

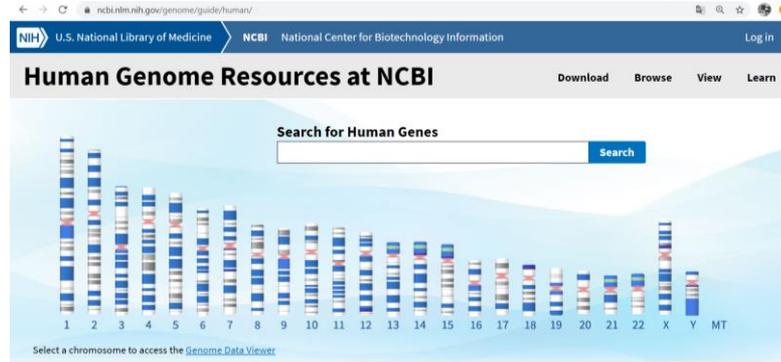
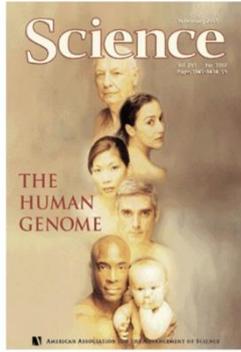


Capitolo 14

Mappe genetiche negli eucarioti

Mappa fisica del genoma

February 2001 - Publication of the first draft of the human genome



ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=7157

Genome Data Viewer

Homo sapiens (human)

Assembly: GRCh38.p13

Search assembly
BRCA1

Genes	Other features
Name	Location
BRCA1	Chr17: 43,044,295 - 43,125,483
BRCA2	Chr13: 32,315,480 - 32,399,672
RAD51	Chr15: 40,694,774 - 40,732,340
BARD1	Chr2: 214,725,645 - 214,809,711
BABAM1	Chr19: 17,267,376 - 17,279,353
BAP1	Chr3: 52,401,004 - 52,410,105
BRIP1	Chr17: 61,679,186 - 61,864,120
LOC111589215	Chr17: 43,124,495 - 43,127,162

Pick Assembly

Assembly: GCF_000001405.39 (GRCh38.p13)

Locations for Gene TP53	
Sequence	Location
NC_000017.11	7,668,402 - 7,687,550



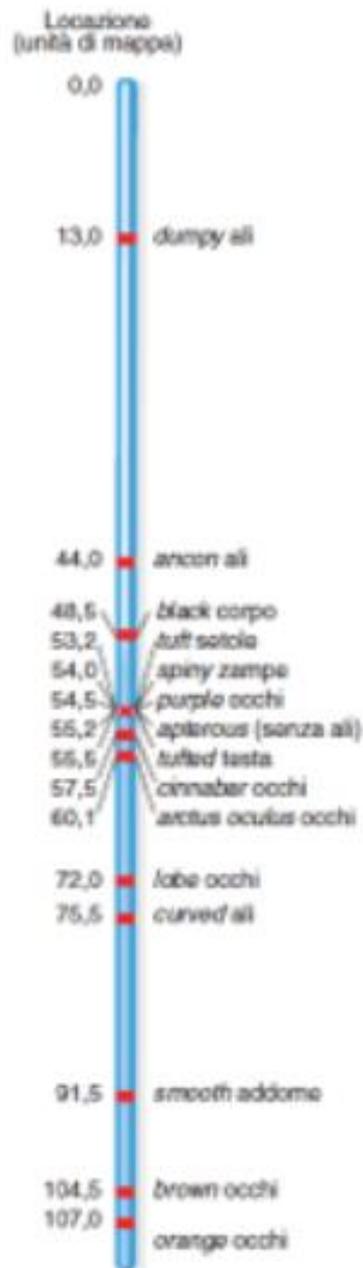


Figura 1.3

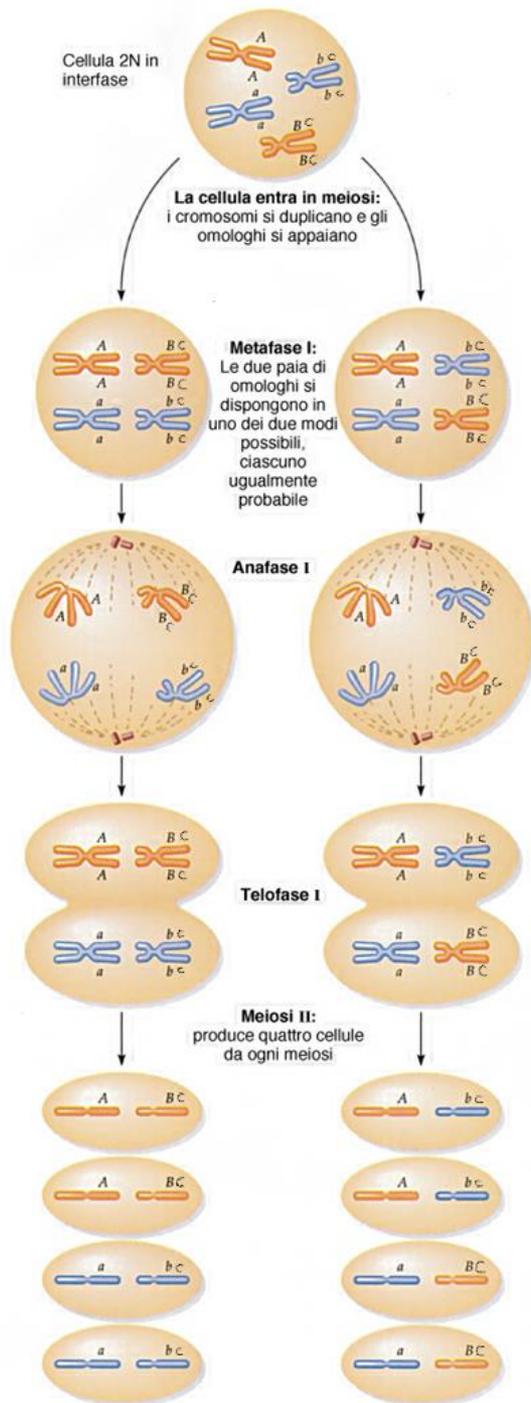
Esempio di mappa genetica che illustra alcuni geni localizzati sul cromosoma 2 del moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*. I numeri rappresentano le distanze dei geni dall'estremità del cromosoma (in alto) misurate in unità di mappa (um, vedi Capitolo 14). Le distanze di mappa sono calcolate sulla base della frequenza di ricombinazione e sono additive (ciò permette di ottenere valori superiori a 50 um pur essendo la frequenza massima di ricombinazione fra due loci pari al 50%).

Cosa sono le mappe genetiche?

Che cosa ci dicono queste mappe?

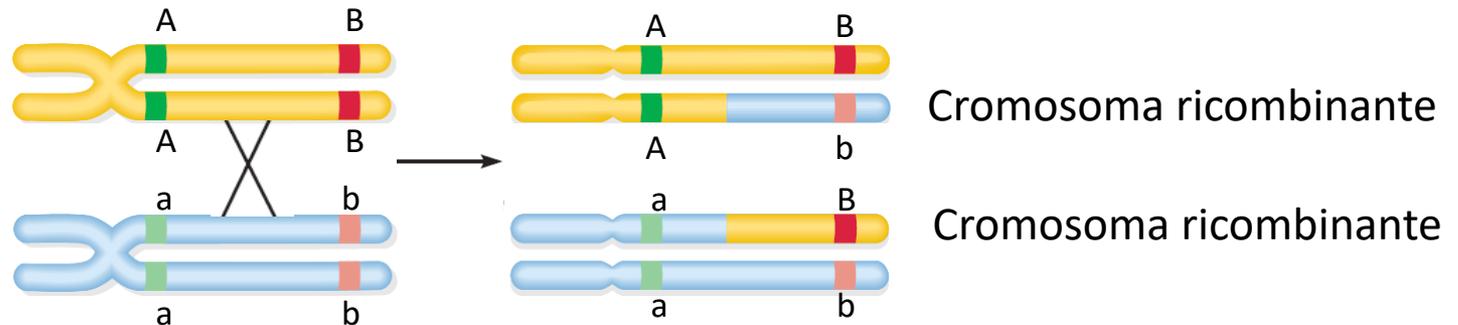
Come sono state costruite?

Come possiamo utilizzarle?

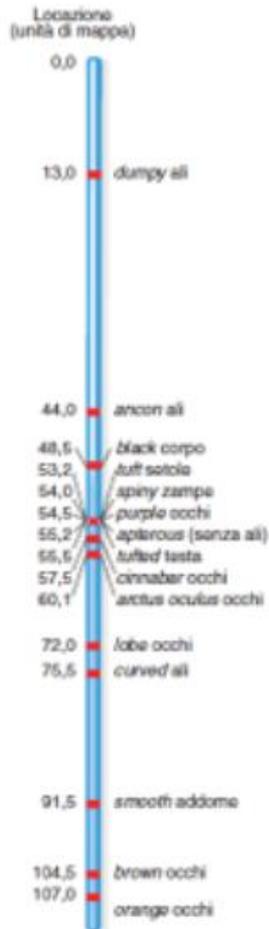


- I geni localizzati su cromosomi diversi (esempio A e B) segregano in modo indipendente durante la meiosi. In vece, i geni che sono localizzati sullo stesso cromosoma vengono ereditati insieme (es. B e C nel cromosoma arancione).
- I geni che non segregano indipendentemente perché localizzati sullo stesso cromosoma mostrano **associazione (*linkage*)** e sono chiamati **geni associati**. Essi costituiscono un *gruppo di associazione*.

Ricombinazione genetica: processo di scambio reciproco di segmenti cromatidici tra copie di cromosomi omologhi. Questo scambio avviene per effetto del *crossing-over* tra geni associati (sullo stesso cromosoma), e porta a nuove combinazioni alleliche e allora, a nuove combinazioni di caratteri fenotipici.



Il *crossing-over* è un meccanismo che determina la **ricombinazione allelica**

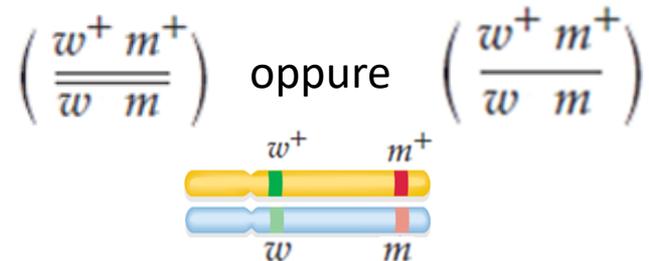


Per costruire le mappe genetiche ci servono varianti geniche (chiamate anche polimorfismi). Questi polimorfismi possono trovarsi dentro alla sequenza dei geni, cioè, gli alleli dei geni, e si chiamano **marcatori genici**; o possono trovarsi anche fuori delle regioni geniche, in sequenze non codificanti, e si chiamano **marcatori di DNA** (per esempio gli STR)

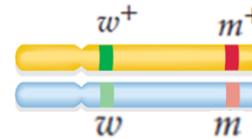
Per mappe genetiche si intende l'analisi di fenotipi ricombinanti, frutto del *crossing-over* tra geni associati.

Rappresentazione dei geni sui cromosomi

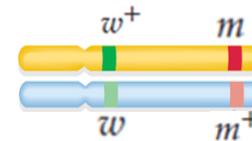
Un individuo doppio eterozigote per i geni w e m , i quali si trovano sullo stesso cromosoma:



$\left(\frac{w^+ m^+}{w m} \right)$ Disposizione **in accoppiamento** o configurazione *cis*: I due alleli selvatici si trovano su un cromosoma omologo e i due alleli mutanti sull'altro.



$\left(\frac{w^+ m}{w m^+} \right)$ Disposizione **in repulsione** o configurazione *trans*: Ciascun omologo porta l'allele selvatico di un gene e l'allele mutante dell'altro.



I primi studi sull'associazione genetica: gli esperimenti di Morgan con *Drosophila*

Morgan studia due geni legati al cromosoma X di *Drosophila*:

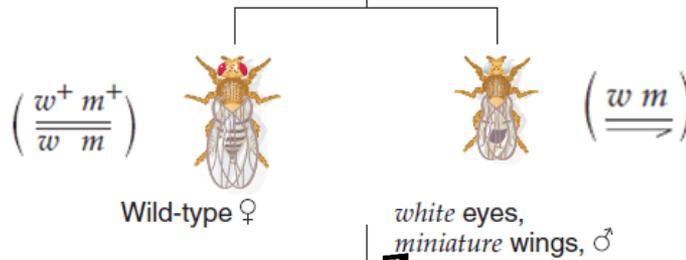
gene *w*: (allele *w*: occhio bianco)

gene *m*: (allele *m*: ali ridotte, *miniature*).

Parental phenotypes



F₁ phenotypes



Gameti ♂

w m

Y

Gameti ♀

w+ m+

w m

$\frac{1}{4}$	$\frac{w^+m^+}{w\ m}$	XX
$\frac{1}{4}$	$\frac{w^+m^+}{}$	XY
$\frac{1}{4}$	$\frac{w\ m}{w\ m}$	XX
$\frac{1}{4}$	$\frac{w\ m}{}$	XY

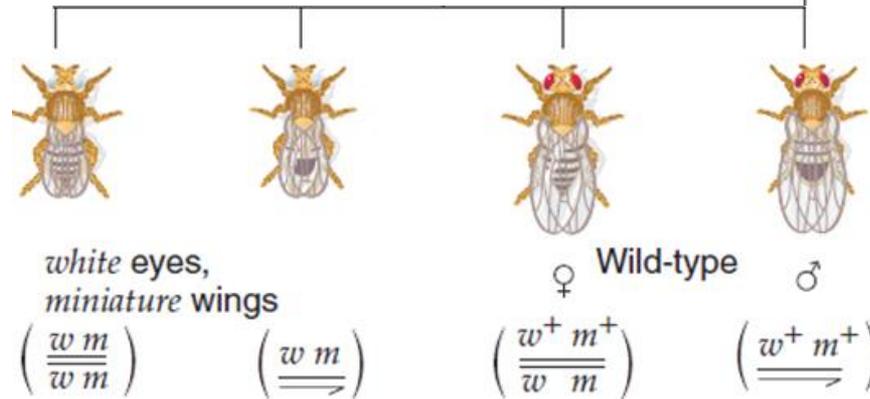
Parental phenotypes



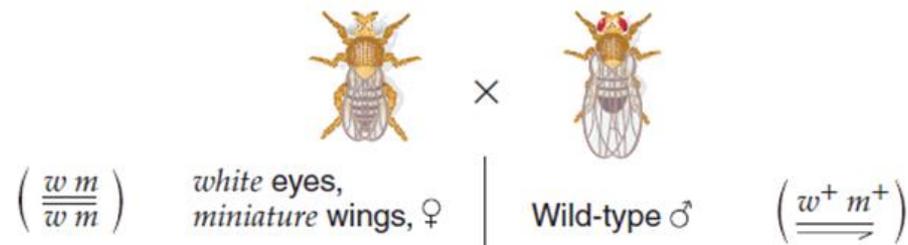
F₁ phenotypes



F₂ phenotypes



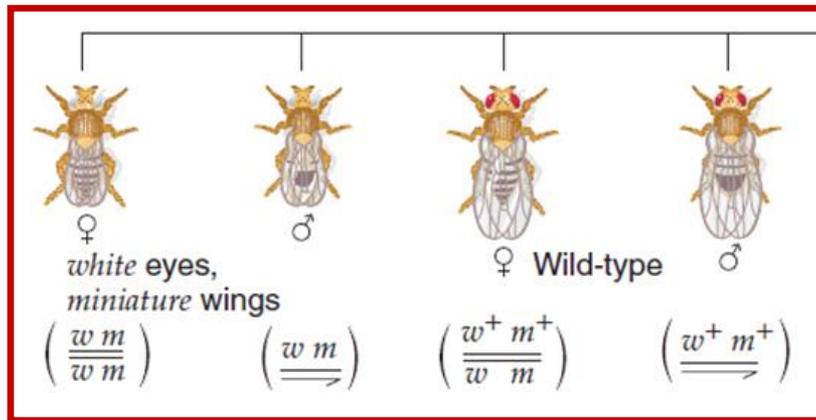
Parental phenotypes



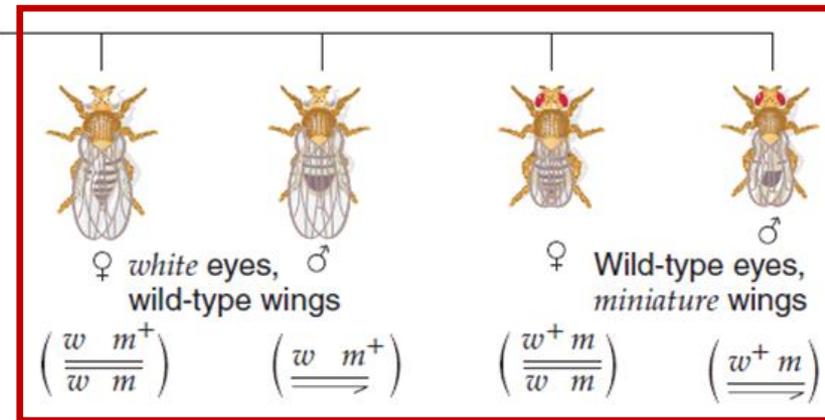
F₁ phenotypes



F₂ phenotypes



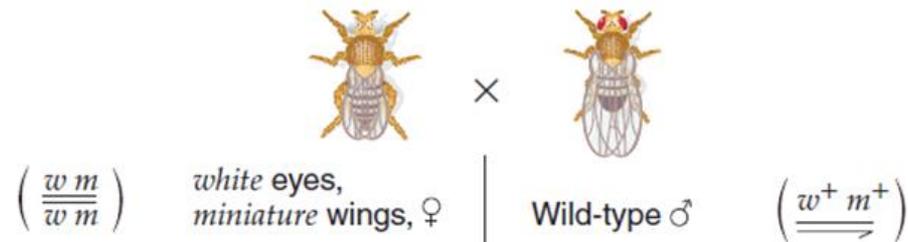
Genotipi parentali



Genotipi recombinanti

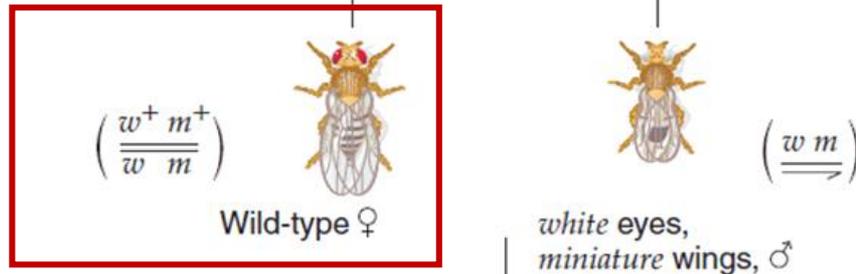
In *Drosophila* non avviene ricombinazione nei maschi.

Parental phenotypes

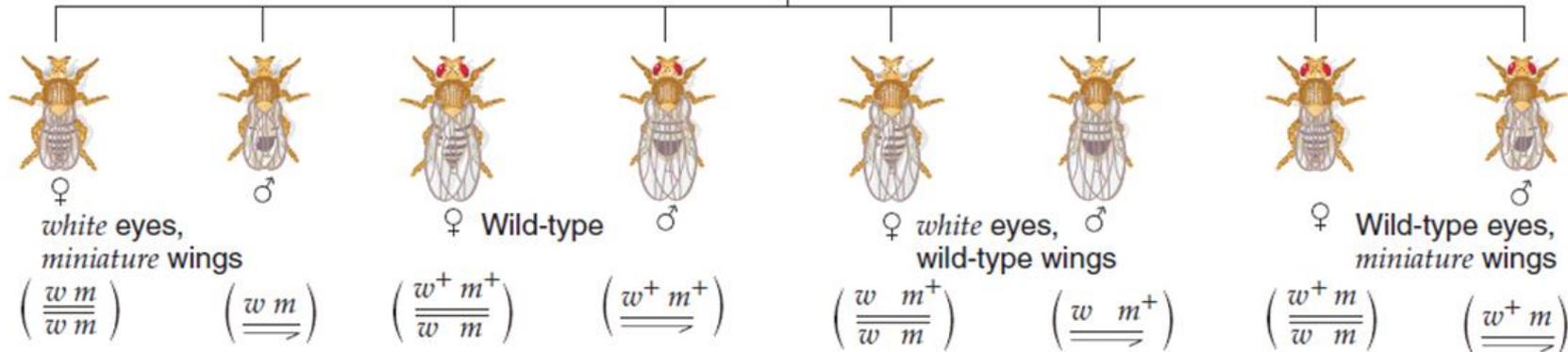


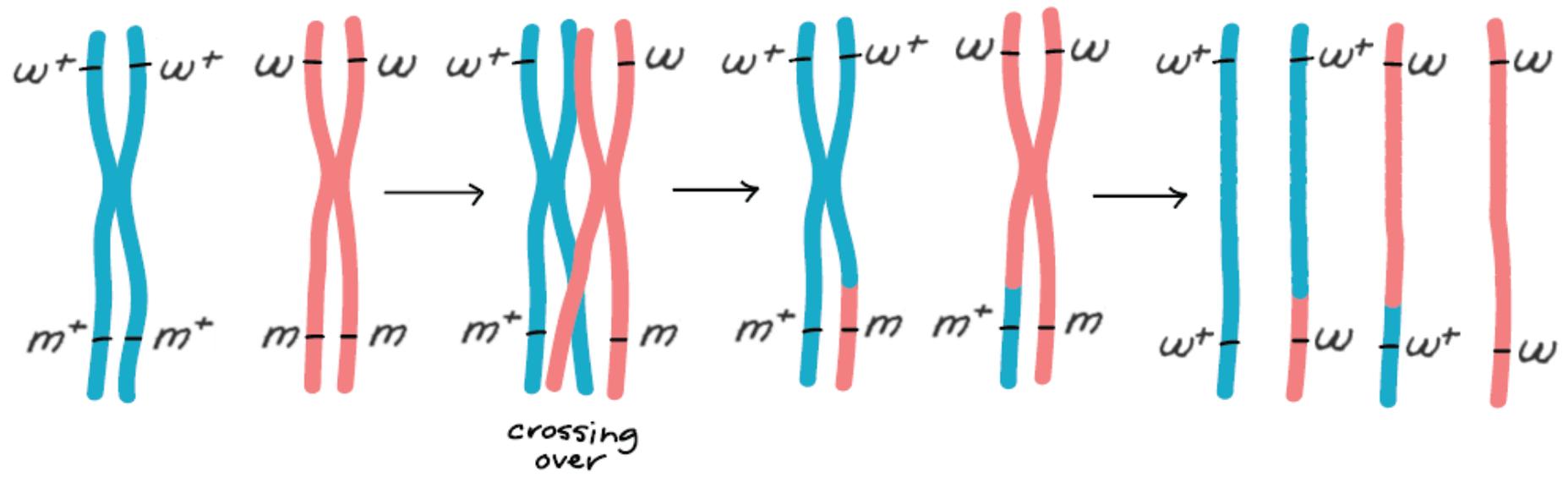
F₁ phenotypes

Il crossing-over avviene tra i cromosomi X della femmina F₁.

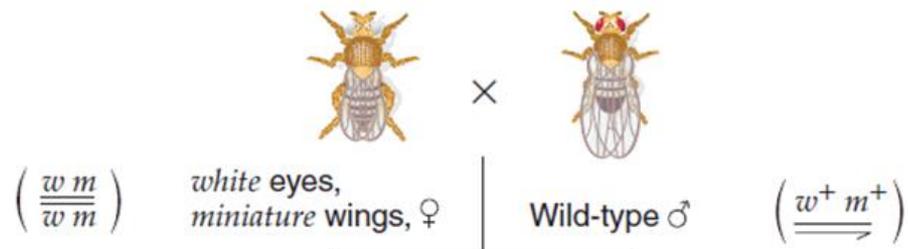


F₂ phenotypes

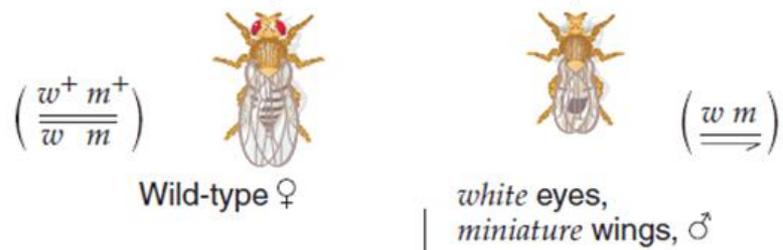




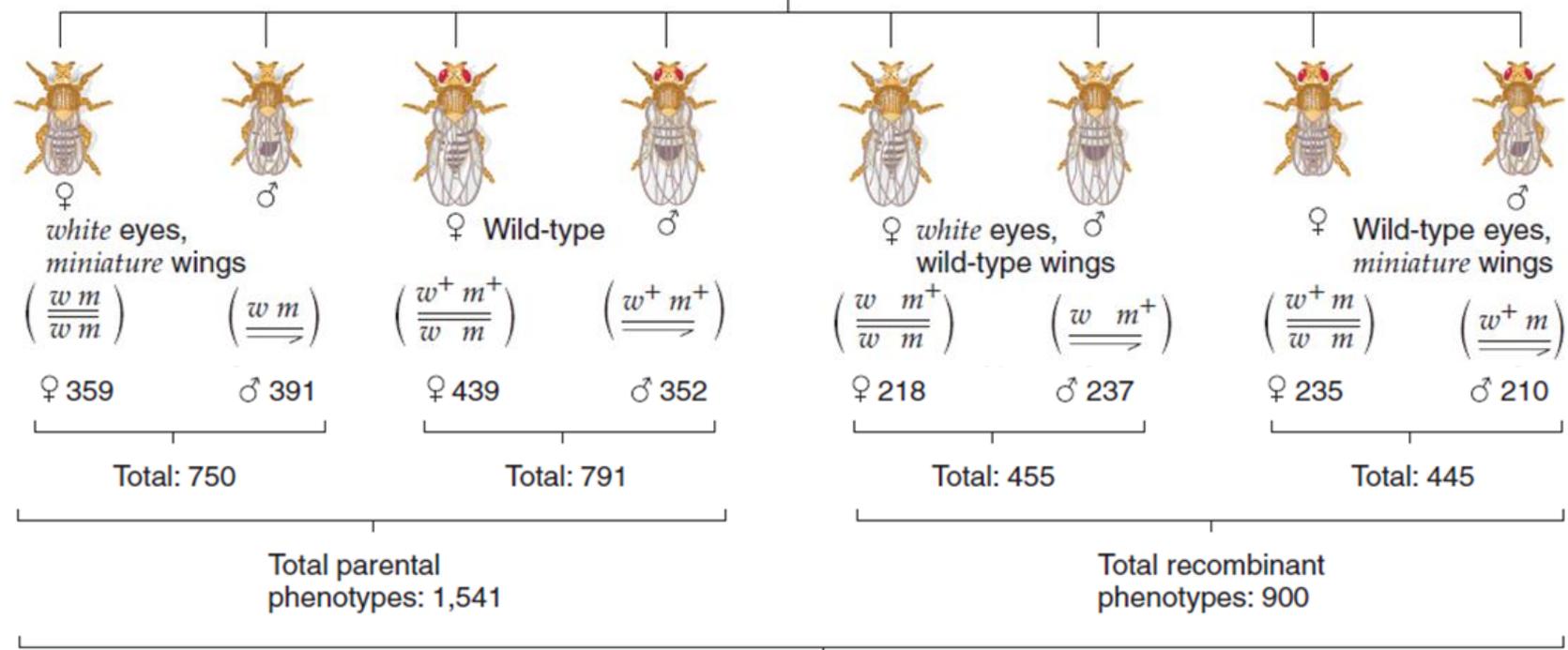
Parental phenotypes



F₁ phenotypes



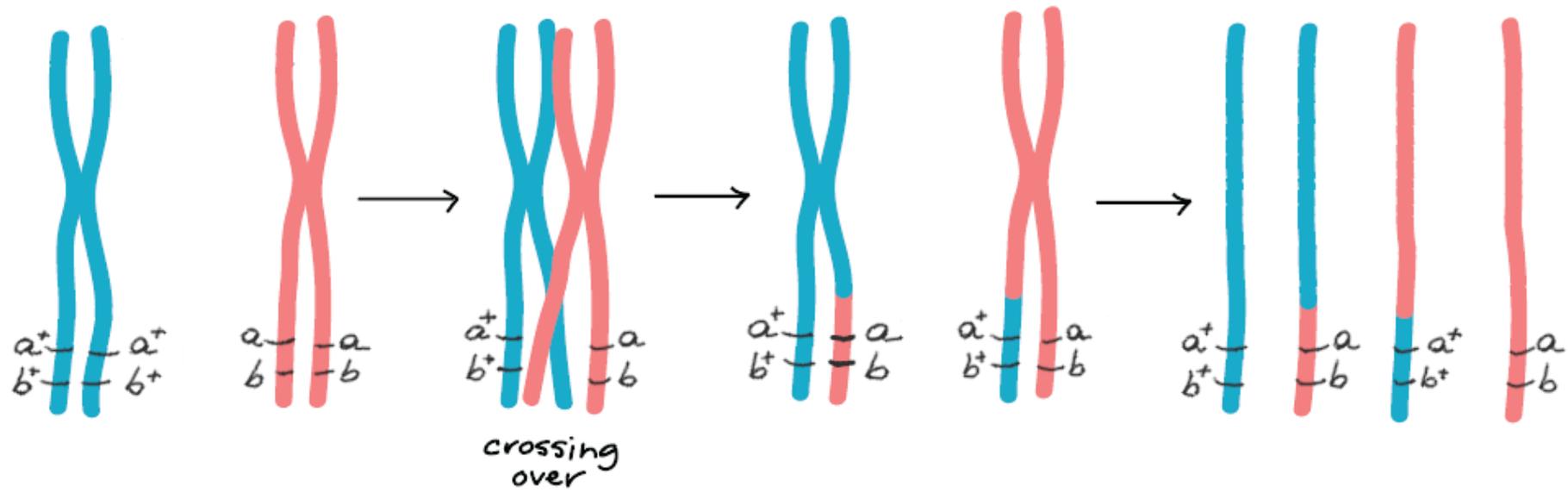
F₂ phenotypes

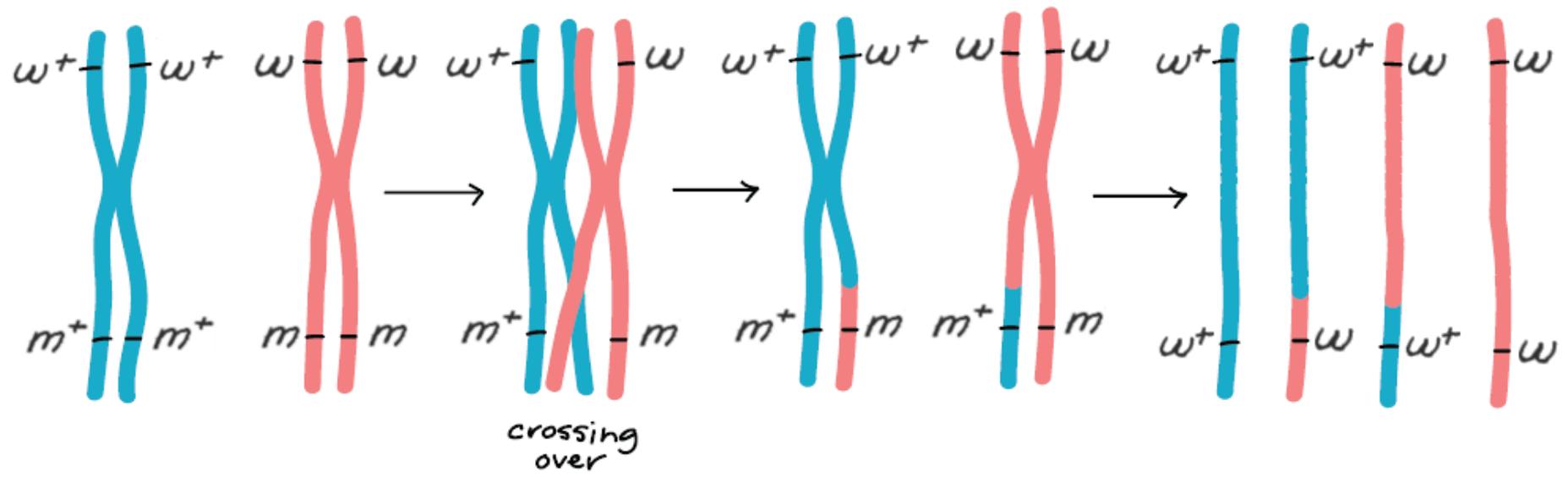


Total progeny: 1,541 + 900 = 2,441

Percent recombinants: $\frac{900}{2,441} \times 100 = 36.9$

Quanto più due geni sono vicini sul cromosoma, meno probabile è che accada tra di loro il processo di *crossing-over* e tanto più tendono a rimanere insieme durante la meiosi: tali geni tenderanno a segregare insieme durante la meiosi, quindi **non assordiscono indipendentemente**. Questo porterà alla produzione di un minor numero di progenie ricombinante rispetto al 50% attesi da una segregazione indipendente.





Costruire le mappe genetiche:

1. Come rilevare l'associazione tra i geni: Incrocio di prova

Segregazione indipendente

$$\frac{a^+}{a} \frac{b^+}{b} \times \frac{a}{a} \frac{b}{b}$$

Gameti ♂

ab

Gameti ♀

a⁺b⁺

$$\frac{1}{4} \frac{a^+b^+}{ab}$$

ab

$$\frac{1}{4} \frac{ab}{ab}$$

a⁺b

$$\frac{1}{4} \frac{a^+b}{ab}$$

ab⁺

$$\frac{1}{4} \frac{ab^+}{ab}$$

Freq. dei fenotipi
parentali ~ 50%

Freq. dei fenotipi
ricombinanti ~ 50%

Proporzioni fenotipiche: 1:1:1:1

Associazione

$$\frac{a^+}{a} \frac{b^+}{b} \times \frac{a}{a} \frac{b}{b}$$

Gameti ♂

ab

Gameti ♀

a⁺b⁺

$$\frac{a^+b^+}{ab}$$

ab

$$\frac{ab}{ab}$$

a⁺b

$$\frac{a^+b}{ab}$$

ab⁺

$$\frac{ab^+}{ab}$$

Freq. dei fenotipi
parentali > 50%

Freq. dei fenotipi
ricombinanti < 50%

Esempio:

In *Drosophila* il gene *B* è un gene autosómico che determina il colore del corpo:

Allele b^+ : corpo grigio

Allele b : corpo nero

Il gene *VG* è un gene autosomico che determina la forma delle ali:

Allele vg^+ : ali normali

Allele vg : ali vestegiali

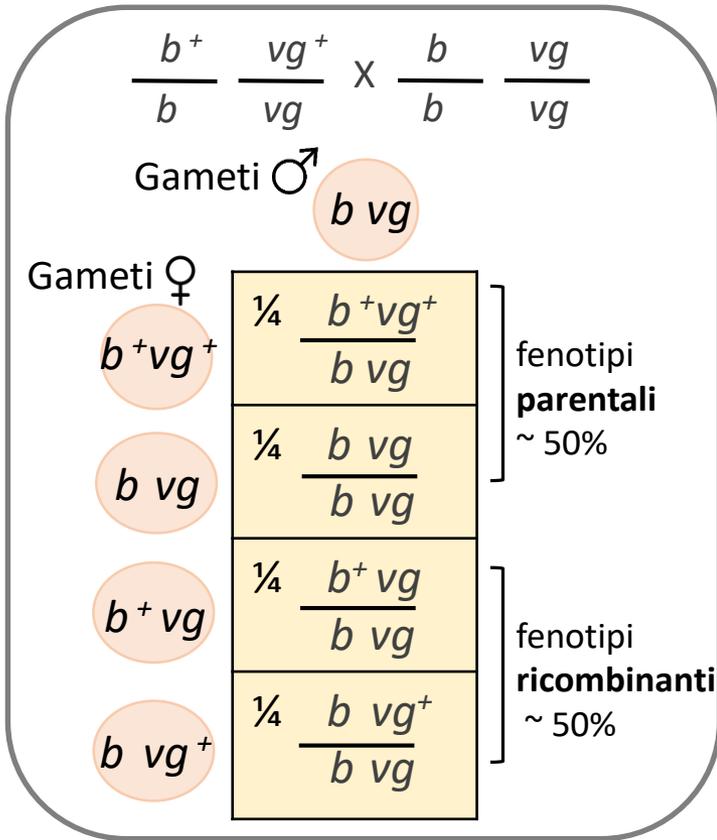
$$\begin{array}{c} \text{♀ grigi, ali normali} \\ \frac{b^+}{b} \quad \frac{vg^+}{vg} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{♂ neri, ali vestigiali} \\ \frac{b}{b} \quad \frac{vg}{vg} \end{array} \quad \text{reincrocio}$$

In *Drosophila* non avviene ricombinazione nei maschi.

Frequenza osservate nella progenie:

283	grigi, ali normali
1294	grigi, ali vestigiali
1418	Neri, ali normali
241	Neri, ali vestigiali
<hr/>	
Totale: 3236	moscerini

Ipotesi nulla: "I geni B e VG non sono associati"



$$X^2 = \sum \frac{(foss - fatt)^2}{fatt}$$

$$X^2 = 1479$$

$$g.l = 1$$

Fenotipi	N.oss.	N.att.	D (oss-att)	d ²	d ² /att
Parentali	2712	1618	1094	1196836	739,7
Ricombinanti	524	1618	-1094	1196836	739,7
Totali	3236	3236			1479,4

Tabella 10.5 Probabilità di chi-quadrato

df	Probabilità									
	0,95	0,90	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,004	0,016	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,10	0,21	0,71	1,39	2,41	3,22	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,42	2,37	3,67	4,64	6,25	7,82	11,35	16,27
4	0,71	1,06	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47
5	1,15	1,61	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52
6	1,64	2,20	3,83	5,35	7,23	8,56	10,65	12,59	16,81	22,46
7	2,17	2,83	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32
8	2,73	3,49	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,13
9	3,33	4,17	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88
10	3,94	4,87	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59
11	4,58	5,58	8,15	10,34	12,90	14,63	17,28	19,68	24,73	31,26
12	5,23	6,30	9,03	11,34	14,01	15,81	18,55	21,03	26,22	32,91
13	5,89	7,04	9,93	12,34	15,12	16,99	19,81	22,36	27,69	34,53
14	6,57	7,79	10,82	13,34	16,22	18,15	21,06	23,69	29,14	36,12
15	7,26	8,55	11,72	14,34	17,32	19,31	22,31	25,00	30,58	37,70
20	10,85	12,44	16,27	19,34	22,78	25,04	28,41	31,41	37,57	45,32
25	14,61	16,47	20,87	24,34	28,17	30,68	34,38	37,65	44,31	52,62
30	18,49	20,60	25,51	29,34	33,53	36,25	40,26	43,77	50,89	59,70
50	34,76	37,69	44,31	49,34	54,72	58,16	63,17	67,51	76,15	86,66

←—————|—————→
 Accettare | Rifiutare
 al livello di 0,05

Fonte: Estratto dalla Tabella IV in *Statistical Tables for Biological, Agricultural, and Medical Research* di Fisher e Yates, 6ª ed., 1974, Ri-stampato per gent. conc. di Addison Wesley Longman Ltd.

L'ipotesi nulla di assortimento indipendente tra i geni B e VG viene scartata (la probabilità che la differenza tra i valori attesi e osservati sia dovuta al caso è minore dal 1 per 1000 ($P < 0,001$)).

2. La frequenza di ricombinazione tra i geni viene usata come misura della distanza tra loro.

La distanza tra due geni viene misurata in **unità di mapa o centimorgan (cM)**. Una unità di mapa (oppure 1 cM) corrisponde a una percentuale di ricombinazione del'1%.

Quanto più elevata è la frequenza di eventi di crossing-over tra due geni, tanto più essi sono distanti tra loro.

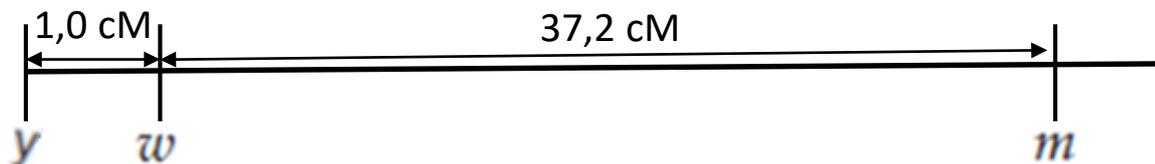
Esempio di mappa genetica per tre geni di *Drosophila*: *w*: occhi bianchi, *m*: ali ridotte, *y*: corpo giallo.

Calcolo della frequenza di ricombinazione per gli incroci:

$$\left(\frac{w^+ m^+}{w m} \right) \times \left(\frac{w m}{\longrightarrow} \right) \quad 32\% \text{ fenotipi ricombinanti}$$

$$\left(\frac{w^+ y^+}{w y} \right) \times \left(\frac{w y}{\longrightarrow} \right) \quad 1\% \text{ fenotipi ricombinanti}$$

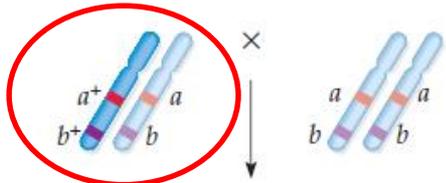
$$\left(\frac{m^+ y^+}{m y} \right) \times \left(\frac{m y}{\longrightarrow} \right) \quad 33\% \text{ fenotipi ricombinanti}$$



Mappatura dei geni mediante reincroci di prova a due punti.

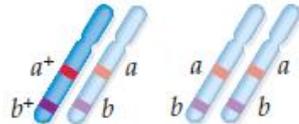
Il reincrocio di prova è anche informativo in quanto alla configurazione dei geni mediante nei cromsomi.

Testcross



Progeny analyzed for recombinant progeny

Parental nonrecombinant progeny

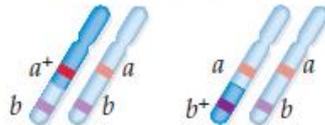


Phenotypes

$a^+ b^+$
(wild-type)

$a b$

Recombinant progeny



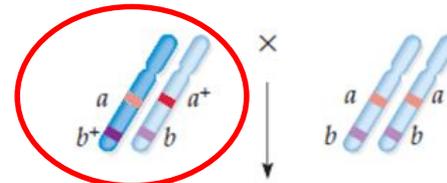
Phenotypes

$a^+ b$

$a b^+$

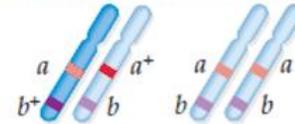
configurazione *cis*

Testcross



Progeny analyzed for recombinant progeny

Parental nonrecombinant progeny

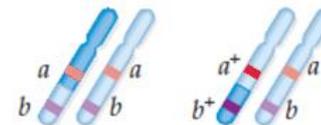


Phenotypes

$a^+ b^+$
(wild-type)

$a b$

Recombinant progeny



Phenotypes

$a b$

$a^+ b^+$

configurazione *trans*

180 $a^+ b$

680 $a^+ b^+$

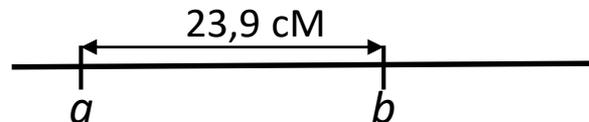
521 $a b$

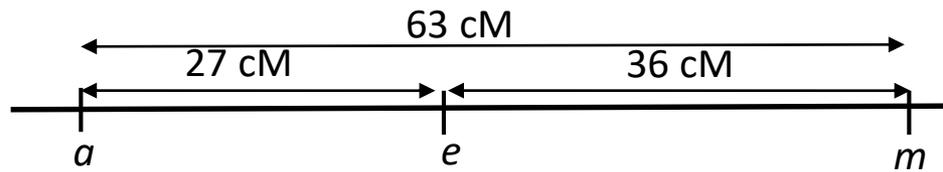
199 $a b^+$

Totale: 1580

$$\frac{\text{num. dei ricombinanti}}{\text{num. totale della progenie}} \times 100 = \text{freq. di ricombinazione} = \text{unità di mappa}$$

$$\frac{180 + 199}{1580} \times 100 = 23,9 \% = 23,9 \text{ um} (= 23,9 \text{ cM})$$

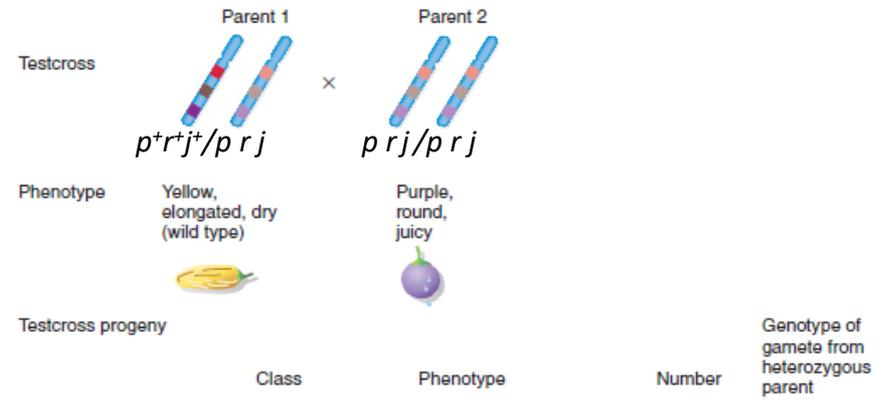




Mappatura dei geni con il reincrocio a tre punti.

$$\frac{a^+ b^+ c^+}{a b c} \times \frac{a b c}{a b c}$$

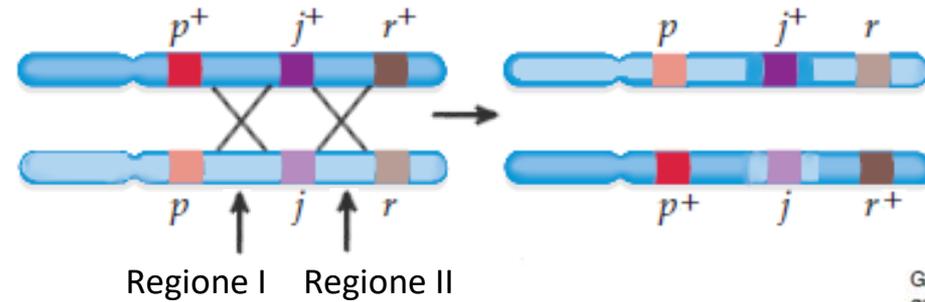
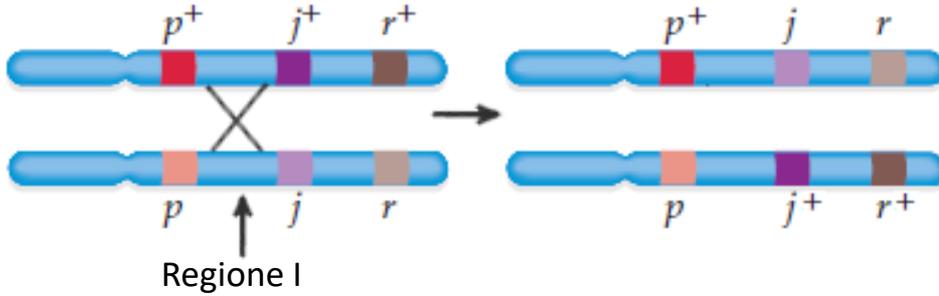
Figure 14.5 Three-point mapping, showing the testcross used and the resultant progeny.



- p^+ : colore giallo del frutto
- p : colore viola del frutto
- r^+ : forma allungata del frutto
- r : forma rotonda del frutto
- j^+ : frutto secco
- j : frutto succoso

$2^3 = 8$ classi fenotipiche nella progenie

1. Stabilire l'ordine dei geni:



	Class	Phenotype	Number	Genotype of gamete from heterozygous parent	
Parental phenotypes	1	Wild type (yellow, elongated, dry)	179	$p^+ j^+ r^+$	Parentali, senza <i>crossing-over</i>
	2	purple, round, juicy	173	$p j r$	
Recombinant phenotypes	3	yellow, round, juicy	46	$p^+ j r$	Ricombinanti sigolo <i>crossing-over</i> regione I
	4	purple, elongated, dry	52	$p j^+ r^+$	
	5	yellow, round, dry	22	$p^+ j^+ r$	Ricombinanti sigolo <i>crossing-over</i> regione II
	6	purple, elongated, juicy	22	$p j r^+$	
	7	yellow, elongated, juicy	4	$p^+ j r^+$	Ricombinanti doppio <i>crossing-over</i>
	8	purple, round, dry	2	$p j^+ r$	
			Total = 500		

2. Calcolare le frequenze di ricombinazione tra i geni: $\frac{p^+ j^+ r^+}{p j r} \times \frac{p j r}{p j r}$

	Class	Phenotype	Number	Genotype of gamete from heterozygous parent	
Parental phenotypes	1	Wild type (yellow, elongated, dry)	179	$p^+ j^+ r^+$	Parentali, senza crossing-over
	2	purple, round, juicy	173	$p j r$	
Recombinant phenotypes	3	yellow, round, juicy	46	$p^+ j r$	Ricombinanti sigolo crossing-over regione I
	4	purple, elongated, dry	52	$p j^+ r^+$	
	5	yellow, round, dry	22	$p^+ j^+ r$	Ricombinanti sigolo crossing-over regione II
	6	purple, elongated, juicy	22	$p j r^+$	
	7	yellow, elongated, juicy	4	$p^+ j r^+$	Ricombinanti doppio crossing-over
	8	purple, round, dry	2	$p j^+ r$	
			Total = 500		

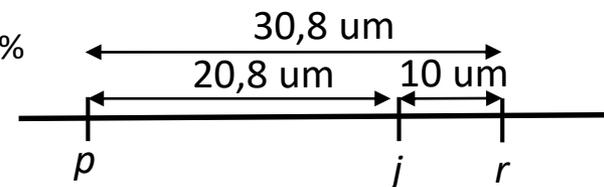
La frequenza di ricombinazione puo essere calcolata per due geni alla volta:

Distanza tra p e j : tutti i ricombinanti in regione I (tutte le combinazioni $p^+ j$ e $p j^+$: classi 3, 4, 7 e 8)

$$\text{Frequenza di ricombinazione tra } p \text{ e } j = \frac{(46 + 52) + (4+2)}{500} \times 100 = 20,8\%$$

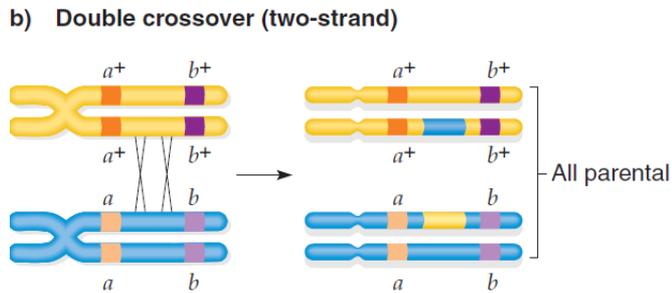
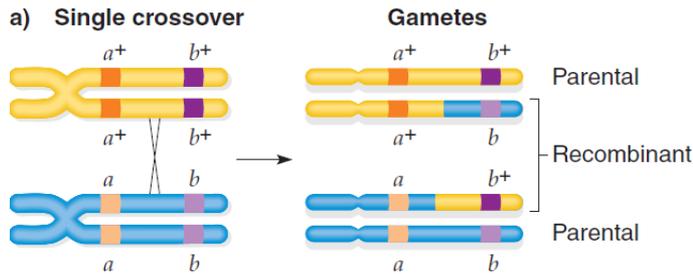
Distanza tra j e r : tutti i ricombinanti in regione II (tutte le combinazioni $j^+ r$ e $j r^+$: classi 5, 6, 7 e 8)

$$\text{Frequenza di ricombinazione tra } p \text{ e } j = \frac{(22 + 22) + (4+2)}{500} \times 100 = 10,0\%$$



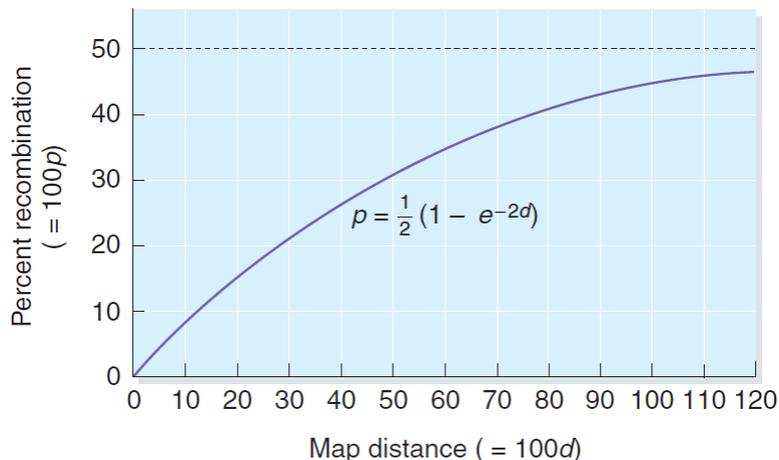
Calcolo accurato delle distanze di mappa:

A volte, la frequenza di ricombinazione è una sottoestima della vera distanza di mappa.



Un evento di crossing-over puo essere cancellato da un secondo evento di crossing-over e non portare alla formazione di fenotipi ricombinanti

La **funzione di mappa** è una formula matematica che define la relazione tra distanza di mappa e frequenza di ricombinazione:



La relazione tra distanza di mappa e frequenza di ricombinazione è diretta fino a 7 um.

d: frequenza di crossing-over. e: base dei logaritmi naturali.

Alcuni appunti in più sull'accuratezza delle mappe di associazione:

La frequenza di ricombinazione varia lungo il genoma. In alcune regioni cromosomiche chiamate **hot spots**, il crossing-over avviene con una frequenza superiore alla media, mentre in altre regioni (*cold spots*) si verifica una frequenza più bassa.

Nelle specie animali con riproduzione sessuale il sesso omogametico (XX nell'uomo) mostra una maggiore frequenza di ricombinazione rispetto al sesso eterogametico (XY). E questo vale per tutto il genoma, non solo per i cromosomi sessuali.

Associazione tra geni e marcatori di DNA:

a) Gene locus

MendAliens (2N)



Black eyes
(*O/O* or *O/o*)

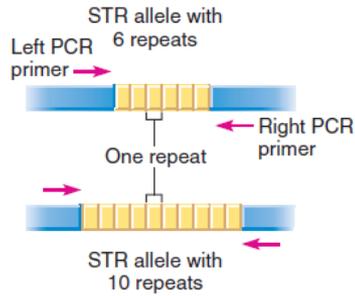


Orange eyes
(*o/o*)

Box Figure 14.1b DNA marker locus with STR alleles

b) DNA marker locus with STR alleles

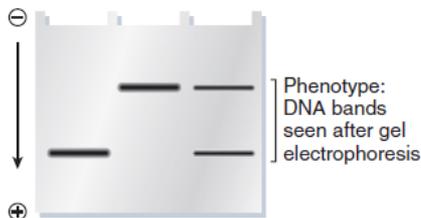
Short Tandem Repeat (STR) alleles



PCR, gel electrophoresis

STR genotype

(6,6) (10,10) (6,10)



Box Figure 14.2 Crosses used to calculate map distance between the eye color gene locus and the STR DNA marker locus.

Linked eye color and STR loci

Parents:
homologous
chromosomes

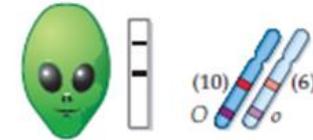


Phenotypes

Black eyes, (10,10)

Orange eyes, (6,6)

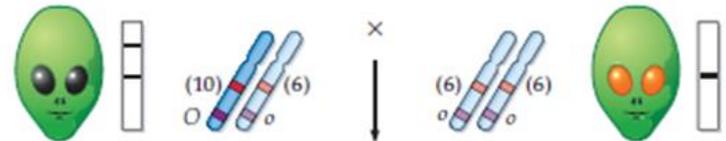
F₁ generation



Phenotype

Black eyes, (10,6)

Testcross



Progeny
analyzed for
recombinant
progeny

Parentals



Phenotypes

Black eyes, (10,6)

Orange eyes, (6,6)

Recombinants



Phenotypes

Black eyes, (6,6)

Orange eyes, (10,6)

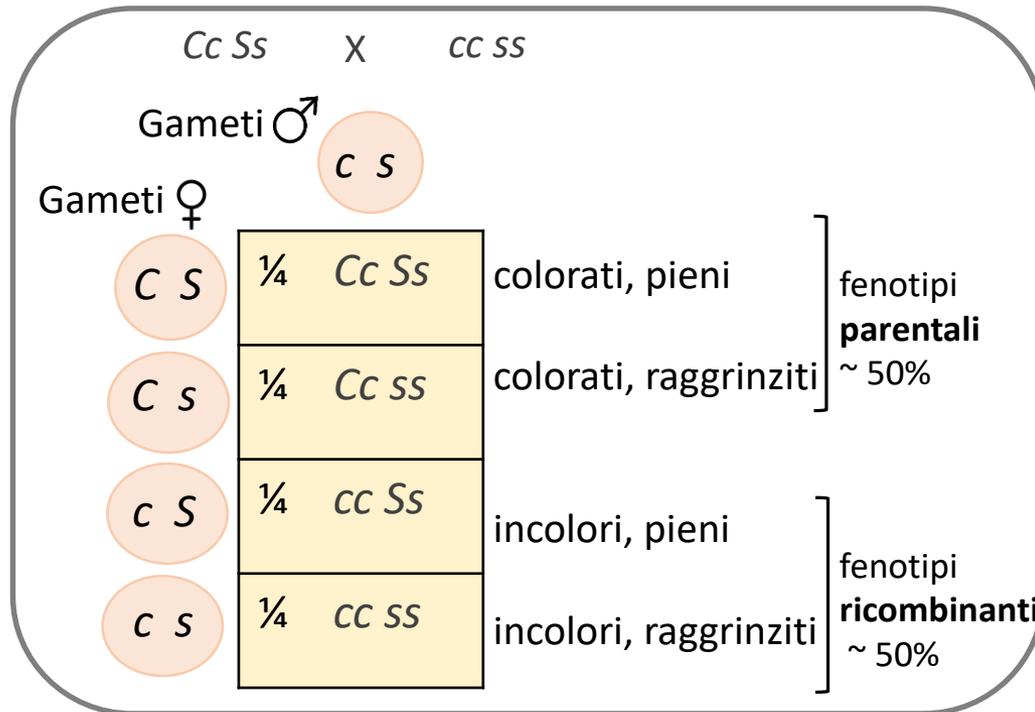
Nel granoturco l'allele per semi colorati (C) è completamente dominante sull'allele per semi incolori (c). Analogamente, una singola coppia allelica controlla se l'endosperma è pieno o raggrinzito. Pieno (S) è dominante su raggrinzito (s). Una pianta di linea pura con semi colorati e pieni è stata incrociata con una a semi incolori e raggrinziti. Le piante della F1 colorate e piene sono state reincrociate con un doppio recessivo, cioè incolore e raggrinzito. I risultati sono stati i seguenti:

4032	colorati, pieni
149	colorati, raggrinziti
152	incolori, pieni
4035	incolori, raggrinziti
Totale:	8368

C'è evidenza che il gene per il colore e il gene per la forma dell'endosperma siano associati? Se sì, qual è la differenza di mappa tra i due loci.

1. Testare l'associazione tra i geni C e S

Ipotesi nulla: "I geni C e S non sono associati"



$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{foss} - \text{fatt})^2}{\text{fatt}}$$

$$\chi^2 = 7207,3$$

$$g.l = 1$$

Fenotipi	N.oss.	N.att.	D (oss-att)	d ²	d ² /att.
Parentali	8.067	4184	3883	15.077.689	3603,65
Ricombinanti	301	4184	-3883	15.077.689	3603,65
Totali	8368	8368			7207,3

Tabella 10.5 Probabilità di chi-quadrato

df	Probabilità									
	0,95	0,90	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,004	0,016	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,10	0,21	0,71	1,39	2,41	3,22	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,42	2,37	3,67	4,64	6,25	7,82	11,35	16,27
4	0,71	1,06	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47
5	1,15	1,61	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52
6	1,64	2,20	3,83	5,35	7,23	8,56	10,65	12,59	16,81	22,46
7	2,17	2,83	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32
8	2,73	3,49	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,13
9	3,33	4,17	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88
10	3,94	4,87	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59
11	4,58	5,58	8,15	10,34	12,90	14,63	17,28	19,68	24,73	31,26
12	5,23	6,30	9,03	11,34	14,01	15,81	18,55	21,03	26,22	32,91
13	5,89	7,04	9,93	12,34	15,12	16,99	19,81	22,36	27,69	34,53
14	6,57	7,79	10,82	13,34	16,22	18,15	21,06	23,69	29,14	36,12
15	7,26	8,55	11,72	14,34	17,32	19,31	22,31	25,00	30,58	37,70
20	10,85	12,44	16,27	19,34	22,78	25,04	28,41	31,41	37,57	45,32
25	14,61	16,47	20,87	24,34	28,17	30,68	34,38	37,65	44,31	52,62
30	18,49	20,60	25,51	29,34	33,53	36,25	40,26	43,77	50,89	59,70
50	34,76	37,69	44,31	49,34	54,72	58,16	63,17	67,51	76,15	86,66

←—————|—————→
 Accettare | Rifiutare
 al livello di 0,05

Fonte: Estratto dalla Tabella IV in *Statistical Tables for Biological, Agricultural, and Medical Research* di Fisher e Yates, 6ª ed., 1974, Ri-stampato per gent. conc. di Addison Wesley Longman Ltd.

L'ipotesi nulla di assortimento indipendente tra i geni C e S viene scartata (la probabilità che la differenza tra i valori attesi e osservati sia dovuta al caso è minore dal 1 per 1000 ($P < 0,001$)).

2. Determinare i tipi parentali e ricombinanti

Percentuali osservate:

149/149 = 1	colorati, raggrinziti] Tipi ricombinanti
152/149 = 1	incolori, pieni	
4032/149 = 27	colorati, pieni] Tipi parentali
4035/149 = 27	incolori, raggrinziti	

Da i tipi parentali possiamo determinare che i due geni sono associati in disposizione *cis*:v

Test-cross (o reincrocio prova):

colorati, pieni	x	incolori, raggrinziti
$\frac{C S}{c s}$		$\frac{c s}{C S}$

2. Determinare la distanza di mappa tra i geni

$$\text{Frequenza di ricombinazione tra i geni } C \text{ e } S = \frac{(149 + 152)}{8368} \times 100 = 3,59\%$$

