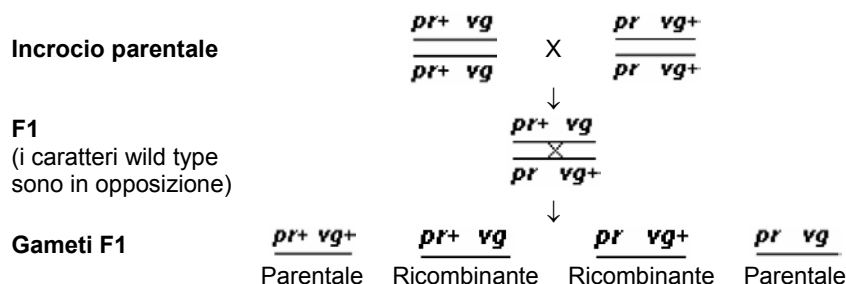


I risultati ottenuti da Morgan confermano quindi l'ipotesi fatta da Bateson e Punnett, secondo la quale non sempre due geni si assortiscono in maniera indipendente. Morgan effettuò anche l'incrocio tra moscerini a **occhi rossi** e **ali vestigiali** con moscerini a **occhi viola** e **ali normali**. Mentre nel primo incrocio i due alleli dominanti e i due recessivi erano situati sullo stesso cromosoma, in questo incrocio un allele dominante ed uno recessivo si trovano sullo stesso cromosoma. Per definizione, la disposizione degli alleli nel genitore F1 del primo incrocio viene detta **in accoppiamento**, mentre nel secondo caso viene detta **in repulsione**. Si utilizza anche la definizione di **cis** e **trans**, rispettivamente.



Come nel primo incrocio, Morgan sottopose questi moscerini F1 a testcross, ottenendo i seguenti risultati:

Gamete F1	Distribuzione nel testcross	Tipo di gamete
$pr^+ \quad vg^+$	157	Ricombinante
$pr^+ \quad vg$	965	Parentale
$pr \quad vg^+$	1067	Parentale
$pr \quad vg$	146	Ricombinante

Il testcross permette di stabilire la distanza tra i due geni e la distribuzione nell'eterozigote parentale: i due gameti più frequenti sono quelli **parentali**; si può stabilire se l'eterozigote è cis o trans.

Ci si aspettava che sia gli incroci in accoppiamento, sia gli incroci in repulsione dessero gli stessi risultati, vale a dire un rapporto 1:1:1:1. Il test statistico del χ^2 permette di valutare se un dato osservato si discosti significativamente dal dato atteso sulla base di un'ipotesi.

TEST DEL χ^2 PER L'INCROCIO IN ACCOPPIAMENTO (CIS)

Vengono confrontati i dati osservati nell'incrocio con quelli attesi sulla base dell'ipotesi di indipendenza. La formula adottata è **(dati osservati-dati attesi)² / dati attesi**.

GAMETI F1	OSSERVATI	ATTESI	(O-A) ² /A
$pr^+ \quad vg^+$	1339	709,75	557,9
$pr^+ \quad vg$	151	709,75	439,9
$pr \quad vg^+$	154	709,75	435,2
$pr \quad vg$	1195	709,75	331,8
Totali	2839	2839	$\chi^2 = 1764,8$

Valori di χ^2 elevati indicano che le differenze sono statisticamente significative, e quindi che l'ipotesi di indipendenza deve essere rigettata.

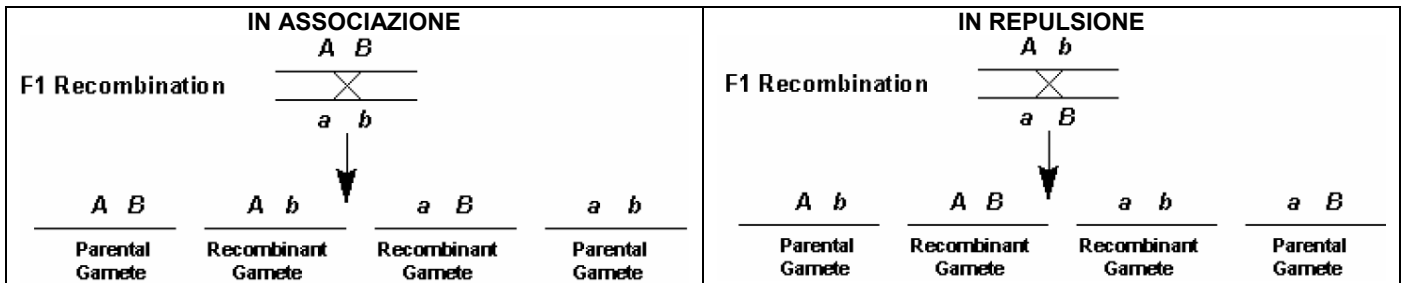
TEST DEL χ^2 PER L'INCROCIO IN REPULSIONE (TRANS)

GAMETI F1	OSSERVATI	ATTESI	(O-A) ² /A
$pr^+ \quad vg^+$	157	583,75	312,0
$pr^+ \quad vg$	965	583,75	249,0
$pr \quad vg^+$	1067	583,75	483,3
$pr \quad vg$	146	583,75	328,3
Totali	2335	2335	$\chi^2 = 1372,6$

Valori di χ^2 elevati indicano che le differenze sono statisticamente significative, e quindi che l'ipotesi di indipendenza deve essere rigettata.

LA RICOMBINAZIONE E LA STIMA DELLA DISTANZA TRA I GENI

Alla prima divisione meiotica, il **crossing over** è un evento che si verifica normalmente. L'effetto di questo fenomeno è quello di riarrangiare i cromosomi omologhi dell'eterozigote in nuove combinazioni attraverso la ricombinazione. La ricombinazione può aver luogo tra due geni qualsiasi di un certo cromosoma, e la probabilità che un crossing over si verifichi tra due geni è funzione della distanza tra i geni. Se due geni sono molto lontani tra loro, ad esempio alle due estremità di un cromosoma, gameti parentali e gameti ricombinanti saranno prodotti all'incirca nelle stesse proporzioni, come avviene per geni indipendenti. Il numero di crossing over tra due geni vicini sarà tanto più limitato quanto più i geni sono tra loro vicini. Pertanto, i gameti parentali verranno prodotti con frequenza maggiore rispetto ai gameti ricombinanti.



Generalmente è abbastanza semplice capire quali sono i gameti **ricombinanti**: sono quelli **meno frequenti**. Inoltre, identificando quali sono i gameti più abbondanti, è possibile determinare se l'eterozigote della F1 era in accoppiamento o in repulsione, vale a dire in *cis* o in *trans*.

Nel caso di un eterozigote **in accoppiamento**, i gameti più frequenti saranno quelli con i due alleli dominanti e con i due alleli recessivi.

Nel caso di un eterozigote **in repulsione**, i gameti più abbondanti saranno quelli con allele dominante e uno recessivo. Questo è fondamentale per poter calcolare la distanza che separa i due geni.

CALCOLO DELLA DISTANZA TRA DUE GENI

Più due geni sono vicini sul cromosoma, meno frequenti saranno gli eventi di crossing-over e di conseguenza le percentuali di gameti ricombinanti.

Per definizione, un'unità di mappa è pari all'**1% di fenotipi ricombinanti**. L'unità di mappa viene determinata **centiMorgan (cM)**.

Volendo determinare la distanza tra i due geni *pr* e *vg*, siamo in realtà in grado di effettuare due stime di questa distanza, in quanto abbiamo a disposizione i dati del testcross in accoppiamento e in repulsione.

Nell'incrocio in **cis**, abbiamo un totale di 2839 gameti, e di questi 305 sono **ricombinanti** (151 *pr⁺vg⁺* + 154 *prvg⁺*). Per determinare la distanza, basta dividere il numero di gameti ricombinanti per il numero totale di gameti ed esprimere il dato in percentuale.

$$[(305/2839) \times 100] \rightarrow \text{la distanza tra } pr \text{ e } vg \text{ è di } 10,7 \text{ cM}$$

Possiamo determinare la distanza anche utilizzando i dati dell'incrocio in **trans**. In quell'esperimento sono stati analizzati in totale 2335 gameti di cui 303 (151 *pr⁺vg⁺* + 154 *prvg*) sono derivati da eventi di ricombinazione. La stima della distanza tra **pr** e **vg** sulla base di questi dati è:

$$[(303/2335) \times 100] = 13,0 \text{ cM}$$

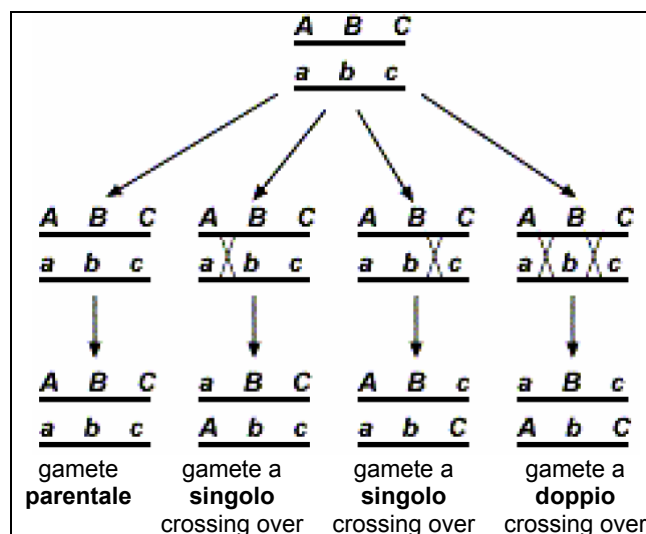
Possiamo quindi concludere che i geni in questione sono concatenati sullo stesso cromosoma. Nessuno dei due valori della distanza ottenuti è vero o falso: sono entrambi una stima del valore reale. Solo effettuando una serie di altri esperimenti in incroci differenti per gli stessi geni si possono accumulare dati che permettono di avvicinarsi al valore reale.

Possiamo eventualmente utilizzare i dati finora ottenuti per calcolare la media delle due determinazioni. In questo caso, otteniamo un valore di 11,85 cM. Si può quindi disegnare una mappa come quella a lato.



Ovviamente, non potremo mai avere una frequenza di ricombinanti superiore al 50%. Pertanto, la massima distanza che possiamo determinare è inferiore ai 50 cM. Se i due geni distano più di 50 cM, non possiamo stabilire se si trovano sullo stesso cromosoma o su cromosomi diversi utilizzando questo metodo. Occorre pertanto utilizzare metodi diversi per calcolare le distanze per geni localizzati sullo stesso cromosoma a distanza superiore a 50 cM. Uno dei metodi adatti è l'**incrocio a 3 punti**.

STIMA DELLA DISTANZA E DELL'ORDINE DEI GENI MEDIANTE GLI INCROCI A 3 PUNTI



In un testcross di un eterozigote F1 per caratteri indipendenti, ci aspetteremmo un rapporto di 1:1:1:1:1:1:1:1 tra i diversi tipi di gameti prodotti. Come nel caso degli incroci a due punti appena analizzati, una deviazione statisticamente significativa da questi rapporti indica che c'è concatenazione.

Esempio

- Supponiamo di aver effettuato un incrocio tra due linee pure AABBCc e aabbcc.
- Sottoponiamo quindi la F1 (eterozigoti) ad un testcross allo scopo di stabilire l'ordine dei geni sul cromosoma e di stimare le distanze tra i geni.

Genotipo	Osservati	Tipo di gamete
ABC	390	Parentale
abc	374	Parentale
AbC	27	Singolo ricombinante tra C e B
aBc	30	Singolo ricombinante tra C e B
ABc	5	Doppio ricombinante
abC	8	Doppio ricombinante
Abc	81	Singolo ricombinante tra A e C
aBC	85	Singolo ricombinante tra A e C
Totale	1000	

- I genotipi **più frequenti** sono quelli **parentali**, quindi **ABC** e **abc**.

Il passo successivo consiste nel determinare l'ordine dei geni. Una volta determinati i genotipi parentali, utilizziamo questa informazione insieme a quella dei doppi ricombinanti per determinare l'ordine dei geni.

- I gameti **doppi ricombinanti** sono quelli **meno frequenti di tutti**, quindi **ABc** e **abC**.
- Un evento di doppio crossing-over sposta l'allele che sta in mezzo da un cromatidio fratello all'altro.

Il gene **C** è quello che sta in mezzo: infatti, l'allele recessivo **c** si trova ora sullo stesso cromosoma sul quale si trovano gli alleli **A** e **B**, e l'allele dominante **C** si trova sullo stesso cromosoma sul quale si trovano gli alleli recessivi **a** e **b**.

Ora sappiamo che l'ordine dei geni è **ACB**; possiamo quindi procedere a determinare le distanze tra A e C, e tra C e B. La distanza si ricava dividendo il numero dei gameti ricombinanti per il totale dei gameti. L'unica differenza rispetto all'esempio precedente consiste nel fatto che occorre prendere in considerazione anche i doppi ricombinanti, perché in questi è avvenuto un crossing-over sia tra A e C, sia tra C e B.

- Pertanto la distanza tra i geni **A** e **C** è di $[100 \times (81+85+5+8) / 1000] = 17,9 \text{ cM}$
- La distanza tra **C** e **B** è: $[100 \times (27+30+5+8) / 1000] = 7,0 \text{ cM}$
- La distanza tra **A** e **B** è la somma delle due distanze
- Si può quindi disegnare la mappa:



IL CARIOTIPO UMANO NORMALE

Il **cariotipo umano normale** è un repertorio cromosomico che determina uno stato di normalità: il numero e la struttura dei cromosomi devono essere integri.

Per definire il cariotipo si può fare un prelievo di sangue periferico. Si usano le uniche cellule che possono dividersi in coltura, cioè i **linfociti**, che nel sangue di un soggetto normale sono in fase G_0 .

Si è scoperto che si possono separare le cellule utilizzando estratti vegetali contenenti **lectine**, che si legano ai gruppi glucidici delle cellule. Alcune di queste lectine, come la **concanavalina** e la **fitoemoagglutinina**, sono capaci di indurre un'aggregazione e una proliferazione delle cellule.

Utilizzando la **colchicina**, che è un inibitore della formazione dei microtubuli, le cellule vengono bloccate in **metafase** e possono quindi essere utilizzate per studiare il corredo cromosomico. Si induce un rigonfiamento delle cellule tramite **shock ipotonico**, esponendo temporaneamente le cellule ad una soluzione ipotonica: appena la cellula tocca il vetrino scoppia e i cromosomi diventano facilmente colorabili e quindi visibili.

I cromosomi sono stati colorati inizialmente con il **Giemsa**, che li colora uniformemente permettendo di contarli e di valutarne le dimensioni. Esponendo i cromosomi ad una **proteasi (pepsina)**, essi presentano una serie di bande. I cromosomi omologhi presentano la stessa successione di bande.

L'analisi del cariotipo è usata prevalentemente per effettuare diagnosi prenatali, cioè per verificare il numero e l'integrità dei cromosomi. Nell'**amniocentesi**, si aspira un campione di liquido amniotico e poi si raccolgono le cellule fetali mediante centrifugazione. Le cellule vengono poi fatte crescere per parecchie settimane in terreni di coltura di laboratorio prima dell'analisi del cariotipo. L'amniocentesi deve essere intorno alla 16° settimana. Nella **villocentesi**, viene prelevato un piccolo campione di villi coriali, le cui cellule si possono preparare direttamente per l'analisi del cariotipo. Con la villocentesi si può effettuare l'analisi del cariotipo anche a 10 settimane.

ANOMALIE CROMOSOMICHE O ANEUPLOIDIE

Per **aneuploidia** si intende una differenza del numero cromosomico rispetto allo stato **euploide** o **normale**. La perdita di un cromosoma è un evento molto grave: le monosomie degli autosomi non arrivano al 3° mese di gravidanza. Nelle femmine può esistere una sindrome data da monosomie del cromosoma X.

Non si sa ancora perché la presenza di un cromosoma in più causi effetti dannosi. Le trisomie più frequenti sono le meno gravi, perché raggungono la nascita. Sono trisomie che interessano cromosomi relativamente piccoli.

TRISOMIA 21 – SINDROME DI DOWN

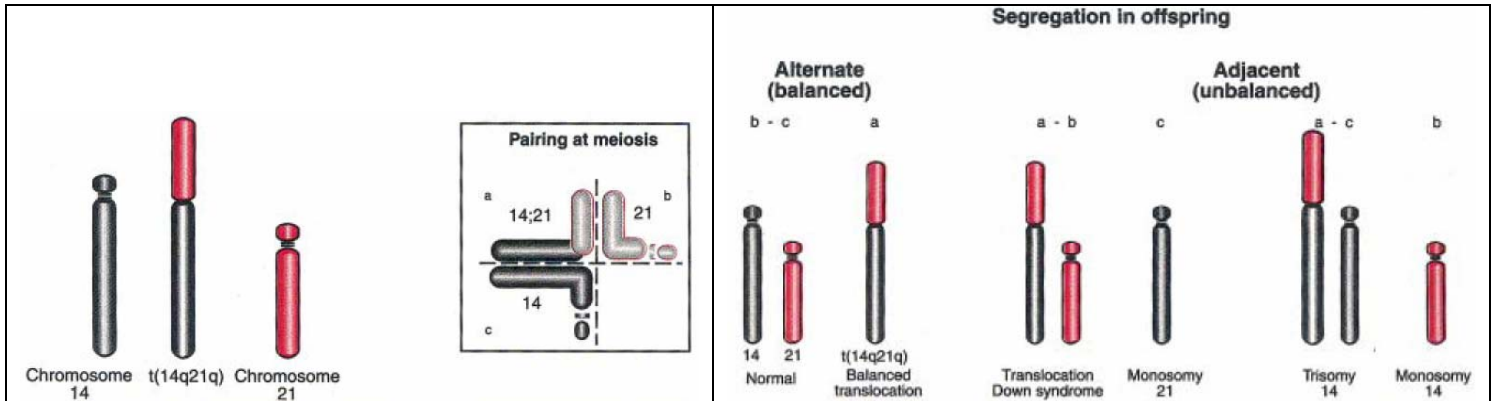
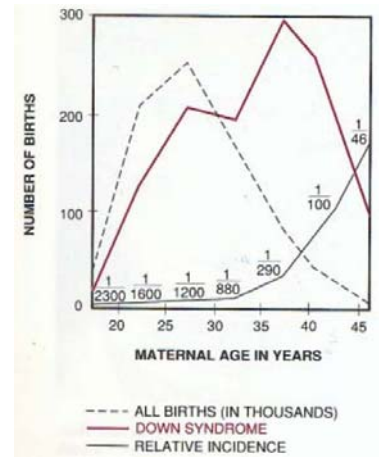
- Sindrome di Down da non-disgiunzione meiotica
- 3 copie del cromosoma 21, cariotipo 47, XX (o XY), +21
- Il cromosoma 21 contiene almeno 3500 geni

I soggetti presentano una vasta gamma di difetti, come difetti cardiovascolari o particolare suscettibilità alle infezioni (difetti della superossididuttasi), ma riescono a sopravvivere a lungo. Hanno inoltre caratteristiche morfologiche tipiche, come i caratteri mongolici e la socievolezza.

Invece della determinazione del cariotipo si può effettuare un'ibridazione in situ con sonde specifiche per un determinato cromosoma, la **FISH: Fluorescence In Situ Hybridization**.

Nel 95% dei casi di Sindrome di Down da trisomie effettiva, l'evento di non-disgiunzione si è verificato durante la gametogenesi materna. E' anche evidente un effetto dell'età materna nella probabilità di eventi di non-disgiunzione. Infatti, dato che il numero di ovociti nella madre è determinato alla nascita, il ritardo di maturazione degli ovociti stessi li rende più suscettibili a difetti: si può avere un ovocita con 2 cromosomi 21.

Circa il 4% degli affetti da Sindrome di Down ha 46 cromosomi, ma ha un cromosoma 21 in eccesso **traslocato** in genere sul cromosoma 14. Con la FISH si rilevano comunque 3 segnali per il cromosoma 21.



Normalmente i cromosomi omologhi si appaiano. Un cromosoma traslocato può appaiarsi sia con il 14 che con il 21. Si può avere una **segregazione bilanciata**: un gamete ha 22 cromosomi, ma ci sono comunque 2 copie del 21 e 2 copie del 14. Nel caso di portatori di una traslocazione bilanciata, non si osserva alcun effetto legato all'età né al sesso del genitore, in quanto esiste una probabilità costante ed elevata di produrre soggetti sbilanciati. Se un soggetto è portatore di una traslocazione bilanciata 21/21, ha il 100% di probabilità di avere figli affetti da Sindrome di Down.

Un piccola parte (circa l'1%) degli affetti da Sindrome di Down presenta nel sangue periferico un cariotipo di 46 cromosomi normali. Nelle cellule della mucosa però si rileva la trisomia 21. Questi individui presentano un **mosaicismo**: alcuni tessuti sono affetti dalla trisomia, altri no. Questo avviene perché, delle prime cellule duplicatisi dallo zigote, alcune hanno perso il 3° cromosoma 21. La gravità dei mosaici è in genere inferiore.

TRISOMIA 18 – SINDROME DI EDWARDS

- 3 copie del cromosoma 18, cariotipo 47, XX (o XY), +18
- E' più grave della Sindrome di Down e ha quindi frequenza molto più bassa alla nascita e sopravvivenza di pochi mesi.

TRISOMIA 13 – SINDROME DI PATAU

- 3 copie del cromosoma 13, cariotipo 47, XX (o XY), +13
- Sopravvivenza di poche settimane.

CRI DU CHAT (CDC)

La **CDC** è una rara malattia genetica causata da un pezzo mancante (delezione) nel braccio corto del **cromosoma 5**: è chiamata anche **sindrome 5p meno**.

Approssimativamente ogni anno negli USA nascono 50-60 bambini con la CDC. La CDC è una delle sindromi da delezione più comuni, con un'incidenza tra 1 su 20.000 e 1 su 50.000 nati vivi. La CDC è stata individuata per la prima volta dal Dr. Lejeune, lo stesso medico che ha trattato per la prima volta della Sindrome di Down.

Non esiste una cura per la CDC, comunque, con interventi ed educazione appropriati, gli individui con la CDC possono condurre una vita piena e significativa. Ci sono vari livelli di difficoltà di apprendimento: alcuni bambini possono seguire un'educazione normale, mentre altri devono essere collocati in classi speciali. Un recente studio riguardante la funzione cognitiva dei bambini con tipica CDC suggerisce che c'è una discrepanza tra la capacità di capire il linguaggio e quella di esprimerlo. I ricercatori indicano che queste scoperte dovrebbero infondere ottimismo ai genitori riguardo alle capacità dei loro figli, quanto sono in grado di capire un linguaggio più complesso di quanto suggerisca la loro capacità di esprimersi. Alcuni bambini possono imparare ad esprimersi usando frasi brevi, il linguaggio dei segni e/o gesti.

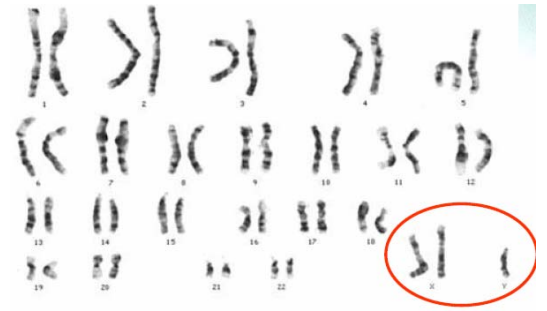
SINDROME DI TURNER

La sindrome di Turner è una monosomia dell'X in soggetti di sesso femminile: è l'unico caso di monosomia compatibile con la vita. In genere, gli individui con la Sindrome di Turner hanno intelligenza normale. Questo è in contrasto con le altre sindromi cromosomiche, come la Sindrome di Down. Comunque, le ragazze e le donne con la sindrome di Turner possono avere difficoltà con specifiche operazioni di coordinazione visuale-spaziale (es.: ruotare mentalmente oggetti nello spazio) e nell'apprendimento della matematica (geometria, aritmetica). Questo specifico problema di apprendimento è stato chiamato "fenotipo neurocognitivo di Turner"

e appare dovuto alla perdita di geni del cromosoma X importanti per certi aspetti dello sviluppo del sistema nervoso. Alcune ragazze e donne con la sindrome di Turner hanno difficoltà di memoria e coordinazione motoria. Questi problemi potrebbero essere correlati ad una mancanza di estrogeni e gli individui spesso migliorano quando ricevono un trattamento con estrogeni. La capacità verbale degli individui con la Sindrome di Turner è in genere normale.

SINDROME DI KLINEFELTER

- Eterosomi: **XXY** (individui di sesso maschile)
- Alta statura
- Fisico vagamente femminile
- Tendenza a perdere i peli sul petto
- Configurazione del pelo pubico di tipo femminile
- Atrofia testicolare
- Osteoporosi
- Sviluppo del seno
- Esigua crescita della barba
- Calvizie frontale assente



MASCHI XYY

- Non si parla di sindrome
- Prima si riteneva che avessero maggior tendenza alla violenza, ma questo non corrisponde a verità
- Alta statura
- Acne
- QI normale

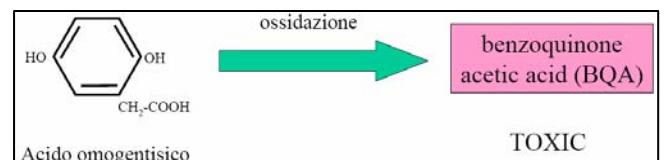
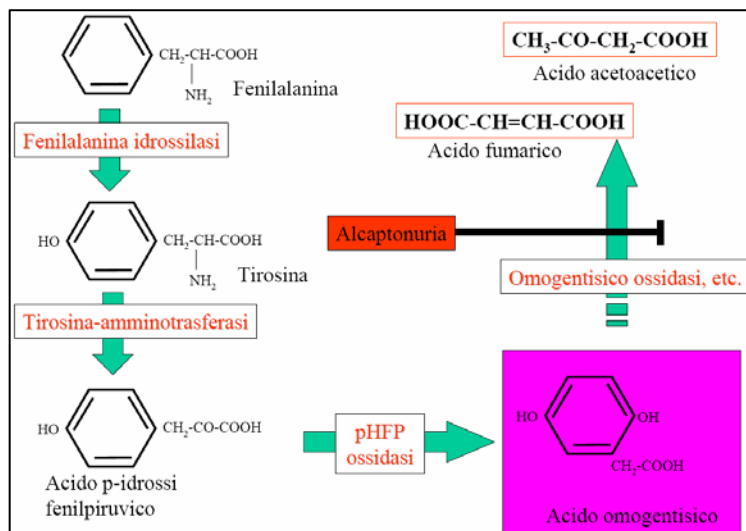
GENETICA BIOCHIMICA

ERRORI CONGENITI DEL METABOLISMO

ALCAPTONURIA

- Descritta da Archibald Garrod
- **Autosomica recessiva**
- Urine scure (elevate quantità di acido omogentisico → suscettibilità all'ossidazione)
- Artrite degenerativa della colonna e delle grandi articolazioni
- Colorazione scura del palato
- Depositi neri nelle sclere

Il problema è a carico della **fenilalanina**. Normalmente l'**acido omogentisico** viene rapidamente ossidato: nell'alcaptonuria c'è un blocco dell'omogentisico-ossidasi. L'acido omogentisico si accumula ed è responsabile delle colorazioni scure.



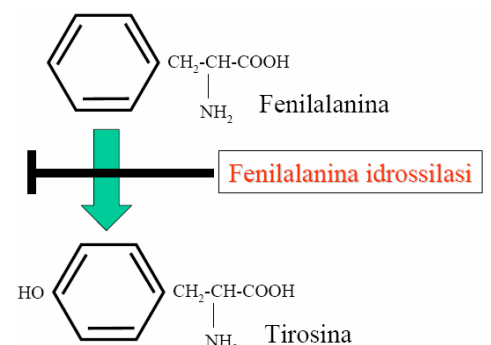
Il gene che codifica per l'**omogentisico-ossidasi** è composto da 14 esoni che codificano una proteina di 445 amminoacidi. In tutti gli esoni ci sono mutazioni che comportano una mutazione o la scomparsa dell'attività enzimatica: ci sono mutazioni **frameshift**, **missense**, **nonsense** e mutazioni che influenzano lo **splicing**: l'mRNA contiene una sequenza intronica che può facilmente contenere un segnale di stop. Dato il gran numero di mutazioni possibili, ci possono essere diversi fenotipi.

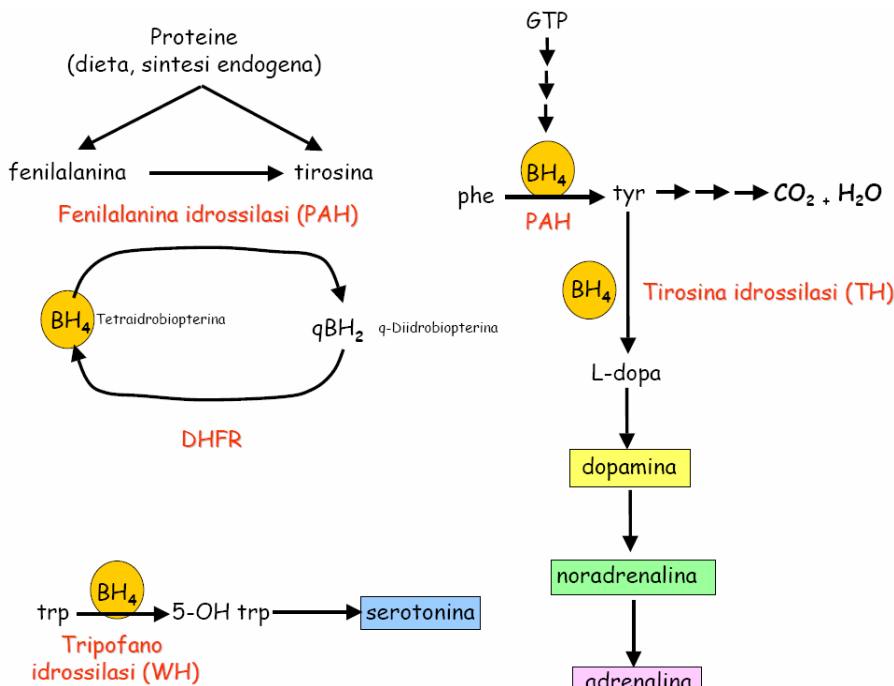
IPERFENILALANINEMIE

- Fenilchetonuria (**PKU**)
- Iperfenilalaninemia benigna

La **fenilalanina** in genere viene trasformata in **tirosina** tramite un coenzima, la **tetra-idro-biopterina (BH₄)**.

La **tirosina-idrossilasi (TH)** trasforma la **tirosina** in **L-dopa**. Un blocco della BH₄ riduce la tirosina con conseguenze su tutta la via metabolica.





Nella **PKU** si riscontra un difetto a carico della **PAH** (fenilalanina-idrossilasi), con conseguente accumulo di fenilalanina nel sangue e nei fluidi corporei (concentrazioni > 2 mM, 20 volte il normale). Nelle **iperfenilalaninemia benigna** c'è un'attività residua della PAH (5%) che determina concentrazioni plasmatiche di Phe attorno ad 1 mM (nei soggetti **normali** è **0.1 mM**).

Nel 2-3% dei pazienti con iperfenilalaninemia, la PAH è normale, ma c'è un difetto di sintesi della **tetra-idro-biopterina (BH₄)**. Può trattarsi di uno dei passaggi che dal GTP porta a BH₄ o della rigenerazione di BH₄ da parte della DHFR.

Mentre nella PKU "classica" è sufficiente una dieta priva di fenilalanina per evitare danni a carico dello sviluppo del SNC, nei deficit di BH₄ occorre somministrare **L-dopa** e **5-idrossi-triptofano** per normalizzare i livelli di neurotrasmettitori.

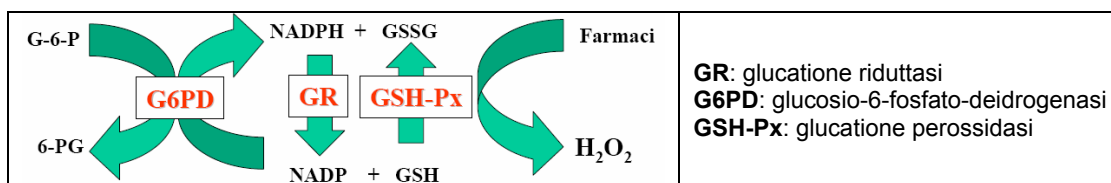
La fenilalanina viene sintetizzata dall'organismo, quindi in questi casi bisogna evitare di assumerla con gli alimenti. Attraverso una diagnosi prenatale si può evitare il presentarsi della sintomatologia grave. Durante la gravidanza eventuali eccessi di fenilalanina vengono metabolizzati dalla madre. Dopo la nascita, la fenilalanina deve essere evitata nei primi 5-6 anni di vita, poi risulta meno tossica.

DEFICIT DI GLUCOSIO-6-P-DEIDROGENASI (G6PD)

- Recessivo associato ad **X**

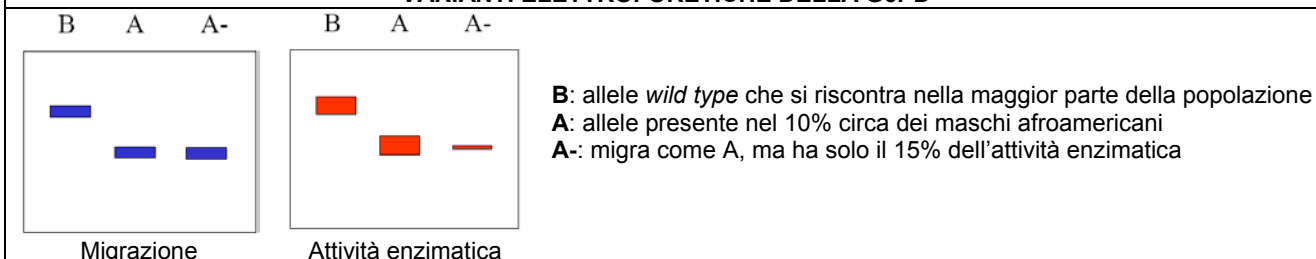
Un difetto della **G6PD** inibisce la reazione di detossificazione dei farmaci e determina una maggior resistenza alla malaria: se il globulo rosso ha difetti a carico della G6PD o dell'emoglobina diventa un ambiente meno favorevole per il plasmodio.

Il 10% dei soldati afroamericani inviati in Corea, a cui veniva somministrata la **primachina** per la profilassi antimalarica, svilupparono anemia acuta dovuta ad emolisi intravascolare. Anche una piccola percentuale di soldati di origine mediterranea presentava un fenomeno analogo, ma di maggior gravità.

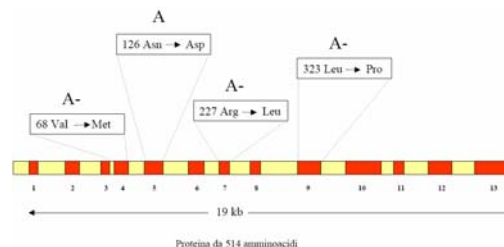


GR: glutatione riduttasi
G6PD: glucosio-6-fosfato-deidrogenasi
GSH-Px: glutatione perossidasi

VARIANTI ELETTROFORETICHE DELLA G6PD



Struttura del gene della **G6PD** sul cromosoma **X** e localizzazione delle mutazioni riscontrate in diversi alleli. La maggiore mobilità elettroforetica che caratterizza tutti gli alleli A rispetto all'allele B è dovuta alla sostituzione di Asn con Asp in posizione 126.



DEFICIT DI α_1 -ANTITRIPSINA

I **neutrofil**i, per farsi strada, secernono **elastasi**. A livello dei polmoni c'è una grande attività dei neutrofil e un'intensa attività elastasica. La funzione principale della **α_1 -antitripsina** è inibire la elastasi dei neutrofil a livello del polmone: accorcia l'emivita dell'elastasi in modo che non distrugga il tessuto. Si tratta quindi di un inibitore delle proteasi a serina. I geni vengono identificati con **PI** (Protease Inhibitors).

Gene: 12 kb sul cromosoma **14** → **proteina** da 394 amminoacidi

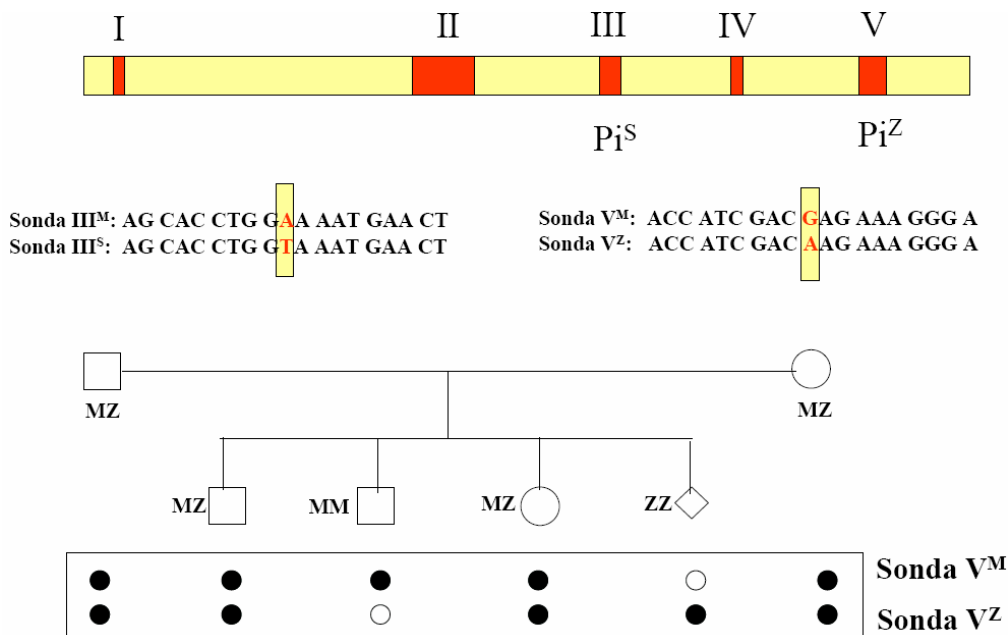
L'allele più frequente è **PI^M**, anche se in realtà si tratta di 4 alleli che codificano proteine aventi identica mobilità elettroforetica, ma che differiscono per un amminoacido, pur avendo funzione normale. Frequenza all'elica complessiva delle 4 varianti: 0,95.

L'allele **PI^S** deriva da una mutazione GAA → GTA nell'**esone 3** (264 Glu → Val) che determina una ridotta stabilità dell'inibitore. L'allele **PI^Z** deriva da una mutazione nell'**esone 5** (GAG → AAG, 342 Glu → Lys) che altera la struttura tridimensionale della proteina e ne provoca l'aggregazione nel RER.

I soggetti **PI^{ZZ}** presentano 10-15% di attività enzimatica e, negli indoeuropei, sono all'incirca 1:2500. Questa mutazione è presente nella maggior parte dei casi di deficit di α_1 -AT che presentano enfisema polmonare ed epatopatia, dovuta all'accumulo di α_1 -antitripsina.

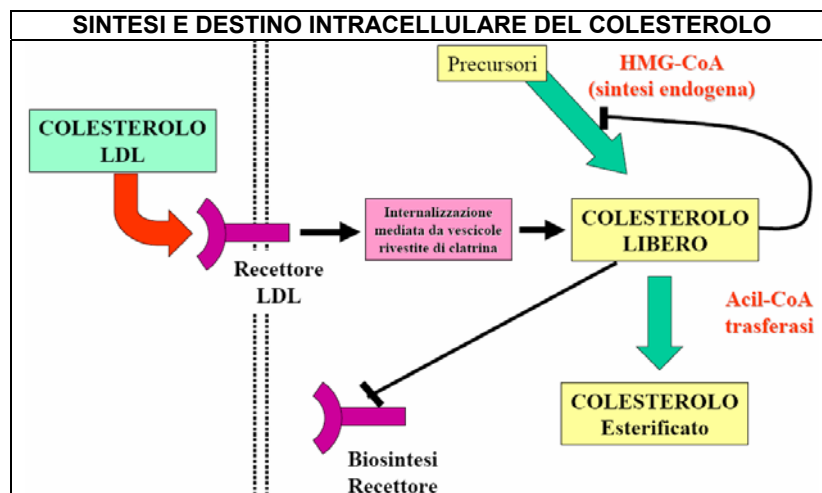
I soggetti **PI^{SS}** presentano 50-60% di attività enzimatica e sono praticamente asintomatici. I soggetti **PI^{SZ}** presentano 30-35% di attività enzimatica e sono a rischio di sviluppo di enfisema.

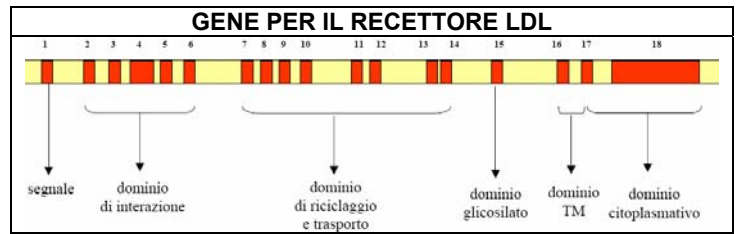
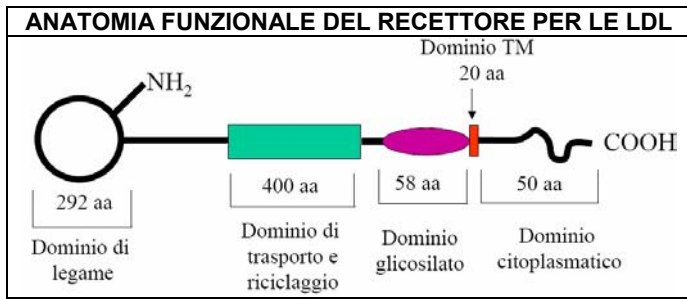
I soggetti con deficit di α_1 -AT sono particolarmente suscettibili al fumo di sigaretta. Per la terapia sostitutiva, si utilizza α_1 -AT ricombinante. Il deficit di α_1 -AT può essere diagnosticato con **ASO**: si possono costruire sonde molecolari per rilevare le mutazioni. L'ibridizzazione avviene solo quando c'è perfetta complementarità.



IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

- Autosomica, dominante
- Colpisce 1/500 individui
- Gli **eterozigoti** presentano livelli elevati di colesterolemia (300-600 mg/dl) e colesterolo-LDL > 200 mg/dl. Hanno tendenza a malattie cardiovascolari aterosclerotiche ad insorgenza precoce.
- Gli **omozigoti** hanno livelli di colesterolemia molto elevati (600-1200 mg/dl), vanno incontro ad attacchi cardiaci nell'infanzia e spesso muoiono per coronaropatie durante la seconda o la terza decade di vita.





Classi di mutanti

- **Classe 1:** mancata produzione (non-senso o *frame-shift*), possono riguardare qualsiasi esone.
- **Classe 2:** blocco del trasporto dal RE al Golgi. Riguardano il dominio di interazione e quello di riciclaggio e trasporto.
- **Classe 3:** il recettore raggiunge la superficie ma non lega le LDL. Esoni del dominio di interazione, in alcuni casi anche del dominio di riciclaggio.
- **Classe 4:** il recettore raggiunge la superficie e lega le LDL, ma non entra nelle vescicole rivestite di clatrina, quindi non internalizza le LDL legate. A carico del dominio citoplasmatico e TM.
- **Classe 5:** recettori che legano e internalizzano le LDL, ma non rilasciano il ligando negli endosomi. Di conseguenza, l'intero complesso ligando-recettore viene degradato.

POLIMORFISMI, ALBERI GENEALOGICI E DIAGNOSI

<p>Eredità autosomica dominante</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gli affetti hanno almeno un genitore affetto • Sono colpiti entrambi i sessi • E' trasmessa da entrambi i sessi 	
<p>Eredità autosomica recessiva</p> <ul style="list-style-type: none"> • I genitori degli affetti sono portatori asintomatici • Sono colpiti entrambi i sessi • Aumentata incidenza in caso di consanguineità tra i genitori (la doppia linea orizzontale indica la parentela) 	
<p>Eredità dominante associata all'X</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colpisce entrambi i sessi, ma più le femmine • Il 50% dei figli di un'affetta è affetto • Un affetto avrà figlie affette e maschi sani 	
<p>Eredità recessiva associata all'X</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colpisce quasi esclusivamente i maschi • La madre di un affetto è una portatrice sana • La madre di un affetto ha parenti maschi affetti • Solo l'incrocio tra portatrice e maschio affetto dà femmine affette e una apparente trasmissione da maschio a maschio 	
<p>Eredità associata all'Y</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colpisce solo i maschi • I maschi affetti hanno sempre un maschio affetto • Tutti i figli maschi di un affetto sono affetti 	

Alcune caratteristiche ereditarie non si manifestano in certi individui perché vengono compensate da altre caratteristiche. Ad esempio, alcuni soggetti producono poco **fattore di crescita**, ma compensano con una maggiore affinità del recettore. Queste caratteristiche hanno **penetranza incompleta**. La **penetranza** è la capacità di un carattere di manifestarsi. L'**espressività** di un carattere è variabile: il carattere si presenta in maniera diversa nei vari soggetti.

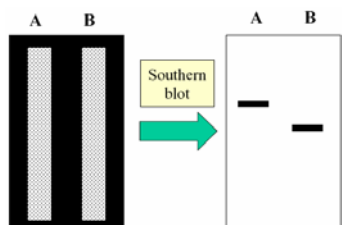
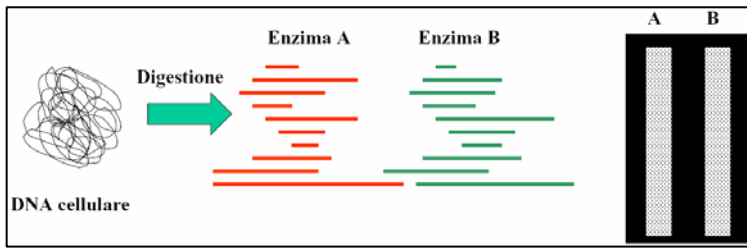
POLIMORFISMI

- **Polimorfismo:** qualsiasi modificazione di un gene rispetto alla sua forma più frequente presente nella popolazione.
- **Locus polimorfico:** locus in corrispondenza del quale esistono più forme alleliche a livello della popolazione.

I polimorfismi "classici" sono stati utilizzati per la mappatura genetica. Tuttavia, una mappa basata solo su questi polimorfismi è poco dettagliata negli eucarioti. I **polimorfismi del DNA** permettono di raggiungere un maggior grado di dettaglio, in quanto i siti polimorfici sono in numero maggiore.

Solo il 3% circa del genoma umano è impegnato nella sintesi di proteine. Il restante 97% non è sottoposto ad una pressione selettiva molto importante.

Uno dei primi esempi di polimorfismo studiati è la posizione dei **siti di taglio** utilizzati da **enzimi di restrizione**. Ogni enzima di restrizione riconosce una sequenza nucleotidica specifica e taglia la molecola del DNA in corrispondenza di questa sequenza. Se il DNA è di grandi dimensioni si ottiene una scia praticamente continua di frammenti, che sono difficilmente risolvibili in un gel di elettroforesi. Se però si dispone di una **sonda molecolare** avente una sequenza specifica, è possibile evidenziare, dopo l'elettroforesi, il frammento di DNA contenente la sequenza complementare alla sonda mediante **ibridazione**.

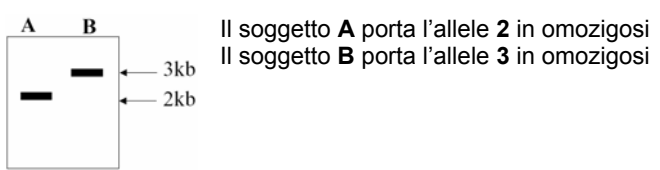
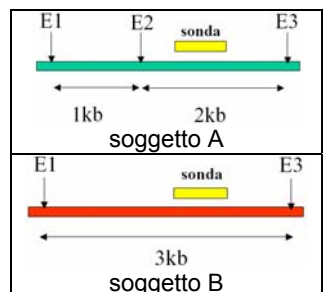


La sonda molecolare ibridizza con frammenti di DNA di dimensioni diverse, generati dal taglio con enzimi di restrizione differenti.

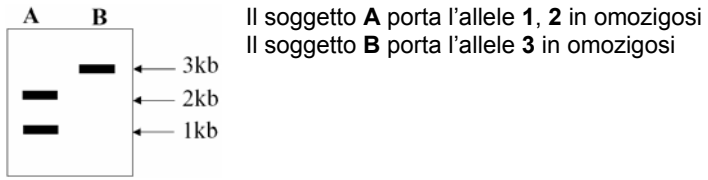
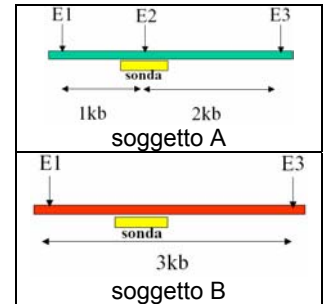
Supponiamo di tagliare il DNA di due soggetti diversi con uno stesso enzima di restrizione e di utilizzare una sonda radiomarcata per evidenziare il frammento di DNA contenente la sequenza complementare alla sonda.

- Nel soggetto **A** l'enzima taglia il DNA nella regione interessata generando un frammento da 1 kb ed un frammento da 2 kb.
- Nel soggetto **B** manca il sito di restrizione **E2**, per cui l'enzima taglia il DNA generando un frammento complementare alla sonda che è lungo 3 kb.

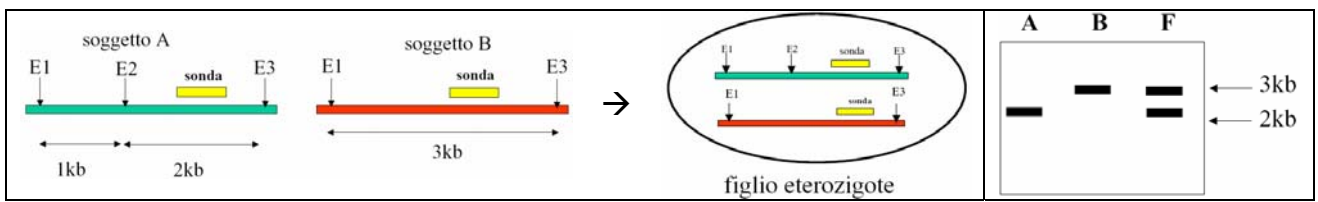
Questo è un **RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism**.



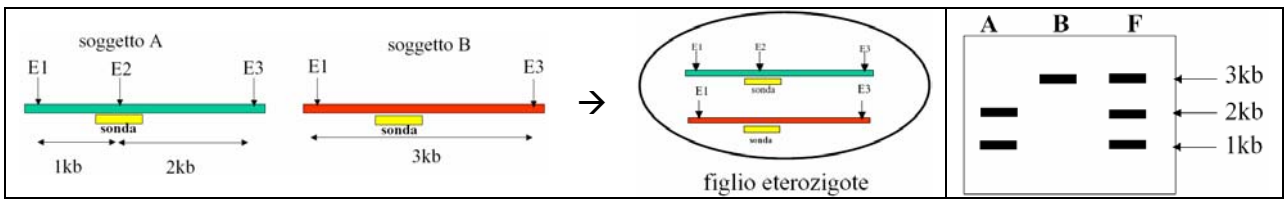
Supponiamo che la sequenza complementare alla sonda di DNA si trovi a cavallo del sito di restrizione **E2**. Ci aspettiamo che il DNA del soggetto **A** ibridizzi con la sonda in corrispondenza di due frammenti (1 e 2 kb), mentre il DNA del soggetto **B** con un unico frammento (3 kb). Anche questo è un **RFLP**.



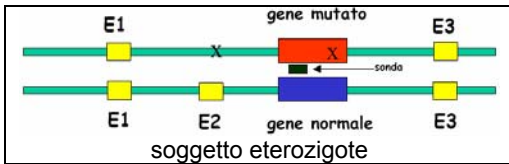
Supponiamo che i due soggetti si incrocino ed abbiano un figlio. Ciascuno di essi trasmetterà, attraverso i gameti, l'allele che contiene (il soggetto **A** l'allele **2**, il soggetto **B** l'allele **3**). Il figlio risulterà essere **eterozigote 2/3**.



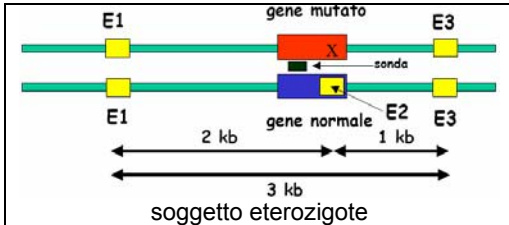
Nel caso della sonda che ibridizza a cavallo del sito di restrizione, il soggetto **A** trasmette l'allele **1, 2**, mentre il soggetto **B** trasmette l'allele **3**. Il figlio sarà **eterozigote 1, 2 / 3**.



Gli **RFLP** si comportano quindi come veri e propri **caratteri codominanti** e sono stati utilizzati inizialmente per scopi diagnostici, sfruttando la loro vicinanza con geni noti che causano malattie. In alcuni casi la mutazione che causa la malattia coincide con quella che determina la comparsa o la scomparsa di un sito di restrizione.

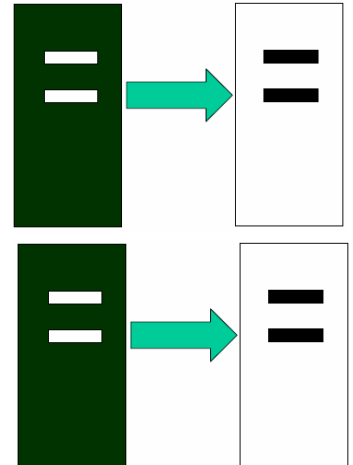


banda a 3 kb **potrebbe** indicare la presenza di un gene mutato.

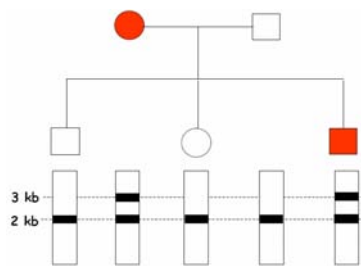


Quanto più la mutazione che determina la scomparsa del sito di restrizione è vicina al gene mutato, tanto più attendibile è l'uso di questo marcatore per la diagnosi della malattia, in quanto la frequenza di crossing-over dipende dalla distanza tra i due geni. In questo caso, la presenza di una

In questo caso la mutazione che causa la malattia coincide con quella che determina la scomparsa di un sito di restrizione. La mutazione che determina la scomparsa del sito di restrizione coincide con quella che determina la mutazione del gene. In questo caso, quindi, la presenza di una banda a 3 kb indica che il gene è mutato.



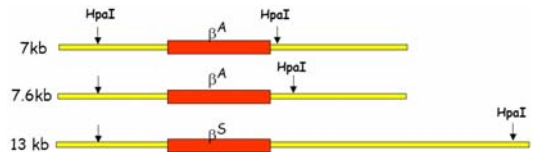
Pertanto, alcuni RFLP possono essere utilizzati per una diagnosi (ad esempio prenatale) di malattie.



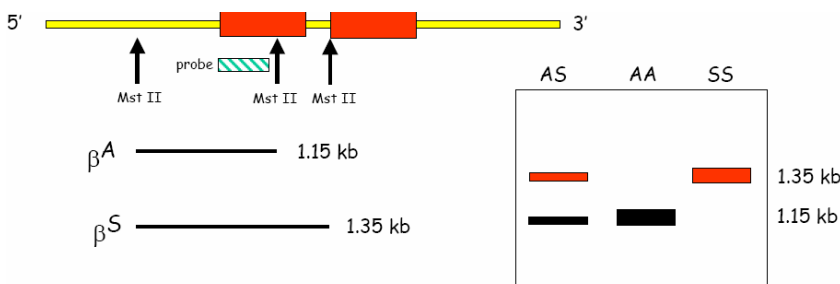
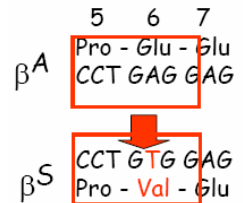
I simboli in rosso nell'albero indicano i soggetti affetti dalla malattia.

In basso, un Southern Blot dal quale si evince che i soggetti malati hanno una banda a 3 kb, mentre i soggetti sani hanno una banda a 2 kb.

Polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione per **HpaI** adiacente al gene **βs**. In alcune popolazioni africane, il frammento da 13 kb è quasi sempre associato all'allele **HbS** invece che all'allele **HbA**. In popolazioni di altre zone, ad esempio India, Sudafrica, Gabon, Kenya e Arabia Saudita, la mutazione HbS è associata preferenzialmente al frammento da 7,6 kb. Ciò indica che la mutazione HbS è comparsa più volte (almeno due) indipendentemente in popolazioni diverse. La protezione che questo allele conferisce agli eterozigoti nelle zone malariche spiega l'elevata frequenza dell'allele in alcune parti del mondo. L'omozigosi è grave e dà **anemia falciforme**.

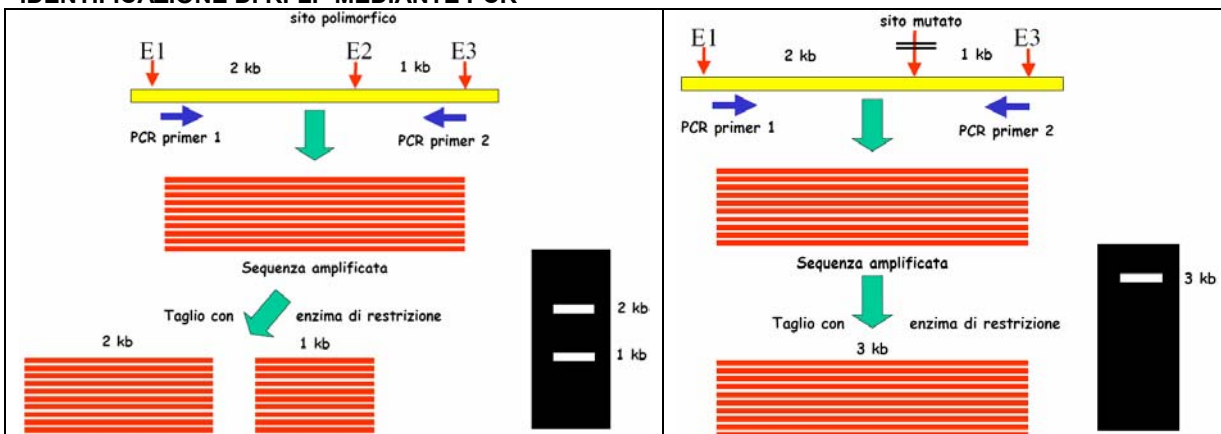


Nella **βs** un'adenina viene sostituita con una **timina**. La mutazione provoca un cambiamento della proteina. La mutazione da HbA ad HbS determina anche la scomparsa di un sito di restrizione per **MstII** (CCTNAGG). Pertanto, la sonda molecolare ibridizza, nel caso di **HbS**, con un frammento da **1,35 kb**, mentre nel caso di **HbA**, con un frammento da **1,15 kb**.



La possibilità di sbagliare la diagnosi è alta perché la distanza è grande e possono avvenire dei crossing-over.

IDENTIFICAZIONE DI RFLP MEDIANTE PCR



La PCR è un metodo più rapido rispetto all'ibridazione Southern Blot e permette di identificare molto velocemente la presenza o meno di un polimorfismo. Non richiede l'uso di radioisotopi ed i prodotti di amplificazione possono essere sequenziati.