

# Soluzioni del Capitolo 21

**21.1** a. 11; b. 4; c. 8; d. 7; e. 12; f. 9; g. 13; h. 3; i. 1; j. 5; k. 6; l. 10; m. 2.

**21.2 a.** Per analizzare il ruolo di un particolare gene nello sviluppo del cuore, è utile: (I) generare mutazioni a perdita di funzione e anche (se possibile) mutazioni a guadagno di funzione nel gene; (II) analizzare i fenotipi mutanti per esaminare in dettaglio come interferiscono con l'anatomia e la fisiologia del cuore; (III) monitorare l'mRNA e i prodotti proteici del gene per determinare i particolari tessuti in cui questi sono espressi. La maggior parte di questi esperimenti non può essere eseguita con gli esseri umani per ragioni sia pratiche sia etiche. (Tuttavia, se si trovasse per caso un paziente con una mutazione nel gene, si potrebbe certamente esaminare il cuore con mezzi non invasivi.) Il miglior organismo modello da usare sarebbe probabilmente un topo. Il motivo è che i topi hanno cuori simili a quelli degli umani e le manipolazioni sopra descritte possono essere tutte eseguite con i topi. Un primate avrebbe un cuore più simile a quello di un essere umano, ma principalmente per ragioni etiche e secondariamente per quelle di spesa, la maggior parte degli scienziati evita lo studio su modelli di primati.

**b.** Per trovare i geni necessari per lo sviluppo del cuore, si deve eseguire una sorta di screening genetico (ricercando mutazioni che interrompono lo sviluppo cardiaco) o uno screening molecolare (ricercando proteine o altre molecole espresse nei tessuti cardiaci in via di sviluppo). Nella scelta di un organismo modello, le considerazioni includono: (1) Quanto è simile il cuore dell'organismo al cuore umano? (Maggiore è la somiglianza, maggiore è la probabilità che i geni trovati abbiano funzioni simili negli esseri umani.) (2) Quanto è facile eseguire lo screening desiderato? (Per esempio, saranno necessarie dissezioni complesse

se per osservare il cuore in via di sviluppo?) (3) Quanti animali con cromosomi mutagenizzati si possono selezionare? (Questo numero dipende dal tempo di generazione dell'organismo, da quanta progenie produce una coppia e da quanto sarebbe costoso mantenere un gran numero di animali.) Topi, pesce zebra e *Drosophila* rappresentano tutte buone scelte per motivi diversi.

I topi sarebbero probabilmente la scelta migliore per uno screening molecolare, come l'analisi RNA-Seq del tessuto cardiaco per trovare geni che vengono trascritti in momenti specifici dello sviluppo cardiaco. Il cuore di topo e quello umano sono i più simili perché entrambi gli organismi sono mammiferi e le dissezioni necessarie per isolare il tessuto cardiaco sono probabilmente più facili nei topi perché sono animali più grandi. Sebbene i costi di stabulario siano più alti per i topi, non è necessario allevare molti individui per eseguire questo tipo di esperimento.

Ciascuno dei tre modelli avrebbe vantaggi e svantaggi per uno screening genetico. Il principale vantaggio dei topi è la loro somiglianza con gli esseri umani. Gli screening genetici sono possibili con i topi, ma sono costosi e richiedono molto tempo. Inoltre, è probabile che le mutazioni con perdita di funzione che colpiscono lo sviluppo del cuore siano omozigoti letali e i cromosomi bilanciatori che permettono di mantenere le linee con mutazioni letali esistono solo per pochi cromosomi di topo. Anche gli screening genetici di Zebrafish sono laboriosi e richiedono tempo. Tuttavia, uno dei principali vantaggi del pesce zebra è che gli embrioni sono trasparenti, quindi il cuore è visibile nei pesci vivi. Anche se il cuore della *Drosophila* è molto diverso dai cuori umani, gli screening genetici che utilizzano i moscerini della frutta sono molto più facili da eseguire. Il tempo di generazione della *Drosophila* è

inferiore a 2 settimane, ogni femmina produce centinaia di moscerini, i cromosomi bilanciatori consentono di mantenere facilmente gli stock di mutazioni letali omozigoti e l'allevamento dei moscerini è poco costoso. Pertanto, in *Drosophila* potrebbero essere selezionati molti più mutanti rispetto agli altri due modelli e potrebbero essere identificati più geni. Almeno alcuni di questi geni dovrebbero essere rilevanti per lo sviluppo anche del cuore umano.

**21.3 a.** In *C. elegans*, l'ablazione laser in questa fase iniziale di sviluppo sarebbe quasi certamente letale. Il motivo è che distruggerebbe gran parte dei tipi cellulari che discenderebbero dalla cellula ablata non essendovi altre cellule che potrebbero sostituirli. Nei topi, la perdita di una cellula embrionale precoce su quattro probabilmente non avrebbe alcun effetto. Il motivo è che i discendenti delle cellule che non sono state distrutte potrebbero prendere il posto dei discendenti della cellula che è stata distrutta.

**b.** Separare le quattro cellule sarebbe letale per *C. elegans* perché nessuna di queste cellule sarebbe in grado di svilupparsi in un organismo completo. Nei topi, è possibile che ciascuna delle cellule separate possa trasformarsi in un topo.

**c.** La fusione di due embrioni a quattro cellule in *C. elegans* sarebbe probabilmente letale, perché il corretto sviluppo dipende dai segnali tra le varie cellule e tali segnali sarebbero quasi certamente interrotti dall'evento di fusione. Nei topi, una tale fusione sarebbe probabilmente tollerata dando origine a un animale chimerico. Ricordiamo dalla Figura 20.8 che fusioni simili (l'iniezione di cellule staminali embrionali da un ceppo nelle blastocisti di un secondo ceppo) costituiscono infatti un passo importante nella procedura per la realizzazione di topi knockout.

**21.4 a.** Utilizzando ceppi mutanti che non complementano, il gene *wg* potrebbe essere identificato utilizzando una qualsiasi delle strategie mostrate in Figura 21.3. Supponiamo che i mutanti *wg* siano stati tutti ottenuti in uno screening di mutanti del secondo cromosoma, quindi già si sa che le mutazioni *wg*<sup>-</sup> risiedono sul cromosoma 2.

Se almeno uno dei mutanti è causato dall'inserzione di un elemento trasponibile (TE), il metodo più semplice sarebbe di utilizzare la PCR inversa (vedi Figura 15.29) per amplificare e sequenziare il DNA genomico adiacente al TE. Per identificare la posizione del sito di inserimento del TE nel genoma, è necessario confrontare la sequenza amplificata con la sequenza di riferimento del ge-

noma di *Drosophila* utilizzando una ricerca BLAST. Se il TE è inserito all'interno o vicino a un gene, quel gene diventa il gene candidato.

Se nessuna delle mutazioni è causata da un inserimento TE, è possibile ricorrere a una o entrambe le seguenti strategie. In primo luogo, è possibile sequenziare i genomi di tutti e quattro i ceppi mutanti e di un ceppo parentale di tipo selvatico e cercare i geni mutati in tutti e quattro i ceppi mutanti rispetto al controllo di tipo selvatico. Questo metodo è ancora al momento un po' costoso, ma certamente può essere applicato. In secondo luogo, è possibile determinare la posizione delle mutazioni che causano il fenotipo *wg* mediante mappatura per delezione (vedi Figura 13.5) e/o mappatura per ricombinazione rispetto ai marcatori (mutazioni geniche o inserzioni del trasposone P [*w*<sup>+</sup>]) sul cromosoma 2. Il numero di marcatori e le delezioni disponibili sono così grandi che la ricerca del gene potrebbe essere limitata a uno o pochi candidati. Quindi si amplificano per PCR e si sequenziano gli esoni dei geni candidati in tutti i ceppi mutanti per identificare le mutazioni correlate al fenotipo mutante.

Dopo aver identificato un gene candidato utilizzando uno dei metodi sopra descritti, si deve verificare che questo gene sia effettivamente la causa del fenotipo. Per far questo, si inserisce il DNA genomico di tipo selvatico corrispondente al gene candidato in un vettore con l'elemento P e si inietta negli embrioni per creare moscerini transgenici (vedi Figura 20.3). Con gli opportuni incroci si crea una mosca che simultaneamente è *wg*<sup>-</sup>/*wg*<sup>-</sup> e ha il transgene. Se questi moscerini hanno ali normali, il transgene deve contenere DNA corrispondente al gene *wg*<sup>+</sup>.

In alternativa, si può verificare il gene candidato, eliminandolo da un ceppo selvatico, utilizzando una tecnica di mutagenesi mirata come CRISPR/Cas9. Se si generano omozigoti mutanti e sono privi di ali, la conclusione è che le mutazioni nel gene candidato sono effettivamente responsabili del fenotipo mutante privo di ali.

**b.** I membri della famiglia del gene *WNT* nell'uomo sono omologhi del gene *wg* di *Drosophila*.

**21.5 a.** Si esegue uno screening per i mutanti omozigoti per il mancato spostamento verso la luce UV. Per esempio, si possono posizionare ceppi omozigoti per cromosomi mutagenizzati a un'estremità di un tubo lungo con una sorgente UV all'altra estremità del tubo. Trascorso un certo periodo, si contano i moscerini che non si sono mossi verso la sorgente UV. Uno screening di

questa natura, infatti, è stato il modo in cui furono identificati i primi mutanti *sevenless*.

**b.** Le mutazioni in ogni gene richiesto per lo sviluppo di R7 non possono essere recuperate nello screening descritto. Tale screening richiede che i mutanti omozigoti a perdita di funzione siano vitali, il che preclude il recupero delle mutazioni nei geni pleiotropici richiesti non solo per lo sviluppo di R7 ma anche per pathway di sviluppo essenziali. (Potrebbero essere identificati alleli ipomorfi di geni pleiotropici potenzialmente omozigoti vitali.) Inoltre, non verrebbero identificate mutazioni nei geni con funzioni ridondanti nella via di sviluppo di R7: se un gene fosse eliminato, il gene ridondante sarebbe ancora presente e in grado di fornire la stessa funzione, non producendo alcun fenotipo mutante.

**c.** Si potrebbe eseguire un test di complementazione per determinare se i mutanti appena identificati ( $m^-$ ) sono alleli di *sev* o di *boss*. Basta incrociare i moscerini che portano le mutazioni con gli omozigoti *sev* o *boss* e determinare se i moscerini  $m^-/sev$  o  $m^-/boss$  mancano di R7 (nessuna complementazione; le mutazioni sono nello stesso gene) o se sono di tipo selvatico (complementazione; le mutazioni sono in geni diversi).

**d.** È possibile identificare ulteriori alleli mutanti di un gene ( $m$ ) richiesto specificamente per lo sviluppo dell'occhio eseguendo uno screening per le mutazioni che non complementano. Per esempio, si potrebbero mutagenizzare moscerini maschi, incrociarli con femmine  $m^-/m^-$  e analizzare la progenie  $F_1$  (cromosoma mutagenizzato/ $m^-$ ) per la presenza di un fenotipo mutante dell'occhio. Un animale  $F_1$  mutante porterà probabilmente un nuovo allele mutante del gene  $m$  sul cromosoma mutagenizzato.

Ci sono diversi motivi per voler generare molti alleli  $m^-$  diversi. In primo luogo, una varietà di alleli permette ai ricercatori di comprendere la gamma di ruoli svolti dal prodotto genico. Se l'allele originale fosse ipomorfo anziché nullo, i fenotipi associati all'allele originale potrebbero essere solo quelli più sensibili alla perdita parziale della funzione genica. Al contrario, se l'allele originale fosse nullo e causasse la morte prematura, non si potrebbe appurare se il prodotto genico ha funzioni interessanti più avanti nello sviluppo. In secondo luogo, la disponibilità di più alleli può aiutare i ricercatori a identificare il gene a livello molecolare: l'identificazione del gene spesso implica il confronto delle sequenze degli alleli wild-type e mutanti, e questo è molto più facile da at-

tuare quando sono disponibili molti alleli mutanti diversi. Infine, le sequenze di DNA di molti alleli mutanti diversi possono anche aiutare gli scienziati ad analizzare la relazione tra la struttura di un gene e la sua funzione; le sequenze mutanti potrebbero rivelare specifici elementi regolativi o amminoacidi chiave per la funzione del gene e/o del suo prodotto proteico.

**21.6 a.** L'allele  $rg^{\gamma^3}$  causa il fenotipo più grave (occhi molto ruvidi) ed è quindi l'allele più forte.

**b.** Poiché il fenotipo  $rg^{41}$  è più simile al tipo selvatico (meno grave), questo allele produce più proteine Rugose o la stessa quantità di proteina, ma più attiva rispetto all'allele  $rg^{\gamma^3}$ . (L'allele  $rg^{41}$  produce invece meno proteina Rugose o la stessa quantità di una proteina Rugose meno attiva rispetto all'allele wild-type.)

**c.** Il test di Muller confronta il fenotipo associato all'omozigosi per una mutazione recessiva con quello associato alla transeterozigosi per la stessa mutazione e una delezione del gene. Se questi due genotipi presentano fenotipi identici, la mutazione è una mutazione nulla. Se il genotipo mutazione/delezione ha un fenotipo più grave, la mutazione non è nulla ma ipomorfa. Le risposte alle parti (a) e (b) hanno stabilito che  $rg^{41}$  è un allele ipomorfo debole che produce almeno una certa quantità di proteina Rugose, quindi non può essere un allele nullo (con nessuna attività). Ciò lascia  $rg^{\gamma^3}$  come unico candidato per essere un allele nullo. Il test di Muller suggerisce che  $rg^{\gamma^3}$  è probabilmente un allele nullo perché il fenotipo di un omozigote  $rg^{\gamma^3}$  è lo stesso di un transeterozigote  $rg^{\gamma^3}/Df(1)JC70$ . Sappiamo che la delezione deve essere nulla per il gene  $rg$  perché il gene è del tutto assente. Se  $rg^{\gamma^3}$  codificasse almeno parzialmente proteine Rugose  $rg^{\gamma^3}/Df(1)JC70$  dovrebbe produrre la metà della quantità di prodotto genico degli omozigoti  $rg^{\gamma^3}$ , risultando in un fenotipo più grave, ma questo non è ciò che è stato osservato.

**d.** Un ricercatore che vuole comprendere tutte le funzioni di un gene deve conoscere la conseguenza per l'organismo di una completa perdita della funzione di quel gene, cioè il fenotipo nullo.

**e.** Il test di Muller potrebbe essere utilizzato per determinare se l'allele dominante è ipermorfo. Il fenotipo mutante delle mosche  $rg^{yper}/rg^+$  è dovuto a livelli di attività Rugose superiori ai livelli di tipo selvatico. Le mosche eterozigoti  $rg^{yper}/rg^+$  dovrebbero mostrare maggiore attività  $rg^+$  e quindi un fenotipo mutante più grave rispetto al-

le mosche *rg<sup>hyper</sup>/Df(1)JC70* se l'allele è davvero ipermorfo.

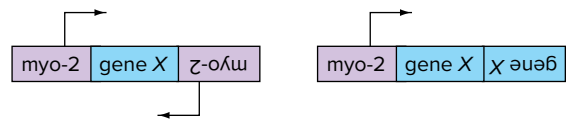
**f.** Il fenotipo mutante delle mosche *rg<sup>anti</sup>/rg<sup>+</sup>* è dovuto a livelli di attività Rugose inferiori ai livelli wild-type [ricordiamo che in un eterozigote, un allele antimorfo (dominante negativo) interferisce in qualche modo con l'attività dell'allele wild-type o quella del suo prodotto]. I moscerini eterozigoti *rg<sup>anti</sup>/Dp(rg<sup>+</sup>)* dovrebbero avere più attività Rugose e quindi un fenotipo mutante meno grave rispetto alle mosche *rg<sup>anti</sup>/rg<sup>+</sup>*.

**21.7 a.** Si potrebbero usare animali transgenici *myo-2::GFP* come background genetico in cui eseguire uno screening di mutagenesi per trovare vermi con una faringe morfologicamente anormale. L'espressione di GFP nella faringe renderà la struttura facilmente visibile *in vivo* nei vermi.

**b.** In primo luogo, si genera un costrutto genico in cui le sequenze wild-type codificanti per *pha4* sono fuse con la regione regolativa di un gene espresso in un organo diverso dalla faringe (per esempio la vulva, che fa parte dei genitali esterni della femmina). Se *pha4* è un regolatore principale della formazione della faringe, i vermi trasformati con il gene di fusione *pha4* dovrebbero trasformare le cellule della vulva in cellule faringee. Se i vermi contenessero anche il transgene *myo-2::GFP*, la trasformazione sarebbe visibile *in vivo* nei vermi, perché la GFP sarebbe espressa non solo nella faringe, ma anche nelle cellule situate dove normalmente si troverebbe la vulva.

**21.8** Per determinare se il gene *X* è importante per specificare la faringe, è lì che se ne deve bloccare l'espressione, mantenendo la sua normale espressione in tutti gli altri tessuti. Pertanto, si può far esprimere specificamente nella faringe un RNA a doppio filamento (RNAi) corrispondente al gene *X*. Un modo per raggiungere questo obiettivo è posizionare il gene *X* tra due regioni regolatrici di *myo-2* in modo che venga trascritto in direzioni opposte (vedi la figura a sinistra). In alternativa, si possono posizionare due copie del gene *X* orientate in direzioni opposte a valle di una singola regione regolativa per *myo-2* (come nella figura a destra); quando questi geni vengono trascritti, il risultato sarà un RNA a doppio filamento. Trasformando con questi costrutti vermi contenenti *myo-2::GFP*, verrà prodotto il dsRNA solo nella faringe perché la regione di regolazione di *myo-2* è attiva solo in quel tessuto. Poi si esamina il pattern della fluorescenza verde

per verificare se l'RNAi per il gene *X* interferisce con lo sviluppo faringeo.



**21.9 a.** Lo screening per i modificatori del fenotipo ipomorfo *sev<sup>-</sup>* (vedi Figura 21.4) si basa sulla vitalità e fertilità sia dei ceppi di partenza (omozigoti per *sev<sup>hypo</sup>*) sia dei moscerini F<sub>1</sub> con un fenotipo *sev-* modificato (potenziato o soppresso). Poiché l'EGFR è espresso in molti tessuti, quasi tutti gli alleli ipomorfi di *Egfr* sono letali recessivi. Potrebbe essere possibile trovare un allele *Egfr* raro e debolmente ipomorfo vitale e fertile e anche con un fenotipo morfologico utile per uno screening di modificatori. È interessante notare che, anche se questo fosse possibile, probabilmente si potrebbero trovare solo mutazioni di soppressione: i moscerini F<sub>1</sub> potenziati sarebbero probabilmente letali (perché il percorso biochimico a valle di *Egfr* funzionerebbe in modo molto inefficiente in una varietà di tessuti), rendendo impossibile recuperare i potenziatori nello stesso tipo di screening.

**b.** L'uso di moscerini transgenici in cui l'espressione di un allele mutante *Egfr* è confinata a un organo che non è essenziale in condizioni di laboratorio (come l'occhio) è un modo per aggirare il problema della letalità osservato nella parte (a). Per esempio, si potrebbe costruire un gene di fusione in cui le sequenze regolative trascrizionali specifiche dell'occhio guidano l'espressione di un cDNA *Egfr* che codifica per una proteina del recettore ipermorfo. (Questo è simile al transgene descritto in Figura 21.6a.) Poiché la segnalazione EGFR è utilizzata in una varietà di processi di sviluppo nell'occhio, le proteine del pathway Ras/MAPK sono presenti essenzialmente in tutte le cellule dell'occhio. Pertanto, l'*EGFR* ipermorfo altererebbe molti processi di sviluppo causando malformazioni oculari che potrebbero essere utilizzate come background per uno screening per i modificatori. Mediante questo transgene, i potenziatori identificherebbero i geni che antagonizzano la segnalazione EGFR, perché una mutazione a perdita di funzione in un tale gene aumenterebbe la segnalazione EGFR nell'occhio (che è già troppo alta a causa della mutazione ipermorfa). Eventuali soppressori trovati nello screening sarebbero mutazioni a perdita di funzione nei geni che intervengono nella trasmissione del segnale EGFR.



In alternativa, si potrebbe costruire un transgene per RNAi in cui le sequenze regolative specifiche dell'occhio guidano l'espressione di un esone *Egfr* in entrambe le direzioni. Potrebbe essere identificata una linea transgenica in cui l'espressione della proteina EGFR è soppressa, ma non del tutto abolita; questi moscerini avrebbero un allele *Egfr* ipomorfo specifico dell'occhio. Se un tale transgene RNAi fosse utilizzato come background nello screening, le mutazioni di potenziamento identificerebbero i geni necessari per la trasmissione della segnalazione EGFR, mentre i soppressori sarebbero mutazioni a perdita di funzione nei geni che antagonizzano la segnalazione EGFR.

**21.10 a.** Una proteina Ras negativa dominante espressa nei precursori R7 impedirebbe la segnalazione del recettore Sevenless; alcuni ommatidi negli occhi del moscerino mancherebbero di R7.

**b.** Usando una linea transgenica *sev::RasS17N* (Ras dominante negativa) come background nello screening, il fenotipo mutante è dovuto alla perdita della funzione Ras. Ciò significa che le mutazioni a perdita di funzione nei geni che trasmettono il segnale Sevenless verrebbero recuperate come potenziatori, mentre le mutazioni a perdita di funzione nei geni che antagonizzano la segnalazione Sevenless sarebbero soppressori. Pertanto, i geni che codificano per *Ras*, *Drk*, *Sos*, *Raf*, *Mek*, *MAPK* e *Pnt* potrebbero essere identificati come potenziatori e i geni per *Gap* e *Yan* come soppressori.

**c.** Se il background per lo screening fosse *sev::RasG12V* (Ras ipermorfo), il fenotipo mutante sarebbe dovuto a un eccesso della funzione Ras. Ciò significa che le mutazioni a perdita di funzione nei geni che trasmettono il segnale Sevenless verrebbero recuperate come soppressori, mentre le mutazioni a perdita di funzione nei geni che antagonizzano la segnalazione Sevenless sarebbero potenziatori. Pertanto, i geni che codificano per *Ras*, *Drk*, *Sos*, *Raf*, *Mek*, *MAPK* e *Pnt* potrebbero essere identificati come soppressori e i geni per *Gap* e *Yan* come potenziatori.

**21.11 a.** Diagrammando il testcross:

$w/w; ro^-/ro^+ P[w^+] \text{ ♀} \times w/w; ro^-/ro^- \text{ ♂} \rightarrow$   
 $\rightarrow$  si generano le quattro classi di progenie elencate nel problema.

L'allele  $ro^-$  del genitore maschio manifesta il fenotipo occhio ruvido se il cromosoma del genitore femminile è  $ro^-$ . Il transgene  $P[w^+]$  è un al-

lele dominante; in un background  $w/w$ , i moscerini con una copia di  $P[w^+]$  hanno gli occhi rossi e quelli senza  $P[w^+]$  hanno gli occhi bianchi. Pertanto, i fenotipi parentali sono 145 occhi rossi lisci ( $ro^+ P[w^+]$ ) e 142 occhi bianchi ruvidi ( $ro^-$ ), e i fenotipi ricombinanti sono 2 occhi bianchi lisci ( $ro^+$ ) e 1 occhi rossi ruvidi ( $ro^- P[w^+]$ ).

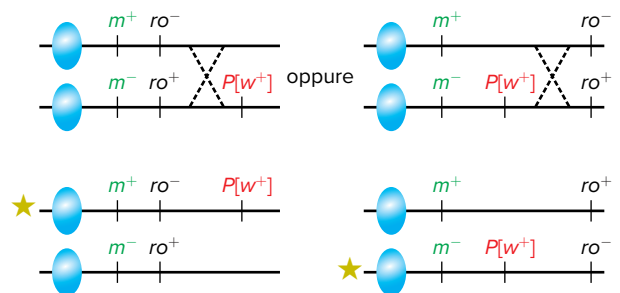
$$FR = (1 + 2)/(145 + 142 + 1 + 2) = 3/290 = 1\%.$$

Il gene *ro* e l'inserto  $P[w^+]$  sono linked con una distanza  $ro \leftrightarrow P[w^+]$  di 1 u.m.

**b.** I dati nella parte (a) non indicano se *ro* è più vicino al centromero (prossimale) o al telomero (distale) rispetto all'elemento  $P[w^+]$ . Per determinare le posizioni relative di centromero, *ro* e  $P[w^+]$ , il cromosoma  $P[w^+]$  del testcross originale dovrebbe contenere anche un'altra mutazione ( $m^-$ ) che causa un fenotipo mutante visibile e che è molto vicino al centromero. (La mutazione può essere dominante o recessiva; nell'esempio seguente,  $m^-$  è recessiva):

$$w/w; m^+ ro^-/m^- \{ro^+ P[w^+]\} \text{ ♀} \times w/w; m^- ro^-/m^- ro^- \text{ ♂} \rightarrow ??$$

(Le parentesi  $\{ \}$  nel genotipo qui sopra indicano che le posizioni relative del gene *ro* e dell'elemento  $P[w^+]$  non sono note.) Se *ro* è centromerico rispetto a  $P[w^+]$  (come mostrato sul lato sinistro del diagramma che segue), i crossing-over singoli tra *ro* e  $P[w^+]$  producono cromosomi  $m^+ ro^-$  e  $P[w^+]$ . Al contrario, se *ro* è telomerico rispetto a  $P[w^+]$  (come mostrato sul lato destro del diagramma), i crossing-over singoli tra *ro* e  $P[w^+]$  darebbero cromosomi  $m^- ro^- P[w^+]$ .



Pertanto, si osserva la progenie del testcross con occhi rossi e ruvidi: se la maggior parte ha il fenotipo associato a  $m^+$ , allora *ro* è centromerico rispetto a  $P[w^+]$ ; se la maggior parte ha il fenotipo associato a  $m^-$ , allora *ro* è telomerico rispetto a  $P[w^+]$ .

**c.** Il problema afferma che i siti di inserzione dei due diversi elementi  $P[w^+]$  sono distanti 5000 bp

(5 kb). Si può determinare con precisione questa distanza con la PCR inversa (vedi Figura 15.29) per trovare i siti di inserimento degli elementi trasponibili e quindi confrontare queste posizioni rispetto alla sequenza di riferimento del genoma di *Drosophila*, disponibile online. In una regione di 5000 bp, è probabile sia presente un solo gene, a meno che contenga alcuni piccoli geni. (Il genoma del moscerino ha una lunghezza totale di circa 130 Mb e contiene circa 13 000 geni codificanti proteine, quindi in media c'è solo un gene ogni 10 kb di DNA.)

Per discriminare tra i geni candidati, si può usare la sequenza del DNA genomico di questo gene per progettare coppie di primer per PCR che consentano di amplificare gli esoni dei geni candidati in diversi ceppi mutanti *ro*<sup>-</sup>. Sequenziando poi i prodotti della PCR si cercano le mutazioni che potrebbero alterare la funzione genica. Come affermato in precedenza nella risposta al Problema 5, parte (d), più alleli si analizzano in questo modo, più solida sarà l'identificazione del gene candidato corretto.

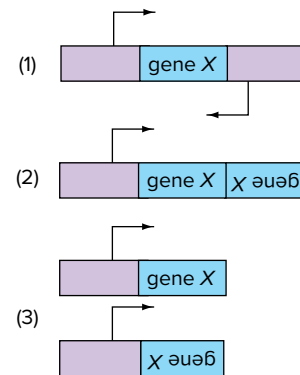
Infine, si verificherà l'associazione del gene candidato con il fenotipo mutante introducendo un transgene contenente il DNA genomico di tipo selvatico del gene candidato. Se il transgene recupera il fenotipo mutante, allora il transgene deve contenere il gene corrispondente alla mutazione *ro*<sup>-</sup>.

**d.** Il database del progetto genoma di *Drosophila* conterrà una "traduzione virtuale" dell'ORF del gene *rough*. È quindi possibile utilizzare un programma per computer come BLAST per confrontare la sequenza di amminoacidi del prodotto genico putativo con le sequenze di amminoacidi di altre proteine in altri organismi. L'output del programma BLAST mostrerà motivi di sequenza comuni che indicano funzioni particolari, come il legame al DNA, l'inserimento nella membrana cellulare ecc. Infatti, *rough* codifica un fattore di trascrizione con un dominio di legame al DNA chiamato omeodominio.

**21.12 a.** I diagrammi che seguono mostrano tre diversi modi per generare un RNA a doppio filamento corrispondente a un gene, con cui eliminare o ridurre l'espressione del gene stesso mediante l'RNAi. Nei diagrammi, il rettangolo viola corrisponde a una regione regolativa (enhancer e promotore) e i rettangoli blu sono tutto o parte del cDNA di un gene. Le frecce rappresentano la direzione secondo cui si muoverebbe l'RNA poli-

merasi nella trascrizione delle sequenze del gene *X* a partire da ciascun promotore.

Quali regioni regolative dovrebbero essere aggiunte a questi costrutti? La risposta non è semplice e dipende dallo scopo dell'esperimento. Se si vuole abbattere l'espressione del gene *X* in tutti i tessuti in cui è espresso, in teoria la regione di regolazione dovrebbe essere quella del gene *X*. Tuttavia, non è sempre chiaro quali sequenze di DNA in prossimità del gene dovrebbero essere incluse per garantire che siano compresi tutti gli elementi regolativi. Un'alternativa è esprimere il costrutto RNAi in tutti i tessuti; per esempio, la regione di regolazione potrebbe essere quella di un gene dello shock termico e i moscerini potrebbero essere allevati ad alta temperatura. Ancora, un'altra alternativa è esprimere le sequenze del gene *X* specificamente in un tessuto di interesse; la parte (b) di questo problema descrive un metodo efficiente per raggiungere questo obiettivo.



**b.** Il modo migliore per eseguire uno screening di RNAi per i geni di sviluppo delle ali è utilizzare il sistema di espressione binaria Gal4/UAS<sub>G</sub> (vedi il riquadro Gli strumenti di genetica nel Capitolo 18). Un punto di forza di questo metodo è di poter sfruttare linee di moscerini transgenici già esistenti, ognuna delle quali ha un transgene per l'RNAi che prende di mira un gene diverso e la cui espressione è guidata da UAS<sub>G</sub>. Come mostrato nella figura che segue, si incrocia ciascuna linea RNAi con una linea driver Gal4 specifica per l'ala, per generare moscerini che contengono entrambi i transgeni. Il fattore di trascrizione Gal4 sarà espresso specificamente nelle ali e attiverà nel tessuto alare la trascrizione di un dsRNA per il gene *X* che abatterà l'espressione del gene *X* endogeno.



Infine, si effettua uno screening per ceppi di moscerini con ali anormali generate dall'abbattimento dell'espressione del gene *X* nelle ali.

Alcuni geni *X* con ruoli nello sviluppo delle ali potrebbero essere pleiotropici, per cui i mutanti classici, che eliminano la loro espressione ovunque, porterebbero alla letalità; quindi, questi geni non verrebbero rilevati negli screening per questo tipo di mutanti. Il sistema di espressione binaria Gal4/UAS<sub>G</sub> aggira questo problema perché l'RNA interferente sarà espresso solo nell'ala; quindi, si potrebbero identificare i geni pleiotropici che operano nello sviluppo delle ali.

**21.13** Nutrire i nematodi con i batteri che esprimono RNAi per il gene *par-1*, abbastanza tardi nel loro sviluppo per permettere di completare la prima funzione di *par-1*. (I batteri che esprimono RNAi per un gene di *C. elegans* sono batteri che ospitano costrutti che producono RNA a doppio filamento per geni di interesse come *par-1*. Questi costrutti assomiglierebbero a quelli illustrati sopra nelle risposte al Problema 8 e al Problema 12, parte (a), con la differenza che le regioni regolatrici dovrebbero essere promotori forti procariotici che operano nelle cellule batteriche.)

**21.14 a.** Il pattern di espressione dell'mRNA di *rugose* in embrioni di moscerino *in toto*, o tessuti dissezionati da diversi stadi di sviluppo, può essere monitorato attraverso esperimenti di ibridazione in situ dell'RNA come quello mostrato in Figura 21.19a. In alternativa, è possibile isolare campioni di molti tipi di tessuti e determinare i livelli relativi di espressione dell'mRNA attraverso il sequenziamento ad alta risoluzione (RNA-Seq) di milioni di cDNA preparati dall'mRNA totale di ciascun tessuto. La frequenza con cui si presentano le read di un qualsiasi tipo di cDNA indica l'abbondanza relativa dell'mRNA corrispondente. L'espressione proteica può essere rilevata colorando embrioni interi o tessuti con anticorpi. Sebbene nella maggior parte dei casi i livelli di espressione dell'mRNA e di espressione proteica in un tessuto siano direttamente correlati, questo non è sempre il caso perché la regolazione a livello di traduzione può aumentare o inibire la traduzione di particolari mRNA.

L'espressione genica in un particolare tipo cellulare non significa che il prodotto genico sia necessariamente richiesto a quel livello; i geni possono avere ruoli ridondanti.

**b.** Se gli esperimenti riportati nella parte (a) non evidenziano né l'mRNA, né la relativa proteina (o mostrano l'mRNA, ma non la proteina, come

ci si potrebbe aspettare per una mutazione non senso subito dopo il codone di inizio), allora l'allele è potenzialmente nullo. Tuttavia, un tale risultato di per sé non sarebbe assolutamente definitivo, perché l'allele potrebbe essere ancora un ipomorfo e l'mRNA o il prodotto proteico potrebbero essere presenti a livelli così bassi da essere al di sotto del livello di rilevamento. D'altra parte, anche se si rilevano mRNA e proteine (in quantità normali o inferiori al normale), non si può concludere che l'allele non sia una mutazione nulla perché il prodotto proteico che si osserva potrebbe essere completamente non funzionante. Pertanto, l'osservazione dei livelli di mRNA e proteine è utile ma non conclusiva per distinguere tra alleli ipomorfi e nulli. Ulteriori informazioni che potrebbero rafforzare una conclusione provvisoria includono la natura molecolare dell'allele mutante (è una mutazione non senso o frameshift?), saggi per la funzione della proteina e l'incrocio del ceppo mutante con un ceppo recante una delezione per la regione in questione (test di Muller), come descritto nel Problema 6.

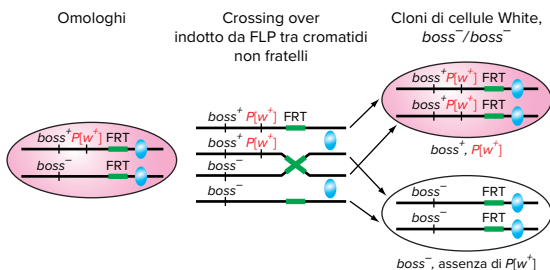
L'ibridazione in situ dell'RNA (o l'RNA-Seq) e la immunocolorazione con gli anticorpi potrebbero talvolta essere utili per discriminare tra i diversi tipi di alleli dominanti. Gli alleli antimorfi spesso, ma non sempre, hanno livelli elevati di mRNA e proteine rispetto al tipo selvatico; il motivo è che la sovraespressione del prodotto genico mutante può essere necessaria per antagonizzare la funzione del prodotto genico di tipo selvatico. Gli alleli ipermorfi possono produrre quantità eccessive del prodotto genico normale o prodotti genici alterati che funzionano in modo più efficiente rispetto al tipo selvatico. Pertanto, un allele ipermorfo può o meno produrre livelli elevati di mRNA o proteine. Gli alleli neomorfi possono produrre prodotti genici mutanti che funzionano in modo diverso dal tipo selvatico, oppure producono prodotti genici di tipo selvatico ma con pattern di espressione anomali (espressione ectopica). In sintesi, se i pattern di espressione dell'RNA e della proteina appaiono di tipo selvatico, l'allele potrebbe essere antimorfo, ipermorfo o neomorfo; se si osserva un'espressione ectopica, l'allele è probabilmente neomorfo; se si osservano più mRNA o proteine rispetto alle quantità di tipo selvatico, allora l'allele è probabilmente antimorfo o ipermorfo.

**21.15 a.** Boss è il ligando, espresso in R8, per il recettore Sevenless, espresso in cinque cellule precur-

sori R7. Gli ommatidi a mosaico con un fenotipo wild-type (R7 presente) devono avere R8 rossi che sono  $w^+boss^+$ ; gli ommatidi a mosaico con un fenotipo mutante (R7 assente) devono avere R8 bianchi che sono  $w^-boss^-$ . I genotipi per i geni  $w$  e  $boss$  delle altre cellule di qualsiasi ommatidio non determinano se l'ommatidio avrà o meno una cellula R7. Pertanto, il fulcro dell'azione del gene  $boss^+$  è la cellula R8.

**b.** Il diagramma che segue mostra i due omologhi del cromosoma 3 nei moscerini utilizzati per l'esperimento del mosaico descritto nella parte (a). Il genoma di questi moscerini deve contenere anche un gene che codifica per la ricombinasi FLP, la cui espressione può essere indotta durante il processo di sviluppo dell'occhio nelle larve di *Drosophila* (non mostrato). Un modo per raggiungere questo obiettivo è impiegare un transgene in cui le sequenze codificanti per FLP sono poste sotto il controllo di un enhancer/promotore di shock termico e quindi far crescere le larve ad alte temperature durante lo stadio chiave.

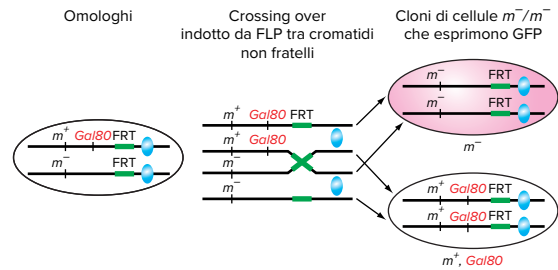
Da notare che nel diagramma che segue è fondamentale che la FRT sia prossimale sia a  $P[w^+]$  sia a  $boss$  (cioè, la FRT dovrebbe essere più vicina al centromero), in modo che quando FLP catalizza la ricombinazione mitotica sito-specifica tra i siti FRT, la progenie risultante sia anche omozigote per entrambi i loci, per cui tutte le cellule di colore bianco (cioè le cellule prive di  $P[w^+]$ ) saranno anche omozigoti per  $boss^-$ .



**21.16 a.** La figura che segue mostra il genotipo di moscerini in cui la tecnica MARCM potrebbe essere utilizzata per generare cloni di cellule che esprimono GFP e sono omozigoti per un allele mutante di un gene di interesse ( $m^-/m^-$ ). Tutte le cellule che contengono sequenze codificanti per il gene del lievito *Gal80* esprimeranno la proteina *Gal80* perché è posta a valle di un enhancer/promotore che opera in tutte le cellule. Questi moscerini contengono anche altri tre transgeni che si trovano altrove nel genoma e non sono mostrati: (1) un transgene  $UAS_GFP$ ; (2) un transgene

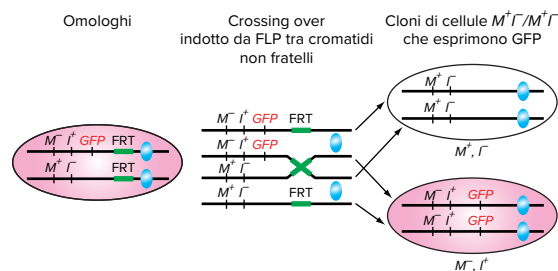
che può esprimere la ricombinasi FLP; (3) un transgene che può esprimere ubiquitariamente la proteina *Gal4*.

Nessuna delle cellule di questo moscerino produrrà GFP, a eccezione delle cellule derivate dalla ricombinazione mitotica FLP/FRT, che sono  $m^-/m^-$  e che mancano anche della proteina *Gal80* che regola negativamente la proteina *Gal4* che induce l'espressione di *GFP*. Pertanto, tutte le cellule che emettono fluorescenza verde devono essere  $m^-/m^-$ , consentendo ai ricercatori di esaminare il fenotipo delle cellule che sono omozigoti mutanti.



**b.** I cloni omozigoti  $m^-/m^-$  potrebbero essere limitati al sistema nervoso adulto se l'espressione di FLP viene posta sotto un enhancer specifico del sistema nervoso adulto.

**21.17** Come mostra il diagramma che segue, il metodo migliore è sfruttare il sistema FLP/FRT descritto in Figura 21.10 e nei Problemi 15 e 16. Inoltre, sarebbe bene includere un transgene che esprime GFP in modo ubiquitario (come nel Problema 16) in modo che i ricercatori possano identificare i cloni desiderati  $M^+ l^-/M^+ l^-$ , doppiamente omozigoti perché saranno le uniche cellule che non emettono fluorescenza in verde. Il sito FRT deve essere prossimale (più vicino al centromero) rispetto al gene *M*, al gene *l* e al transgene *GFP*. L'ordine degli altri elementi è meno importante perché quasi tutti gli eventi di ricombinazione mitotica che si verificano avverranno tra i siti FRT.



**21.18** Gli alleli mutanti i cui prodotti proteici si ripiegano in modo errato quando la temperatura vie-



ne aumentata (alleli ad attività ts) sono più utili per esperimenti di variazione della temperatura rispetto agli alleli mutanti i cui prodotti proteici si ripiegano in modo errato solo quando la temperatura viene aumentata durante la traduzione (alleli a traduzione ts). Il motivo è che la proteina codificata dall'allele ad attività ts diventerà inattiva immediatamente quando la temperatura viene aumentata. Al contrario, per gli alleli a traduzione ts, saranno interessate solo le proteine sintetizzate dopo il cambio di temperatura; la proteina precedentemente sintetizzata potrebbe essere stabile per molto tempo dopo lo shift di temperatura e la sua presenza potrebbe complicare la determinazione di quando la proteina è richiesta.

**21.19 a.** I dati indicano che *zyg-9* è richiesto a partire da circa 52 minuti fino a 70 minuti dopo la fecondazione. (Supponiamo che l'allele ts *zyg-9* utilizzato sia ts per l'attività come definito nella risposta al Problema 18.) Se gli embrioni vengono esposti prima o dopo questa finestra di tempo, gli animali si sviluppano normalmente anche se la proteina *Zyg-9* è stata inattivata durante l'esposizione ad alta temperatura.

**b.** Un allele wild-type (*zyg-9*<sup>+</sup>) fornito all'embrione precoce dallo spermatozoo non ha alcun effetto sulla polarità dell'embrione; cioè, non può recuperare il fenotipo mutante *zyg-9*. Il motivo è che *zyg-9* è un gene a effetto materno; in questo caso, né l'allele materno né quello paterno nel genoma dell'embrione sono espressi in questa fase iniziale dell'embriogenesi. L'mRNA (e/o la stessa proteina ts *Zyg-9*) sono stati trascritti dal genoma materno (e/o tradotti) e quindi depositati nell'uovo. In effetti, il periodo sensibile alla temperatura si verifica così presto dopo la fecondazione che i geni *zyg-9* nelle cellule embrionali non sono ancora stati trascritti.

Sulla base delle informazioni fornite, un'altra possibilità è che ci si trovi di fronte a un fenomeno di imprinting, a causa del quale l'allele del maschio non viene espresso mentre viene espresso quello del gamete femminile. Tuttavia, questo scenario non coincide con il fatto appena esposto che il periodo sensibile alla temperatura si verifica prima che uno qualsiasi dei geni nel genoma dello zigote venga espresso.

**21.20** Un confronto delle due colonne più a sinistra del diagramma riportato nel problema mostra che dopo 4 ore alla temperatura restrittiva il solco morfogenetico è avanzato anteriormente di 2 righe. Durante queste 4 ore, ogni ommatidio nella

colonna all'estrema sinistra del diagramma è maturato nella forma alla sua destra lungo la riga orizzontale. Nel diagramma sono mostrati cinque esempi di tale maturazione.

Per determinare i diversi requisiti per la proteina Notch, si può confrontare lo sviluppo di ommatidi di tipo selvatico (colonna centrale nel diagramma), dopo 4 ore a temperatura restrittiva, con mutanti *N<sup>ts</sup>* (colonna più a destra nel diagramma). Partendo dall'ommatidio più anteriore, e quindi dal primo evento di sviluppo (riga 1), e spostandosi posteriormente verso la riga 5, si può verificare che *Notch* è necessario per:

- (Riga 1) Determinare R8 (se la proteina Notch è inattivata prima che le cellule R8 si siano formate in una riga, allora non si formano cellule R8 in quella riga);
- (Riga 2) Regolare la spaziatura degli ommatidi all'interno di righe (se la proteina Notch è inattivata dopo che le cellule R8 si sono formate nella fila, queste cellule R8 diventano più strettamente giustapposte di quanto non siano se Notch è attivo);
- (Riga 3) Impedire a fotorecettori extra di aggiungersi all'ommatidio tra R3 e R4 (se Notch è inattivato dopo che le cellule R8 sono state determinate ed è già stata stabilita la corretta spaziatura degli ommatidi, gli ommatidi nella riga hanno un fotorecettore extra tra R3 e R4);
- (Riga 5) Determinare R7 (se Notch è inattivato prima della determinazione delle cellule R7, le cellule R7 non si formano).

**21.21** Molto probabilmente, i mutanti ipomorfi *Fgf8* potrebbero essere stati ottenuti in uno screening di mutagenesi per animali con inversione sinistra/destra. In alternativa, si potrebbe utilizzare la tecnologia CRISPR/Cas9 per alterare il gene *Fgf8*. Per esempio, le sostituzioni amminoacidiche potrebbero produrre una proteina meno efficiente, oppure modificazioni del promotore o dell'enhancer potrebbero portare a una minore trascrizione del gene. Per eseguire l'editing del genoma, tuttavia, è necessario conoscere come funziona la proteina o come viene regolata la trascrizione del gene, al fine di prevedere quali tipi di cambiamenti produrrebbero un allele ipomorfo.

**21.22 a.** Negli embrioni da madri mutanti *pelle*<sup>-</sup>/*pelle*<sup>-</sup>, la proteina Dorsal è localizzata nel citoplasma lungo tutto l'asse dorso ventrale (DV). Negli embrioni di madri mutanti *Toll<sup>D</sup>/Toll<sup>+</sup>*, la proteina Dorsal è localizzata nei nuclei lungo tutto l'asse DV.

**b.** La proteina Dorsal è mal localizzata sia nei mutanti *pelle<sup>-</sup>/pelle<sup>-</sup>*, sia in quelli *Toll<sup>D</sup>/Toll<sup>+</sup>*, ma né l'espressione della proteina Pelle, né quella di Toll sono colpite negli embrioni di madri mutanti *dorsal<sup>-</sup>/dorsal<sup>-</sup>*. Ciò vuol dire che *dorsal* funziona a valle sia di *pelle*, sia di *Toll*. Le proteine Pelle e Dorsal regolano la localizzazione della proteina Dorsal, da cui dipende il destino cellulare lungo l'asse DV. Questi dati, però, non ci permettono di ordinare temporalmente l'azione di *pelle* e *Toll*.

**c.** Il livello più alto di localizzazione nucleare di Dorsal specifica i nuclei più ventrali. Quindi, gli embrioni di madri *Toll<sup>D</sup>/Toll<sup>+</sup>* sono ventralizzati perché tutte le cellule lungo l'asse DV "pensano" di essere le cellule più ventrali, in quanto i loro nuclei hanno i massimi livelli della proteina Dorsal. Viceversa, gli embrioni di madri mutanti *pelle<sup>-</sup>/pelle<sup>-</sup>* sono "dorsalizzati" perché tutte le cellule lungo l'asse DV "pensano" di essere più dorsali poiché mancano della localizzazione nucleare di Dorsal.

**21.23 a.** Lo screening ha identificato 67 geni necessari per l'udito tra gli alleli amorfi del 15% dei geni del genoma. L'aspettativa è quindi di identificare circa 447 geni necessari per l'udito in una collezione di topi omozigoti per alleli amorfi del 100% dei geni. (Una tale collezione non potrebbe esistere, tuttavia, poiché gli alleli amorfi di molti geni sono letali in omozigosi.) Tuttavia, non tutti questi geni sono necessariamente richiesti specificamente per l'udito [vedi parte (b)].

**b.** Poiché gli omozigoti sono vitali, i ricercatori possono essere sicuri che gli alleli amorfi non sono omozigoti letali. I geni potrebbero essere ancora pleiotropici, tuttavia, se la funzione diversa dall'udito non è vitale. I topi dovrebbero essere testati per caratteristiche mutanti diverse dalla compromissione dell'udito.

**c.** Poiché i modi in cui odono sono così diversi, è probabile che i geni necessari per l'udito nei moscerini della frutta e nei topi siano diversi.

**d.** I 67 geni dell'udito identificati potrebbero codificare praticamente qualsiasi tipo di prodotto genico, perché l'udito richiede interazioni tra orecchi, nervi e cellule cerebrali. Questi organi e tipi cellulari devono svilupparsi correttamente e quindi devono svolgere le loro varie funzioni.

**e.** No; non tutti i 67 geni dovrebbero essere espressi nell'orecchio. Come spiegato nella parte (d), alcuni dei geni potrebbero funzionare nel cervello e altri nelle cellule nervose.

**f.** Gli scienziati potrebbero eseguire l'ibridazione in situ dell'RNA su cervello, sistema nervoso e

tessuto dell'orecchio. Le sonde sarebbero copie clonate di ciascuno dei 67 geni del topo.

**21.24 a.** Il fenotipo mutante *sev<sup>-</sup>* è assenza di R7; il fenotipo mutante *yan<sup>-</sup>* genera fino a cinque R7. I doppi mutanti *sev<sup>-</sup>yan<sup>-</sup>* mostrano il fenotipo *yan<sup>-</sup>*, quindi *yan<sup>-</sup>* è epistatico su *sev<sup>-</sup>*.

**b.** Yan reprime la trascrizione dei geni bersaglio che promuovono lo sviluppo di R7 e la modulazione della funzione di Yan avviene a valle di Sevenless. L'attivazione di Sevenless provoca l'inattivazione di Yan e quindi la de-repressione dei geni che promuovono la determinazione delle cellule R7. Se Yan è assente, l'attivazione Sevenless non è più necessaria per de-reprimere i geni bersaglio. Pertanto, è logico che *yan<sup>-</sup>* sia epistatico su *sev<sup>-</sup>*.

**c.** Due mutazioni nulle, come *sev<sup>-</sup>* e *yan<sup>-</sup>*, possono generare fenotipi diversi mutanti se funzionano in modo antagonistico nello stesso pathway.

**d.** La Figura 21.6 mostra che *Ras<sup>GV12</sup>* attivo costitutivamente fa sì che cinque cellule in ciascun ommatidio diventino R7 (proprio come nel caso delle mutazioni nulle *yan<sup>-</sup>*). La Figura 21.13 mostra che questo fenotipo a cinque cellule R7 è in entrambi i casi epistatico rispetto al fenotipo *sev<sup>-</sup>*. Ras e Yan agiscono entrambi a valle di Sevenless, ma nel pathway Ras opera nella stessa direzione di Sevenless, mentre le funzioni di Yan e Sevenless sono antagoniste. Ha quindi senso che un allele mutante Ras costitutivamente attivo e un allele nullo di *yan* possano causare lo stesso fenotipo mutante e che entrambe queste mutazioni siano epistatiche su un allele null *sev*.

**21.25 a.** La cascata di determinazione del sesso in *Drosophila* è un percorso di commutazione/regolazione. L'interruttore è *Sxl* e il segnale è il numero di cromosomi X. Nelle cellule con due cromosomi X (XX), l'interruttore viene attivato (viene trascritto *Sxl*); nelle cellule con un cromosoma X (XY), l'interruttore viene commutato su OFF (*Sxl* non viene trascritto).

**b.** In termini di morfologia, gli animali XY che sono *tra<sup>-</sup>* o *ix<sup>-</sup>* sono maschi normali. Le ragioni sono che i moscerini XY normalmente non producono né proteine Tra né Dsx-F e Ix è richiesto solo per la funzione Dsx-F. Animali XX che sono *tra<sup>-</sup>* sono morfologicamente maschi; senza Tra, il trascritto primario *dsx* subisce uno splicing che produce Dsx-M, che causa la morfologia maschile. Animali XX che sono *ix<sup>-</sup>* saranno degli inter Sesso; Dsx-F viene prodotto e può attivare i geni della morfologia femminile, ma senza Ix, Dsx-F

non può reprimere i geni della morfologia maschile. Pertanto, in questi animali sono attivi sia i geni della morfologia maschile sia quelli della morfologia femminile.

**c.** Negli animali XY, i doppi mutanti  $tra^-ix^-$  non mostrano fenotipo mutante [cioè, sono maschi normali, come spiegato nella risposta alla parte (b)]. Negli animali XX, ci si aspetterebbe che i doppi mutanti  $tra^-ix^-$  abbiano il fenotipo mutante  $tra^-$  (cioè, questi animali sono morfologicamente maschi). Indipendentemente dai cromosomi sessuali, in assenza di Tra viene prodotto Dsx-M invece di Dsx-F. Poiché Ix è richiesto solo per la funzione Dsx-F, la sua assenza non ha effetto in un background  $tra^-$ ; pertanto,  $tra^-$  è epistatico in  $ix^-$ .

**d.** Nei precedenti esempi di  $sev^-Ras^{G12V}$  e  $sev^-yan^-$  (discussi nel Problema 24), il gene epistatico era quello a valle. Tuttavia, come descritto nella parte (c) qui sopra, in alcuni pathway il gene epistatico può essere il gene a monte. Cosa spiega questa differenza? La risposta ha a che fare con lo stato del segnale nelle cellule interessate dalla mutazione: cioè, se le cellule che esprimono il fenotipo mutante sono cellule in cui il segnale normalmente accende l'interruttore oppure lo spegne.

Gli esempi  $sev^-Ras^{G12V}$  e  $sev^-yan^-$  hanno una caratteristica in comune; in entrambi i casi, una delle mutazioni ( $sev^-$ ) fa sì che mostrino il fenotipo mutante quelle cellule in cui il segnale normalmente posizionerebbe l'interruttore su ON, mentre l'altra mutazione ( $Ras^{G12V}$  o  $yan^-$ ) induce il fenotipo mutante nelle cellule in cui il segnale normalmente posizionerebbe l'interruttore su OFF (vedi Figura 21.13). Normalmente, la cellula precursore R7 che tocca R8 verrebbe attivata dal segnale Boss sulla superficie di R8, ma in occhi  $sev^-$  senza un recettore Sevenless funzionale, la cellula precursore R7 non può rispondere a Boss. D'altra parte, nei mutanti  $Ras^{G12V}$  o  $yan^-$ , il fenotipo mutante si manifesta in cellule in cui l'interruttore sarebbe normalmente OFF, cioè cellule che non toccano R8 e i cui recettori Sevenless non sono attivati dal ligando Boss, ma diventano R7 in modo inappropriato. In casi come questo, quando nei doppi mutanti le due mutazioni provocano un fenotipo mutante in cellule con stati opposti di segnale, il gene epistatico è quello a valle della via.

Nel caso dei mutanti  $tra^-$  e  $ix^-$ , le cellule in cui si verifica ciascun fenotipo mutante sono cellule XX. Nelle parti (a) e (b) abbiamo verificato che il segnale per la determinazione del sesso in

*Drosophila* è il numero di cromosomi X e che nelle cellule XX l'interruttore (*Sxl*) è attivato, il che significa che il gene *Sxl* è trascritto. Abbiamo anche determinato che sia  $tra^-$  sia  $ix^-$  causano fenotipi mutanti solo negli animali XX, nelle cui cellule l'interruttore normalmente è attivato. In casi come questo, quando entrambe le mutazioni nei doppi mutanti causano fenotipi anormali nelle cellule in cui l'interruttore è normalmente attivato, la mutazione epistatica colpisce il passaggio a monte del percorso. (Lo stesso sarebbe vero se entrambe le mutazioni mostrassero fenotipi mutanti nelle cellule in cui l'interruttore è normalmente disattivato.)

Lo scopo di questa domanda è mostrare che l'interpretazione dei risultati dell'analisi dell'epistasi può essere complessa. Chiaramente, gli scienziati devono verificare qualsiasi ordine provvisorio di eventi che è stato dedotto da interazioni epistatiche con altri esperimenti che svelano i processi biochimici di base.

**21.26 a.** L'eredità materna del DNA degli organelli (come discusso nel Capitolo 16) implica che tutti gli organelli contenenti propri genomi (mitocondri o cloroplasti) sono trasmessi nel citoplasma dell'uovo, mentre nel caso dell'effetto materno i prodotti dei geni (RNA e/o proteine) espressi dal genoma materno, non il DNA stesso, vengono depositati nel citoplasma dell'uovo. Entrambi questi tipi di eredità possono influenzare il fenotipo della progenie.

**b.** Il modello dell'eredità mitocondriale è che le madri con il carattere trasmettono il fenotipo mutante a tutta (o parte, nel caso dell'eteroplasmia) della loro progenie (maschi e femmine) in ogni generazione. Tuttavia, i maschi affetti non trasmetteranno mai il carattere. Per i geni a effetto materno (caratteri recessivi), tutta la progenie (maschi e femmine) di una femmina mutante omozigote mostrerà il carattere, ma nessun membro di questa progenie (maschi o femmine) trasmetterà il carattere alla generazione successiva a meno che (in rari casi) la progenie femminile affetta abbia anche ereditato l'allele mutante del gene a effetto materno con il gamete paterno.

**21.27 a.** In una linea pura di lumache sinistrorse, tutte le lumache sono  $s^-/s^-$ ; in una linea pura di lumache destrorse, il genotipo è  $s^+/s^+$ . In un incrocio di ermafroditi  $s^-/s^-$  con maschi  $s^+/s^+$ , gli ermafroditi forniscono le uova. Poiché *s* è un gene a effetto materno, tutta la progenie mostra il fenotipo  $s^-$  (sinistrorso).

**b.** In un incrocio di ermafroditi  $s^+/s^+$  con maschi  $s^-/s^-$ , gli ermafroditi  $s^+/s^+$  forniscono le uova. Poiché  $s$  è un gene a effetto materno, tutta la progenie avrà il fenotipo  $s^+$  (destrorso).

**c.** La  $F_1$  della parte (a) e della parte (b) sono entrambe  $s^+/s^-$  indipendentemente dal fenotipo materno che mostrano. Se gli ermafroditi  $F_1$  si autofecondano, tutta la progenie  $F_2$  sarà destrorsa indipendentemente dai propri genotipi. Il motivo è che il prodotto genico codificato dall'allele materno  $s^+$  dominante, presente nel genoma della  $F_1$ , sarà presente in tutte le uova che danno origine alla generazione  $F_2$ .

**d.** La  $F_2$  degli incroci (a) e (b) è  $1/4 s^+/s^+ : 1/2 s^+/s^- : 1/4 s^-/s^-$ . La  $F_2 s^+/s^+$  e  $s^+/s^-$  produrrà per autofecondazione tutta progenie destrorsa (l'allele materno  $s^+$  fornirà un prodotto genico di tipo selvatico alle uova), mentre la  $F_2 s^-/s^-$  produrrà per autofecondazione tutta progenie sinistrorsa (assenza di  $s^+$  nel genoma materno, quindi nessun prodotto genico di tipo selvatico viene inserito nelle uova).

**21.28 a.** Le femmine  $F_3$  erano omozigoti per mutazioni casuali a perdita di funzione, mentre lo screening richiedeva di esaminare la progenie  $F_4$  per i difetti di segmentazione. Se il prodotto di un particolare gene mutante svolgesse un ruolo essenziale al di fuori della linea germinale, le femmine omozigoti  $F_3$  sarebbero morte anziché sterili, quindi non verrebbe prodotta alcuna progenie  $F_4$ .

**b.** Esaminare i maschi  $F_3$  omozigoti per il mutante in questione e determinare se presentano un fenotipo mutante; se lo fanno, la mutazione a effetto materno svolge un ruolo anche nei maschi. Oltre all'ispezione visiva di questi maschi  $F_3$ , altri fenotipi da analizzare includono la longevità, il comportamento e la fertilità.

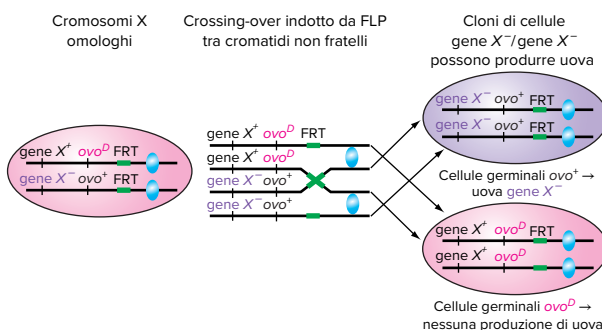
**c.** Il cromosoma bilanciante ha consentito sia il mantenimento sia l'identificazione di mutanti omozigoti. Il bilanciante ha impedito che avvenisse una ricombinazione nella  $F_2$ , mantenendo così il marcatore  $Cy$  e la mutazione  $m^-$  su cromosomi separati. Questo implica che gli omozigoti  $m^-/m^-$  possono essere identificati come mosche  $F_3$  senza ali, propagando il cromosoma  $m^-$  in moscerini  $m^-/bilanciante$ . (Il mutante non può essere mantenuto come ceppo omozigote perché le femmine omozigoti per una mutazione a effetto materno sono sterili.)

**21.29 a.** Se il gene  $X$  si trova sul cromosoma  $X$ , le femmine transeterozigoti per una mutazione  $X^-$  del gene e una mutazione  $ovo^D$ , entrambe su cromosomi con FRT vicino al centromero, potrebbero essere utilizzate per generare nella linea germi-

nale, tramite FLP, cloni omozigoti per il gene  $X^-$ , come mostrato nella figura che segue. (I moscerini devono anche recare un transgene che può far esprimere FLP nella linea germinale femminile [non mostrato].) Poiché le cellule della linea germinale  $ovo^D/ovo^+$  non producono uova, tutte le uova prodotte da queste femmine devono derivare dalla ricombinazione mitotica e quindi devono provenire da cellule della linea germinale  $X^- ovo^+/X^- ovo^+$  (ombreggiate in azzurro nella figura). Si noti che è fondamentale che sia il gene  $X$  che il gene  $ovo$  siano distali rispetto al sito FRT ed è auspicabile che  $ovo$  sia prossimale al gene  $X$ .

(I) Per determinare se l'RNA e/o la proteina del gene  $X$  sono normalmente forniti alle uova per via materna, si prelevano uova non fecondate da una madre wild-type e uova derivate da cellule germinali omozigoti per il gene  $X$  usando la tecnica  $ovo^D$ . Si deve quindi monitorare l'RNA (mediante ibridazione in situ per l'RNA o RNA-Seq) o la proteina (colorazione con l'anticorpo) nei due campioni di uova. L'allele  $X^-$  del gene sarebbe molto utile per questo scopo se fosse un allele veramente nullo che non produce RNA o proteina. Se l'RNA o la proteina fossero forniti dalla madre alle uova, si troverebbero nelle uova della madre wild-type ma non nelle uova dei cloni  $X^-$  della linea germinale. (Cioè, quest'ultimo campione servirebbe come controllo negativo nell'esperimento.)

(II) Se i prodotti del gene  $X$  forniti dalla madre non sono necessari per una corretta embriogenesi, le uova da cellule germinali omozigoti  $X^-$ , fecondate con spermatozoi di tipo selvatico (gene  $X^+$ ), dovrebbero svilupparsi normalmente. Se per l'embriogenesi sono invece necessari i prodotti materni del gene  $X$  (cioè, se il gene  $X$  è un gene a effetto materno), le uova fecondate dai cloni  $X^-$  della linea germinale non si svilupperanno correttamente, anche se fecondate da spermatozoi che recano gene  $X^+$ .



**b.** Il gene mutante  $ovo^D$  è stato clonato e questo allele è dominante rispetto all'allele wild-type.



Pertanto, utilizzando la trasformazione mediata dall'elemento *P* (descritta in Figura 20.3), è possibile generare moscerini contenenti un transgene *ovo<sup>D</sup>* inserito in posizioni casuali nel genoma. Se il genoma contenesse già un sito FRT molto vicino al centromero di un autosoma, alcuni di questi trasformanti avrebbero il transgene *ovo<sup>D</sup>* sullo stesso cromosoma di un sito FRT. Si potrebbe quindi far accoppiare i trasformanti con un ceppo contenente una presunta mutazione a effetto materno e un'altra copia di FRT su un autosoma omologo. In questo modo, si potrebbe condurre lo stesso esperimento mostrato nella risposta alla parte (a) per i geni di interesse su qualsiasi cromosoma.

**c.** Come descritto nella parte (a), se il gene *X* è un gene a effetto materno, le cellule germinali omozigoti  $X^-/X^-$  produrranno uova  $X^-$ ; ma anche se sono fecondate con il gene  $X^+$  dello spermatozoo, non andranno incontro a un'embriogenesi normale. Se il gene *X* è necessario per l'oogenesi, anche i cloni di cellule  $X^-/X^-$  della linea germinale, che hanno perso la mutazione *ovo<sup>D</sup>* [vedi il diagramma nella parte (a)] non produrranno uova. Se un gene è richiesto per l'oogenesi ed è anche un gene a effetto materno, la funzione a effetto materno sarebbe mascherata.

**d.** Anche se non si è in grado di trovare una risposta specifica a questa domanda, si può tenere conto che i ceppi di moscerini possono essere mantenuti in modo tale che la mutazione *ovo<sup>D</sup>* sia presente solo nei maschi. Ricordiamo dal Capitolo 3 che i moscerini della frutta XXY sono femmine perfettamente normali. I ricercatori della *Drosophila* mantengono ceppi in cui i maschi sono XY e le femmine sono  $X^AXY$  con i loro due cromosomi X fisicamente attaccati tra loro: questi sono chiamati ceppi con X attaccati e sono diagrammati  $X^AX$ . I cromosomi X attaccati segregano sempre insieme durante la meiosi, quindi i gameti delle femmine  $X^AXY$  sono  $X^AX$  o Y. Il quadrato di Punnett che segue mostra cosa succede quando femmine  $X^AXY$  vengono accoppiate con maschi XY normali con una mutazione *ovo<sup>D</sup>* sul loro cromosoma X:

	Uovo	$X^AX$	Y
Spermatozoo	$X^{ovoD}$	$X^AX^{ovoD}$	$X^{ovoD}Y$
	Y	$X^AXY$	$YY$

Le caselle barrate rappresentano genotipi letali. Osservando questo quadrato di Punnett, si possono fare due osservazioni insolite: (1) la progenie maschile eredita il cromosoma Y dalle madri; (2) la progenie maschile eredita il cromosoma X dai padri. Si può osservare che in un ceppo in cui i maschi sono  $X^{ovoD}Y$  e le femmine sono  $X^AXY$ , il cromosoma  $X^{ovoD}$  verrà trasmesso attraverso i maschi a ogni generazione.

**21.30** Le femmine della specie umana omozigoti per mutazioni nei geni a effetto materno sarebbero sterili: le loro uova sarebbero prive di un RNA o di una proteina necessari per lo sviluppo precoce. Naturalmente, le femmine possono essere sterili anche per ragioni diverse dalle mutazioni nei geni a effetto materno; per esempio, disturbi ormonali potrebbero impedire alla donna di produrre uova mature. Probabilmente, sarebbero necessarie molte altre indagini per determinare la causa della sterilità.

**21.31** L'iniezione di mRNA di *bicoid*, sintetizzato in vitro, nel polo posteriore di uova normali produce embrioni con due poli anteriori speculari; le appendici anteriori si sviluppano a entrambe le estremità dell'embrione.

**21.32 a.** Il gene *hunchback* è trascritto nella linea germinale femminile (come si può osservare in Figura 21.20), ma è anche trascritto nell'embrione precoce, e infatti è stato inizialmente identificato come gene gap zigotico (vedi Figura 21.21). Oltre a un promotore, deve essere presente un unico enhancer che sia attivo nella linea germinale femminile e anche nell'embrione precoce, o, in alternativa, il gene *hunchback* dovrebbe includere sia enhancer specifici della linea germinale femminile sia dell'embrione precoce.

**b.** Si ricorda che *hunchback* è sia un gene a effetto materno sia un gene gap; *hunchback* codifica per un fattore di trascrizione che è riconoscibile dal suo dominio di legame al DNA a dita di zinco.

**c.** L'UTR al 3' dell'mRNA di *hunchback* ha siti di legame per la proteina Nanos, che impedisce la traduzione dell'mRNA di *hunchback* fornito dalla madre nella metà posteriore dell'embrione. Questo meccanismo aiuta a stabilire il gradiente anteriore (alto)-posteriore (basso) della proteina Hunchback osservato negli embrioni precoci, anche se l'mRNA di *hunchback* è distribuito uniformemente nell'uovo (vedi Figura 21.20).

**21.33 a.** Le osservazioni nel loro insieme indicano che se un embrione manca dell'mRNA *hunchback* materno, la proteina Nanos (fornita anch'essa

dalla madre) non è necessaria. L'implicazione è che l'unica funzione di Nanos è di inibire la funzione dell'mRNA *hunchback* fornito dalla madre. Come descritto nella risposta al Problema 32, parte (c), la proteina Nanos impedisce la traduzione dell'mRNA materno di *hb*. Si noti che l'mRNA di *hunchback* materno non è richiesto per un corretto sviluppo, ma se questo mRNA è presente, è fondamentale che la proteina Nanos sopprima la sua funzione. (Nanos materno è degradato prima che possa reprimere la traduzione di *hunchback* zigotico.)

**b.** Può sembrare sconcertante che il moscerino abbia un gene, *nanos*, la cui unica funzione è inibire la funzione materna di un altro gene, *hunchback*. Perché semplicemente il moscerino non evita di produrre *hunchback* materno, non avendo quindi affatto bisogno del gene *nanos*? I biologi dello sviluppo hanno scoperto molti meccanismi doppi negativi come questo, perché il processo di evoluzione è disordinato e può apparire inefficiente, nel senso che certi circuiti regolativi si sono evoluti milioni di anni fa sotto pressioni selettive che oggi non siamo in grado di conoscere, né di ricostruire.

Com'è possibile che si sia verificata questa particolare situazione con *hunchback* e *nanos*? Non conosciamo la risposta, ma una possibilità è che in un lontano antenato della *Drosophila* le riserve materne di *hunchback* erano necessarie per un corretto sviluppo. In alternativa, forse Nanos era presente nell'uovo perché aveva un gene bersaglio diverso e la sua presenza consentiva alla regione regolatrice di *hunchback* di esprimere il gene maternamente (senza danni), oltre che nello zigote. Ipotesi come queste possono essere studiate analizzando l'espressione di *hunchback* e *nanos* in specie di moscerini vicine alla *Drosophila*.

**21.34 a.** L'assenza della funzione *knirps* non ha alcun effetto sulla distribuzione della proteina Hunchback, ma influisce sulla localizzazione della proteina Krüppel. Più specificamente, questi risultati mostrano che Knirps è necessario per limitare il limite posteriore della zona di espressione di Krüppel. Poiché queste proteine dei geni gap sono tutti fattori di trascrizione, l'implicazione è che Knirps reprime la trascrizione di Krüppel, almeno in questa parte dell'embrione.

**b.** In assenza di Nanos, la proteina Hunchback sarebbe distribuita lungo tutto l'embrione precoce perché non esiste una proteina Nanos a inibire la traduzione dell'mRNA di *hunchback* fornito

dalla madre. Più tardi nell'embriogenesi, a partire da prima della cellularizzazione, questo pattern comincerebbe a cambiare perché il gene *hunchback* inizierebbe a essere trascritto dai nuclei zigotici. La trascrizione zigotica di *hunchback* si verifica solo nella regione anteriore dell'embrione dove la concentrazione del morfogeno Bicoid è più alta. Pertanto, un gradiente antero-posteriore (alto-basso) della proteina Hunchback inizierebbe lentamente a formarsi poiché la proteina fornita zigoticamente sostituisce la proteina tradotta dall'mRNA di *hunchback* materno in assenza di Nanos.

**21.35 a.** L'enhancer della striscia 2 è attivo solo nelle cellule della striscia 2 perché solo in quella regione dell'embrione i siti di legame dell'enhancer sono legati con elevata densità dalle proteine attivatrici (Bcd e Hb) rispetto alle proteine repressive (Kni e Gt), attivando la trascrizione. Pertanto, il motivo per cui *eve* è espresso nella striscia 2 è che in queste cellule i livelli di Bcd e Hb sono alti, mentre i livelli di Kni e Gt sono bassi.

**b.** Due diversi scenari potrebbero spiegare la capacità di un singolo enhancer di operare in due strisce non adiacenti. Una possibilità è che l'enhancer risponda agli stessi fattori di trascrizione nelle due strisce; questo scenario richiede che tali fattori di trascrizione siano presenti a livelli simili in queste due regioni non adiacenti. In alternativa, diversi fattori di trascrizione potrebbero regolare la trascrizione di *eve* nelle due strisce non adiacenti; in ciascuna delle due strisce, per attivare la trascrizione potrebbero essere occupati siti diversi sull'enhancer.

**c.** La trascrizione dei geni pair-rule secondari, come *ftz*, è regolata (in parte) dalle proteine dei geni pair-rule primari. Poiché queste proteine primarie sono presenti secondo un pattern periodico di sette strisce lungo l'asse AP dell'embrione, un singolo enhancer con siti di legame per le proteine pair-rule primarie potrebbe attivare la trascrizione di *ftz* con un pattern a sette strisce. I siti di legame dell'enhancer sarebbero occupati (o vuoti) secondo uno schema che si ripete sette volte lungo l'asse AP.

Questo concetto è illustrato nel diagramma che segue; il modello mostra come l'espressione genica pair-rule divida l'embrione in 14 segmenti impostando un codice combinatorio di proteine pair-rule in uno schema che si ripete a segmenti alternati. Nel diagramma, ogni cerchio rappresenta una cellula lungo l'asse AP dell'embrione e i numeri indicano 4 delle 14 divisioni

(segmenti), ciascuna larga quattro cellule, lungo l'asse AP. Ogni colore (blu, bianco, arancione e verde) rappresenta una proteina pair-rule primaria diversa (il nero rappresenta l'assenza di proteine).



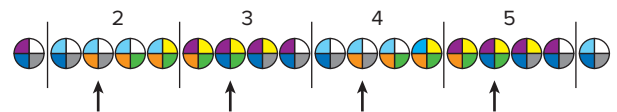
Nel modello precedente, ogni proteina pair-rule primaria è espressa in una striscia larga quattro cellule. Si noti che ogni striscia di espressione della proteina pair-rule è una cellula fuori registro con quella della striscia precedente. Le linee colorate nella parte inferiore del diagramma rappresentano quattro diversi pattern di espressione periodica (diversi da quelli degli stessi geni pair-rule primari) generati dalle strisce delle proteine primarie. L'idea è che l'enhancer di un gene pair-rule secondario possa attivare la trascrizione in risposta a una qualsiasi delle quattro combinazioni di proteine pair-rule primarie nei cerchi sopra la linea, ma non dei pattern indicati dagli altri quattro cerchi. In questo modo, i geni pair-rule secondari saranno trascritti, in risposta alle proteine pair-rule primarie, in sette strisce lungo l'asse AP. Le strisce proteiche pair-rule secondarie non sono a registro con le strisce proteiche primarie, ma sia le strisce proteiche primarie sia quelle secondarie hanno una periodicità a segmenti alternati.

Per determinare se esiste un singolo enhancer *ftz*, diversi frammenti di DNA genomico che circondano il gene *ftz* potrebbero essere fusi con un gene reporter *GFP* senza enhancer. L'espressione della GFP verrebbe monitorata in linee di *Drosophila* trasformate con i diversi geni di fusione. Se il frammento di DNA genomico nella fusione reporter contiene un singolo enhancer *ftz* con le proprietà descritte nel modello precedente, gli embrioni con quel transgene dovrebbero esprimere GFP in sette strisce corrispondenti al pattern di espressione di *ftz*.

**d.** La trascrizione del gene della polarità segmentale è controllata dalle proteine dei geni pair-rule. Come spiegato per la regolazione trascrizionale di *ftz*, poiché le proteine pair-rule sono espresse secondo un pattern a strisce lungo l'asse AP, un enhancer che lega le proteine pair-rule potrebbe attivare la trascrizione di *engrailed* con un pattern a strisce. Un'altra possibilità è che la trascrizione di *engrailed* sia attivata da due diversi en-

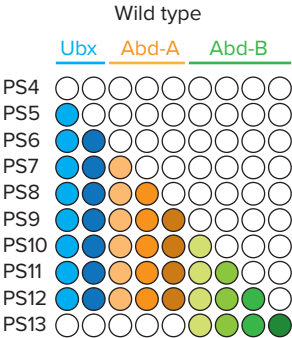
hancer; un enhancer potrebbe operare nelle strisce dispari e l'altro nelle strisce pari. In entrambi gli scenari, la trascrizione di *engrailed* dovrebbe essere attivata da più di un fattore di trascrizione codificato dai geni pair-rule (per esempio, Eve e Ftz, come mostrato in Figura 21.22a) per garantire che *engrailed* sia espresso in 14 anziché in 7 strisce.

Il modello che segue rende facile visualizzare come le proteine pair-rule, espresse in sette strisce (una periodicità a segmenti alternati), potrebbero indurre la trascrizione dei geni della polarità segmentale, come *engrailed*, in 14 strisce (una periodicità segmentale). Nel diagramma, ogni cerchio rappresenta una cellula lungo l'asse AP dell'embrione e i numeri indicano 4 delle 14 divisioni (segmenti), ciascuna larga 4 cellule. Ogni colore rappresenta una diversa proteina pair-rule.



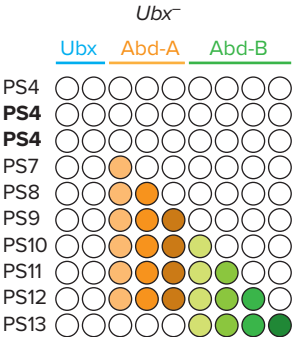
Nel diagramma ogni proteina pair-rule è espressa in una striscia larga quattro celle e ogni striscia proteica pair-rule è fuori registro di una cellula con la successiva striscia proteica pair-rule. Il risultato è un codice combinatorio; ogni cellula in una striscia larga 2 divisioni (larghezza 8 celle) esprime una combinazione unica di proteine pair-rule. Se un singolo enhancer di *engrailed*, per esempio, viene attivato da una delle due combinazioni di proteine indicate dalle frecce, allora *engrailed* verrebbe trascritto in 14 strisce, uno schema con una periodicità segmentale. In alternativa, il modello di espressione di *engrailed* a quattordici strisce potrebbe essere ottenuto da due enhancer diversi; uno con siti di legame per una particolare combinazione di proteine pair-rule nei segmenti pari (blu, arancione, grigio e bianco nel diagramma) e l'altro che lega una specifica combinazione di proteine pair-rule presenti all'interno dei segmenti dispari (viola, arancione, verde e giallo nel diagramma).

**21.36** Il modo più semplice per pensare a come *BX-C* controlla le identità dei parasegmenti 5-13 (segmenti pT3-aA8) è che le cellule in ciascun parasegmento hanno una parola d'ordine, una particolare combinazione di espressione dei geni *BX-C*. Il diagramma che segue illustra questo concetto:



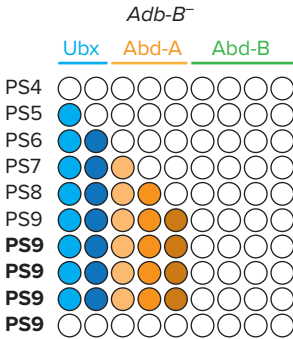
Nel diagramma la parola d'ordine per PS5 è espressione Ubx; la parola d'ordine per PS6 è livelli più alti di espressione Ubx; la parola d'ordine per PS7 è la stessa di PS6 più un particolare livello di espressione Abd-A; la parola d'ordine per PS8 è la parola d'ordine PS7 più l'espressione Abd-A aggiuntiva ecc. L'elemento più importante di ogni parola d'ordine è l'elemento finale, che rende ogni segmento diverso da quello anteriore a esso.

Utilizzando questo modello, è facile verificare (come mostrato nel diagramma che segue) che, in completa assenza di Ubx, PS5 e PS6 si trasformano in PS4; le cellule che normalmente formerebbero PS5 e PS6 ora hanno la parola d'ordine PS4, ovvero nessuna espressione di alcuna proteina BX-C:



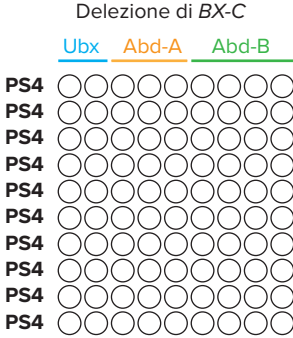
Si deve notare che le mutazioni *bx* distruggono un enhancer che dirige la trascrizione di *Ubx* nella metà posteriore di PS5 (il compartimento anteriore di T3), mentre le mutazioni *pbx* distruggono un enhancer necessario per la trascrizione di *Ubx* nella metà anteriore di PS6 (il compartimento posteriore di T3). Questi fatti spiegano le trasformazioni associate alle mutazioni *bx* e *pbx* mostrate in Figura 21.25a. Questa idea chiarisce anche perché un moscerino doppio mutante *bx pbx* abbia 4 ali (vedi Figura 21.25b): poiché, nei mutanti *bx pbx*, *Ubx* non è espresso nelle porzioni dei parasegmenti PS5 e PS6 che normalmente di-

venterebbero T3, queste parti di PS5 e PS6 si sviluppano come T2 e diventano ali, non bilanceri. **a.** Negli embrioni privi di tutta la funzione del gene *Abd-B*, ci sarebbe una trasformazione diretta in avanti dei parasegmenti in cui è espresso *Abd-B*. Il risultato sarebbe che i parasegmenti PS10-13 verrebbero tutti trasformati per assomigliare a PS9, che è il segmento immediatamente anteriore in cui *Abd-B* non è espresso. Secondo il modello, in assenza di *Abd-B* PS10-12 avrebbero tutti la parola d'ordine A4. Sebbene non sia evidente dal nostro modello semplificato, PS13 ha anche una parola d'ordine simile alla parola d'ordine Abd-B. Il motivo è che in assenza della proteina Abd-B, la regione dell'espressione della proteina Abd-A si espande posteriormente.



**b.** I parasegmenti 10-12 sono morfologicamente distinguibili l'uno dall'altro, anche se ciascuno esprime tutti e tre i geni *BX-C*. Ognuno ha una parola diversa perché in un animale selvatico il livello dell'espressione *Abd-B* è diverso in ogni parasegmento 10-12 (vedi il diagramma del modello di tipo selvatico sopra).

**c.** Senza l'espressione di nessuno dei tre geni *BX-C*, ogni parasegmento di PS5-PS13 avrebbe la parola in codice per PS4; tutti i parasegmenti che normalmente esprimono i geni *BX-C* verrebbero trasformati in PS4:



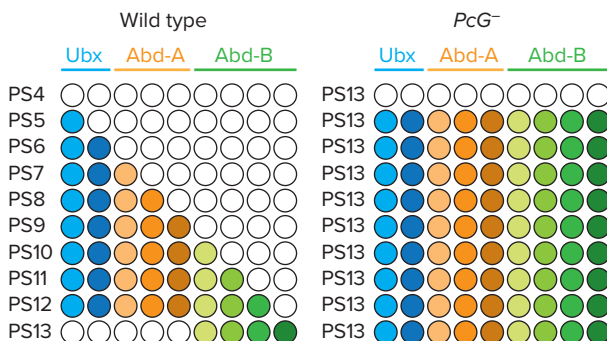
**d.** Nei moscerini di tipo selvatico, l'ala è nel parasegmento 4 mentre il bilanciere è nel paraseg-



mento 5, quindi le mutazioni *Contrabithorax* provocano una trasformazione da una struttura anteriore a una struttura più posteriore. Poiché le trasformazioni da posteriore ad anteriore sono associate a mutazioni con perdita di funzione del gene *Ubx*, è probabile che le mutazioni *Contrabithorax* siano mutazioni a guadagno di funzione in cui il gene *Ubx* è espresso ectopicamente in PS4. Sono dominanti rispetto ai loci *BX-C* di tipo selvatico perché *Ubx* fornito ectopicamente da un allele mutante *Contrabithorax* è sufficiente per causare la trasformazione morfologica.

**21.37 a.** Nel PS13, *Abd-B* è espresso in misura massima. Poiché il fenotipo delle mutazioni a perdita di funzione dei geni *PcG* è una trasformazione di PS5-PS12 in PS13, normalmente la funzione *PcG* probabilmente blocca l'espressione dei geni *Hox* (come quelli di *BX-C*) in quei parasegmenti. I geni *PcG* codificano per repressori e co-repressori. I repressori legano sequenze di DNA specifiche all'interno dei silenziatori e reclutano complessi di co-repressori come le metiltransferasi e le deacetilasi istoniche che chiudono la cromatina in una struttura inattiva.

**b.** Quando una qualsiasi delle proteine *PcG* è assente, i silenziatori non possono funzionare e i geni *BX-C* sono de-repressi. Pertanto, negli animali con mutazioni a perdita di funzione nei geni *PcG*, i parasegmenti 5-13 hanno tutti l'elemento più importante della parola d'ordine PS13, che è la piena espressione di *Abd-B*:



**21.38 a.** In base al modello, il grafico può essere compilato come mostrato a destra. Si noti che le ultime 6 righe del grafico sono la risposta alla parte (c). **b.** Assumiamo qui che gli alleli nulli di qualsiasi gene non producano mRNA stabile e che i pattern di mRNA e proteine per qualsiasi gene siano identici.

Nel wild type: i trascritti *AP2* dovrebbero essere presenti nelle spirali 1 + 2; i trascritti *AP3* e *PI* nelle spirali 2 + 3; i trascritti *AG* nelle spirali 3 + 4.

Nei mutanti *AP2*: i trascritti *AP3* e *PI* nelle spirali 2 + 3; i trascritti *AG* nelle spirali 1-4.

Nei mutanti *AG*: i trascritti *AP2* nelle spirali 1-4; i trascritti *AP3* e *PI* nelle spirali 2 + 3.

**c.** Si veda il grafico che segue. Proprio come per i fenotipi dei singoli mutanti, il modello può essere utilizzato per prevedere i fenotipi del doppio mutante.

**d.** I quattro geni descritti sono simili ai geni omeotici, come quelli *BX-C* nei moscerini della frutta. Le quattro spirali sono simili ai segmenti di *Drosophila* in quanto inizialmente sono primordi dello sviluppo equivalenti. Le spirali primordiali sono governate da fattori di trascrizione (le proteine omeotiche) che conferiscono loro identità specifiche. Possiamo fare questa affermazione perché nei vari mutanti le spirali possono cambiare identità come fanno i segmenti nei mutanti *BX-C*.

Genotipo	Spirale 1	Spirale 2	Spirale 3	Spirale 4
Fenotipo wild-type	Sepalo	Petalo	Stame	Carpello
	AP2 AP3 PI AG	AP2 AP3 PI AG	AP2 AP3 PI AG	AP2 AP3 PI AG
Wild-type	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP2-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP3-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
PI-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AG-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP2- AP3-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP2- PI-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP2- AG-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP3- PI-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
AP3- AG-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
PI- AG-	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■