano aspetti di crescita e differenziamento di parti del corpo o strutture intercellulari.

#### 4.1.1 Lievito gemmante *S. cerevisiae* e *Neurospora crassa*

TO BE DONE TO BE DONE TO BE DONE TO BE DONE TO BE DONE

I lieviti sono organismi eucarioti che possono esistere sia in forma aploide che diploide. Nel secondo caso sono in grado di fare meiosi producendo spore molto resistenti alle condizioni ambientali. Per *S. cerevisiae* la meiosi è particolare in quanto i suoi prodotti sono confinati in un asco. Manipolando gli aschi si può seguire la meiosi in diretta. Una cosa analoga avviene nella *Neurospora crassa*, in cui la meiosi viene ordinata spazialmente: le cellule si organizzano in un astuccio compatto occupando posizioni specifiche. In questo caso si ha una mitosi dopo la seconda meiosi (8 gameti totali) disposti ordinatamente in base alla loro origine. Le spore, quando appoggiate singolarmente su un terreno di coltura sono in grado di crescere e vivere come aploidi. L'ottade ordinata permette di dedurre eventi di crossing over dalla disposizione delle spore. Nell'asco si nota ha un'alternanza di alleli dominanti e recessivi in modo ordinato.

### 4.1.1.1 Mappatura del pathway biosintetico

L'esperimento svolto da Beadle e Tatum cerca di mappare la genetica di un percorso biosintetico legato alla produzione e sintesi dell'amminoacido arginina. In una provetta con *Neurospora* si utilizzano raggi X per mutagenizzare nella zona dei corpi fruttiferi. Dopo la mutagenizzazione si incrociano gli individui e si microdisseziona l'asco, si pongono le spore in terreno di coltura e si osserva quali sopravvivono. In particolare il terreno è in assenza di arginina e si isola un mutante *arg*: si escludono prima le spore che hanno subito mutazioni ai geni essenziali facendo crescere in terreno completo i mutanti. Da questo pool si trasferiscono gli aploidi in terreno minimo in modo da isolare i mutanti di interesse. Per determinare la natura dei mutanti si creano quattro terreni: uno di controllo, uno minimo, uno in assenza di vitamine e uno in assenza di amminoacidi. Si osserva come i mutanti non crescono in assenza di amminoacidi. La mutazione pertanto deve coinvolgere la produzione di amminoacidi. Per determinare quale amminoacido non riesce a sintetizzare si pone in coltura in terreni in cui manca un unico amminoacido e si nota che il mutante è per arginina.

### 4.1.1.2 Studio dei mutanti

Dopo aver isolato i mutanti si cerca di ricostruire la loro storia molecolare. Si prendono pertanto cloni dei mutanti isolati precedentemente e si fa un test di complementazione per prototrofia: facendo accoppiare due aploidi si cerca di verificare se complementano. In caso di complementazione si ha un riacquisto della prototrofia e il diploide deve poter crescere su un terreno di arginina. In questo caso pertanto i mutanti devono essere mutati su due geni diversi recessivi che fanno parte di un pathway biosintetico. Per capire dove si trova la mutazione nel pathway biosintetico i mutanti vengono fatti crescere su terreni contenenti precursori dell'arginina nel pathway: *Ornitina*, *Citrullina* e *Arginina* e si nota come:

- *arg7* cresce sia in presenza di ornitina, citrullina e arginina, pertanto la mutazione deve trovarsi a valle di questi tre prodotti nel pathway.
- *arg3* cresce unicamente in presenza di citrullina e arginina, ma non di ornitina: la mutazione si trova nell'enzima che trasforma ornitina in citrullina.
- *arg1* cresce unicamente in presenza di arginina, ma non di ornitina e citrullina: la mutazione si trova nell'enzima che trasforma citrullina in arginina.

Si nota pertanto come il gene *arg7* si trova a monte del pathway rispetto agli altri due, mentre *arg1* è quello più a valle.

## 4.2 Fattori addizionali su un singolo locus

L'estensione naturale dell'analisi genetica mendeliana è considerare che dato un certo locus non è detto che vi si trova un solo gene. Inoltre è naturale come i geni non lavorano in modo isolato e per capire in un fenotipo si devono considerare più geni. I geni inoltre si confrontano con l'ambiente cellulare, extracellulare ed esterno. Questi tre fattori devono essere tutti considerati quando si studiano i geni. Gli esperimenti di Mendel usavano alleli che mostravano dominanza completa, ma esistono altre interazioni.

### 4.2.1 Tipi di dominanza

#### 4.2.1.1 Dominanza incompleta

Si ha dominanza incompleta quando in eterozigosi si trova un fenotipo intermedio rispetto a quello dell'omozigote dominante e recessivo: si ha la possibilità di vedere fenotipicamente l'eterozigote. Avviene in quanto si ha per alleli diversi una diversa quantità di prodotto. Ogni allele conta nel contribuire a un tratto fenotipico, importante nella genetica multifattoriale per mappare il contributo quantitativo di alleli sparsi nel genoma. Nella dominanza incompleta ci si aspettano gradazioni intermedie ai due estremi di omozigosi dominante e omozigosi dell'allele meno funzionale.

##### 4.2.1.1.1 Esempi

- In alcuni fiori il dominante puro ha fenotipo rosso il recessivo puro bianco, mentre l'eterozigote è rosa.
- Dimensione del pomodoro.
- Colore del piumaggio di polli e galline.
- Colore del frutto della melanzana: vira da viola a bianco.

Il carattere in eterozigosi non si deve necessariamente trovare a metà tra le omozigosi ma anche a diverse gradazioni. Inoltre i rapporti fenotipici e genotipici sono identici in  $1 : 2 : 1$ . Si noti come le differenze nei sistemi di modello indicano come probabilmente si tratti di un principio universale.

#### 4.2.1.2 Codominanza

La codominanza avviene quando due alleli mostrano contemporaneamente la loro presenza. A differenza della dominanza incompleta non si produce un fenotipo intermedio ma l'effetto di ogni gene è discreto e in codominanza sono presenti entrambe le caratteristiche intermedie.

##### 4.2.1.2.1 Esempi

- Lenticchie con chiazze e puntini, in eterozigosi si mostrano sia chiazze che puntini.
- Gruppi sanguigni nel modello  $ABO$ :
  - Omozigosi recessiva  $ii$ : non si hanno antigeni e si producono anticorpi  $A$  e  $B$ .
  - Eterozigosi  $I^A i$  ed omozigosi  $I^A I^A$ : si possiede l'antigene  $A$  e si producono anticorpi  $B$ .
  - Eterozigosi  $I^B i$  ed omozigosi  $I^B I^B$ : si possiede l'antigene  $B$  e si producono anticorpi  $A$ .
  - Eterozigosi  $I^B I^A$ : si possiedono gli antigeni  $A$  e  $B$  e non si producono anticorpi.

- Gruppi sanguigni nel modello  $MN$ :
  - Omozigosi recessiva  $ll$ : non si hanno antigeni e non si producono anticorpi  $M$  e  $N$ .
  - Eterozigosi  $L^M l$  ed omozigosi  $L^M L^M$ : si possiede l'antigene  $M$  e si producono anticorpi  $N$ .
  - Eterozigosi  $L^N l$  ed omozigosi  $L^N L^N$ : si possiede l'antigene  $N$  e si producono anticorpi  $M$ .
  - Eterozigosi  $L^N L^M$ : si possiedono gli antigeni  $M$  e  $N$  e non si producono anticorpi.

### 4.2.1.3 Allelismo multiplo

Nell'allelismo multiplo i geni esistono in più di due forme alleliche e ogni individuo può possedere solo due alleli diversi di uno stesso gene. In questo caso si distinguono tre categorie tra le quali esiste un ordine di dominanza:

- Alleli amorfici o recessivi non funzionanti o nulli.
- Alleli parzialmente funzionanti o ipomorfici recessivi rispetto a quelli più funzionali.
- Alleli funzionanti o dominanti rispetto agli altri.

#### 4.2.1.3.1 Esempi

**4.2.1.3.1.1 Conigli** Considerando i conigli come organismi modello e incrociandoli si nota la distribuzione di fenotipi e pertanto le caratteristiche degli alleli. In un certo cromosoma si trova un locus con un'informazione genetica. Di questo gene ne esistono diverse forme:

- Selvatica: associata con una colorazione marrone del pelo:  $c^+ \_$ .
- Cincillà: chiazze grigie:  $c^{ch} c^{ch}$ ,  $c^{ch} c$ ,  $c^{ch} c^h$  con codominanza
- Himalaiano: chiazze su parte del muso, porzione di orecchie e zampe:  $c^h c^h$  o  $cc^h$ .
- Albino: nessun tipo di colorazione: omozigote  $cc$ .

Si notano pertanto quattro alleli diverse del gene che stanno in una relazione di dominanza tra di loro:

$$c^+ > c^{ch} > c^h > c$$

**4.2.1.3.1.2 Eterozigosi composita** L'eterozigosi composita è un esempio di allelismo multiplo: due alleli mutanti si trovano in un individuo e la presenza di due mutazioni causano la comparsa in eterozigosi del fenotipo recessivo. La gravità del fenotipo dipende dall'ordine di ipomorfismo oltre che da aspetti ambientali.

#### 4.2.1.4 Il livello di fenotipo osservato può influenzare la dominanza

In base al punto di vista con cui si considera il fenotipo si possono osservare diversi tipi di dominanza.

##### 4.2.1.4.1 Fibrosi cistica

**4.2.1.4.1.1 Effetti** La fibrosi cistica è un'anomalia genetica considerata recessiva: le persone affette producono una grande quantità di muco denso e viscoso che ostruisce le vie aeree dei polmoni e intasa i dotti che collegano pancreas e intestino, causando infezioni respiratorie e problemi digestivi.

**4.2.1.4.1.2 Analisi molecolare** Il gene responsabile della fibrosi cistica è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 e codifica per il regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica *CFTR*, che agisce come una barriera che regola il passaggio degli ioni cloruro attraverso la membrana. I soggetti affetti ne possiedono una forma mutata e disfunzionale che causa un accumulo degli ioni nella cellula. In condizione di eterozigosi vengono prodotte entrambe le proteine, pertanto a livello molecolare gli alleli sono codominanti, ma essendo che un allele funzionante produce *CFTR* in quantità sufficiente per il trasporto degli ioni non presenta effetti dannosi e si rivela recessiva a livello fisiologico.

### 4.2.1.5 Caratteristiche della dominanza

La dominanza è il risultato di interazioni fra geni in un medesimo locus, ovvero un'interazione allelica. La dominanza non altera il modo in cui gli alleli sono ereditati, ma solo come vengono espressi nel fenotipo. È pertanto un'interazione fra i prodotti dei geni e dipende al livello al quale il fenotipo viene osservato.

## 4.2.2 Penetranza ed espressività

### 4.2.3 Penetranza

Una parete della popolazione può possedere un certo genotipo ma non mostrare il fenotipo atteso, ovvero il gene ha penetranza incompleta. Si definisce pertanto penetranza come la percentuale di individui di un certo genotipo che esprimono il fenotipo atteso.

#### 4.2.3.1 Esempi

**4.2.3.1.1 Polidattilia** La polidattilia è un carattere dominante, ma casualmente alcuni individui con l'allele possono avere un numero normale di dita nelle mani e nei piedi: il gene della polidattilia non è completamente dominante. Il fenotipo non si manifesta nel 25-30% degli individui portatori dell'allele.

**4.2.3.1.2 Huntington e SLA** La penetranza di corea di Huntington e la SLA presentano una penetranza variabile nel tempo: inizia a 0 durante la nascita e sale con l'età. Mettendo sull'asse *X* l'età e sull'asse *Y* la penetranza si osserva un grafo a sigmoide.

### 4.2.4 Espressività

Il grado o intensità con cui un particolare genotipo è espresso in un fenotipo.

#### 4.2.4.1 Esempi

**4.2.4.1.1 Polidattilia** La polidattilia mostra un'espressività variabile: il numero, la forma e la posizione delle dita in eccesso variano tra gli individui.



**4.2.4.1.2 Gradazioni di pezzatura del mantello del Bracco** Colorazione del mantello è dovuta a 7 geni, ma con lo stesso genotipo si osservano colorazioni diverse. Le differenze sono dovute a modifiche dell'espressività di tali geni.

**4.2.4.1.3 Mascella Asburgo** Il prognatismo mandibolare è un carattere dominante a penetranza incompleta ed espressività variabile.

**4.2.4.1.4 Sindrome di Waardenburg** La sindrome di Waardenburg causa quattro caratteristiche:

- Capelli precocemente grigi.
- Ciocca di capelli bianca nella zona della fronte.
- Perdita di udito.
- Eterocromia dell'iride.

Gli individui affetti possono presentare caratteristiche in combinazioni diverse.

### 4.2.5 Alleli letali

Si definiscono geni essenziali quei geni che se malfunzionanti portano alla morte anticipata dell'organismo. Quando un allele per tale gene è presente in forma mutata e porta alla comparsa del fenotipo drammatico si dice allele letale. Per un allele letale dominante sia in omo che in eterozigosi si presenta il fenotipo e pertanto tende ad autolimitarsi nella sua diffusione. Se invece è recessivo il fenotipo non si presenta in eterozigosi e pertanto possono rimanere nella popolazione protetti dall'allele selvatico.

#### 4.2.5.1 Esempi

**4.2.5.1.1 Gatto di Man** Il gatto dell'isola di Man in eterozigosi presenta una deformazione della spina dorsale e assenza di coda. In eterozigosi non è letale ma riduce l'aspettativa di vita in quanto ha effetto su altri fenotipi, mentre in omozigosi si ha un aborto spontaneo.

**4.2.5.1.2 Topo giallo** Gli esperimenti sul topo giallo vengono svolti nei primi del 900 da Morgan. Svolge un incrocio tra topi Agouti e selvatici e altri che presentano una colorazione del pelo gialla per studiare i principi di Mendel. Prende una popolazione Agouti  $AA$  e una gialla  $AA_y$ . Il risultato è quello aspettato con  $\frac{1}{2}$  della popolazione Agouti e l'altra gialla. Incrociando successivamente due topi gialli di questa generazione nota come  $\frac{2}{3}$  siano gialli e  $\frac{1}{3}$  siano Agouti, che sembrerebbe andare in contraddizione con le regole mendeliane. La spiegazione è che una categoria sia invisibile, si sia formata a livello di gametogenesi e fecondazione ma avviene un aborto spontaneo in quanto l'allele in omozigosi è letale.

**4.2.5.1.2.1 Letalità di un gene responsabile della colorazione del pelo** Nel 1993 si studia la ragione per cui una mutazione di un gene responsabile della colorazione del pelo porta alla morte dell'embrione se in omozigosi. Il gene si trova nel cromosoma 2 e ha come vicino il gene Raly, che ha tra i trascritti uno per la produzione di una proteina responsabile della corretta espressione genica e legante RNA. La mutazione del topo giallo non è puntiforme ma è una delezione del gene Raly, dello spazio intergenico e del promotore per il gene Agouti. Il colore giallo è dovuto a una sovraespressione del gene, ora controllato dal promotore di Raly e la letalità in omozigosi è dovuta alla mancanza della proteina che porta a un deragliamento dello sviluppo embrionale.

#### 4.2.5.2 Alleli letali umani

Esempi di alleli letali per l'uomo sono la sindrome di Tay-Sachs, la fibrosi cistica e la fenilchetonuria (*PKU*), non tutti portano a un aborto ma causano un effetto visibile in età infantile riducendo l'aspettativa di vita. La qualità della vita delle persone affette è migliorabile grazie alle interazioni dei geni con l'ambiente in modo da modulare con esse la letalità.

**4.2.5.2.1 Sindrome di Tay-Sachs** La sindrome di Tay-Sachs *TDS* è causata da mutazioni in omozigosi o eterozigosi composta della subunità  $\alpha$  del gene esosaminidasi *A HEXA* sul cromosoma 15q23. È un disordine autosomale recessivo e progressivo neurodegenerativo che nella forma infantile è fatale nei primi 3 anni di vita. È caratterizzato da un insieme di ritardi nello sviluppo infantile seguito da paralisi, demenza e cecità fino alla morte. Si riconosce grazie a un'area grigio biancastra intorno alla fovea centralis dell'occhio a causa di cellule gangliari ricche di lipidi. Una verifica patologica è fornita da neuroni a forma di pallone nel sistema nervoso centrale. È utile per un riconoscimento una precoce e persistente estensione della risposta ai suoni.

**4.2.5.2.1.1 Genetica molecolare** La lesione più frequente nella sindrome è un'inserzione di 4 coppie di basi nell'esone 11 del gene *HEXA*. Il gene responsabile per la forma giovanile è allelico a quello responsabile per la forma infantile e questi pazienti con la deficienza parziale sopravvivono fino ai 15 anni. Il gene *HEXA* codifica per la subunità  $\alpha$  dell'enzima lisosomale  $\beta$ -esosaminidasi che insieme al cofattore *GM2* catalizza la degradazione del ganglioside *GM2* e altre molecole contenenti terminale *N*-acetil esosaminasi. Mutazioni nella subunità  $\alpha$  o  $\beta$  portano ad un accumulo del ganglioside *GM2* nei neuroni e disordini neurodegenerativi detti *GM2 gangliosidosi*. La malattia è causata da 78 diverse mutazioni semplici, inserzioni o delezioni.

**4.2.5.2.2 Interazioni geni-ambiente nella *PKU*** Le cellule viventi e gli organismi complessi hanno la necessità di interagire con l'ambiente per acquisire materia causando una pressione evolutiva per fenomeni metabolici che prendono le macromolecole dall'esterno per produrre energia o altre macromolecole. Si nota come possano esistere errori congeniti nel metabolismo, ovvero nei complessi pathway metabolici ci possono essere mutazioni di geni codificanti enzimi coinvolti in esso che portano ad un blocco del cammino. Un esempio di questo è la fenilchetonuria *PKU*, che porta a una scorretta elaborazione della fenilalanina introdotta dalla dieta. Il fenotipo della malattia viene influenzato da vari fattori come la quantità di fenilalanina introdotta con la dieta (necessaria in quanto amminoacido essenziale), le mutazioni del gene per la fenilalanina idrossilasi (che la trasforma in tirosina), la produzione del cofattore necessario al suo funzionamento tetraidrobiopterina *TBH*, i livelli di produzione di acido fenilpiruvico alla fine del pathway che viene trasportato fuori dal fegato nel sangue, la sua interazione con la barriera ematoencefalica e infine la gestione del suo accumulo nelle cellule nervose. Si nota come la complessità delle interazioni con l'ambiente può rendere molto difficile il riconoscimento dei principi mendeliani attraverso lo studio degli effetti fenotipici, il determinismo genetico è reso più complesso.

#### 4.2.5.3 Letalità sintetica

Due geni o due proteine vengono definiti letali sintetici quando la deficienza nell'espressione di uno dei due non compromette la vitalità, mentre la contemporanea alterazione in entrambi è incompatibile con la sopravvivenza cellulare. Considerando due oggetti *A* e *B* che interagiscono tra di loro e con il DNA localizzandone una porzione creando un'interazione con esso. Si indica con  $A^+$  e  $B^+$  la loro forma funzionale e con  $A^-$  e  $B^-$  la loro forma non funzionale. Nel caso della formazione del

complesso  $A^+B^-$  o  $A^-B^+$  il complesso, nonostante la forma modificata è ancora in grado di legare il DNA e svolgere la sua funzione con costante di affinità minore ma comunque abbastanza per impedire la nascita del fenotipo drammatico. Nel caso in cui invece entrambi siano mutati e si formi il fenotipo  $A^-B^-$  il complesso perde la sua affinità con il DNA causando la comparsa del fenotipo drammatico dovuto alla sua perdita di funzionalità.

**4.2.5.3.1 Terapie antitumorali** Questo concetto viene utilizzato per terapie antitumorali: i tumori possono presentare una mutazione somatica con un difetto in uno degli elementi del complesso e per far perdere ad esso la funzione essenziale si utilizza un farmaco in grado di colpire il partner generando la situazione letale nelle cellule tumorali. La tossicità per le cellule non tumorali viene mantenuta bassa in quanto in esse non è presente la mutazione del partner.

### 4.3 Interazioni geniche e rapporti mendeliani modificati

Si intende per interazione genica un'interazione in cui geni posti su loci diversi non sono indipendenti nella loro espressione fenotipica. I prodotti dei geni si combinano per produrre nuovi fenotipi non prevedibili osservando un singolo locus.

#### 4.3.1 Interazione genica che produce nuovi fenotipi

I geni su due loci interagiscono per determinare una singola caratteristica.

##### 4.3.1.1 Esempi

**4.3.1.1.1 Polli** Si prende in considerazione la forma della cresta dei polli. Si consideri una generazione parentale in cui un individuo possiede una cresta frastagliata o Wyandotte e l'altro a fagiolo o Brahma. Tentando di studiare la base genotipica per la differenza si incrociano gli individui. Si nota come nella  $F_1$  tutti gli individui possiedano un fenotipo con cresta a noce. Incrociando ancora si ottiene una  $F_2$  in cui si osservano quattro fenotipi:

- Wyandotte  $\frac{3}{16}$ .
- Brahma  $\frac{3}{16}$ .
- Noce  $\frac{9}{16}$ .
- A cresta singola o Longhorn  $\frac{1}{16}$ .

I rapporti tra i fenotipi sembrano indicare un rapporto mendeliano e come la morfogenesi della cresta sia influenzata da due morfogeni. Chiamando i due geni  $Rr$  e  $Pp$  si determina il fenotipo:

- Wyandotte  $RRpp$ .
- Brahma  $rrPP$ .
- Noce  $R - P -$ .
- Longhorn  $rrpp$ .

L'assenza dei geni porta a un programma di base, mentre la presenza di uno dei due porta a situazioni intermedie tra entrambi presenti e entrambi assenti.

**4.3.1.1.2 Peperoni** Si consideri una popolazione parentale con un peperone rosso e verde provenienti dalla stessa pianta (si possono incrociare e ottenere una progenie fertile). La generazione  $P$  è rosso con verde e la  $F_1$  presenta peperoni tutti rossi. Autofecondando la  $F_1$  si ottiene una  $F_2$  in cui compaiono due nuovi fenotipi:

- Marrone  $\frac{3}{16}$ .
- Giallo  $\frac{3}{16}$ .
- Rosso  $\frac{9}{16}$ .
- Verde  $\frac{1}{16}$ .

La numerologia esclude l'allelismo multiplo. I rapporti tra i fenotipi sembrano indicare un rapporto mendeliano e come il colore del peperone sia influenzato da due geni. Chiamando i due geni  $Cc$  e  $Rr$  si determina il fenotipo:

- Marrone  $R - cc$ .
- Giallo  $rrC -$ .
- Rosso  $R - C -$ .
- Verde  $rrcc$ .

La  $F_1$  è pertanto un'eterozigote da ambo le parti e il fenotipo è l'interazione di quattro alleli in due geni con dominanza completa. Quando entrambi recessivi non si produce pigmento e rimane il colore dato dalla clorofilla.

**4.3.1.1.3 Lenticchie** Si consideri un altro incrocio che conferma lo stesso principio. Si consideri una popolazione di lenticchie composta da individui con colore marrone-rosso  $AAbb$  e con colore grigio  $aaBB$ . È un modello a due geni e la popolazione parentale è omozigote trans per entrambi. Nella  $F_1$  tutti gli individui sono eterozigoti con entrambi associato con il fenotipo marrone. Incrociando  $F_1$  si ottiene  $F_2$  e si studia il fenotipo:

- Marrone  $\frac{9}{16}$ ,  $A - B -$ .
- Marrone-rosso  $\frac{3}{16}$ ,  $A - bb$ .
- Grigio  $\frac{3}{16}$ ,  $aaB -$ .
- Verde  $\frac{1}{16}$ ,  $aabb$ .

**4.3.1.1.4 Drosophila melanogaster** Si consideri la pigmentazione dell'occhio composito della *Drosophila*: questo si presenta o rosso o bianco. Incrociando i due individui si nota come in  $F_1$  tutta la progenie abbia occhi rossi. Incrociando un individuo di  $F_1$   $Bw^+BwSt^+St$  e si incrocia con un individuo con gli occhi bianchi  $BwBwStSt$ . Si ottiene una  $F_2$  in cui si notano nuovi fenotipi.

- Occhio rosso  $\frac{1}{4}$ ,  $Bw^+St^+$ .
- Occhio scarlatto  $\frac{1}{4}$ ,  $Bw^+St$ .
- Occhio marrone  $\frac{1}{4}$ ,  $BwSt^+$ .

- Occhio bianco  $\frac{1}{4}$ , *BwSt*.

Si nota come il rapporto è di  $\frac{1}{4}$  si lavora con due geni e quattro alleli e il fenotipo è guidato da un omozigosi di entrambi e nel fenotipo è guidato dal fenotipo dell'individuo doppio eterozigote che quando incrociato con un doppio recessivo.

### 4.3.2 Fenocopia

Si intende per fenocopia geni diversi che concorrono allo stesso fenotipo.

#### 4.3.2.1 Esempi

**4.3.2.1.1 Colorazione dell'occhio di *Drosophila*** Considerando l'esempio precedente sulla colorazione dell'occhio di *Drosophila melanogaster* si nota come oltre ai geni precedenti che producono il pigmento, detti *b* e *v*, ne esiste un altro che controlla il suo trasporto all'occhio. Questo gene esiste in due forme alleliche: quella dominante o funzionale  $w^+$  che mostra il fenotipo del colore prodotto dai primi due geni e quella recessiva o non funzionale *w* che mostra un fenotipo di colore bianco. Si nota pertanto come i geni concorrono allo stesso fenotipo e si dicono pertanto fenocopie.

### 4.3.3 Interazione genica con epistasi

Si intende per epistasi un tipo di interazione genica in cui un gene maschera e nasconde l'effetto fenotipico di un altro su un locus diverso. IL gene che opera il mascheramento viene detto epistatico, mentre quello il cui effetto viene inibito è detto gene ipostatico. I geni epistatici possono essere dominanti o recessivi.

#### 4.3.3.1 Epistasi recessiva

Nell'epistasi recessiva l'omozigote recessivo di un gene maschera gli effetti di entrambi gli alleli di un altro. Si ottiene un rapporto tra fenotipi di 9 : 3 : 4.

##### 4.3.3.1.1 Esempi

**4.3.3.1.1.1 Labrador** Si consideri il colore del pelo del labrador:

- $B\_ E\_$  nero.
- $bbE\_$  marrone.
- $\_\_ ee$  biondo.

Un locus genetico determina il tipo di pigmento prodotto dalle cellule cutanee: *B* codifica per il pigmento nero, mentre *b* per il marrone. Gli alleli del secondo locus influenzano la sua deposizione nel fusto del pelo: l'allele dominante *E* permette la deposizione del pigmento scuro, mentre quello recessivo *e* ne impedisce la deposizione, causando una colorazione bionda del pelo. Si nota perciò come la presenza del genotipo *ee* maschera l'espressione degli alleli nero e marrone sul primo locus. Si incroci ora una generazione parentale nero *BB EE* con biondo *bb ee*. Si nota come si forma una  $F_1$  tutta nera con *BbEe*. Con un incrocio stile mendeliano tra  $F_1$  eterozigoti si nota come compare un nuovo colore: i fenotipi diventano nero, marrone e biondo e sono in rapporto 9 : 3 : 4. Si nota come si ha un'interazione tra gli alleli del gene *E* e *B*. Si nota come il biondo compare con doppia

omozigosi recessiva  $ee$  e con tutte le combinazioni possibili dello stato allelico di  $B$ :  $ee$  causa biondo. Questo vuol dire che omozigosi recessiva di  $e$  nasconde la genetica di  $B$ . Questa è un epistasi recessiva in quanto il mascheramento è attuato da un omozigosi recessiva.  $e$  è epistatico e  $b$  è ipostatico. In assenza di omozigosi recessiva per  $E$  l'omozigosi  $bb$  porta a una colorazione intermedia marrone. Questa è un'epistasi recessiva semplice in quanto si distingue il mascheramento da un secondo gruppo fenotipico dove il mascheramento non ci sarebbe ma l'omozigosi recessiva del gene ipostatico fa sì che il fenotipo si differenzi da quello selvatico legato alla presenza di un allele dominante per entrambi i geni.

**4.3.3.1.1.2 Gruppo sanguigno  $ABO$  - fenotipo Bombay** Gli alleli sul locus  $ABO$  codificano per antigeni dei globuli rossi, brevi catene di carboidrati racchiusi nelle membrane dei globuli rossi. La differenza tra  $A$  e  $B$  dipende da differenze chimiche nello zucchero terminale della catena.  $I^A$  e  $I^B$  codificano per enzimi diversi che aggiungono zuccheri  $A$  e  $B$  al termine di catene dei carboidrati. Il substrato comune su cui agiscono questi enzimi è una molecola  $H$ .  $i$  non aggiunge zucchero a  $H$  né codifica un enzima funzionale. Gli individui con fenotipo Bombay sono omozigoti per una mutazione recessiva  $h$  che codifica per un enzima difettoso che non è in grado di produrre  $H$  e pertanto non vengono sintetizzati antigeni  $ABO$ .

Gli alleli sul locus  $ABO$  sono ipostatici rispetto all'allele recessivo  $h$  epistatico. Come molti meccanismi di epistasi un gene che esercita il suo effetto su una fase precoce del processo biochimico risulta epistatico sui geni che influenzano le fasi successive in quanto i loro effetti dipendono dal prodotto delle reazioni precedenti.

#### 4.3.3.2 Epistasi dominante $I$

Nell'epistasi dominante  $I$  l'allele dominante di un gene nasconde gli effetti di entrambi gli alleli di un altro. Si ottiene un rapporto tra fenotipi di  $12 : 3 : 1$ .

##### 4.3.3.2.1 Esempi

**4.3.3.2.1.1 Zucca** Due loci determinano il colore dei frutti in una varietà di zucca estiva con tre colori:

- 12: 9  $W\_ \_ \_$  bianchi.
- 3:  $wwY\_$  giallo.
- 1:  $wwyy$  verde.

Quando una pianta omozigote a colore bianco viene incrociata con una pianta omozigote a colori verdi e si riincrocia  $F_1$  si ottengono i risultati indicati precedentemente. Si nota come in  $F_2$  le zucche bianche e colorate stanno in rapporto  $3 : 1$ . Questo suggerisce che un allele dominante su un locus impedisce la produzione di pigmento generando una progenie bianca. Pertanto il genotipo  $W\_$  causa la scomparsa del pigmento, mentre negli altri compaiono zucche colorate. Tra  $ww$  di  $F_2$  le zucche gialle e verdi sono in rapporto  $3 : 1$ , a causa di un secondo locus che determina il pigmento, rispettivamente  $Y\_$  e  $yy$ .

Il pigmento giallo è un prodotto in un processo a due fasi: una sostanza incolore  $A$  è trasformata dall'enzima  $I$  nella sostanza verde  $B$  che viene poi trasformata dall'enzima  $II$  nella sostanza  $C$ , pigmento giallo del frutto. Le piante  $ww$  producono l'enzima  $I$  e possono essere verdi o gialle.  $W$  sul primo locus inibisce la conversione di  $A$  in  $B$  causando i frutti bianchi. Pertanto l'allele  $W$  è

epistatico e maschera l'espressione dei geni che producono i pigmento. È epistatico dominante in quanto è sufficiente la presenza in singola copia affinché la produzione del pigmento sia inibita.

**4.3.3.2.1.2 Colore dei fiori foxglove** Questi fiori possono avere colorazione punteggiata bianca, rossa o rosso leggero. Si ottiene una  $F_1$  con incrocio di linee pure doppi eterozigoti per due geni coinvolti per il fenotipo di cui si valuta la genetica:  $DdWw$ . Si autoincrocia  $F_1$  e si ha una relazione tra genotipo e fenotipo. Si ha un precursore non colorato convertito dai prodotti del gene  $D$  che produce un pigmento colorato che deve raggiungere il posto corretto: il gene  $W$  si occupa di tale trasporto. Quando dominante la pigmentazione viene confinata nei throat spots, di fatto fiore bianco con macchie rosse. In omozigosi di  $dd$  l'assenza di funzione dovuta ad essa porta ad una colorazione light molto più leggera ma  $W$  condiziona il trasporto. I conti suggeriscono che i rapporti sono ancora in  $12 : 3 : 1$ . Quando l'epistasi in omozigosi recessiva di  $w$  si ha l'effetto del gene  $D$ : in dominanza il pigmento scuro diffuso con fiore rosso, con combinazione di omozigosi recessiva di  $dd$  si ha una diffusione di un colore più sbiadito.

#### 4.3.3.3 Epistasi dominante II

Nell'epistasi dominante II l'allele dominante di un gene nasconde gli effetti dell'allele dominante di un altro gene. Si ottiene un rapporto tra fenotipi di  $13 : 3$ .

##### 4.3.3.3.1 Esempi

**4.3.3.3.1.1 Galline livornesi** Si valuti la pigmentazione delle galline con  $P$  livornese bianca  $AABB$  e americana colorata  $aabb$ . Si ottiene una  $F_1$   $AaBb$  e il suo auto incrocio porta alla formazione di prodotti fenotipici  $13 : 3$ : il colore si ha solo per  $A-bb$ . Il mascheramento è operato dalla presenza di un allele dominante  $B$ , con epistasi dominante e recessiva in quanto in questo caso la rottura dell'epistasi nella contemporaneità dell'omozigosi porta anch'essa all'assenza di colore. L'assenza del gene ipostatico copia il fenomeno di epistasi.

#### 4.3.3.4 Epistasi recessiva doppia

Nell'epistasi recessiva doppia l'omozigosi per l'allele recessivo a uno dei due loci è in grado di sopprimere un fenotipo. Si ottiene un rapporto tra fenotipi di  $9 : 7$ .

##### 4.3.3.4.1 Esempi

**4.3.3.4.1.1 Fiori** Si considerino due fiori con fenotipo recessivo bianco e nell'ipotesi più semplice mendeliana, una generazione parentale bianca indica un'omozigosi recessiva per l'allele responsabile del fenotipo. L'incrocio dovrebbe creare solo figli bianchi. Si nota come invece un'incrocio tra fiori bianchi in  $F_1$  si ottiene una popolazione con colorazione selvatica viola. Questo è un fenomeno di complementazione: due genomi incrociati con fenotipo recessivo porta alla comparsa del fenotipo dominante. Si può interpretare proponendo che i due recessivi siano fenocopie, con genetica complementare: un fiore è  $C/C$  e  $p/p$ , mentre il partner è  $c/c$  e  $P/P$ . Accettando questa ipotesi si nota come in  $F_1$  tutta la popolazione sia eterozigota doppia: la presenza di un allele dominante assicura la presenza di un fenotipo selvatico di un fiore colorato. Incrociando ora  $F_1 \times F_1$  i risultati seguono la regola dell'incrocio di-ibrido con assortimento indipendente. Scomponendo l'incrocio di-ibrido si attende in  $F_2$ :

- $\frac{3}{4} C/-$ :
  - $\frac{3}{4} P/-$ :  $\frac{9}{16} C/- P/-$  selvatico
  - $\frac{1}{4} p/p$ :  $\frac{3}{16} C/- p/p$  bianco.
- $\frac{1}{4} c/c$ :
  - $\frac{3}{4} P/-$ :  $\frac{3}{16} c/c P/-$  bianco.
  - $\frac{1}{4} p/p$ :  $\frac{1}{16} c/c p/p$  bianco.

Osservando le classi fenotipiche si nota come queste stanno in rapporto 9 : 7. Questo a causa dell'interazione funzionale di geni diversi. Interpretando questo fenomeno come un mascheramento in cui un gene maschera un fenotipo dell'altro si può determinare qual è il gene che maschera l'altro: non è facile capire qual è che viene mascherato in quanto ci si trova in un caso di epistasi recessiva doppia. Senza una comprensione molecolare del percorso biosintetico non si è in grado di decidere quale gene determina sull'altro.

Si nota come nella via biosintetica ci sia un precursore su cui agisce  $C$  che forma un intermedio incolore e un prodotto finale che dà il colore sintetizzato da  $P$ . Con uno dei due geni non presente il pathway è bloccato e si trova assenza di antocianina. In questo caso in  $c/c$  la via biosintetica si interrompe con accumulo di precursore. In questa interpretazione l'allele  $c$  maschera in omozigosi recessiva. Questa si osserva nella condizione di omozigosi di un gene  $C$  che essendo a monte della via biosintetica rende il genotipo di  $P$  irrilevante in quanto l'assenza dell'intermedio porta alla sua incapacità di esprimere la sua funzione. È anche doppia in quanto l'assenza di  $P$  ha la stessa conseguenza. L'epistasi recessiva doppia: il gene epistatico è  $C$  e quello mascherato si dice ipostatico  $P$ .

**4.3.3.4.1.2 Lumache d'acqua** Il guscio della conchiglia può essere marrone o non colorato ed è legato alla genetica di una via biosintetica multifase. L'albinismo dipende da due alleli recessivi su uno di due loci diversi. Incrociando due lumache albine tutta la progenie  $F_2$  risulta albina. Reincrociando  $F_1$  invece la  $F_2$  risulta per  $\frac{9}{16}$  composta da lumache pigmentate e per  $\frac{7}{16}$  da lumache albine. Il rapporto 9 : 7 si presenta quando gli alleli dominanti su due loci  $A\_B\_$  producono lumache pigmentate e qualsiasi altro lumache albine.

Dal punto di vista biochimico è determinato da un processo di produzione del pigmento a due fasi: questo viene prodotto solo dopo che la sostanza  $A$  viene trasformata dall'enzima  $I$  in una sostanza  $B$  che viene trasformata nel pigmento da un enzima  $II$ . Pertanto alleli funzionanti di uno dei due loci portano all'albinismo.

#### 4.3.4 Ridondanza genica

Nella ridondanza genica i rapporti mendeliani sono modificati 15 : 1: un fenotipo compare unicamente in doppia omozigosi recessiva. La ridondanza genetica può dipendere dalla duplicazione genica. Il gene  $A$  e  $B$  potrebbero essere geni paraloghi, forse con antenato comune con duplicazione eptopica (su cromosomi diversi) in modo che segreghino in modo indipendente. In questo caso la distanza dalla nascita dei paraloghi non è abbastanza appia per aver diversificato la loro funzione. Sono ridondanti per la funzione biochimica che per essere persa si devono perdere 4 alleli.



#### 4.3.4.1 Esempi

**4.3.4.1.1 Capsula della pianta borsa del pastore** Si consideri che questo oggetto ha una forma ovale e una triangolare. Si possono ottenere linee pure e triangolare è  $TTVV$ , mentre l'altro  $ttvv$ . Si ottiene una  $F_1$  doppia eterozigote che si incrocia con sè stessa: il fenotipo ovale compare solo in doppia omozigosi recessiva. Questo vuol dire che il gene  $T$  e quello  $V$  interagiscono sullo stesso punto del pathway, pertanto per perdere il passaggio morfogenetico si rende necessario disattivare entrambe le coppie.

#### 4.3.5 Interazione genetica dominante

L'interazione genica dominante è caratterizzata da un tasso di-ibrido 9 : 6 : 1.

#### 4.3.5.1 Esempi

**4.3.5.1.1 Zucche** Si consideri la forma a disco o allungata o a sfera e si nota come la deviazione come l'omozigosi recessiva per un gene con dominante per l'altro e il complementare possiedono lo stesso fenotipo.

#### 4.3.6 Sovradominanza o vantaggio dell'eterozigote

Si consideri un globulo rosso con forma normale e antigeni se gene  $H$  funzionante e stato allelico  $AB0$ . Nell'altro si trova una forma a falce legata alla presenza di una mutazione specifica nel gene della beta-globina. A valle di una meiosi si nota come la frequenza dei portatori e dei casi e la distribuzione della malaria: nei residenti in regioni affette dalla malaria gli eterozigoti sembrano avere un vantaggio sugli omozigoti selvatici. Questo è un esempio di sovradominanza: un allele di per sè negativo in omozigosi diventa vantaggioso nello stato di eterozigosi o vantaggio dell'eterozigote. Il vantaggio è legato a un'interazione con l'ambiente in quanto resistenza alla riproduzione del plasmodio falciparum.

#### 4.3.7 Un soppressore extragenico può cancellare gli effetti fenotipici di una mutazione

In *Drosophila* esistono due proteine che interagiscono tra di loro: hairless  $S$  e un suo soppressore  $SoH$ . Nel wild type il soppressore sopprime il gene hairless e permette la formazione delle setole in *Drosophila*. Nel caso di mutazioni al soppressore viene modificata la concentrazione relativa di soppressore al gene hairless e l'alterazione dei rapporti causa la scomparsa delle setole. Si nota come un doppio mutante per  $H$  e  $SoH$  ripristinando il rapporto stechiometrico permette la ricomparsa del fenotipo selvatico.

#### 4.3.8 La complementazione - determinare se le mutazioni sono sullo stesso locus o su loci diversi

Per capire se mutazioni diverse che influenzano una certa caratteristica sono portate dallo stesso locus o da loci diversi si esegue un test di complementazione. Per eseguire il test sulle mutazioni recessive vengono incrociati genitori omozigoti per mutazioni differenti che producono una progenie eterogenea. Se le mutazioni sono alleliche allora la prole eterozigote possiede solo alleli mutanti e mostrerà un fenotipo mutante. Se invece le mutazioni sono su loci diversi ciascun genitore è omozigote per l'allele recessivo ad un locus ma possiede i geni selvatici sull'altro, pertanto la progenie eterozigote eredita un allele mutante e uno selvatico. In questo caso la presenza di un allele selvatico

complementa la mutazione a ciascuno dei due loci: la progenie è doppio eterozigote e mostra il fenotipo selvatico. La complementazione si verifica se un individuo che porta due mutazioni recessive mostra un fenotipo wild type, indicando che le mutazioni riguardano geni non allelici.

#### 4.3.9 Drosophila

In Drosophila sono stati fatti molti esperimenti di complementazione. Si osserva il colore del corpo di colore nero, mentre quello selvatico sul marroncino. Incrociando due Drosophila con colorazione atipica si arriva al fenotipo selvatico. Si è in complementazione in quanto i fenotipi recessivi sono fenocopie: hanno genetica diversa e complementare:  $ee BB EE bb$ . Si ha il corpo nero per omozigosi recessiva di  $e$  o  $b$ , ma si ha un rapporto di dominanza completa all'interno della coppia allelica di  $B$  o  $E$  e il doppio eterozigote ripristina la colorazione selvatica. Si nota come la complementazione è intergenica.

#### 4.3.10 Analisi di complementazione

Nell'analisi di complementazione sono svolti incroci multipli lungo mutanti recessivi per determinare quanti geni contribuiscono al fenotipo. Le mutazioni che falliscono nel complementarsi sono dette gruppo di complementazione che, in questo contesto, si riferisce a un gene.

### 4.4 Influenza del sesso su trasmissione ed espressione dei geni

Ci si occupa di come l'espressione dei geni sugli autosomi può essere influenzata dal sesso del genitore da cui i geni sono trasmessi.

#### 4.4.1 Caratteri influenzati dal sesso

I caratteri influenzati dal sesso sono determinati da geni autosomici ereditati secondo le leggi di Mendel ma espressi in modi diversi nei maschi e nelle femmine. Il carattere ha penetranza maggiore in uno dei sessi, ovvero il numero di cromosomi  $X$  influenza la loro espressione. Considerando il rapporto tra *maschi* : *femmine* si nota come:

- Labbro leporino 2 : 1.
- Osteoporosi 1 : 3.
- Gotta 8 : 1.
- Artrite reumatoide 1 : 3.
- Lupus eritematoso sistemico 1 : 9.

##### 4.4.1.1 Esempi

**4.4.1.1.1 Barba nelle capre** La presenza della barba in alcune capre è determinata dal gene autosomico  $B^b$  dominante nei maschi e recessivo nelle femmine: nei primi basta un singolo allele  $B^b$  per la sua espressione, mentre le femmine necessitano di genotipo  $B^b B^b$ .

**4.4.1.1.1.1 Incroci** Incrociando un maschio senza barba  $B^+ B^+$  e una femmina con la barba  $B^b B^b$  tutti gli individui in  $F_1$  sono eterozigoti  $B^b B^+$ . Essendo il carattere dominante nei maschi e recessivo nelle femmine tutti i maschi della generazione possiedono la barba, mentre le femmine non la presentano. Reincrociando gli individui di  $F_1$ :

- $\frac{1}{4}$  è  $B^b B^b$ .
- $\frac{1}{2}$  è  $B^b B^+$ .
- $\frac{1}{4}$  è  $B^+ B^+$ .
- $\frac{3}{4}$  dei maschi hanno la barba.
- $\frac{1}{4}$  delle femmine hanno la barba.

**4.4.1.1.2 Calvizie** La calvizie dell'uomo è un carattere influenzato dal sesso e funziona in modo del tutto analogo alla barba nelle capre.

## 4.4.2 Caratteri limitati dal sesso

I caratteri limitati dal sesso sono codificati da geni autosomici che si esprimono solo in un sesso: nell'altro il carattere mostra penetranza zero.

### 4.4.2.1 Esempi

**4.4.2.1.1 Tipologia di piumaggio nel gallo** Nei polli domestici alcuni maschi mostrano una tipologia di piumaggio detta piumaggio da gallo, gli altri maschi e tutte le femmine mostrano piumaggio da gallina. Questo è un carattere autosomico recessivo limitato dal sesso dei maschi. Essendo il carattere autosomico i genotipi di maschio e femmina sono gli stessi, ma i fenotipi sono diversi:

| Genotipo | Fenotipo maschile    | Fenotipo femminile   |
|----------|----------------------|----------------------|
| $HH$     | Piumaggio da gallina | Piumaggio da gallina |
| $Hh$     | Piumaggio da gallina | Piumaggio da gallina |
| $hh$     | Piumaggio da gallo   | Piumaggio da gallina |

**4.4.2.1.2 Pubertà precoce** Nell'uomo la pubertà precoce è un carattere limitato dal sesso. Ci sono diverse forme e quella limitata al sesso maschile è causata da un allele  $P$  autosomico dominante che si esprime solo nei maschi. Quelli che possiedono tale carattere vanno incontro a una pubertà precoce intorno a quattro anni. Non vi è alcun danno alla funzionalità sessuale, ma rimangono bassi di statura. I maschi sono di solito eterozigoti  $Pp$  e un maschio con pubertà precoce che si accoppia con una donna che non ha storia familiare di tale condizione trasmette l'allele a  $\frac{1}{2}$  dei figli, ma l'allele viene espresso solo nei maschi.

## 4.4.3 Eredità extranucleare - citoplasmatica

Non tutto il materiale genetico è contenuto nel nucleo: alcune caratteristiche sono codificate da geni nel citoplasma. Tali caratteristiche vengono trasmesse attraverso eredità citoplasmatica. I mitocondri e i cloroplasti contengono DNA e codificano per caratteristiche importanti del fenotipo. Uno zigote riceve gli organelli citoplasmatici da un solo genitore, per lo più dall'uovo. In tal modo i caratteri citoplasmatici sono presenti sia nei maschi che nelle femmine ma vengono trasmessi alla progenie dalla madre. Essendo che i mitocondri segregano casualmente nelle cellule della progenie figli diversi della stessa madre o cellule diverse in un individuo della progenie possono risultare variabili nei fenotipi. Pertanto in certi individui si trova una condizione di omoplasmia mentre in altri di eteroplasmia.

### 4.4.3.1 Esempi

**4.4.3.1.1 Eredità citoplasmatica nella pianta bella di notte** Foglie e germogli di una varietà di bella di notte erano screziate e mostravano una mescolanza di macchie verdi e bianche. Inoltre

alcuni rami avevano foglie tutte verdi, mentre altre tutte bianche. Incrociando fiori provenienti da rami screziati:

- Semi di rami verdi producono sempre progenie verde.
- Semi di rami bianchi producono una progenie bianca
- Semi di rami screziati producono progenie verdi, bianche o screziate in rapporti variabili.

Si dimostra pertanto che la screziatura è un caso di eredità citoplasmatica: i fenotipi e la progenie erano dipendenti interamente dal genitore materno. In queste piante infatti la screziatura è causata da un gene difettoso nel cpDNA (DNA del cloroplasto) che inibisce la produzione del pigmento verde della clorofilla.

**4.4.3.1.2 Dimostrazione dell'origine materna dell'eredità citoplasmatica** In questo esperimento si utilizzano mutanti poki di *Neurospora crassa*. Il sistema sperimentale presenta un individuo con un gene mutante nucleare che viene coniugato con un gene che cambia la dimensione delle spore aploidi prodotte dalla meiosi: un mutante produce una macrospora. Incrociando una *Neurospora* poki che produce spore grandi e una con spore di dimensione normale si ottiene un diploide dove il contributo citoplasmatico è esclusivo della macrospora. Si nota come il biomarker, una mutazione del fenotipo citoplasmatico legato a una variazione del citocromo è dettato dalla natura della macrospora utilizzata nella fecondazione.

**4.4.3.1.3 Malattie mitocondriali** Sono state identificate malattie nell'uomo che mostrano un'ereditarietà mitocondriale. Sono dovute a mutazioni del mtDNA: ha origine nei geni che codificano per i componenti della catena di trasporto degli elettroni che produce la maggior parte del *ATP*.

**4.4.3.1.3.1 Neuropatia ottica ereditaria di Leber** *LHON* causa ai pazienti che ne soffrono perdita della vista in entrambi gli occhi a causa della morte delle cellule del nervo ottico. La perdita della vista si verifica tra i 20 e i 24 anni, ma può aver luogo dopo l'adolescenza. Si nota una notevole variabilità nella gravità della malattia, anche all'interno della stessa famiglia.

#### 4.4.4 Effetto genetico materno

L'effetto genetico materno avviene quando il fenotipo della progenie viene determinato dal genotipo della madre: i geni vengono trasmessi da entrambi i genitori ma il fenotipo non è determinato dal genotipo della progenie. Si nota quando sostanze presenti nel citoplasma di una cellula uovo hanno un ruolo decisivo nelle fasi precoci dello sviluppo.

##### 4.4.4.1 Esempi

**4.4.4.1.1 Avvolgimento della conchiglia di *Lymnaea peregra*** Le conchiglie possono avere un avvolgimento determinato da una coppia di alleli: destrorso  $s^+$  dominante su quello sinistrorso  $s$ . Gli avvolgimenti sono determinati dal genotipo della madre: l'andamento dipende dalla modalità con cui il citoplasma si divide dopo la fecondazione direzionato da una sostanza prodotta dalla madre e trasmessa alla prole nel citoplasma dell'uovo.

**4.4.4.1.1.1 Incroci** Se un maschio omozigote per gli alleli destrorsi  $s^+s^+$  viene incrociato con una femmina omozigote per gli alleli sinistrorsi  $ss$  tutti gli individui  $F_1$  sono eterozigoti ma hanno la conchiglia sinistrorsa secondo il genotipo della madre. Auto-fecondando  $F_1$   $F_2$  ha rapporto fenotipico  $1s^+s^+ : 2s^+s : 1ss$ , mentre il fenotipo risulta verso destra in quanto il genotipo della madre eterozigote codifica per questo tipo di avvolgimento.

#### 4.4.5 Imprinting genomico

Si definisce imprinting genomico il fenomeno in cui avviene espressione differenziata del materiale genetico a seconda che sia stato ereditato dal genitore maschio o femmina. Molti geni oggetto di imprinting sono associati alla crescita fetale. Il meccanismo non è chiaro se la metilazione del DNA è essenziale.

##### 4.4.5.1 Esempi

**4.4.5.1.1 Fattore di crescita insulino-simile nell'uomo e nei topi** Il gene *Igf2* mostra imprinting genomico: la progenie riceve un allele dalla madre e uno dal padre: la copia paterna è espressa nel feto e nella placenta, mentre quella materna rimane silente. Nella progenie sia il maschio che la femmina possiedono i geni, se il gene viene espresso dipende dal sesso del genitore che lo trasmette. Il gene si manifesta solo quando trasmesso dal genitore di sesso maschile. L'allele paterno promuove la crescita della placenta e del feto. Quando la copia parentale viene eliminata si ottiene una placenta di piccole dimensioni e una progenie di basso peso alla nascita.

##### 4.4.5.1.2 Sindrome di Prader-Willi e di Angelman

**4.4.5.1.2.1 Sindrome di Prader-Willi** I bambini affetti dalla sindrome di Prader-Willi hanno mani e piedi piccoli, bassa statura, basso sviluppo sessuale e ritardo intellettuale. Si nutrono con difficoltà alla nascita, ma appena iniziano a camminare sviluppano un appetito insaziabile. In molti soggetti si verifica la perdita di una regione sul braccio lungo del cromosoma 15.

**4.4.5.1.2.2 Sindrome di Angelman** La delezione della regione deve però essere ereditata dal padre. La delezione della medesima regione può essere ereditata dalla madre, ma determina un insieme di sindromi diversi e causa la sindrome di Angelman: i sintomi sono accessi di riso, movimenti muscolari incontrollati, bocca di grandi dimensioni e convulsioni sporadiche.

**4.4.5.1.2.3 Conclusioni** Affinchè lo sviluppo sia normale sembra che sia necessario ricevere la regione del cromosoma 15 da entrambi i genitori.

### 4.5 Anticipazione

Un fenomeno genetico non spiegato dalle leggi di Mendel è l'anticipazione: un carattere genetico si manifesta in modo più intenso o in età più precoce mano a mano che viene trasmesso da una generazione all'altra. Spesso è dovuta a regioni instabili del DNA che possono allungarsi durante la trasmissione del gene da una generazione all'altra: la gravità e precocità della comparsa sono dovute alla lunghezza della regione instabile.

## 4.6 Fattori ambientali

Essendo il fenotipo il risultato di un genotipo che si sviluppa in un ambiente: ogni genotipo può produrre diversi fenotipi a seconda delle condizioni ambientali in cui si trova. Si notano alleli sensibili alla temperatura o termosensibili che si attivano a determinate temperature.

### 4.6.1 Effetti ambientali sul fenotipo

#### 4.6.1.1 Esempi

**4.6.1.1.1 Colorazione della pelliccia dei conigli** L'allele himalaiano nei conigli produce una pelliccia scura nelle parti terminali del corpo. L'allele si sviluppa però solo quando il coniglio è allevato a una temperatura inferiore ai 25° altrimenti non sviluppa le chiazze.

**4.6.1.1.2 Occhio di drosophila e ali vestigiali** Il numero delle unità ottiche o ommatidi di *Drosophila* cambia in base alla temperatura di sviluppo della larva: a 15° anche più di mille, ma a 30° 250 in meno. Un meccanismo analogo avviene per le ali: a 18° si presentano molto piccole, mentre a temperature elevate normali. La temperatura ha anche un ruolo minore nella femmina. Inoltre un mutante shibire è vitale tra i 18° e i 28°, ma a temperature più elevate si ha paralisi reversibile fino alla morte. Il mutante è un gene che codifica una proteina essenziale per la trasmissione nervosa.

**4.6.1.1.3 Fenilchetonuria** La malattia è dovuta a una mancanza di un enzima per il metabolismo della fenilalanina che quando si accumula può portare a danni cerebrali. Adottando una dieta a basso contenuto di fenilalanina si previene il ritardo mentale.

### 4.6.2 Eredità delle caratteristiche continue

Si intende per caratteristiche continue caratteristiche che presentano una distribuzione continua dei fenotipi. In quanto devono essere descritte in termini quantitativi si dicono anche caratteristiche quantitative. Hanno spesso origine in quanto i fenotipi sono il risultato dell'interazione di molti geni o caratteristiche poligeniche.

### 4.6.3 Pleiotropia

Si dice pleiotropia il fenomeno per cui un singolo gene determina un certo numero di caratteri apparentemente non correlati.

#### 4.6.3.1 Esempi

**4.6.3.1.1 Singed - mutante di *Drosophila*** L'allele singed è un omologo della fascina coinvolto nella regolazione della formazione di alcuni elementi del citoscheletro.

**4.6.3.1.1.1 Effetti fenotipici** È considerato un esempio di pleiotropia in quanto sue mutazioni hanno un effetto visibile sulla formazione di una caratteristica somatica esterna, la formazione e il numero e aspetto delle setole, ma i mutanti singed oltre all'alterazione nella formazione delle setole sono poco fertili e le uova non sembrano essere in grado di portare alla formazione di zigoti con sviluppo embrionale selvatico.

**4.6.3.1.1.2 Genetica molecolare** Incroci e studi di complementazione puntano al fatto che si tratta dello stesso gene e dello stesso allele. Per ricondurre questi due fenotipi alla funzione di un solo allele difettivo. La spiegazione la si trova nel ruolo funzionale del gene *singed* omologo della fascina che porta alla formazione di fasci di actina che controllano struttura del citoscheletro: i bundle di actina sono importanti per organizzazione e formazione delle setole a livello somatico ma questa stessa funzione è importante anche nelle camere importanti per la maturazione dell'uovo: la stessa funzione genica si esplica in contesti diversi grazie a un unico meccanismo molecolare in cui le cellule organizzano strutture utili per il movimento in cellule specializzate. Questo è un fenomeno di pleiotropia: una mutazione e due fenotipi apparentemente non facilmente collegabili.

**4.6.3.1.2 Anemia falciforme** Si nota come la mutazione nel gene della beta globina in posizione codificante modificando un acido glutammico in valina in posizione 6 causa l'anemia falciforme. L'ossigeno viene trasportato in modo aberrante con difetto di apporto di ossigeno, legando un evento genetico con difetto proteico con conseguenza legata a tale difetto. Si nota come il difetto porta a diversi fenotipi: variano da difetti di crescita, a cognitivi, dolore, deformazione nelle ossa, ittero, problemi renali. Questi fenotipi apparentemente non collegati sono collegabili e andando a ritroso si nota come a partire dal difetto genetico e alterazione del trasporto dell'ossigeno si arriva ad avere difetti a livello epatico, cistifellea, cuore, ossa.

### 4.6.3.2 Pleiotropia antagonistica

Notando l'età sull'asse  $x$  e la forza di selezione sull'asse  $y$  si ha una riduzione della forza di selezione che parte molto alta e scende gradatamente fino a diventare zero. Questo grafico indica la pleiotropia antagonistica. La forza di selezione cambia con l'età: tra i 15 e i 35 anni. Questo vuole provare a convincere che l'effetto di pressione selettiva di alleli è legato a quando e come gli alleli hanno un impatto sulla trasmissione successiva. Se l'allele lo dimostra precocemente con effetto fenotipico importante l'allele ha un effetto forte sulla selezione impedendo che la possibilità abbia una progenie azzerando la trasmissione. Se l'effetto si manifesta successivamente con l'età diminuisce tale forza di selezione. Alleli con effetti pleiotropici e conseguenza fenotipica antagonistica in funzione con l'età: alleli con successo produttivo in giovinezza ma che sono associati a un più rapido deterioramento in tarda età potrebbero essere selezionati e trasmessi nella popolazione.

## 4.6.4 Probabilità

Eventi genetici casuali possono distanziare genotipo e fenotipo con una serie di eventi di modulazione.

### 4.6.4.1 Esempi

**4.6.4.1.1 Sindrome di predisposizione al cancro a penetranza incompleta** Il passaggio da una cellula normale a una tumorale aggressiva richiede diversi eventi che possono partire da una presenza di eventi germinali ereditati che però non sono sufficienti per la conversione fenotipica: si devono acquisire eventi somatici, mutazioni che avvengono nella linea somatica in maniera stocastica. Pertanto eventi casuali influenzano l'evoluzione fenotipica.

**4.6.4.1.1.1 Processo di trasformazione** Le cellule del tessuto epiteliale sono organizzate in maniera ordinata, polarizzata e ancorata a formare una barriera. Può avvenire casualmente una lesione pre-cancerosa a causa dello stress di replicazione che porta a danno al DNA e attiva il pathway di riparazione attraverso *ATM*, *ATR* e *CHK* e di *p19ARF*. Questo processo può portare

a mutazioni di geni gatekeeper, oncogeni o repressori dei tumori chiave come *RAS* e *MYC*. Ora il processo si ramifica: la risposta al danno al DNA attiva *p53* e altri soppressori dei tumori che possono portare internamente all'arresto del ciclo cellulare, senescenza e apoptosi o esternamente al legame con i recettori del sistema immunitario e loro eliminazione. In altro caso mutazioni e perdita di eterozigosi nei soppressori chiave dei tumori che regolano il ciclo cellulare causano mutazioni che portano a ottimizzare il fitness di cellule cancerogene maligne.



## Capitolo 5

# Pedigree

I principi di Mendel sulla segregazione dei geni sono validi per tutti gli eucarioti come l'uomo. Lo studio dell'ereditarietà dei caratteri genetici dell'uomo è complicata dal fatto che non possono essere effettuati incroci programmatici. L'accertamento del tipo di ereditarietà avviene nell'ambito dei caratteri monogenici. Si rende necessario analizzare i caratteri mediante lo studio degli alberi genealogici esaminando la comparsa del carattere in individui che lo manifestano chiaramente.

### 5.1 Simboli dei pedigree

- Quadrato: sesso maschile.
- Cerchio: sesso femminile.
- Rombi: sesso non noto (figlio che deve nascere o non specificato).
- Colore pieno: individuo affetto.
- Colore vuoto: individuo sano.
- Punto nel simbolo: portatore obbligato.
- Barra verticale nel simbolo: portatore asintomatico.
- Numero nel simbolo: individui multipli.
- Barra orizzontale sul simbolo: individuo deceduto.
- Freccia con  $P$ : probando, primo membro affetto della famiglia ad essere preso in considerazione.
- “?” nel simbolo: storia familiare dell'individuo non nota.
- Linee orizzontali tra simboli: accoppiamento.
- Linee verticali tra figli: rapporto genitore-figli.
- Linea che si biforca: gemelli, triangolo se gemelli.
- Doppia linea orizzontale: unione tra individui imparentati, consanguineità.
- Parentesi quadre e linea tratteggiata: adozione.
- Numero romano: generazione.

## 5.2 Analisi del pedigree

Il numero limitato di figli di molte famiglie umane rende impossibile individuare in un singolo pedigree chiari rapporti di tipo mendeliano. Si deve pertanto interpretare i dati a disposizione in modo da chiarire la natura del tratto preso in considerazione.

### 5.2.1 I caratteri autosomici recessivi

I caratteri autosomici recessivi compaiono con la stessa frequenza in entrambi i sessi (a meno di differenze nella penetranza) e si manifestano unicamente quando l'individuo eredita un allele per genitore. Se il carattere è raro la maggior parte dei genitori è eterozigote e non affetta: il carattere sembra saltare generazioni. Può essere trasmesso per diverse generazioni senza che compaia nel pedigree. Quando entrambi i genitori sono eterozigoti ci si aspetta che circa un quarto della progenie esprima il carattere. Nel caso in cui entrambi i genitori sono affetti da un tratto autosomico recessivo questo è presente in tutta la progenie. Se il tratto è raro gli individui sono tipicamente omozigoti per l'allele normale. Quando una persona con il carattere si unisce a un partner esterno alla famiglia nessuno dei figli manifesta il tratto, ma ne saranno portatori eterozigoti.

### 5.2.2 Caratteri autosomici dominanti

I caratteri autosomici dominanti si manifestano con la stessa frequenza in entrambi i sessi ed entrambi sono in grado di trasmetterli alla progenie: ogni individuo con un carattere dominante deve aver ereditato l'allele da almeno un genitore. I caratteri dominanti pertanto non saltano le generazioni a meno che un individuo acquisisca il carattere come mutazione *de novo* o esso ha una penetranza ridotta. Se un allele dominante è raro la maggior parte degli individui che lo manifestano è eterozigote. Con un genitore eterozigote e l'altro privo  $\frac{1}{2}$  della progenie presenta il carattere. Con entrambi i genitori eterozigoti  $\frac{3}{4}$  della progenie presenta il carattere. Individui sani non trasmettono il carattere se ha penetranza completa.

### 5.2.3 Caratteri recessivi legati al cromosoma X

I caratteri recessivi legati a  $X$  appaiono più frequentemente nei maschi in quanto hanno bisogno di ereditare solo una copia dell'allele che esprime il carattere, mentre le femmine ne devono ereditare due. I maschi che lo possiedono sono nati da madri non affette ma portatrici in quanto ereditano da lei l'allele. In quanto la trasmissione avviene da femmina non affetta a maschio affetto a femmina non affetta tende a saltare le generazioni. Una donna eterozigote avrà metà dei figli affetta e metà delle figlie portatrice non affetta. I caratteri recessivi legati a  $X$  non sono trasmessi da padre a figlio in quanto un figlio eredita dal padre il cromosoma  $Y$  e non  $X$ . Tutte le figlie di un uomo affetto saranno portatrici e una donna per presentare il carattere deve essere omozigote per esso e sarà presente in tutti i figli maschi.

### 5.2.4 Caratteri dominanti legati al cromosoma X

I caratteri dominanti legati a  $X$  compaiono in maschi e femmine, ma con maggiore frequenza nelle seconde. Ogni individuo deve avere un genitore affetto e i caratteri non saltano le generazioni. I maschi affetti li trasmettono a tutte le figlie ma non ai figli. Le donne affette se eterozigoti trasmettono il carattere a metà dei figli e metà delle figlie. I maschi ereditano il carattere dominante solo dalla madre, mentre le femmine uno per ogni genitore.

### 5.2.5 Caratteri legati al cromosoma Y

I caratteri legati a *Y* presentano un modello di eredità caratteristico: sono affetti solo i maschi e il carattere si trasmette da padre a figlio. Un maschio affetto ha progenie maschile completamente affetta. Che nel cromosoma *Y* umani si trovi poca quantità genetica come la mascolinità. Inoltre essendo che ogni maschio possiede solo un cromosoma *Y* i caratteri legati ad esso non sono né dominanti né recessivi.

## 5.3 Esempi

### 5.3.1 Fibrosi cistica

La fibrosi cistica è un carattere autosomico recessivo frequente nella popolazione europea. Il gene responsabile quando alterato è nella regione 7q31.2–31.3, nel braccio lungo e sottobanda 2. Mappato per clonaggio posizionale.

#### 5.3.1.1 Funzione del gene

Il gene produce una proteina lunga, un canale transmembrana con due domini collegati da una regione citoplasmatica. La proteina scambia ioni, controllando il bilancio di cloro. La mutazione più frequente nella popolazione europea e nord-americana è una mutazione che si tratta di una delezione di 3 nucleotidi e rimuove un amminoacido 508 in una regione che non sembra fondamentale per la funzionalità della proteina. La mutazione sembra impedire la localizzazione della proteina. Negli alveoli polmonari avviene una diminuzione dei fluidi che devono aggiungersi alla secrezione delle ghiandole aumenta il rischio di infezione dovuto a pseudo-monas.

**5.3.1.1.1 Altre mutazioni** In caso di sospetto si può valutare un pannello delle mutazioni più frequenti: pazienti eterozigoti composti, due alleli con due mutazioni diverse.

### 5.3.2 Sindrome di Marfan

La sindrome di Marfan è un carattere autosomico dominante. È un difetto del tessuto connettivo che colpisce il sistema scheletrico e il sistema cardiovascolare.

#### 5.3.2.1 Prodotto genico - fibrillina

Il tessuto connettivo intorno alla base dell'aorta si indebolisce portando ad allargamento e rottura. Può capitare che ci sia una rottura dell'aorta traumatica non recuperabile. La fibrillina è una delle componenti che rendono i tessuti connettivi elastici.

### 5.3.3 Fenilchetonuria *PKU*

La *PKU* viene ereditata come un carattere autosomico recessivo.

#### 5.3.3.1 Funzione del gene

Gli alleli normali nel locus *PAH* codificano una *PAH* funzionale che converte la fenilalanina in tirosina. Alleli mutanti invece codificano una *PAH* difettosa che non compie la conversione e alti livelli di fenilalanina causano ritardo mentale, eczema e cute chiara.

### 5.3.3.2 Differenze tra omozigoti ed eterozigoti

**5.3.3.2.1 Omozigoti** Gli omozigoti mostrano un'attività molto bassa dell'enzima *PAH* e alte concentrazioni di fenilalanina.

**5.3.3.2.2 Eterozigoti** Gli eterozigoti mostrano livelli intermedi di attività enzimatica ma una bassa concentrazione plasmatica di fenilalanina.

**5.3.3.2.3 Conclusione** La *PKU* esibisce dominanza incompleta riguardo l'attività enzimatica, ma in riferimento alla concentrazione plasmatica di fenilalanina si mostra recessiva.

**5.3.3.2.4 Conclusione** La *PKU* esibisce dominanza incompleta riguardo l'attività enzimatica, ma in riferimento alla concentrazione plasmatica di fenilalanina si mostra recessiva.

### 5.3.3.3 Eterozigoti compositi

A livello del locus *PAH* si incontrano molti alleli diversi e alleli mutati mostrano ampia variabilità di difetti nell'attività enzimatica con effetti sulla gravità dei sintomi.

### 5.3.3.4 Caratteristiche cliniche

È importante una diagnosi precoce in quanto il ritardo mentale è curabile attraverso una dieta particolare. Altre caratteristiche sono pigmentazione leggera, postura particolare e epilessia.

### 5.3.3.5 Fenilchetonuria materna

La nascita di ritardo mentale nella progenie di madri omozigoti è un esempio di malattia genetica basata sul genotipo della madre. Il danno è aggravato da processi placentari che funzionano per mantenere un alto livello di amminoacidi nel feto. Si è notato come la frequenza di anomalie congenitali aumenta aumentando i livelli materni di fenilalanina.

## 5.3.4 Piebaldismo

Il piebaldismo è un fenotipo raro presente nell'uomo con variabilità dell'espressione fenotipica. L'allele dominante interferisce con la migrazione dei melanociti: il *c-Kit* protooncogene.

## 5.3.5 Incapacità di sentire l'amaro

La variante polimorfica che determina l'incapacità di sentire l'amaro è recessiva ma il carattere non salta generazioni.

## 5.3.6 Famiglia cinese colpita da corea di Huntington

La penetranza della patologia è legata all'età e raggiunge il 100% a 80 anni. La patologia è legata a un allele, ma non è una mutazione puntiforme. Il fenomeno legato è l'espansione di un elemento ripetuto di *CAG*, che essendo in una porzione codificante codifica per glutammina. Nel gene dell'huntingtina un esone contiene uno stretch di ripetizioni. La malattia è dominante. Questo studio unisce analisi genetica con analisi molecolare.

### 5.3.6.1 Elettroforesi

L'elettroforesi viene utilizzata per determinare il numero di ripetizioni di *CAG* presenti nel gene dopo *PCR*. Si notano due bande sugli eterozigoti, mentre una sugli omozigoti. La posizione delle bande indica il numero di ripetizioni presenti.

### 5.3.7 Complementazione genica nell'uomo - sordità

In famiglie diverse affette da sordità segregano mutazioni non alleliche: ciò rende possibile il fenomeno della complementazione genica quando individui di famiglie diverse si incrociano. Genitori con sordità profonda hanno uditi di figlio normale.

### 5.3.8 Sindrome di Beckwith-Wiedemann

La sindrome di Beckwith-Wiedemann *BWS* è causata da mutazioni o delezioni di geni imprinted nel cromosoma 11p15.5. Geni coinvolti sono *P57*, *H19* e *LIT1*. La malattia può anche essere causata da mutazioni puntiformi nel gene *CDKN1C*. È un disordine della crescita pediatrico con predisposizione nello sviluppo dei tumori. La presentazione clinica è variabile.

#### 5.3.8.1 Caratteristiche cliniche

Individui con *BWS* possono crescere più rapidamente durante la seconda metà della gravidanza e nei primi anni di vita, ma l'altezza degli adulti rimane normale. La crescita anormale si può manifestare come emipertrofia o macroglossia. L'ipoglicemia è riportata nel 50% dei bambini. Aumenta la frequenza di malformazioni e complicazioni mediche come difetti della parete addominale, e visceromegalia.

#### 5.3.8.2 Ereditarietà

Il metodo di eredità della sindrome è complesso: pattern possibili includono:

- Ereditarietà autosomale dominante con espressività variabile.
- Imprinting genomico risultante da una copia difettiva o assente del gene della madre.

## Capitolo 6

# Determinazione del sesso ed eredità legata ad esso

### 6.1 Teoria cromosomica dell'eredità

#### 6.1.1 Scoperta dei cromosomi

Sutton scoprì che è possibile distinguere cromosomi individuali nelle cellule che stanno subendo meiosi durante test del grillo *Brachystola magna*. Nel 1902 descrive pertanto le configurazioni dei cromosomi nella cellula durante i vari stadi della meiosi. Distingue 11 paia di cromosomi in base alla loro dimensione e un singleton accessorio che presume essere un cromosoma sessuale.

##### 6.1.1.1 Teoria cromosomica dell'eredità

I cromosomi materni e paterni che si associano in coppie e poi si separano durante la divisione riduzionale della meiosi pongono le basi fisiche per la legge mendeliana dell'ereditarietà.

#### 6.1.2 Indipendenza dei cromosomi

Sutton nota anche che la posizione di ogni cromosoma sulla piastra metafasica era casuale e non si nota un lato paterno o materno consistente. Pertanto ogni cromosoma doveva essere indipendente dagli altri. Durante la separazione in gameti, l'insieme di cromosomi in ogni cellula figlia potrebbe contenere una mescolanza di tratti parentali ma non la stessa di altre cellule figlie.

##### 6.1.2.1 Combinatoria

L'indipendenza cromosomica impone che il numero di combinazioni cromosomiche per ogni gamete potesse essere calcolato in base al numero di cromosomi nell'organismo. Considerando  $2^n$  possibili combinazioni di cromosomi, dove  $n$  è il loro numero, e il loro accoppiamento con altri la variazione negli zigoti si calcola come:

$$i(2^n)^2$$

### 6.1.3 Relazione tra il comportamento dei cromosomi e l'eredità dei caratteri secondo Mendel

Il meccanismo con cui si ereditano i caratteri è spiegabile con le modalità di trasmissione dei cromosomi durante la gametogenesi e la fecondazione.

#### 6.1.3.1 Principi fondamentali

- I cromosomi contengono il materiale genetico che viene trasmesso dai genitori.
- I cromosomi vengono replicati e trasmessi di generazione in generazione.
- I nucleo contengono cromosomi che si presentano in coppie omologhe e un membro di ciascuna coppia viene ereditato dalla madre mentre l'altro dal padre.
- Durante la gametogenesi i cromosomi di tipo diverso segregano indipendentemente l'uno dall'altro.

#### 6.1.3.2 Prima legge di Mendel

La prima legge di Mendel si spiega con la segregazione dei cromosomi omologhi durante la meiosi. Le due coppie di un gene si trovano su cromosomi omologhi, per cui durante la divisione si ha la segregazione dei due alleli in gameti distinti.

#### 6.1.3.3 Seconda legge di Mendel

La seconda legge di Mendel si spiega con l'allineamento casuale delle tetradi durante la profase della meiosi *I*. I due geni situati su due cromosomi differenti durante la metafase della meiosi *I* si dividono casualmente e le disposizioni possibili dei cromosomi omologhi nelle tetradi possono condurre a combinazioni diverse negli alleli nei gameti risultanti.

## 6.2 Esclusione del *mtDNA* paterno

Nonostante lo scopo della riproduzione sessuale sia di mischiare i genomi, si nota come il *mtDNA* paterno viene escluso.

### 6.2.1 *OXPHOS*

Il *mtDNA* codifica per le subunità centrali dei complessi a multipli peptidi *OXPHOS I, III, IV, V*. Essendo la sequenza dei geni di *mtDNA* altamente variabile il mescolamento di due diverse variazioni di *mtDNA* degli stessi elementi *OXPHOS* potrebbe essere deleteria. Una congettura predice che se due *mtDNA* normali ma diversi verrebbero mescolati nello stesso animale avverrebbe dell'incompatibilità. Questa incompatibilità renderebbe instabile lo stato eteroplasmatico e avere effetti negativi sul fenotipo dell'animale.

### 6.2.2 Endonucleasi mitocondriale *G*

I mitocondri sono ereditati maternalmente nella maggior parte degli animali, ma i meccanismi di eliminazione elettiva mitocondriale paterna *PME* sono sconosciuti. Analizzando fertilizzazione in

*Caenorhabditis elegans* si osserva che mitocondri paterni perdono rapidamente l'integrità della membrana interna. *CSP-6* un'endonucleasi mitocondriale *G* si rilocalizza dallo spazio intermembrana alla matrice dopo la fecondazione per degradare il DNA mitocondriale. Agisce con autofagia materna e macchinari di proteosomi per promuovere *PME*. Rimozione ritardata di mitocondri paterni causa un aumento nella letalità embrionale.

### 6.2.3 Eteroplasma del *mtDNA* nel topo è geneticamente instabile e causa cognizione e comportamento alterati

L'eredità materna del *mtDNA* è la norma e per investigare le conseguenze si generano topi contenenti una miscelanza di *mtDNA* *NZB* e *129S6* nella presenza di un congenito background nucleare *C57BL/6J*. L'analisi della segregazione dei due *mtDNA* rivela che la porzione di *NBZ* era ridotta preferenzialmente. La segregazione produce topi *NZB-129* eteroplasmici e le controparti omoplasmiche. Comparando i fenotipi si dimostra come i topi eteroplasmici presentano attività ridotta di intake di cibo, di tasso respiratorio, risposta allo stress accentuata e impedimenti cognitivi. Un'insieme dei due *mtDNA* diversi è geneticamente instabile e può produrre effetti fisiologici avversi.

## 6.3 Sistemi di determinazione del sesso

### 6.3.1 I sistemi cromosomici di determinazione del sesso

#### 6.3.1.1 Scoperte

**6.3.1.1.1 Henking** Nel 1891 Henking scopre una struttura peculiare nel nucleo delle cellule di insetti maschi e la chiama corpo *X*.

**6.3.1.1.2 Stevens e Wilson** Nel 1905 Stevens e Wilson dimostrano che nelle cavallette e altri insetti le cellule della femmina hanno due cromosomi *X*, mentre in quelle del maschio solo 1. In alcuni insetti contano lo stesso numero di cromosomi nei maschi e nelle femmine, ma notano che una coppia di questi era diversa: nelle femmine si trovano due *X*, mentre nei maschi compare un solo *X* e uno più piccolo detto *Y*. Mostrano come i due cromosomi *X* e *Y* si separano in cellule diverse durante la formazione dello sperma: metà riceve un *X* e l'altra un *Y*. Tutte le cellule uovo invece ricevono un *X*. Se uno spermatozoo con un *X* incontra un uovo nasce una femmina *XX*, mentre se contiene un *Y* nasce un maschio *XY*. Questa distribuzione spiega come mai il rapporto fra sessi è 1 : 1. Scoprono pertanto che il sesso è associato all'eredità di una coppia di cromosomi sessuali, diversi in maschi e femmine. I cromosomi uguali non sessuali vengono invece detti autosomi.

#### 6.3.1.2 Determinazione del sesso *XX-X0*

Il sistema di cavallette studiato da McClung è uno dei meccanismi più semplici di determinazione del sesso attraverso i cromosomi. Nel sistema *XX-X0* le femmine hanno due cromosomi *XX* mentre i maschi ne possiedono uno solo *X0*. Il numero zero indica infatti l'assenza di un cromosoma sessuale. Il sesso di un singolo organismo è determinato dal tipo di gamete maschile.

**6.3.1.2.1 Meiosi** Nella meiosi delle femmine i due cromosomi *X* si appaiano e si separano in modo che un solo *X* entra nell'uovo. Nei maschi l'unico *X* segrega in metà delle cellule, mentre la rimanente non riceve alcun cromosoma sessuale.



**6.3.1.2.1.1 Eterogameti e omogameti** I maschi che producono due tipi diversi di gameti sono detti sesso eterogametico, mentre le femmine che ne producono solo uno sono dette sesso omogametico.

### 6.3.1.3 Determinazione del sesso XX-XY

In molte specie le cellule di maschi e femmine hanno lo stesso numero di cromosomi, ma quelle delle femmine hanno due cromosomi  $X$  e quelle dei maschi un solo cromosoma  $X$  e uno sessuale più piccolo  $Y$ . Nell'uomo il cromosoma  $Y$  è acrocentrico. Il maschio è eterogametico, mentre la femmina omogametica. Piante, insetti, rettili e animali hanno questo sistema, mentre molti altri varianti di questo. Durante la meiosi  $X$  e  $Y$  si accoppiano e segregano in cellule diverse. Questo è possibile dal fatto che i cromosomi sono omologhi in aree dette regioni pseudoautosomiche nelle quali partano gli stessi geni. Nell'essere umano sono presenti ad entrambe le estremità e sono dette  $PAR1$  e  $PAR2$ . Può avvenire crossing over in queste regioni durante la meiosi.

### 6.3.1.4 Determinazione del sesso ZZ-ZW

In questo sistema la femmina è eterogametica e il maschio omogametico. Le femmine sono  $ZW$  e i maschi  $ZZ$ , dopo la meiosi metà delle uova hanno il cromosoma  $Z$  e l'altra metà il cromosoma  $W$ . Questo sistema presiede alla determinazione del sesso in uccelli, serpenti, farfalle, anfibi e pasci.

## 6.3.2 Determinazione genica del sesso

In alcuni organismi il sesso è determinato geneticamente ma non ci sono differenze evidenti nei cromosomi di maschi e femmine. Non esistono cromosomi sessuali e sono i genotipi su uno o più loci a determinare il sesso. Avviene in piante, funghi, protozoi e pesci. Si noti come anche nel sistema cromosomico il sesso è determinato da geni individuali.

### 6.3.2.1 Esempi

**6.3.2.1.1 Imenotteri** In alcuni imenotteri non vi sono cromosomi sessuali: la determinazione del sesso si basa sul numero di assetti cromosomici presenti nel nucleo di ciascuna cellula. In particolare in assenza di fecondazione viene prodotto un maschio zigote  $n$  e in presenza di fecondazione si produce la femmina zigote  $2n$ . Nell'aplodiploidia il sesso è determinato dal numero di assetti cromosomici.

## 6.3.3 Determinazione del sesso legata all'ambiente

In un certo numero di organismi il sesso è determinato da fattori ambientali.

### 6.3.3.1 Esempi

**6.3.3.1.1 Crepidula fornicata** Nella crepidula fornicata o patella comune è un mollusco che vive in colonie costituite da più individui sovrapposti. Ogni patella nasce come larva: la prima larva che trova un substrato disponibile si sviluppa come femmina. Produce sostanze chimiche che producono altre patelle che si insediano sopra di lei. Queste si sviluppano come maschi che si accoppiano con la patella sottostante.

**6.3.3.1.1.1 Ermafroditismo sequenziale** Nell'ermafroditismo sequenziale ogni mollusco può essere sia maschio che femmina anche se non nello stesso momento.

**6.3.3.1.2 Tartarughe** Nelle tartarughe temperature elevate durante il periodo di cova producono più femmine.

**6.3.3.1.3 Alligatori** Negli alligatori temperature elevate durante il periodo di cova producono più maschi.

**6.3.3.1.4 Lucertole drago barbute** Nelle lucertole drago barbute i fattori ambientali possono prevalere sulla determinazione cromosomica. Tipicamente i maschi sono  $ZZ$  e le femmine  $ZW$ , ma a temperature elevate individui  $ZZ$  si sviluppano fenotipicamente come femmine.

### 6.3.4 Determinazione del sesso nella *Drosophila melanogaster*

La *drosophila melanogaster* possiede 8 cromosomi: tre coppie di autosomi e una di cromosomi sessuali. Le femmine sono  $XX$  e i maschi  $XY$ . Il sesso della *Drosophila* non è determinato dal numero di cromosomi  $X$  e  $Y$  ma dal bilanciamento fra geni di determinazione femminile localizzati sul cromosoma  $X$  e geni di determinazione maschile presenti sugli autosomi.

#### 6.3.4.1 Rapporto $X : A$

Il sesso dei moscerini è determinato dal rapporto  $X : A$ , il numero di cromosomi diviso per il numero di assetti aploidi dei cromosomi autosomici. I moscerini possiedono solitamente due assetti aploidi di autosomi e due cromosomi  $X$  se femmine, mentre un  $X$  e un  $Y$  se maschi.

- $X : A < 0.5$  maschio sterile.
- $X : A = 0.5$  maschio.
- $0.5 < X : A < 1$  intersesso.
- $X : A = 1$  femmina.
- $X : A > 1$  metafemmina con problemi di sviluppo.

#### 6.3.4.2 Meccanismo molecolare

Sono presenti sul cromosoma  $X$  diversi geni che influiscono sul fenotipo sessuale, ma ne esistono alcuni autosomici che lo fanno. I principali geni responsabili della determinazione del sesso sono situati sul cromosoma  $X$ . L'influenza dei caratteri autosomici è indiretta e influenza la tempistica degli eventi di sviluppo.

### 6.3.5 La determinazione del sesso nell'uomo

L'uomo ha una determinazione del sesso  $XX-XY$ , ma la presenza del gene *SRY* sul cromosoma  $Y$  determina i caratteri sessuali maschili. I fenotipi che risultano da un numero anomalo di cromosoma sessuali dimostra l'importanza del  $Y$ .

#### 6.3.5.1 Patologie legate al sesso

**6.3.5.1.1 Sindrome di Turner** La sindrome di Turner è causata dalla presenza nelle femmine di un solo cromosoma  $X$ . La sindrome di Turner colpisce donne con caratteristiche sessuali secondarie non pienamente sviluppate. Le donne colpite sono di bassa statura, attaccatura di capelli bassa, torace ampio e pieghe cutanee sul collo. Le cellule possono avere un solo cromosoma  $X$ . Non essendo noti casi in cui un individuo abbia perso entrambi i cromosomi  $X$  si dimostra come questo sia essenziale.

**6.3.5.1.1.1 *SHOX*** La perdita del gene *SHOX* importante per lo sviluppo delle ossa e crescita causa la bassa statura e anomalie scheletriche delle donne affette.

**6.3.5.1.2 Sindrome di Klinefelter** Le persone che soffrono della sindrome di Klinefelter hanno cellule con uno o più cromosomi *Y* e *X* multipli. Esiste una condizione mosaico in cui il cromosoma *X* in più si trova unicamente in alcune cellule. Gli uomini colpiti dalla sindrome hanno testicoli ridotti e scarsa peluria sul volto e pube, sono più alti del normale e sterili.

**6.3.5.1.3 Femmine poli-*X*** Le cellule femminili in alcuni casi presentano 3 *X* o sindrome della tripla *X*: non presentano caratteristiche particolari se non una tendenza ad essere alte e magre. Alcune sono sterili ma la maggior parte ha un ciclo regolare ed è fertile. L'incidenza di ritardo mentale è leggermente superiore alla norma. La gravità del ritardo mentale aumenta linearmente con il numero di *X*.

**6.3.5.1.4 Sindrome da insensibilità agli androgeni** Le donne affette da sindrome da insensibilità agli androgeni possiedono una vagina a fondo ceco e al posto di utero, ovidotti e ovaie sono presenti dei testicoli che producono livelli di testosterone simili a quelli dei maschi. Le cellule contengono un cromosoma *X* e un *Y*. In un embrione umano con un cromosoma *Y SRY* trasforma che le gonadi si trasformano in testicoli e producono il testosterone. Questo poi stimola i tessuti embrionali a sviluppare caratteri maschili. Per farlo deve però legarsi a un recettore assente nelle femmine con questa sindrome. Le cellule sono pertanto insensibili al testosterone e sviluppano caratteristiche femminili. Questo gene si trova sul cromosoma *X*.

**6.3.5.1.5 Displasia ectodermica ipoidrotica** La displasia ectodermica ipoidrotica viene descritta nel 1875 da Darwin: considerando 10 uomini nel corso di 4 generazioni, nessuna figlia fu colpita da questa affezione. Nonostante questo esse la trasmettevano ai figli.

### 6.3.5.2 Il numero dei cromosomi sessuali

- Il cromosoma *X* contiene informazioni genetiche essenziali per entrambi i sessi, per uno sviluppo corretto è necessaria la presenza di almeno una copia del cromosoma *X*.
- Il gene che determina il sesso maschile è localizzato sul cromosoma *Y*. Un'unica copia anche in presenza di diversi cromosomi *X* determina un fenotipo maschile.
- La mancanza del cromosoma *Y* di solito produce un fenotipo femminile.
- I geni che influiscono sulla fertilità sono sul cromosoma *X* e *Y*. Per essere fertile, una femmina di solito ha bisogno di almeno due copie del cromosoma *X*.
- Copie eccedenti del cromosoma *X* possono alterare lo sviluppo normale dei maschi e delle femmine producendo problemi fisici e mentali.

### 6.3.5.3 il gene che determina il fenotipo maschile nell'uomo

Il cromosoma *Y* nell'uomo è fondamentale per determinare il fenotipo maschile, ma esistono rari maschi *XX*. Si nota come in questi casi una parte di *Y* si era attaccata a un altro cromosoma. Durante gli stadi precoci dello sviluppo tutti gli esseri possiedono gonadi indifferenziate. A 6 settimane dalla fecondazione si attiva un gene sul cromosoma *Y*: questo fa trasformare le gonadi in testicoli che secernono due ormoni, testosterone e anti-muelleriano, che determinano la regressione dei dotti

#### 6.4. LE CARATTERISTICHE LEGATE AL SESSO SONO DETERMINATE DA GENI PRESENTI SU CROMOSOMI SESSUALI

---

riproduttivi femminili. Il gene della regione  $Y$  di determinazione del sesso  $SVY$  codifica per una proteina fattore di trascrizione che stimola la trascrizione di altri geni legandosi al DNA. Altri geni presenti sul  $X$ , altri sul  $Y$  e sugli autosomici hanno una funzione nella fertilità e differenze fra i sessi.

### 6.4 Le caratteristiche legate al sesso sono determinate da geni presenti su cromosomi sessuali

I geni sul cromosoma  $X$  determinano caratteristiche legate al  $X$  e quelli sul  $Y$  caratteristiche legate al  $Y$ . Essendo  $X$  molto piccolo e contiene una quantità di informazioni limitata molte caratteristiche legate al sesso sono legate al  $X$ .

#### 6.4.1 Occhi bianchi legati al cromosoma $X$ nella *Drosophila*

Morgan studiando *Drosophila* scopre fra i moscerini della colonia del suo laboratorio un maschio con occhi bianchi diverso dai normali con occhi rossi. Per indagare sull'ereditarietà del carattere conduce una serie di incroci: comincia con una linea pura di femmine con gli occhi rossi con il maschio con gli occhi bianchi, producendo una  $F_1$  a occhi rossi. Reincrociando i moscerini in  $F_1$  nota come tutte le femmine di  $F_2$  avevano occhi rossi, mentre metà dei maschi aveva occhi bianchi. Morgan ipotizza che il locus per il colore degli occhi si trovasse sul cromosoma  $X$ . I maschi sono pertanto definiti emizigoti per i loci legati al cromosoma  $X$ . Questo tipo di ereditarietà si definisce criss-cross: la trasmissione di un allele da genitore maschio attraverso una figlia femmina a un nipote maschio.

#### 6.4.2 Meccanismo di non-disgiunzione e teoria cromosomica dell'ereditarietà

Incrociando il maschio a occhi bianchi e femmine omozigoti a occhi rossi tra gli individui ne erano presenti tre con occhi bianchi. Morgan attribuisce la loro presenza a mutazioni casuali, ma la loro frequenza era troppo elevata. Bridges, un suo allievo allora nota come queste eccezioni avvengono solo in certi ceppi di moscerini a occhi bianchi. Incrociando una di queste femmine anomale a occhi bianchi con un maschio a occhi rossi il 5% della progenie maschile aveva occhi rossi e il 5% di quella femminile aveva occhi bianchi. Essendo che in questo incrocio ogni moscerino maschio edita un  $X$  dalla madre con genotipo  $X^WY$  e occhi bianchi, mentre ogni femmina eredita un allele dominante per gli occhi rossi dal  $X$  del padre, tutta la progenie femminile dovrebbe essere  $X^+X^W$  e avere occhi rossi.

##### 6.4.2.1 Spiegazione di Bridges

Per spiegare la comparsa di occhi bianchi Bridges ipotizza che le femmine a occhi bianchi possiedano due  $X$  e un cromosoma  $Y$ : in *Drosophila* i moscerini  $XXY$  sono femmine. Il 90% delle volte i due  $X$  si separano uno dall'altro con un  $X$  e un  $Y$  che entrano in un gamete e  $X$  nell'altro. Questi gameti, quando fecondati da uno spermatozoo di maschio con occhi rossi producono maschi con occhi bianchi e femmine con occhi rossi, ma il 10% delle volte i due cromosomi  $X$  delle femmine non riescono a separarsi nel fenomeno di non-disgiunzione. In questo caso metà delle uova riceve due  $X$  e l'altra metà solo  $Y$ . Si generano pertanto quattro combinazioni:

#### 6.4. LE CARATTERISTICHE LEGATE AL SESSO SONO DETERMINATE DA GENI PRESENTI SU CROMOSOMI SESSUALI

---

- $X^+X^WX^W$  che di solito muore.
- $X^WX^WY$  che si sviluppa come femmina a occhi bianchi.
- $X^+Y$  che si sviluppa come maschio a occhi rossi.
- $YY$  che di solito muore.

Questo esperimento fornisce una prova di come i geni legati al sesso sono situati sul cromosoma  $X$ .

##### 6.4.3 Daltonismo legato al cromosoma $X$ nell'uomo

L'occhio umano percepisce con chiarezza il colore grazie ai coni che ricoprono la retina. Ogni cono contiene uno dei tre pigmenti capace di assorbire la luce di una particolare lunghezza d'onda. Ognuno dei coni è codificato da un locus specifico. Quello per il blu si trova sul cromosoma 7, mentre quelli per verde e rosso su  $X$ . La cecità ai colori è causata da difetti dei pigmenti rosso e verde. Viene detta daltonismo. Il daltonismo è ereditato come carattere recessivo legato a  $X$ .

##### 6.4.4 Caratteri legati al cromosoma $Z$

Negli organismi con determinazione del sesso  $ZZ-ZW$  i maschi sono omogametici e portano due alleli legati al sesso e possono essere omo od eterozigoti. Le femmine sono eterogametiche e hanno un solo allele legato a  $Z$ . L'eredità dei caratteri legati a  $Z$  è la stessa di quelli legati a  $X$ , tranne che il modello di eredità è invertito. La femmina eredita il  $W$  dalla madre e lo  $Z$  dal padre, mentre il maschio eredita  $Z$  dalla madre e dal padre.

###### 6.4.4.1 Esempi

**6.4.4.1.1 Cameo nel pavone blu indiano** Il fenotipo cameo nel pavone blu indiano *Pavo cristatus* è il risultato di un allele legato a  $Z$ . Tipicamente il colore del piumaggio selvatico è blu metallico. Il piumaggio cameo caratterizzato da piume marrone è il risultato di un allele  $Z^{ca}$  recessivo rispetto a blu  $Z^{ca+}$ . Se una femmina blu si incrocia con un maschio cameo tutte le femmine di  $F_1$  saranno cameo e tutti i maschi blu.

##### 6.4.5 Caratteri legati al cromosoma $Y$

I caratteri legati al  $Y$  o caratteri olandrici mostrano un modello di eredità diverso: vengono ereditati solo nei maschi e sempre dal padre. Un maschio con un carattere legato a  $Y$  lo trasmette a tutta la progenie maschile.

###### 6.4.5.1 Evoluzione del cromosoma $Y$

I cromosomi sessuali si evolvono da una coppia di autosomi. Il primo passo si verifica quando un membro di una copia acquisisce un gene che determina il fenotipo maschile. Ogni organismo con una copia del cromosoma diventa maschio. Su questi proto- $Y$  si verificano ulteriori mutazioni riguardanti caratteri vantaggiosi unicamente per il sesso maschile. Per evitare che compaiano anche nelle femmine si sopprime il crossing-over tra  $X$  e  $Y$ . L'assenza di crossing-over porta a un accumulo di mutazioni e perdita di materiale genetico da parte di  $Y$ .

#### 6.4.5.2 Caratteristiche del cromosoma Y nell'uomo

Due terzi del cromosoma *Y* sono costituiti da brevi ripetizioni del DNA e prive di geni attivi. L'altro terzo è costituito da pochi geni: 350, molti sembrano avere un ruolo nello sviluppo sessuale maschile e nella fecondità. Contiene molti elementi che influiscono sull'espressione di numerosi geni autosomici e su *X*. Sono presenti otto sequenze palindromiche tra cui avviene ricombinazione impedendo la sua completa degradazione. In alcuni casi possono portare a delezioni del gene *SRY* producendo femmine *XY*.

### 6.5 La compensazione del dosaggio genico uniforma i livelli di proteina prodotti dai geni X-linked e dai geni autosomici

Nelle specie *XX-XY* la differenza nel numero di cromosomi *X* rappresenta un problema durante lo sviluppo: i geni sui cromosomi *X* e sugli autosomi nelle femmine non sono in equilibrio. Essendo la quantità di proteina prodotta funzione del numero di copie del gene, nei maschi ci sarebbero meno proteine codificati da geni legato a *X*. Alcuni animali superano il problema attraverso meccanismi che rendono uguale il quantitativo di proteina prodotto dall'unico cromosoma *X* e dai due autosomi o compensazione di dose. Nei moscerini della frutta la compensazione è raggiunta raddoppiando l'attività dei geni su *X* dei maschi ma non delle femmine. Nei mammiferi placentati l'espressione dei geni sensibili alla dose su *X* è aumentata associandosi all'inattivazione di uno dei cromosomi *X* nelle femmine in modo che l'espressione dei geni sia bilanciata.

#### 6.5.1 Possibili meccanismi di compensazione

- Ogni gene *X-linked* risulta più attivo nei maschi.
- Viene inattivata una copia de geni *X-linked* nelle femmine.
- Entrambe le *X* sono ipoattive.

##### 6.5.1.1 *Drosophila Melanogaster*

In *Drosophila melanogaster* il rapporto tra i cromosomi autosomici e *X* determina il fenotipo maschile. La determinazione del sesso e il differenziamento sono controllati da un gene chiave master *Sxl* o sex-lethal. Questo gene è attivo nelle femmine e spento nei maschi.

**6.5.1.1.1 Struttura di *Sxl*** L'interruttore di accensione e spegnimento di *Sxl* è regolato a livello trascrizionale da quattro prodotti genici *X-linked* *SISA*, *RUNT*, *SCUTE*, *UNPAIRED* che agiscono a livello del promotore "early" di *Sxl* la cui funzione è influenzata da prodotti di geni autosomici. In particolare tra gli esoni di *Sxl* si trovano due vie di splicing alternativa: una "late" che parte da *L1*, salta *E1* e passa a *L2*. Da *L2* avviene una ramificazione: o viene incluso l'esone *L3* che contiene un codone di stop, determinando un maschio o viene saltato. Lo splicing partendo dall'esone *E1* "early" salta gli esoni *L1-3*.

**6.5.1.1.2 Rapporto X : A e espressione di *Sxl*** Le quantità relative di fattori che determinano femminilità legate a *X* e di fattori che determinano caratteri maschili legati ad autosomi vengono controllate tramite la formazione di omo e eterodimeri. Solo gli omodimeri quando raggiungono una certa concentrazione possono trascrivere *Sxl* "early" e regolano la determinazione del sesso in *Drosophila*.

**6.5.1.1.3 Modello a soglia per la regolazione del promotore early di *Sxl*** Il corepressore materno *Gro* stabilisce la soglia iniziale contro quale la dose di elementi *XSE* (*Scute*, *SisA*, *Runt*, *Upd*) viene misurata.

**6.5.1.1.3.1 Embrioni XX** Negli embrioni *XX* questi livelli superano la soglia. Una volta iniziata la trascrizione di *SlxPe* inizia la repressione è impedita in modo da permettere alle proteine di essere più efficienti. Questo può avvenire direttamente: *Gro* viene antagonizzato da *XSE* o indirettamente se il suo legame è ridotto in base ai cambi di trascrizione indotti nella struttura cromatinica.

**6.5.1.1.3.2 Embrioni XY** Negli embrioni *XY* la repressione mediata da *Gro* è sufficiente per mantenere *SlxPe* silente. Successivamente l'espressione zigotica di *Dpn* combinata con *Gro* aumenta la soglia assicurando lo stato silente di *SlxPe*.

**6.5.1.1.4 Blastoderma** Dopo lo stadio di blastoderma il secondo promotore di *Sxl* viene attivato in entrambi i sessi, ma lo splicing è diverso in maschi e femmine e solo nelle seconde si produce *Sxl*, mentre nei maschi una proteina tronca non funzionale.

**6.5.1.1.5 Regolazione dello splicing alternativo** La proteina *Sxl* regola lo splicing alternativo e la traduzione del suo stesso messaggero. La proteina *Sxl* prodotta nelle fasi precoci dello sviluppo si lega all'esone 3 del RNA trascritto più tardi impedendo la sua inclusione nel trascritto maturo. *Sxl* si lega a sequenze poli-U negli introni 2 e 3 e induce un exon skipping dell'esone 3 che contiene un codone di stop che causerebbe una terminazione prematura della proteina. Con questo processo si stabilisce un circuito positivo di auto-regolazione. *Sxl* si lega anche a sequenze poli-U nel 3'-UTR inibendo la traduzione del messaggero.

**6.5.1.1.6 Cascata di regolazione nella determinazione del sesso in *Drosophila*** La cascata di regolazione nella determinazione del sesso in *Drosophila* coinvolge la regolazione del processamento dei trascritti. La proteina *Sxl* specifica alle donne agisce come un regolatore di splicing di *Sxl* e *tra* pre-mRNA. *Tra* specifica alle femmine e *Tra2* non specifica agiscono come regolatori dello splicing di *dsx* pre-mRNA. Le isoforme di *DSX* maschili e femminili agiscono come attivatori e repressori dei geni a valle controllando il dimorfismo sessuale.

**6.5.1.1.6.1 Isoforme di *Dsx*** I prodotti del gene *dsx* nelle due forme alternative si legano allo stesso enhancer *YP1* ma hanno effetti opposti sull'espressione del gene:

- L'isoforma femminile lo attiva.
- L'isoforma maschile lo reprime.

**6.5.1.1.7 *Sxl* nel soma è essenziale per la fertilità delle cellule germinali** La proteina *Sxl* regola la compensazione del dosaggio genico attraverso la repressione di *MSL* (male specific lethal). Si nota come il segnale  $X : A$  oltre a controllare la determinazione del sesso controlla anche la compensazione del dosaggio e il comportamento sessuale. Il suo target è il gene *Sxl* e l'autoregolazione viene stabilita in embrioni  $2X : 2A$  ma non in  $XY : 2A$ . Il feedback autoregolatorio regola la sua espressione attraverso lo sviluppo e la vita adulta: controlla *tra* e *msl-2* i cui prodotti sono richiesti per il controllo della determinazione sessuale somatica e comportamento sessuale.

**6.5.1.1.8 Male specific letal *MSL*** La proteina *MSL* è legata al cromosoma *X* del maschio ed è omologa a elicasi. I mutanti muoiono nei primi stadi di sviluppo per mancata iperattivazione di *X*. Anticorpi rivelano legami specifici di *MSL* a *X* che contengono RNA *roX1* e *roX2*, la cui espressione è spenta quando *Slx* è attivo. In complesso con RNA *MSL* si legano fino a 300 loci *CES* (chromatin entry site) bidirezionalmente e si diffondono iperattivando tutto il cromosoma *X* nel maschio. *MSL3* è un'acetil transferasi istonica e *X* iperattivo porta alla modificazione epigenetica *H4-K16Ac*. Regola pertanto il dosaggio genico.

**6.5.1.1.8.1 Specificità per *X*** In assenza di *roX* il complesso si lega in un pattern poco definito. I geni *roX* si trovano sul cromosoma *X* ma quando trasposti ad autosomi attraggono *MLS* alla loro nuova locazione. Il legame inoltre si diffonde sulla cromatina che li fiancheggia. Una sequenza consenso sui *CES* composta di *MRE* (elementi di riconoscimento di *MSL*) ricchi di *GA* è necessaria e sufficiente al reclutamento del complesso *MSL*.

## 6.5.2 Ipotesi di Lyon

nel 1949 vengono osservati da Barr corpi compatti nei nuclei delle cellule di gatti femmina. Queste strutture vengono chiamate corpi di Barr e nel 1961 Lyon ipotizza che fossero cromosomi *X* inattivi ( $X_i$ ). Viene suggerito che all'interno di ogni cellula femminile, in maniera casuale uno dei due cromosomi *X* risultasse inattivo. Una conseguenza è che le femmine dei mammiferi placentati sono emizigoti per i geni legati al *X*: negli organismi eterozigoti per un carattere su *X* metà delle cellule esprime un allele, mentre l'altra metà quello rimanente. Le femmine sono pertanto mosaici per l'espressione di questi geni. Essendo che l'inattivazione casuale ha luogo nelle prime fasi dello sviluppo e la linea somatica eredita lo stato le cellule vicine tendono a presentare lo stesso cromosoma *X* inattivo e un modello a chiazze, come si nota nei gatti calico. Le patologie legate al numero di cromosomi *X* suggeriscono che solo il 75% dei geni legati a *X* sono disattivati permanentemente, alcuni sfuggono completamente, mentre altri vengono disattivati solo in alcuni individui.

- Nelle cellule somatiche delle femmine molto precocemente avviene l'inattivazione casuale di uno dei due cromosomi *X*.
- Durante l'oogenesi il cromosoma *X* inattivato si riattiva in quanto sono necessari i suoi geni in doppia dose.
- Dopo che un cromosoma *X* è stato inattivato in una cellula, tutti i discendenti clonali di essa mantengono lo stesso *X* inattivo.
- La manifestazione citologica di questo fenomeno è rappresentata dal corpo di Barr e si evidenzia come una massa di eterocromatina.

## 6.5.3 Meccanismo dell'inattivazione casuale del cromosoma *X*

Approssivamente il 50% delle cellule esprime un allele, mentre il restante l'altro anche se non all'interno della stessa cellula. Le cellule pertanto formano un mosaico rispetto all'espressione dei geni *X*.

### 6.5.3.1 Inattivazione del cromosoma *X* nei mammiferi

Se l'espressione genica del cromosoma *X* non viene equilibrata si verifica letalità precoce, pertanto le femmine dei mammiferi sono mosaici genetici: alcune esprimono i geni *X*-linked materni, altre quelli paterni.



**6.5.3.1.1 Regolazioni epigenetiche** L'inattivazione del cromosoma  $X$  rappresenta un paradigma di come si possa ottenere espressione genica monoallelica nei mammiferi con regolazioni epigenetiche. L'inattivazione di  $X$  richiede interazione di trascritti non codificanti  $Xist$ , modificatori della cromatina e fattori coinvolti nell'organizzazione cellulare. Nei topi si nota che precocemente avviene una forma di inattivazione  $X$  imprinted e poi una casuale.

**6.5.3.1.2 Segnali epigenetici su  $X$  inattivato**  $X$  inattivato ( $X_i$ ) si presenta arricchito di diversi segnali epigenetici associati alla repressione della cromatina, mentre quelli tipici di eucromatina sono assenti. È inoltre presente una variante istonica *macroH2A*.  $Xist$  non è associato a tutto il cromosoma e si distinguono due distinti domini eterocromatici, quello che contiene  $Xist$  ha la modifica  $H3K27me3$ . La metilazione del DNA  $CpG$  a livello dei promotori dei geni  $X$ -linked contribuisce all'inattivazione del cromosoma  $XCI$ .

**6.5.3.1.2.1 Marsupiali** Nei marsupiali non si trova  $Xist$  e  $X_i$  in metafase non presenta segnali epigenetici inattivanti ma neppure quelli attivanti.  $X_i$  avviene per imprinting del cromosoma  $X$  paterno.

**6.5.3.1.2.2 Monotremi** Nei monotremi la situazione è estremamente complessa in quanto le femmine possiedono cinque coppie  $XX$ .

**6.5.3.1.3 Organizzazione spaziale** L'organizzazione spaziale del cromosoma  $X$  sembra avere un ruolo importante nel processo di inattivazione.  $X_i$  appare con una struttura centrale dove si localizza  $Xist$  e i segnali epigenetici inattivanti e una zona esterna dove si localizzano geni che sfuggono all'inattivazione o che si trovano in regioni pseudoautosomiche. È anche confinato alla periferia del nucleo, ma in fase  $S$  può essere osservato in posizione perinucleare  $Hp$ . La localizzazione potrebbe essere importante per la replicazione dei segnali epigenetici.  $X_i$  appare meno condensato della cromatina costitutiva in interfase ed è pertanto facoltativa. Si osservano variazioni di densità nel corpo di Barr.

**6.5.3.1.4 Inattivazione per imprinting** Durante l'inattivazione di  $X$  per imprinting non si osserva metilazione del DNA. Questo spiega la rapida reversibilità dell'inattivazione e la maggiore dipendenza dalle proteine policomb per mantenere l'inattivazione.

**6.5.3.1.5 Tappe per l'inattivazione del cromosoma  $X$**   $XIST$  è un gene espresso dal  $X$  inattivo e viene trascritto ma non tradotto: il suo mRNA copre il cromosoma da inattivare, mentre quello che rimane attivo è quello che reprime il suo  $Xist$ . Il cromosoma inattivo si eterocromatinizza nel corpo di Barr con l'assenza dell'istone  $H_4$  acetilato.

**6.5.3.1.5.1  $XIC$**  Il sito di inizio dell'inattivazione è il centro d'inattivazione  $XIC$ . Devono essere presenti più di 2  $XIC$  e il numero di cromosomi  $X$  viene contato permettendo solo ad uno di rimanere attivo. Un singolo locus  $Xic$  controlla la conta degli  $X$  e la scelta di quello che verrà inattivato.  $Xic$  ectopici (transgenici) possono indurre l'inattivazione di  $X$  in cellule germinali maschili e la delezione al 3' di  $Xic$  può portare all'inattivazione di  $X$  in cellule maschili.

**6.5.3.1.5.2  $Tsix$**   $Tsix$  è l'antisense rispetto a  $Xist$  e la sua espressione è modulata da enhancer presenti in  $Xite$  e  $DXPas34$ .  $CTCF$  è un insulator: l'espressione di  $Tsix$  è inibita nel  $X$  che viene inattivata nel topo ma non nell'uomo.

#### 6.5.4 Escapes

I risultati dai profili di *XCI* confermano che un gran numero di geni umani sfuggono a *XCI* come *PAR1* e geni con omologhi funzionali *X-Y*. Geni senza omologhi che scappano alla disattivazione sono espressi solo parzialmente dal *X* inattivo.

## Capitolo 7

# Il linkage, la ricombinazione e mappatura del gene eucariote

### 7.1 Citogenetica - Bandeggio e mappatura fisica dei cromosomi

#### 7.1.1 Tipi di bandeggio

- Bandeggio *G*: i cromosomi sono soggetti a digestione controllata con trispsina prima di essere colorati con *Giemsa*, un colorante legante il DNA. Le bande colorate sono bande *G*, quelle non colorate *G* negative.
- Bandeggio *Q*: i cromosomi sono colorati con un colorante fluorescente che si lega preferenzialmente a DNA ricco in *AT* come *Quinacrina*, *DAPI* o *Hechst 33258* e osservati in fluorescenza. Le bande fluorescenti sono dette bande *Q* e marcano gli stessi segmenti delle bande *G*.
- Bandeggio *R*: è l'inverso del bandeggio *G*. I cromosomi sono denaturati con calore in soluzione salina prima di essere colorati con *Giemsa*. Le bande *R* e *Q* sono negative. Lo stesso pattern può essere riprodotto da coloranti specifici a *GC*.
- Bandeggio *T*: identifica un sottoinsieme delle bande *R* concentrate ai telomeri. Sono più intensamente colorate e visualizzati con un trattamento a calore del cromosoma prima della colorazione.
- Bandeggio *C*: mostra eterocromatina costitutiva ai centromeri. I cromosomi sono esposti a denaturazione con una soluzione saturata di idrossido di bario prima della colorazione con *Giemsa*.

#### 7.1.2 Categorizzazione dei cromosomi

I cromosomi possono essere divisi in categorie in base alla posizione relativa del centromero:

- Metacentrico: il centromero si trova a metà delle due braccia.
- Submetacentrico: il centromero si trova leggermente spostato rispetto al centro.
- Acrocentrico: il centromero si trova vicino ai telomeri.
- Telocentrico: il centromero si trova sui telomeri.

### 7.1.3 Strutture dei cromosomi

Il cromosoma può essere diviso in braccia corte  $p$  e lunghe  $q$ , divise in bande e sottobande.

$$\overbrace{< p, q >}^{\text{braccio}} \overbrace{< num >}^{\text{banda}} \overbrace{< num >}^{\text{sottobanda}}$$

#### 7.1.3.1 Colorazione *Giemsa* - le bande G

Le bande  $G$  sono utili per identificare cromosomi. Le bande si trovano infatti a luoghi specifici e micrografi a scansione di elettroni mostrano costrizioni a siti dove appaiono le bande o inserti. Regioni di lunghezza variabile sono comuni nella regione dei centromeri. Per convenzione  $p$  denota il braccio corto, mentre  $q$  il lungo. Ogni braccio è diviso in sezioni principali e sottosezioni. Si identifica una particolare sottosezione precedendola con il numero della propria sezione.

### 7.1.4 Cromosomi politenici di *Drosophila*

Nelle ghiandole salivari di *Drosophila* sono presenti moltissime bande e sono detti pertanto politenici. Si intende per politenici cromosomi che presentano moltissimi filamenti. I centromeri dei quattro cromosomi presenti appaiono fusi al centromero.

#### 7.1.4.1 Formazione di un cromosoma politenico

Nel cromosoma politenico delle ghiandole salivari di *Drosophila* il bandeggio è la conseguenza del preciso allineamento di DNA e proteine amplificato da successive replicazioni difettive di centromero e telomero. In questi cromosomi ciascun cromosoma parentale si replica 10 volte e si notano 1024 filamenti appaiati in modo ordinato.

### 7.1.5 Ibridazione in situ con sonde fluorescenti

L'ibridazione in situ con sonde fluorescenti o *FISH* è una tecnica che permette di visualizzare specifiche sequenze di DNA. Un cromosoma metafaseico viene denaturato e avviene un anneal con una sonda fluorescenza. Questa colorazione permette di rivelare la presenza di sequenza specifiche all'interno del cromosoma.

#### 7.1.5.1 Cromosoma Philadelphia

Nowell e Hungerford studiano la leucemia mieloide cronica attraverso il cariotipo di cellule tumorali. Notano pertanto la presenza di cromosomi alternativi associati alla patologia detto cromosoma Philadelphia  $Ph$ . In seguito si nota come questo sia il risultato della fusione di due cromosomi tramite una traslocazione bilanciata, in cui due cromosomi scambiano porzioni specifiche di DNA. Questo processo viene osservato attraverso *FISH* a due colorazione. Le due sonde pertanto sono:

- Rossa: gene del cromosoma 9.
- Verde: gene del cromosoma 22.

La ricostruzione del cariotipo delle cellule tumorali evidenzia lo scambio di un frammento fra due cromosomi: una porzione subtelomerica del cromosoma 9 si scambia con una porzione del piccolo cromosoma 22 in modo reciproco.

**7.1.5.1.1 Processo molecolare** Lo scambio reciproco causa la fusione del gene *BCR* verde sul cromosoma 22 e del gene *ABL* rosso sul cromosoma 9. *ABL* è una proteina chinasi che fosforila tirosine e con funzione oncogenica in quanto sostiene la proliferazione cellulare, mentre *BCR* è un gene attivo nei linfociti. Fondendo questi geni si sovra-esprime grazie al promotore *BCR* una proteina oncogenica.

### 7.1.6 Mappatura per delezione

La mappatura per delezione può essere utilizzata per determinare la localizzazione cromosomica di un gene.

#### 7.1.6.1 Generazione parentale

Si prenda in considerazione un individuo omozigote per un allele mutante recessivo *aa* e un individuo *A+* che presenta una delezione parziale del cromosoma interessato. Questo è pertanto un emizigote funzionale per la funzione associata alla porzione di interesse deleta.

#### 7.1.6.2 Prima generazione

Un incrocio tra il mutante omozigote recessivo e l'eterozigote per delezione si osservano:

- Eterozigoti con la porzione di cromosoma con l'allele dominante *A+* e *a*, con il fenotipo selvatico *A+a*.
- Eterozigoti in cui il cromosoma con l'allele recessivo è in coppia con la delezione parziale del braccio senza allele dominante con fenotipo recessivo *a-*.

#### 7.1.6.3 Risultati

La prima generazione indica come l'allele recessivo risiede fisicamente nella regione mancante del cromosoma e si può dedurre come l'allele si trovi nella porzione subtelomerica di questo cromosoma.

#### 7.1.6.4 Ibridazione

L'ibridazione è un approccio sperimentale con cui si generano ibridi somatici in modo da avere linee cellulari con numeri diversi di cromosomi umani per studiare la residenza in essi di geni. Incrociando un fibroblasto umano e una cellula tumorale murina.

**7.1.6.4.1 Generare ibridi** Il terreno presenta il polietilen glicole che facilita la fusione tra le cellule, che passando per un intermedio a eterocarion genera una cellula ibrida a singolo nucleo. Clonando le cellule si nota come hanno cromosomi più piccoli con un ciclo mitotico tarato su dimensioni inferiori. Questo produce una perdita selettiva di cromosomi umani in quanto fanno più fatica ad essere segregati correttamente.

**7.1.6.4.2 Utilizzo degli ibridi** Si possono così ottenere *n* cloni con pochi cromosomi umani. In questo modo si può operare sui cloni indagando la presenza di un gene attraverso test enzimatici.

**7.1.6.4.3 Selezione degli ibridi** Per selezionare gli ibridi viene utilizzato un terreno specifico *HAT* che contiene un inibitore della diidro-folato-reduttasi *aminopterina* che blocca la generazione di tetraidrofosfato essenziale per una produzione de novo dei nucleotidi. Le cellule con aminopterina non riescono pertanto a crescere. Fornendo *ipoxantina* e *timidina*, via alternativa per la sintesi di nucleotidi si salvano le cellule. Questa via alternativa richiede però dei geni specifici. Si rendono pertanto le cellule umane incapaci di metabolizzare l'ipoxantina  $HPRT^-$  e le cellule murine incapaci di metabolizzare timidina  $TK^-$ . In *HAT* crescono pertanto unicamente le cellule ibride che complimentano  $TH^+$  e  $HPRT^+$ .

**7.1.6.4.4 Fenilchetonuria** L'ibridazione tra cellule umane e di topo ha permesso di osservare come il gene della fenilalanina idrossilasi si trova sul cromosoma 12 dell'uomo. In quanto si ipotizza come la fenilchetonuria classica si provochi da mutazioni strutturali del gene si nota come il locus della malattia nell'uomo si trovi in tale cromosoma.

**7.1.6.4.5 Posizione di un gene all'interno di un cromosoma** L'ibridazione permette di creare una perdita causale di cromosomi o di loro parti. Si nota pertanto come se il prodotto genico è presente in una linea cellulare con un cromosoma intatto ma assente da una linea cellulare che mostra una delezione cromosomica il gene per tale prodotto genico deve essere localizzato nella regione deleta.