

# Genetica

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

**21 novembre 2020**

# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
1.1	Il DNA come base molecolare dell'ereditarietà . . . . .	4
1.1.1	Isolamento del DNA . . . . .	5
1.1.2	Caratterizzazione chimica e prima teorizzazione della struttura . . . . .	5
1.1.3	Determinazione del rapporto tra le basi . . . . .	5
1.1.4	Studi del pneumococco . . . . .	5
1.1.5	Studi dei batteriofagi . . . . .	6
1.1.6	Alternative al DNA a doppio filamento . . . . .	6
1.2	La rivoluzione del DNA . . . . .	7
1.2.1	Leggere il DNA . . . . .	7
1.2.2	Contare il DNA . . . . .	7
1.2.3	Scrivere il DNA . . . . .	7
1.2.4	Interazioni gene e ambiente . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Mitosi e meiosi</b>	<b>11</b>
2.1	Riproduzione cellulare . . . . .	11
2.1.1	Riproduzione procariote . . . . .	11
2.1.2	Riproduzione eucariote . . . . .	11
2.2	Cromosomi . . . . .	11
2.2.1	Struttura . . . . .	12
2.3	Ciclo cellulare e mitosi . . . . .	12
2.3.1	Ciclo cellulare . . . . .	12
2.3.2	Mitosi . . . . .	13
2.4	Eventi drammatici nella mitosi . . . . .	14
2.4.1	Rotture del DNA e polverizzazione dei cromosomi da errori nella mitosi . . . . .	14
2.4.2	Cromotripsi causata dal danno del DNA nei micronuclei . . . . .	16
2.4.3	Endoreplicazione, la poliploidia con uno scopo . . . . .	17
2.5	La riproduzione sessuata - Meiosi . . . . .	18
2.5.1	Meiosi <b>I</b> . . . . .	18
2.5.2	Intercinesi . . . . .	19
2.5.3	Meiosi <b>II</b> . . . . .	19
2.5.4	Confronto con mitosi . . . . .	20
2.5.5	Fonti di variazione genetica nella meiosi . . . . .	20
2.5.6	La meiosi nel ciclo vitale di animali e piante . . . . .	21

<b>3</b>	<b>Mendel</b>	<b>23</b>
3.1	Vita . . . . .	23
3.1.1	Esperimenti . . . . .	23
3.1.2	Il successo . . . . .	23
3.2	Definizioni . . . . .	24
3.3	Segregazione e dominanza - incroci monoibridi . . . . .	24
3.3.1	Esperimento di Mendel . . . . .	24
3.3.2	Interpretazione dei risultati . . . . .	25
3.3.3	Principi determinati . . . . .	25
3.4	Esempi di tratti mendeliani nell'uomo . . . . .	26
3.4.1	Definizioni . . . . .	26
3.4.2	Beta-Talassemia . . . . .	26
3.4.3	Anemia falciforme . . . . .	28
3.5	Principi mendeliani . . . . .	30
3.5.1	Reincrocio . . . . .	30
3.5.2	Secondo esperimento . . . . .	30
3.6	Comprensione molecolare degli esperimenti di Mendel . . . . .	31
3.7	Esempi di tratti mendeliani nell'uomo . . . . .	31
3.7.1	Definizioni . . . . .	31
3.7.2	Beta-Talassemia . . . . .	31
3.7.3	Anemia falciforme . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Estensione dell'analisi genetica mendeliana</b>	<b>36</b>
4.1	Pathway genetici . . . . .	36
4.2	Interazioni tra alleli . . . . .	36
4.2.1	Dominanza incompleta . . . . .	37
4.2.2	Codominanza . . . . .	37
4.2.3	Allelismo multiplo . . . . .	37
4.2.4	Alleli letali . . . . .	38
4.2.5	Letalità sintetica . . . . .	40
4.3	Interazioni geniche e rapporti mendeliani modificati . . . . .	40
4.3.1	Esempi . . . . .	40
4.3.2	Fenocopia . . . . .	42
4.4	Epistasi . . . . .	42
4.4.1	Epistasi recessiva doppia . . . . .	42
4.4.2	Epistasi recessiva . . . . .	43
4.4.3	Epistasi dominante I . . . . .	44
4.4.4	Epistasi dominante II . . . . .	45
4.4.5	Complementarietà . . . . .	45
4.4.6	Ridondanza genica . . . . .	46
4.4.7	Interazione genetica dominante . . . . .	46
4.4.8	Sovradominanza o vantaggio dell'eterozigote . . . . .	46
4.4.9	Un soppressore extragenico può cancellare gli effetti fenotipici di una mutazione . . . . .	46
4.5	Complementazione . . . . .	47
4.5.1	Drosophila . . . . .	47
4.5.2	Analisi di complementazione . . . . .	47
4.6	Lievito gemmante S. cerevisiae . . . . .	47
4.6.1	Studio dei mutanti . . . . .	48

<b>5</b>	<b>Interazioni gene ambiente</b>	<b>49</b>
5.1	Definizioni . . . . .	49
5.1.1	Penetranza . . . . .	49
5.1.2	Espressività . . . . .	50
5.2	Caratteri autosomici limitati/influenzati dal sesso . . . . .	50
5.2.1	Esempi . . . . .	50
5.2.2	Limitato al sesso . . . . .	51
5.3	Probabilità . . . . .	52
5.4	Pleiotropia . . . . .	53
5.4.1	Singed - mutante di Drosophila . . . . .	53
5.4.2	Pleiotropia nell'anemia falciforme . . . . .	53
5.4.3	Pleiotropia antagonistica . . . . .	53
<b>6</b>	<b>Pedigree</b>	<b>55</b>
6.1	Simboli dei pedigree . . . . .	55

# 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 semplici (poche cellule).
- Pluricellulari complessi.

### 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 presente in tutte le forme viventi.
- Deve essere stabile e capace di replicazione fedele.
- Deve essere capace di subire modificazioni permanenti o mutazioni.
- Deve trovarsi nel nucleo e far parte dei cromosomi.
- 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 tardivo 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 cellule 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

#### 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.

### 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.

### 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 Schramm 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

#### 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.

### 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.

### 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.

**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.

**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.

### 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.

**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

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.

##### 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.

##### 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.

##### 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.

### 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.

### 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.

#### Fasi della mitosi

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

**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.

**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.

**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.

**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.

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

### 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*.

**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*.

**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.

**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.

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

### 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.

**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.

**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.

**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.

**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.

**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.

#### 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.

#### Destino dei cromosomi

**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.

**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.

### 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 di 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 cellule e una de poliloidizzazione che porta a una proliferazione mitotica.

### Meccanismi di endoreplicazione

**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.

**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.

**Endomitosi** Durante l'endomitosi le cellule entrano la mitosi e iniziano a condensare i cromosomi senza segregarli ma invece rientrando in uno stato simile a  $G_1$  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.

### Esempi di tessuti endociclianti

**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.

**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.

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

**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.

### 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*.

### 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.

### 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  $G_1$ , *S* e  $G_2$ . 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. LA RIPRODUZIONE SESSUATA - MEIOSI

---

### **Profase I**

La profase viene divisa a sua volta in cinque fasi.

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

**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.

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

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

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

### **Metafase I**

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

### **Anafase I**

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

### **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.

### **Profase II**

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

### **Metafase II**

I singoli cromosomi si allineano lungo la piastra equatoriale.

### Anafase II

I cromatidi fratelli si separano spostandosi verso i poli opposti.

### 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 cromosomi che si muovono sono costituiti da un unico cromatidio.

## 2.5.5 Fonti di variazione genetica nella meiosi

### 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.

**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 leptotema 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 leptotema a zygonema viene detto stage a bouquet in cui i telomeri si raggruppano lungo un polo nucleare.

**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.

**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*.

**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.

***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*.

### 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

### Animali

**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.

**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.

### 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

#### 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  $P$ .

#### 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.

#### 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.

#### Conclusione

Ripetendo poi incroci monoibridi per tutte e 7 le caratteristiche si 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.

#### Terza generazione filiale

**$F_2$  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.

#### $F_2$ con semi lisci

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

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

#### 3.3.2 Interpretazione dei risultati

##### 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.

##### 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  $Rr$ .

##### 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.

##### 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

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

Ogni organismo diploide possiede due allele 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.

#### 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.

## 3.4 Esempi di tratti mendeliani nell'uomo

### 3.4.1 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.

### 3.4.2 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.

#### 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.

#### Caratteristiche cliniche

**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.

**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.

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

**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).

#### 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:

**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*.

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

**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*).

**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.

#### Gestione clinica

**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.

**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.

**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.

**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.

**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 amminoacidica. Le cellule sono state reinfuse nel paziente. Si monitorano poi gli effetti avversi, l'integrazione del vettore e i livelli di replicazione del lentivirus.

**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.

**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.

### 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.

### 3.4.3 Anemia falciforme

#### 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.

#### 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  $\delta$  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.

#### Gestione clinica

**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.

**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.

**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.

**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*.

### 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 stressi 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 emoglobinasi malariali basata sulla super stabilità del tetramero *HbF*.

## 3.5 Principi mendeliani

### Reinterpretazione in tempi moderni

Con la cellula diploide e due cromosomi omologhi, eterozigote per il gene legato al carattere forma del seme. Questa cellula può andare incontro a meiosi per formare nuovi gameti e per farla, si duplica il DNA, i cromosomi sono composti da due cromatidi fratelli con 4 lettere, la cellula viene divisa meioticamente: vengono separati i due omologhi e poi i cromatidi fratelli formando cellule aploidi con solo un cromosoma e una lettera. Partendo da un'eterozigote si formano cellule aploidi in pari numero dominanti e recessivi, vero anche se avviene un crossing-over meiotico che scambia porzioni dei cromatidi non fratelli.

#### 3.5.1 Reincrocio

Un altro incrocio di Mendel: si ha un problema con una pianta che mostra il fenotipo dominante si può non essere sicuri di avere una linea pura omozigote. Per chiarire se la pianta è omozigote od eterozigote il fenotipo non ci può aiutare, Mendel si inventa un incrocio: incrocio di controllo o reincrocio: si prende una pianta a fenotipo dominante e genotipo non noto e incrociarla con una pianta a fenotipo recessivo. Osservando il risultato e la proporzione della progenie si nota il fenotipo della pianta di controllo.

#### 3.5.2 Secondo esperimento

Il secondo esperimento è l'incrocio tra due coppie di caratteri. La generazione parentale presenta omozigosi di due tratti: giallo e liscio *RRYY* e l'altra è verde e rugoso *rryy*. La pianta con il fenotipo dominante e linea pura si separano le coppie di elementi discreti *RY* e il fenotipo recessivo *ry*. Questi gameti vengono fatti reincontrare e  $F_1$  possiede un genotipo *RrYy* con fenotipo dominante giallo liscio. L'esperimento continua e si autofeconda  $F_1$  creando  $F_2$ . Si formano diversi gameti: *RY*, *Ry*, *rY*, *ry*. Non si sa se *R* e *Y* si muovono in modo causale o con delle regole precise, non si sa se si formano davvero o con la stessa proporzione. Aprendo il baccello si nota che si trovano semi gialli e lisci *R - Y -*, gialli e rugosi *rrY -*, verdi e lisci *R - yy* e verdi e rugosi *rryy*. Si nota la comparsa di fenotipi che non si trovavano nella linea parentale. Si dimostra come si assortiscono in modo casuale le coppie di caratteri diversi e i numeri dicono che il processo è casuale:  $\frac{9}{16}$  giallo e liscio,  $\frac{3}{16}$  per giallo e rugoso e verde e liscio e  $\frac{1}{16}$  per verde e rugoso. Si nota come i geni stanno sui cromosomi e la coppia allelica *Yy* sta su un cromosoma e quella *Rr* un altro e l'assortimento indipendente è il movimento indipendente del movimento dei cromosomi.

#### Assortimento indipendente

È vero che ci si deve sempre aspettare assortimento indipendente. Se i geni sono sullo stesso cromosoma ci si aspetta che siano ereditati insieme.

## 3.6 Comprensione molecolare degli esperimenti di Mendel

L'identificazione dei geni responsabili per i tratti di studio di Mendel richiedono dimostrazione che:

- Alleli diversi devono essere responsabili di variazione morfologica.
- La differenza tra alleli è legata a una di DNA.
- I prodotti proteici tra diversi alleli hanno diversa struttura e funzione.
- Le differenze funzionali tra le varianti di proteine hanno effetto sulle variazioni morfologiche.

## 3.7 Esempi di tratti mendeliani nell'uomo

### 3.7.1 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.

### 3.7.2 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.

#### 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.

#### Caratteristiche cliniche

**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.

**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.

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

**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).

#### 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:

**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*.

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

**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*).

**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.

#### Gestione clinica

**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.

**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.

**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.

**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.

**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.

**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.

**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.

#### 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.

#### 3.7.3 Anemia falciforme

##### 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.

##### 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  $\delta$  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.

##### Gestione clinica

**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.

**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.

**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.

**meccanismo di azione dell'idrossiurea** L'obiettivo dell'idrossiurea è l'enzima ribonucleotidasi 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*.

#### **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.

### 4.2 Interazioni tra alleli

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 Dominanza incompleta

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.

#### 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.

Si noti come le differenze nei sistemi di modello indicano come probabilmente si tratti di un principio universale.

### 4.2.2 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.

#### 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.
- Sempre nel modello  $MN$  per il sangue succeda la stessa cosa.

### 4.2.3 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.

### Esempi

**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 che si caratterizzano come selvatica (associata con una colorazione marrone del pelo). Nella popolazione ci sono quattro forme di questo gene o alleli  $C$  diversi con mutazioni diverse in punti specifici. Un coniglio albino è omozigote  $cc$  di un allele non funzionante con assenza di pigmentazione. Un coniglio himalaiano è albino tranne che nella parte del muso, una porzione delle orecchie e nelle zampe  $c^h c^h$ , omozigote ma variante allelica di Agouti (selvatico). Il cincillà presenta chiazze grigie, con alleli e fenotipi diversi. Per capire che sono alleli multipli con interazioni l'uno con l'altro si fanno incroci. Con gli incroci si nota che l'albino è un allele recessivo: deve essere omozigote  $cc$  ma l'himalaiano è dominante sull'allele  $c$  albino: esiste un himalaiano  $c^h c$ . Questa cosa è estensibile: il cincillà può essere eterozigote di  $c^{ch} c^h$  e presentare codominanza. Il cincillà chiaro può essere eterozigote con albino  $c^{ch} c$ . Il selvatico oltre a essere omozigote può essere eterozigote con gli altri e presenta dominanza completa. Nella serie allelica ci sono relazioni complesse di dominanza e  $C$  domina tutti gli altri e si trova un'ordine di dominanza:  $c^+ > c^{ch} \geq c^h > c$ .

**Eterozigosi composita** L'eterozigosi composita è un esempio di allelismo multiplo: due alleli mutanti si trovano in un individuo e la gravità del fenotipo dipende dall'ordine di ipomorfismo. Inoltre possono intervenire anche aspetti ambientali.

### 4.2.4 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.

### Esempi

**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.

**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.

**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.

#### 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.

**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.

**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.

**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 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 una certa costante di DNA. 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. 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 considera oltre a diversi alleli per un singolo gene come più geni possono influenzare lo stesso fenotipo. Ci saranno pertanto più coppie diverse di alleli su geni diversi che convergono sulle stesse caratteristiche.

#### 4.3.1 Esempi

##### 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  $\frac{1}{16}$ .
- Brahma  $\frac{1}{16}$ .
- 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.

##### 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  $frac{316}$ .
- Giallo  $frac{316}$ .
- Rosso  $frac{916}$ .
- Verde  $frac{116}$ .

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.

##### 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  $frac{916}$ ,  $A - B-$ .
- Marrone-rosso  $frac{316}$ ,  $A - bb$ .
- Grigio  $frac{316}$ ,  $aaB-$ .
- Verde  $frac{116}$ ,  $aabb$ .

##### **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  $frac14$ ,  $Bw^+St^+$ .
- Occhio scarlatto  $frac14$ ,  $Bw^+St$ .
- Occhio marrone  $frac14$ ,  $BwSt^+$ .
- Occhio bianco  $frac14$ ,  $BwSt$ .

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.

##### Esempi

**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.

#### 4.4 Epistasi

Si intende per epistasi un esempio di interazione tra geni in base al quale un gene interferisce con l'espressione fenotipica di un altro gene non allelico per cui il fenotipo viene determinato dal primo gene e non dal secondo pur essendo rappresentati entrambi in un genotipo.

##### 4.4.1 Epistassi recessiva doppia

Nell'epistassi recessiva doppia

##### Esempi

**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.

**Pathway biosintetico** 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  $P$ .

**Lumache d'acqua** Il guscio della conchiglia che può essere marrone o non colorato è legato alla genetica di una via biosintetica di un composto colorato dove vengono identificati due enzimi codificati da due geni in cui un precursore viene convertito da un enzima in un intermedio che viene ancora elaborato da un altro che porta alla formazione del pigmento. L'assenza del primo gene maschera la funzione del secondo. La combinazione  $aabb$  blocca tutto e in questo contesto, nel caso  $A$  epistatico sia funzionante e il  $b$  in omozigosi recessiva si avrebbe un guscio bianco. In  $F_2$  con incrocio di-ibrido si avrebbe un rapporto atteso 9 : 7.

#### 4.4.2 Epistasi recessiva

Nell'epistasi recessiva l'omozigote recessivo di un gene maschera gli effetti di entrambi gli alleli di un altro.

##### Esempi

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

- $B - E$  nero.

- $bbE-$  marrone.
- $--ee$  biondo.

Si incroci ora una generazione parentale nero  $BbEE$  con biondo  $bb ee$ . Si nota come si forma una  $F_1$  è tutta nera con  $BbEe$ . Con un incrocio stile mendeliano tra  $F_1$  eterozigoti si nota come compare un nuovo colore: nero, marrone e giallo in rapporto 9 : 3 : 4. Si nota come si ha un'interazione tra gli alleli del gene  $E$  e  $B$ . I biondi sono 4 e uno dei geni maschera l'altro. Si nota come il biondo compare con doppia omozigosi recessiva 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 quello ipostatico è  $b$ . Con epistasi rotta: non omozigosi recessiva per  $E$  l'omozigosi  $bb$  porta a una colorazione intermedia marrone. I nove casi è quella dove con un allele dominante per  $B$  ed  $E$  in assenza di mascheramento e la funzionalità di  $B$  raggiunga l'intensità maggiore. 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.

**Gruppo sanguigno  $ABO$**  Si nota come sulla membrana del globulo può essere presente uno dei lipidi con una coda che protrude e degli zuccheri. Una struttura zuccherina ancorata alla membrana e presenta segnali a due colori. Questi corrispondono ad antigeni del sistema AB, serie allelica con tre alleli, uno recessivo  $i$ , uno  $I_A$  e uno  $I_B$  dominanti su  $i$  e codominanti tra di loro. Si considerino due genitori di gruppo sanguigno 0. Per quello che si sa ha una genetica determinata  $ii$ . Pertanto si prevede il gruppo sanguigno dei due figli: possono avere solo  $ii$  a meno di mutazioni de novo. Ma in questo caso può nascere un figlio di gruppo  $A$  o  $B$ . Forse l'errore è attribuire ad un fenotipo un genotipo certo. Alla luce del discorso sull'epistasi un'altra ipotesi è che il fenotipo 0 contiene un genotipo con allele dominante mascherato. Per mascherare  $I_A$  o  $I_B$  si nota come l'allele  $I$  è responsabile della decorazione dei glicolipidi di un ultimo zucchero variante di galattosio, differenziandosi tra di loro per piccola variazione: galattosio e galattosammina. Si ipotizza che la possibilità di esprimere la funzione dominante è legata alla presenza del substrato della presenza della prima decorazione glicolipidica interessata all'attacco dell'ultimo esamero di zucchero. In caso di genetica che preclude la formazione della prima ancora glicolipidica la funzionalità di  $I$  viene resa invisibile. Questa è recessiva in quanto si deve perdere l'espressione dell'ancora. Il gene responsabile della sintesi della coda è il gene  $H$  e  $hh$  può mascherare la presenza di un allele dominante  $I$ . Questo è il fenotipo Bombay ed è legato a un gene la cui omozigosi recessiva maschera la funzionalità del gruppo genico  $ABO$ :  $hh$  è la situazione epistatica.

#### 4.4.3 Epistasi dominante I

Nell'epistasi dominante I l'allele dominante di un gene nasconde gli effetti di entrambi gli alleli di un altro.

##### Esempio

**Zucchina** Si nota il colore verde in omozigosi  $aabb$  con assenza di vie che producono pigmenti che lo degradano facendo sparire la colorazione e bianco  $AABB$ . Incrociando questi due individui si ottengono una  $F_1$   $AaBb$  doppia eterozigote. Fenotipicamente si nota l'assenza di colore in  $F_1$ , pertanto il bianco è legato alla presenza di un allele per il gene  $A$  e  $B$  con dominanza completa nelle rispettive coppie alleliche. Incrociando ora  $F_1$  con se stessa. Si nota

- 12: 9  $A - B -$  bianchi.
- 3:  $A - bb$  giallo.
- 1:  $aabb$  verde.

Si nota come i numeri si assestano a un rapporto 12 : 3 : 1. Il giallo è omozigosi di  $bb$  e un allele dominante per  $A$  mentre tutti gli altri casi sono bianchi. Questo è una deviazione dei rapporti mendeliani che sembra risultare dalla combinazione di due classi fenotipiche e genotipiche previste. Guardando complessivamente le condizioni la presenza di almeno un allele dominante di  $B$  controlla il fenotipo che ha colorazione bianca.  $b$  in omozigosi recessiva il fenotipo varia con allele  $A$  dominante si ha colore giallo e con entrambi inattivi si ha verde. Questa può essere considerata un esempio di epistasi, ma il mascheramento è reso possibile dalla presenza di un allele dominante: epistasi dominante che può essere rivelata da un rapporto 12 : 3 : 1. Quella più abbondante riflette il mascheramento. Colorazione legata all'accumulo di un pigmento in quanto non viene prodotto uno dei due geni che li converte. Per rompere l'epistasi dominante si rende necessario omozigosi recessiva.

**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 leggero 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.

#### 4.4.4 Epistasi dominante II

Nell'epistasi dominante II l'allele dominante di un gene nasconde gli effetti dell'allele dominante di un altro gene.

##### Esempi

**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 rapporto è complicato da interazioni tra geni. CI sono due fenotipi ma compaiono in proporzioni 13 : 3 questo in quanto 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.

#### 4.4.5 Complementarietà

Nella complementarietà per la produzione del fenotipo è necessario un allele dominante per ciascuno dei due geni.

##### 4.4.6 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 ampia per aver diversificato la loro funzione. Sono ridondanti per la funzione biochimica che per essere persa si devono perdere 4 alleli.

##### Esempi

**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.

##### 4.4.7 Interazione genetica dominante

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

##### Esempi

**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.

##### 4.4.8 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.

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

Si osservano due proteine una hairless *S* e un soppressore di hairless *SoH* che possono interagire: quando l'interazione avviene il soppressore sopprime il gene e permette che in *Drosophila* si formino setole. Nel caso in cui la genetica cambi nel caso: nella cellula ci saranno a causa dell'eterozigosi sia interazioni con il soppressore che uno squilibrio della stechiometria in quanto hairless è ridotta a causa di eterozigosi e questo fa sì che ci sia un'alterazione dei rapporti che porta alla formazione delle setole che non si formano. Inoltre con un doppio mutante con eterozigosi per *H* che per *SoH* che ripristina il rapporto stechiometrico che non crea un eccesso che rappresenta il fenotipo selvatico.

## 4.5 Complementazione

Si era già notata la complementazione con i fiori bianchi e viola. Considerando fenotipi recessivi con genetica complessa, un incrocio smaschera se un individuo è affetto dal fenotipo per una regione genetica equivalente o distinta: con complementazione geni diversi, altrimenti difetto sullo stesso gene.

### 4.5.1 *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 porta 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.

### 4.5.2 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.

## 4.6 Lievito gemmante *S. cerevisiae*

Si nota come i lieviti possono esistere sia in forma aploide che diploide, nella seconda sono in grado di fare meiosi per produrre spore resistenti ad ambienti difficili. *S. cerevisiae* la meiosi dei funghi è particolare in quanto i quattro prodotti delle cellule aploidi sono confinati in un asco. Micromanipolando gli aschi si può seguire la meiosi in diretta, cosa non possibile nei mammiferi in quanto i gameti si trovano in un pool. Nello sporocrasso fa una meiosi equivalente ma molto ordinata spazialmente: le cellule si organizzano in un astuccio compatto e le cellule occupano posizioni specifiche si ha una mitosi dopo la seconda meiosi e le cellule si trovano in un ordine particolare. Appoggiando le spore in un terreno di crescita singolarmente e valutando lo stato allelico delle cellule in quanto questi funghi possono vivere come aploidi. Si nota come l'ottade ordinata consente di dedurre eventi di crossing over dalla disposizione delle spore. SI ha alternanza di alleli dominanti e recessivi in modo ordinato. Con *Neurospora crassa* un esperimento fatto da Beadle e Tatum ha a che fare con la possibilità di mappare la genetica di un percorso biosintetico legato alla produzione e sintesi di un amminoacido. In una provetta con *Neurospora* si utilizzano raggi X per mutagenizzare e nella zona dei corpi fruttiferi dove avvengono le meiosi. Dopo questo fanno degli incroci, meiosi e quando si arriva all'ottade si cerca di fare microdissezione, le si mette in terreno di coltura e osservare se sono vive e che tipo di caratteristiche possono avere. Si interessano alla via che produce arginina: se sono in grado sono in grado di crescere in assenza di arginina. Si isola un mutante *arg*: molte provette di terreno completo dove si fanno germinare le spore aploidi a valle del passo precedente. Siccome il terreno è completo crescono le spore che non hanno subito mutazioni in geni essenziali. Da questo pool di potenziali mutanti si trasferiscono gli aploidi in un terreno minimo per notare qualcuno di questi che non riesce più a crescere. Crescono tutti tranne uno, un mutante nel gene essenziale, hanno un difetto genetico in quanto non crescono sul terreno minimo. Partendo dalla riserva si vuole capire dove è il difetto: si prendono quattro terreni: uno di controllo e tre uno è il terreno minimo e uno è terreno minimo



con tutti amminoacidi (crescita) uno con vitamine ma non amminoacidi (non cresce). Mutazione di un gene non essenziale coinvolto nella produzione di amminoacidi (auxotrofia). Ora si tenta di determinare quale amminoacido non si riesce a sintetizzare. Il mutante per arginina è detto *arg1* e ci sono diversi mutanti per lo stesso fenotipo. Viene scelto *Neurospora crassa* in quanto il modello è in grado di crescere in laboratorio in tempi relativamente veloci facilitando l'enorme variabilità dei terreni. Vengono scelte le spore aploidi (non si possono maneggiare i geni essenziali) ma le mutazioni recessive mascherate nell'interazione allelica con la copia selvatica in un diploide si manifestano in cellule aploidi. Si usano le spore aploidi per rivelare la mutazione recessiva ma il passaggio a diploide aiuta a capire la natura molecolare della mutazione.

##### 4.6.1 Studio dei mutanti

Dopo aver trovato i vari mutanti si cerca di ricostruire la loro storia molecolare. Si trovano tre mutanti *arg1*, *arg2* e *arg3* cloni diversi di un processo di mutagenesi e selezione. Si fa un test di complementazione per prototrofia: si prendono due aploidi e li si fa accoppiare per ottenere un diploide che unisca i due genomi e si cerca di verificare se complementano. Se ci fosse complementazione si riacquista la prototrofia per l'effetto metabolico e il diploide potrebbe crescere su un terreno privo di arginina. Pertanto *arg1* e *arg2* sono due mutanti per due geni diversi recessivi che fanno parte di un pathway biosintetico. Trovati i tre mutanti si fanno degli incroci per valutare la complementazione. Questi complementano 1 con 2, 2 con 3 e 1 con 3: ci sono tre geni essenziali per la sintesi dell'arginina. Successivamente i mutanti singoli vengono testati su terreni privi di arginina ma contenente sostanze a lei simili: arginina, ornitina e citrullina che sono abbastanza plausibili come passaggi unici verso l'arginina. Nel pathway ornitina → citrullina → arginina. Si usano terreni che contenevano o no uno di questi elementi. Si testano i mutanti aploidi originali per vedere come rispondevano in questi terreni. Un mutante *arg7* è in grado di crescere su un terreno contenente ornitina, citrullina e arginina. *arg3* che complementa con *arg3* non è in grado di crescere con terreno di ornitina ma con gli altri. *arg1* non è in grado di crescere in terreno senza ornitina o citrullina. Questo suggerisce che *arg7*, *arg3* e *arg1* sono alleli mutati di geni diversi posizionabili in punto diverso del pathway. Da qui nasce l'ipotesi un gene, un enzima. L'ordine nel pathway è 7-3-1.

##### Pathway dell'arginina in *S. cerevisiae*

Si parte dal glutammato usando cofattori ed energia chimica e un enzima per ogni passaggio. *arg2* definisce la funzione selvatica per passare dal glutammato all'acetil-glutammato. *arg5*, *6* gene con doppia funzione enzimatica. Il gene *arg1* converte citrullina in arginino-succinato senza cui l'ultimo enzima non è in grado di sintetizzare l'arginina. A monte si trova il *arg3* e ancora a monte *arg7*.

## Capitolo 5

# Interazioni gene ambiente

Interessa studiare il genotipo, il meccanismo contenuto nell'informazione. Il percorso da genotipo a fenotipo è accidentato e si propongono modulatori dell'espressione legati a fattori ambientali che possono essere esterni (temperatura conformazione della proteina con mutazione, coniglio himalaiano), l'ambiente interno in un organismo pluricellulare interazioni tra cellule, cellule matrice, sostanze rilasciate che raggiungono altre cellule. Interazioni eterotipiche come batteri o funghi del microbioma che comunicano con le cellule umane. Un altro effetto legato all'ambiente è il background genetico: un gene principale la cui funzione è influenzata da molti altri geni che ne modificano l'espressività. Più geni controllano lo stesso carattere come la fenilchetomuria modulata dagli enzimi che producono il co-fattore che aiutano l'enzima a funzionare. Ci sono influenze nel percorso che sono difficili da inquadrare nelle altre caratteristiche ma che possono essere fenomeni stocastici. Il caso può influenzare penetranza ed espressività. Si nota come il fenotipo è una combinazione di diverse influenze.

### 5.1 Definizioni

#### 5.1.1 Penetranza

Il numero di individui nella popolazione con un certo genotipo ma non tutti mostrano il fenotipo atteso. Penetranza incompleta e si fa un rapporto tra gli individui che mostrano il fenotipo e quelli che possiedono l'allele.

#### Esempi

**Polidattilia penetranza incompleta** Un caso di espressività è il numero diverso di dita su parti distinte del corpo. Un pedigree nota come la polidattilia è una condizione autosomale dominante in cui gli individui affetti hanno più di 5 piedi e dita. L'allele dominante è non penetrante nel 25-30% degli individui che lo trasportano.

**Huntington e SLA** HD presenta una sigmoide e come la SLA le curve sigmoidi vanno interpretate: a  $X$  età e  $Y$  la penetranza: percentuale di individui affetti rispetto al numero di individui che portano l'allele mutante. Questa curva indica come la corea di Huntington la sua penetranza è variabile nel tempo: la penetranza inizia a 0 e più si sale con l'età aumenta. La penetranza variabile raggiunge il 100% quando l'aspettativa di vita è normale. Anche nella SLA la penetranza è

influenzata dall'età. L'età ha questo effetto sulla penetranza in quanto si deve cercare la risposta nel fenotipo e nelle cellule influenzate. Il difetto genetico

### 5.1.2 Espressività

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

#### Esempi

**Bracco** Colorazione dovuta a 7 geni con stesso genotipo e modifiche dell'espressività del genoma con espressività dei geni.

**Mascella Asburgo** Dominante a penetranza incompleta ed espressività variabile.

**Sindrome di Waardenburg** Madre affetta con diversi figli e simboli con quadratini non del tutto riempiti, dal punto di vista fenotipico si definisce e si indica la presenza contemporanea di quattro tratti tipici della sindrome: capelli grigi molto precoci, perdita di udito, ciocca bianca nella zona della fronte ed eterocromia dell'iride. I simboli tetrapartiti indicano la presenza di un simbolo. Figli mostrano tratti diversi con combinazioni variegata. Questo è un caso di espressività variabile. Se a valle dell'individuo sano ci siano dei figli affetti, si pensa che gli individui, se imparentato caso di penetranza incompleta.

## 5.2 Caratteri autosomici limitati/influenzati dal sesso

Nei fenomeni di penetranza ed espressività alcuni alleli autosomici potrebbero essere influenzati dal contesto genomico: dalla presenza di un numero di cromosomi  $X$  e questa influenza dei cromosomi sessuali e dei loro geni può essere leggera o forte: caratteri limitati dal sesso. Alcuni tratti *maschi* : *femmine* sono labbro leporino 2 : 1, gotta 8 : 1, artite reumatoide 1 : 3, osteoporosi 1 : 3, lupus eritematoso sistemico 1 : 9.

### 5.2.1 Esempi

#### Barba nelle capre

Si nota come  $BB$  e  $bb$ . Si tratta di alleli comune. Le linee pure e gli eterozigoti si nota come la barba è presente solo nei maschi e non nelle femmine: la presenza del tratto fenotipico è dominante nel maschio ma recessiva nella femmina.

#### Calvizie

La calvizie nell'uomo funziona come la barba nelle capre con omozigosi  $BB$  nell'uomo e  $bb$  nella donna. Gli individui eterozigoti sono calvi: dominante nel maschio, recessivo nel sesso femminile. Non è limitato al sesso ma è da esso influenzato e si manifesta come tratto dominante nel maschio e recessivo nella donna.

### 5.2.2 Limitato al sesso

Il gene autosomico in numero di coppie uguale negli individui ma limitato al sesso: geni localizzati su autosomi controllano un carattere che si manifesta in un solo sesso come la produzione del latte, comparsa delle corna nella pecora e distribuzione dei peli facciali nell'uomo. Piumaggio da gallo nel pollo: tratto autosomico recessivo limitato ai maschi. Un altro esempio è la pubertà precoce circoscritta al maschio, una mutazione dominante del recettore *LH*.

#### Occhio di *Drosophila*

L'occhio di *Drosophila* è composto da molte unità ottiche in prossimità o ommatidi e si nota come il numero cambia in base alla temperatura dello sviluppo della larva e si approssima una retta che mostra come la complessità dell'occhio varia: a 15 gradi anche più di mille ma a 30 sono 250 unità ottiche in meno. Questa cosa è un esempio di una norma di reazione, la genetica è la stessa, l'effetto di una variabile esterna può avere su un programma genetico comune a tutti gli individui di una popolazione. Cosa simile per le ali con temperatura e lunghezza delle ali: a 18 gradi sono molto piccole mentre a temperature più alte sono ali normali. Si deve avere l'allele ali vestigiali autosomico. La temperatura influenza l'aspetto fenotipico elgato alla genetica. A 29 gradi non si apprezza un difetto mentre a 18 si vede una notevole disfunzione nella produzione di ali. Si nota anche un dimorfismo con ruolo nella temperatura minore nella femmina. Un altro esempio dell'effetto della temperatura in *Drosophila* si ha un mutante shibire vitale tra i 18 e i 28 gradi, ma se la temperatura arriva a 29 gradi con effetto soglia si ha paralisi reversibile e se non lo si porta a temperatura più confortevole l'insetto muore. Questo mutante è un gene che codifica una proteina essenziale per la trasmissione nervosa e l'allele mutato è sensibile alla temperatura.

#### Conchiglie

Si nota come le conchiglie hanno un orientamento destrorso o sinistrorso. L'avvolgimento destrorso è il risultato di un allele autosomico dominante e si incrocia con uno per l'avvolgimento sinistrorso. Si nota come la  $F_1$  eterozigote è sinistrorsa, questo è un tratto monogenico con allele dominante per il sinistrorso. Si analizza ora  $F_2$  autofecondata da  $F_1$  che è completamente  $F_2$ . La scomparsa del dominante in  $F_2$  con due incroci diversi:  $s^+s^+$  femminile destrorsa e il compagno  $ss$  sinistrorso, il complementare di quello visto prima: sesso opposto al fenotipo. In  $F_1$  sono tutti destrorsi. Si nota pertanto come il fenotipo dell'individuo non è associato al suo genotipo ma a quello della madre. La genetica della madre predice il fenotipo dei figli con  $S^+$  dominante e faccia andare a destra. Se fosse così le madri  $F_2$  avrebbero tutti figli equivalenti destrorsi. La madre  $F_2$   $ss$  dovrebbe far cambiare il fenotipo dei figli. Questo è un effetto genetico materno, un'eccezione in cui il fenotipo della progenie è stabilito dal genotipo della madre, dipendente dal citoplasma della cellula uovo: il genotipo della madre condiziona tutte le cellule somatiche e germinali dell'individuo. Quelle germinali femminili sono cellula uovo e il gamete femminile è particolarmente grande con ruolo del citoplasma ruolo importante nelle prime divisioni dello zigote. Pertanto il fenotipo dei figli è legato alle decisioni del citoplasma della cellula uovo nel guidare il posizionamento del fuso mitotico nelle prime fasi della divisione dello zigote influenzando l'avvitamento dell'organismo.

#### Ereditarietà extranucleare

Variazioni fenotipo-genotipo. È un esempio di ereditarietà uniparentale: mitocondri e cloroplasti vengono ereditati da un solo genitore, tipicamente la madre. Le cellule che si dividono, i mitocondri hanno genomi diversi. L'eterozigosi nel genoma mitocondriale viene detta eteroplasmia. Durante

la divisione cellulare i mitocondri vengono divisi in parti uguali nel citoplasma. Per caso in una divisione cellulare i mitocondri sono separati per tipo e si passa da una condizione di eteroplasmia a una di omoplasmia segregando mitocondri con una caratteristica da una apre e l'altra dall'altra con effetto fenotipico.

**Eredità citoplasmatica nella pianta bella di notte** Fenomeno fenotipico legato alla colorazione di foglie specializzate apicali. L'esperimento porta a concludere una preferenzialità nella trasmissione di un tratto fenotipico, la colorazione delle piante. Nella colonna verticale si osserva il seme o macrospora e dall'altra si vedono le caratteristiche della pianta del polline per fecondare. Lo schema guida alla conclusione che sembra evidente ed applicabile a tutte le  $F_1$  il fenotipo è guidato esclusivamente dal fenotipo della pianta da cui è stato preso la macrospora: foglie bianche progenie bianca indipendentemente dall'origine del polline. Lo stesso per il verde. Lo screziato invece può presentare fenotipo bianco, verde o screziato. In questo caso l'ambiente è inteso come il contenuto citoplasmatico delle cellule germinali e si tratta della presenza nel citoplasma di organelli con informazione genetica: i cloroplasti. La macrospora con porzione apicale bianca viene indicata come cellula aploide con la diversa produzione della clorofilla. Il polline non contribuisce elementi genetici citoplasmatici. Il caso variegato è quello più interessante in quanto partendo dalla pianta variegata ci può essere un omoplasmia del tratto bianco, verde e altre siano eteroplasmiche con la compresenza di due tipi di genomi del cloroplasto e a seconda della spora utilizzata si ha piante omogeneamente verdi o bianche oppure continueranno a manifestare la screziatura, una riduzione all'omoplasmia nelle cellule somatiche durante le divisioni mitotiche del soma.

**Confermare l'ipotesi** Gli esperimenti sono rimasti come la storia dei mutanti poki di Neurospora. Il sistema sperimentale coniuga la possibilità di seguire l'ereditarietà di un gene nucleare simboleggiato dal colore dei puntini in eterozigosi rossa nero di informazione nucleare e viene coniugato con il cambio della dimensione delle spore aploidi prodotte dalla meiosi di neurospora: un mutante produce un'equivalente di una macrospora. Facendo un incrocio tra una neurospora poki che produce le spore grandi e una che fa spore di dimensione normale si ottiene un diploide dove il contributo citoplasmatico è quasi esclusivo della macrospora. L'esperimento non è fisiologico ma fenocopia un'ereditarietà uniparentale del materiale citoplasmatico. Si nota nell'asco a valle della fecondazione con neurospore diploidi a cui si stimola il passaggio in meiosi con produzione di astuccio con 8 cellule e confrontando in parallelo i due setup in parallelo si ha l'atteso per la segregazione del biomarker di informazione nucleare ma il colore che indica il fenotipo citoplasmatico legato a una variazione nel citocromo (gene mitocondriale) questo è dettato nel 100% dei casi dalla natura della macrospora utilizzata nella fecondazione. Il citoplasma condiziona il fenotipo legato alla condizione del citocromo mentre il gene nucleare segue il pattern di segregazione atteso. Il citoplasma viene da solo un genitore.

## 5.3 Probabilità

Il ruolo della probabilità, di eventi genetici causali che vengono raggruppati di come genotipo e fenotipo possono essere ditanziati da una serie di fenomeni di modulazione. L'influenza di eventi genetici casuali. Un esempio è legato alla patologia dove il contributo dell'evoluzione del genoma a livello somatico è essenziale per la manifestazione genotipica: sindrome di predisposizione a una neoplasia con penetranza incompleta. Un fenomeno casuale può guidare la relazione genotipo fenotipo. Il tessuto epiteliale organizzato con cellule messe in modo ordinato con cellule polarizzate ed ancorate a formare una barriera, in fondo si nota una morfologia alterata con eccessiva proliferazione ed

espressione di nuovi marcatori. Tra questi due estremi si nota lesione 3 cancerosa e tumore iniziale con l'acquisizione di caratteristiche. Si propone che il passaggio da una cellula normale o tumorale aggressiva è un processo che richiede diversi eventi che può partire da una presenza di eventi germinali ereditati ma che non sono sufficienti per la conversione fenotipica. Questa richiede l'acquisizione di eventi somatici, classificata sotto mutazioni in geni. Se è vero che l'acquisizione di eventi somatici è legata a mutazioni si propone un fenomeno stocastico che influenza l'evoluzione fenotipica.

## 5.4 Pleiotropia

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

### 5.4.1 Singed - mutante di *Drosophila*

La funzione dell'allele *singed* che è un omologo della fascina coinvolto nella regolazione della formazione di alcuni elementi del citoscheletro. 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. Si tratta di due fenotipi lontani. 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.

### 5.4.2 Pleiotropia nell'anemia falciforme

Si nota come la mutazione nel gene della beta globina in posizione codificante con amminoacido che cambia e si vede che un acido glutammico diventa valina in posizione 6 causando 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 e viene presentato come esempio eclatante della complessità di fenomeni pleiotropici.

### 5.4.3 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 la conseguenza fenotipica è 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.

## Capitolo 6

# 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.

### 6.1 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 orizzontaleUnione tra individui imparentati, consanguineità.
- Parentesi quadre e linea tratteggiata: adozione.
- Numero romano: generazione.