

Lentamente muore chi diventa schiavo dell'abitudine, ripetendo ogni giorno gli stessi percorsi, chi non cambia la marca, chi non rischia e cambia colore dei vestiti, chi non parla a chi non conosce. Muore lentamente chi evita una passione, chi preferisce il nero su bianco e i puntini sulle "i" piuttosto che un insieme di emozioni, proprio quelle che fanno brillare gli occhi, quelle che fanno di uno sbadiglio un sorriso, quelle che fanno battere il cuore davanti all'errore e ai sentimenti.

Lentamente muore chi non capovolge il tavolo, chi è infelice sul lavoro, chi non rischia la certezza per l'incertezza, per inseguire un sogno, chi non si permette almeno una volta nella vita di fuggire ai consigli sensati. Lentamente muore chi non viaggia, chi non legge, chi non ascolta musica, chi non trova grazia in se stesso. Muore lentamente chi distrugge l'amor proprio, chi non si lascia aiutare; chi passa i giorni a lamentarsi della propria sfortuna o della pioggia incessante. Lentamente muore chi abbandona un progetto prima di iniziarlo, **chi non fa domande sugli argomenti che non conosce, chi non risponde quando gli chiedono qualcosa che conosce.**

Evitiamo la morte a piccole dosi, ricordando sempre che essere vivo richiede uno sforzo di gran lunga maggiore del semplice fatto di respirare. Soltanto l'ardente pazienza porterà al raggiungimento di una splendida felicità.

P. Neruda

***"Sotto l'azzurro fitto del cielo qualche  
uccello di mare se ne va, nè sosta mai  
perchè tutte le immagini portano scritto  
più in là".***

Eugenio Montale

# IL MAPPAGGIO GENETICO

- ❖ Caratteri mendeliani
- ❖ Caratteri complessi

# IL MAPPAGGIO GENETICO

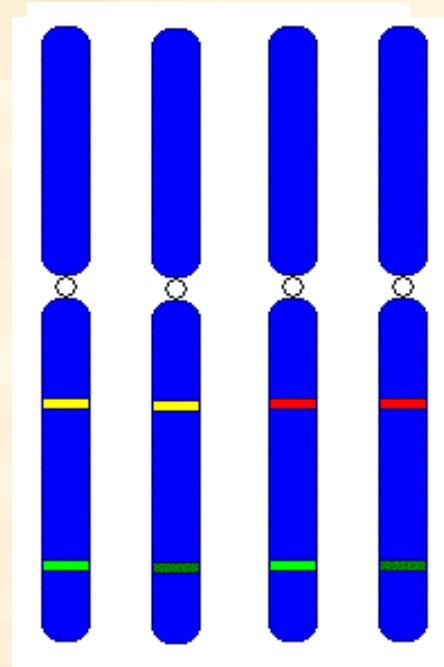
- ❖ Caratteri mendeliani
- ❖ Caratteri complessi

# OBIETTIVO

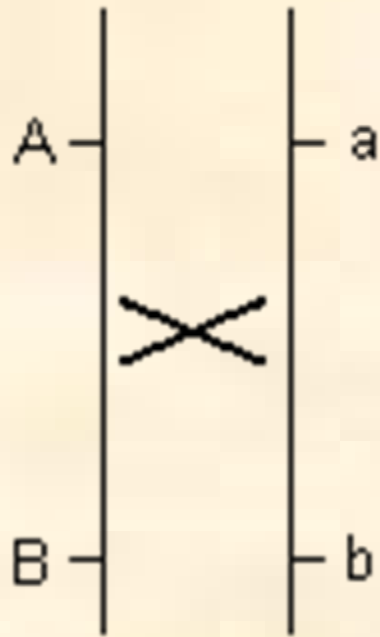
Determinare con quale frequenza due loci vengono separati dalla ricombinazione durante la meiosi

# Il mappaggio genetico

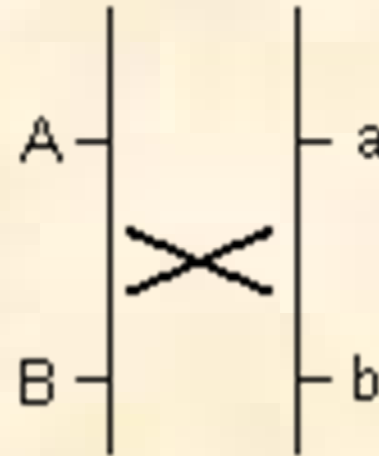
- Ricombinazione...



# linkage

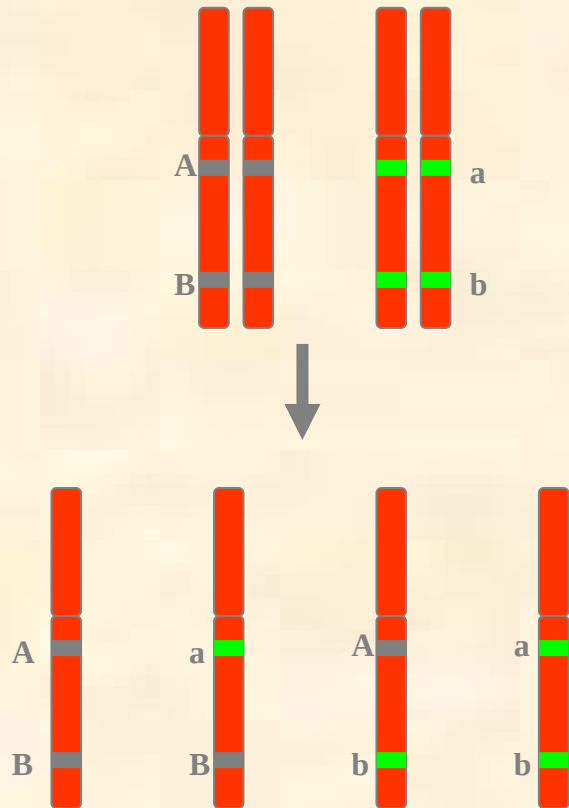


genes far apart,  
crossovers are  
relatively frequent

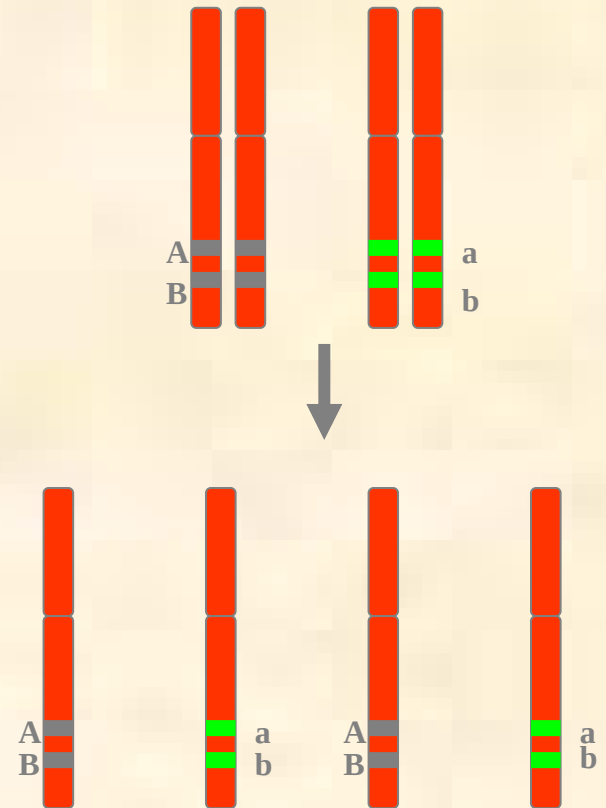


genes close together,  
crossovers are less  
likely to occur between  
them

## LOCI DISTANTI

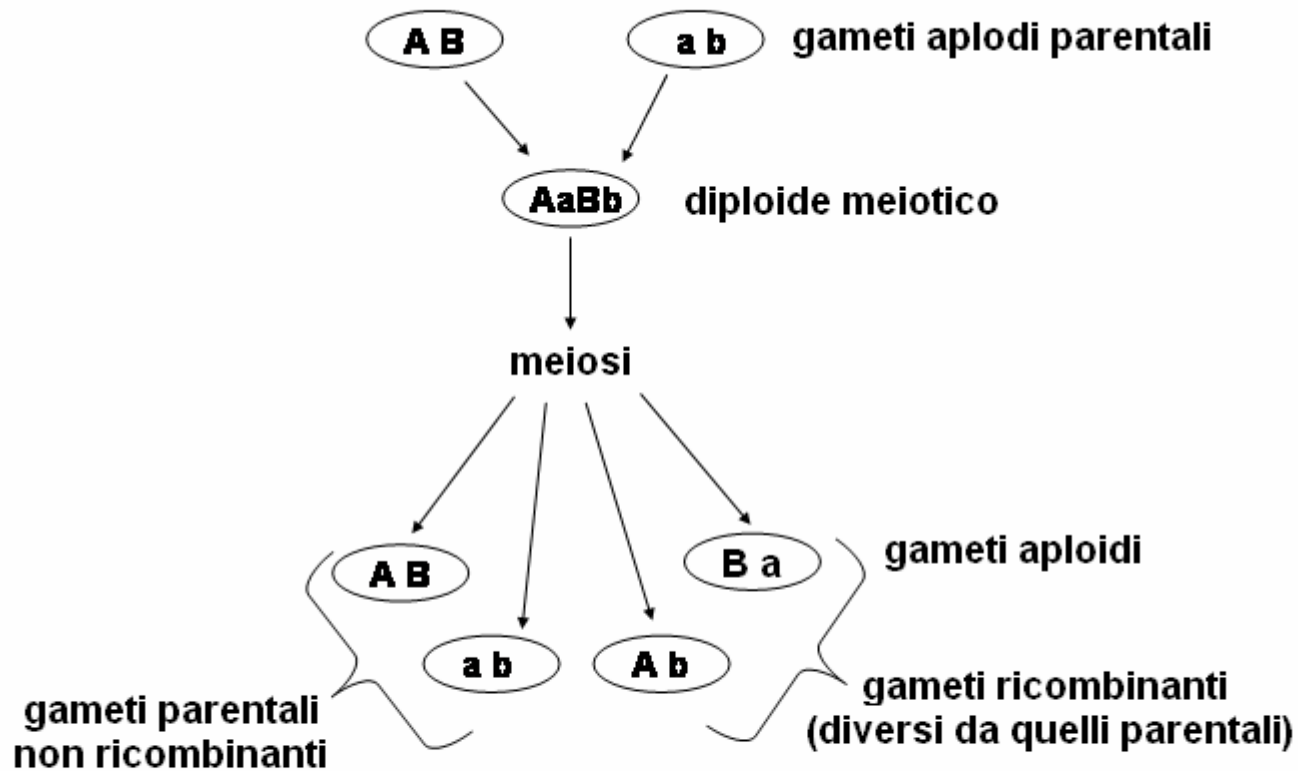


## LOCI VICINI



# DEFINIZIONE

- Due loci si dicono in **linkage** quando la loro frazione di ricombinazione è  $< 0.5$

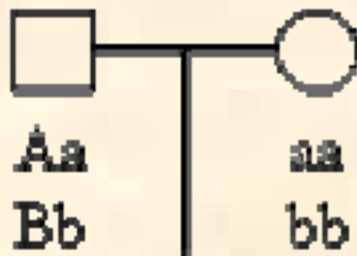


# FRAZIONE DI RICOMBINAZIONE

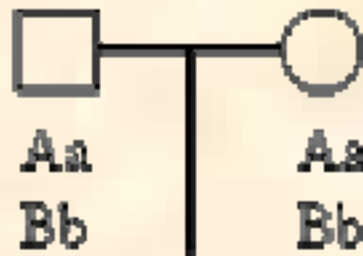
$$\theta = \frac{\text{numero di ricombinanti}}{\text{numero totale meiosi}}$$

# Sono questi geni in linkage?

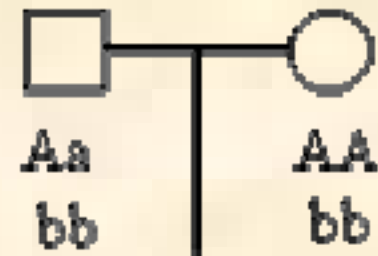
1. Dobbiamo analizzare un numero di famiglie che sono **informative** per i loci di interesse



Fully  
informative



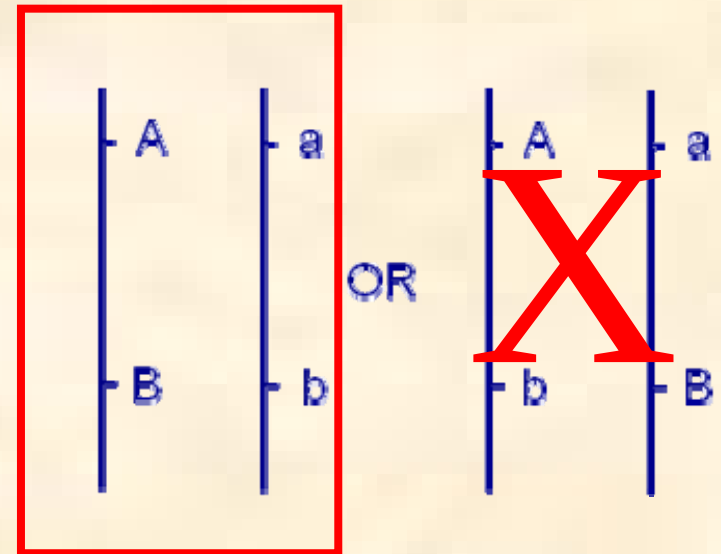
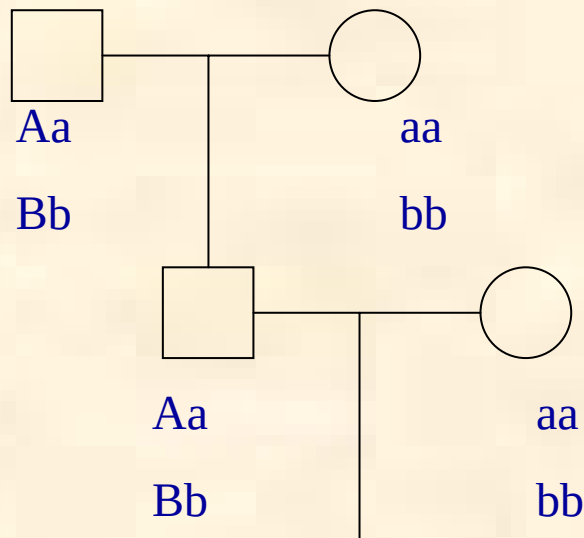
partially  
informative



one of many  
possible  
non-informative  
matings

# Sono questi geni in linkage?

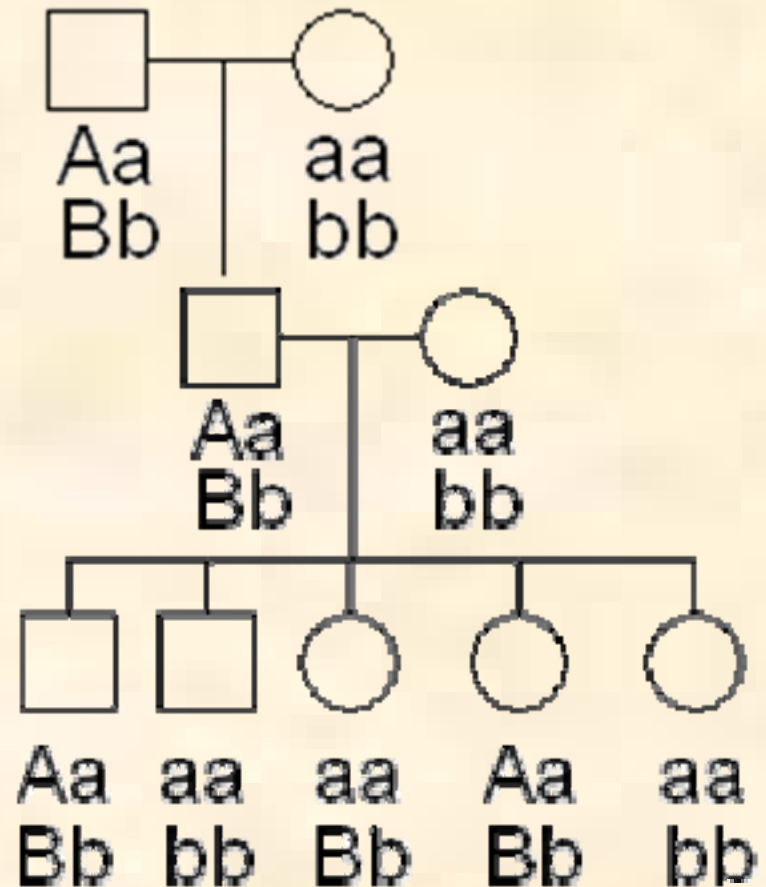
## 2. Noi dobbiamo capire la **fase**



# Sono questi geni in linkage?

3. Dobbiamo cercare di capire se ogni bambino ha una combinazione di alleli parentale o se è un ricombinante

**3 generazioni!!!**



# Sono questi geni in linkage?

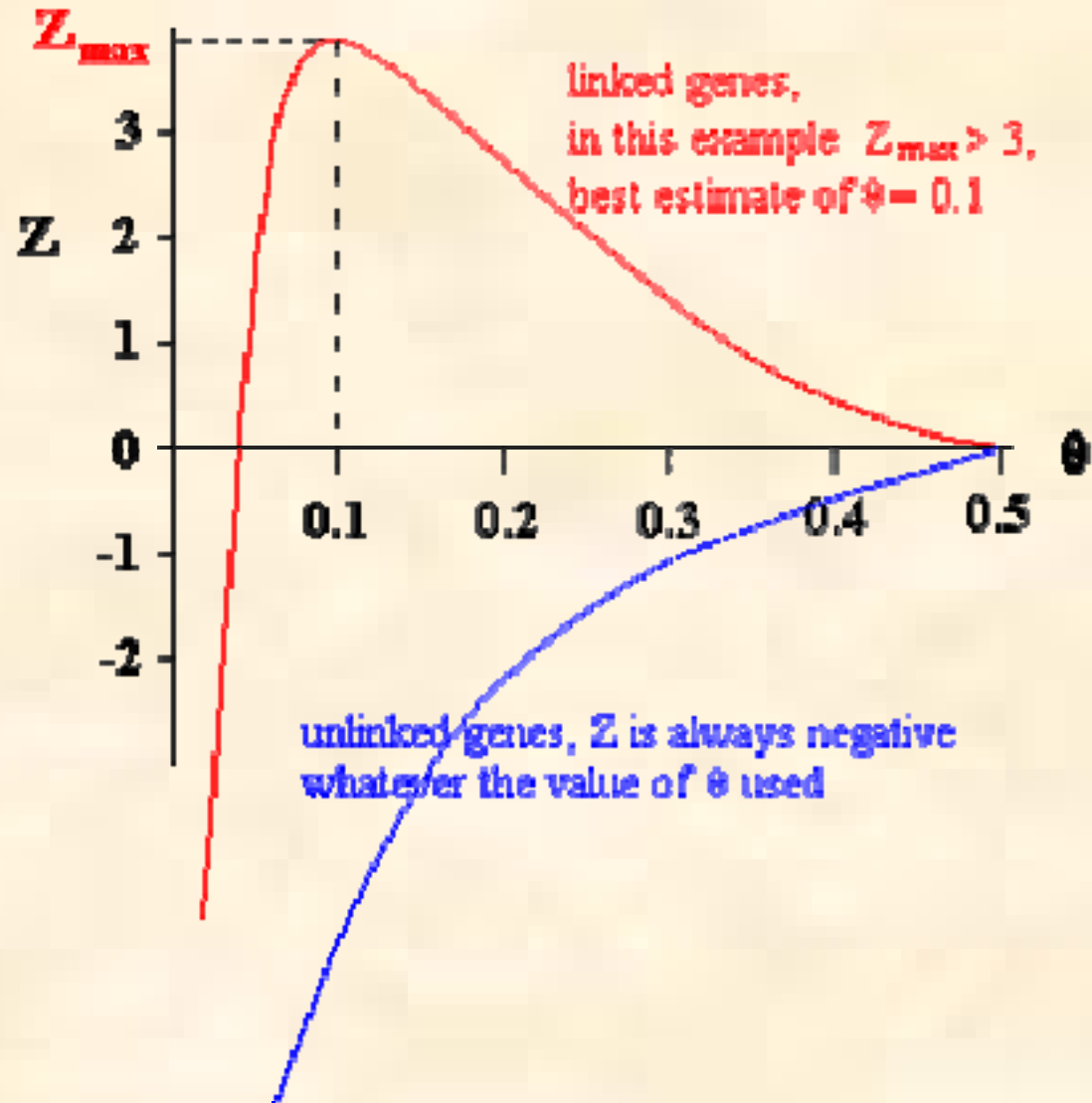
4. E' più probabile che noi abbiamo osservato la particolare combinazione di alleli in quella famiglia perchè i geni sono in linkage piuttosto che per il solo caso dovuto ad assortimento indipendente dei cromosomi!!

# Sono questi geni in linkage?

5. Usiamo il calcolo del lod score

$$Z = \log_{10} \left[ \frac{\text{The probability of observing this family if the genes are linked}}{\text{The probability of observing this family if the genes are not linked}} \right]$$

# Sono questi geni in linkage?



Sono questi geni in linkage?

| $\theta$ | 0.0       | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
|----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Z        | $-\infty$ | 3.9 | 2.7 | 1.5 | 0.5 | 0.0 |

Come capire l'ordine dei geni e le distanze che li separano?



A Il metodo più diretto sarebbe calcolare la frazione di ricombinazione tra geni malattia

B Ma non avremmo i doppi eterozigoti!!!

C  
D Abbiamo bisogno di marcatori a posizione nota e riferire la posizione dei geni rispetto a questi

# MARCATORI

Qualsiasi sequenza che consente di distinguere i cromosomi  
gli uni dagli altri

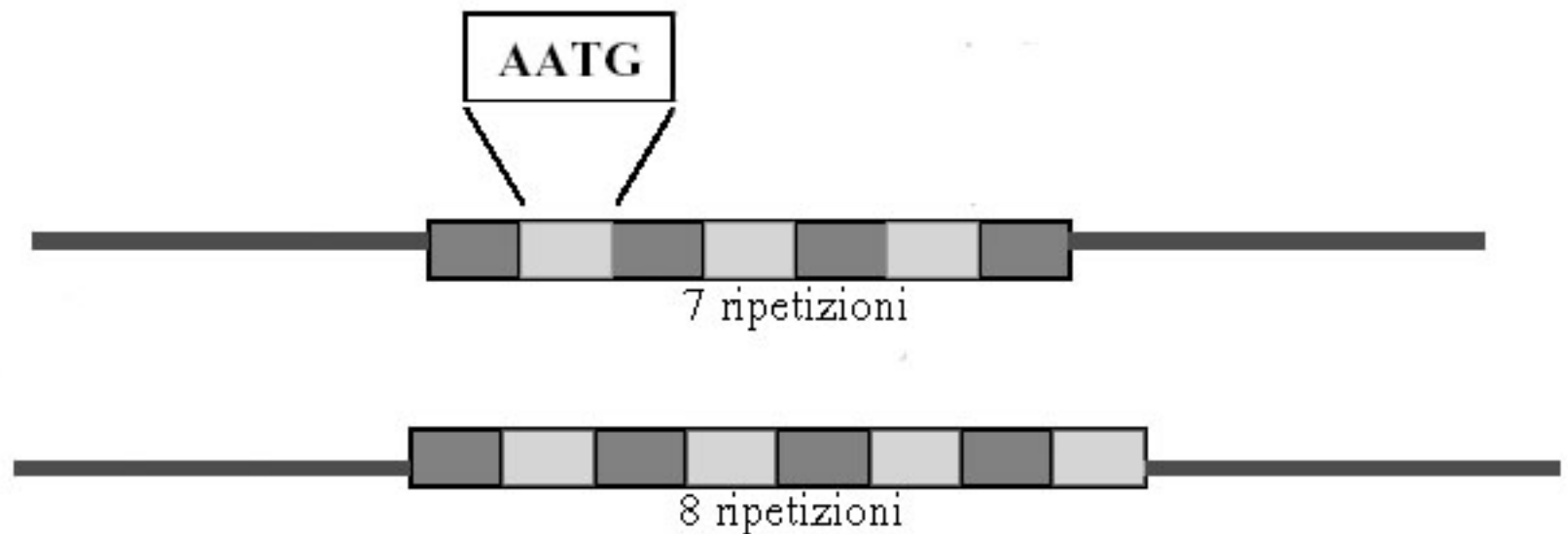
Determinazione dei ricombinanti

Più i marcatori sono ravvicinati, maggiore la possibilità di  
determinare la posizione dei geni con precisione

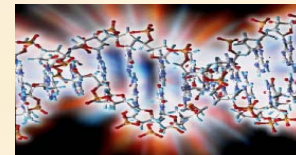
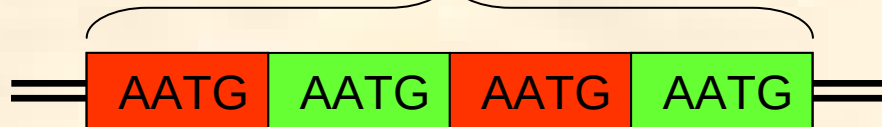
# **I marcatori genetici**

# STRs

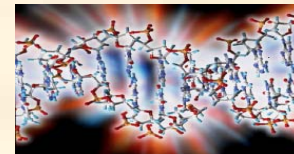
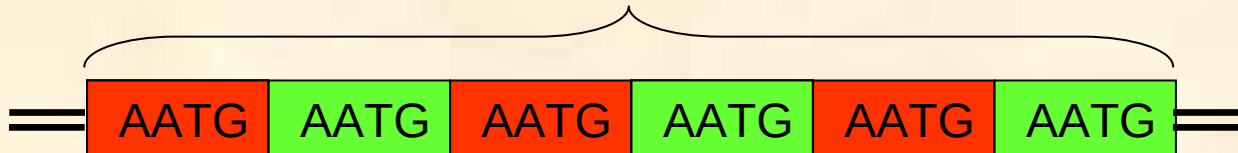
## Short Tandem Repeats (STRs)



4 ripetizioni



6 ripetizioni

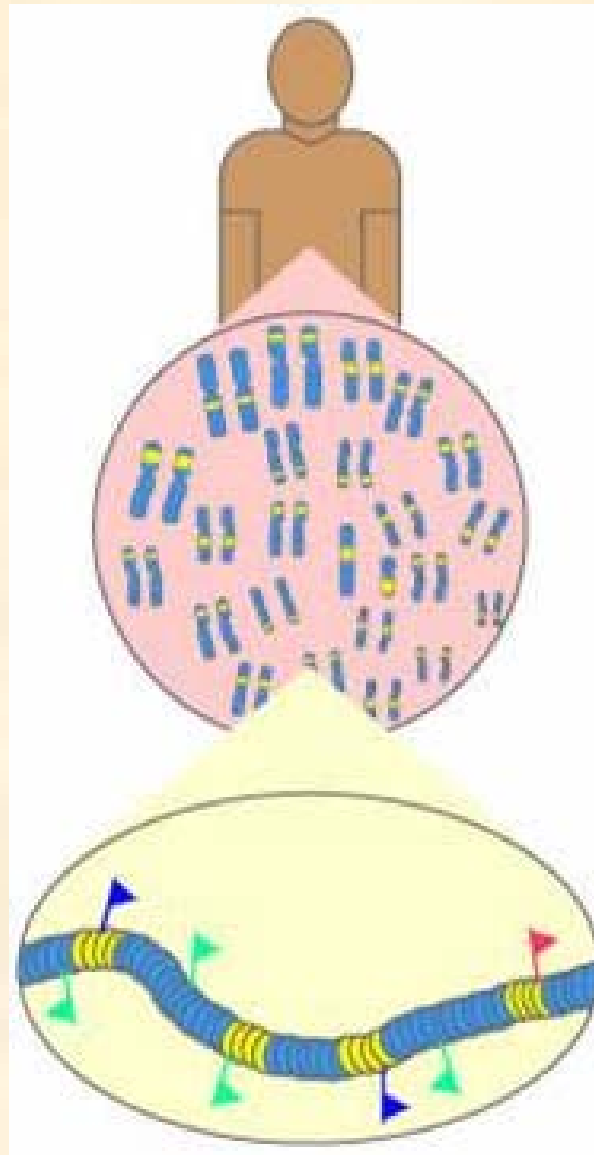


That's the startpoint for modern ability  
to perform human identity test

# CLONAGGIO POSIZIONALE

- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- Identificare i cloni di tutta l'area
- Trovare tutti i geni dell'area
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"

Se dimostro che  
un carattere in  
una o più famiglie  
è in linkage con  
uno o più  
marcatori a  
posizione nota...

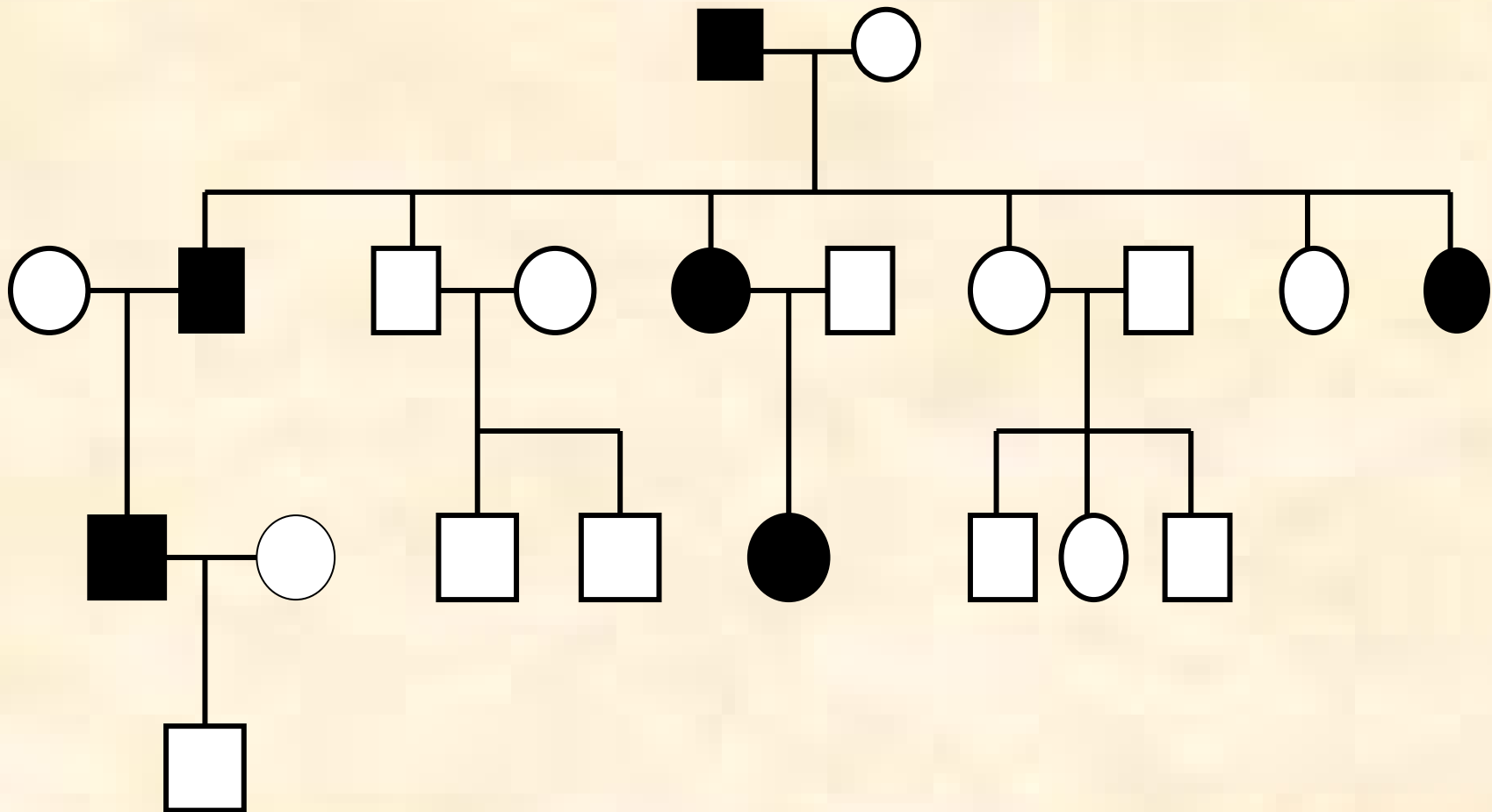


...la posizione  
del gene è  
prossima a  
quella del  
marcatore!

# CLONAGGIO POSIZIONALE

- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- Identificare i cloni di tutta l'area
- Trovare tutti i geni dell'area
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"

# STUDIO DI LINKAGE



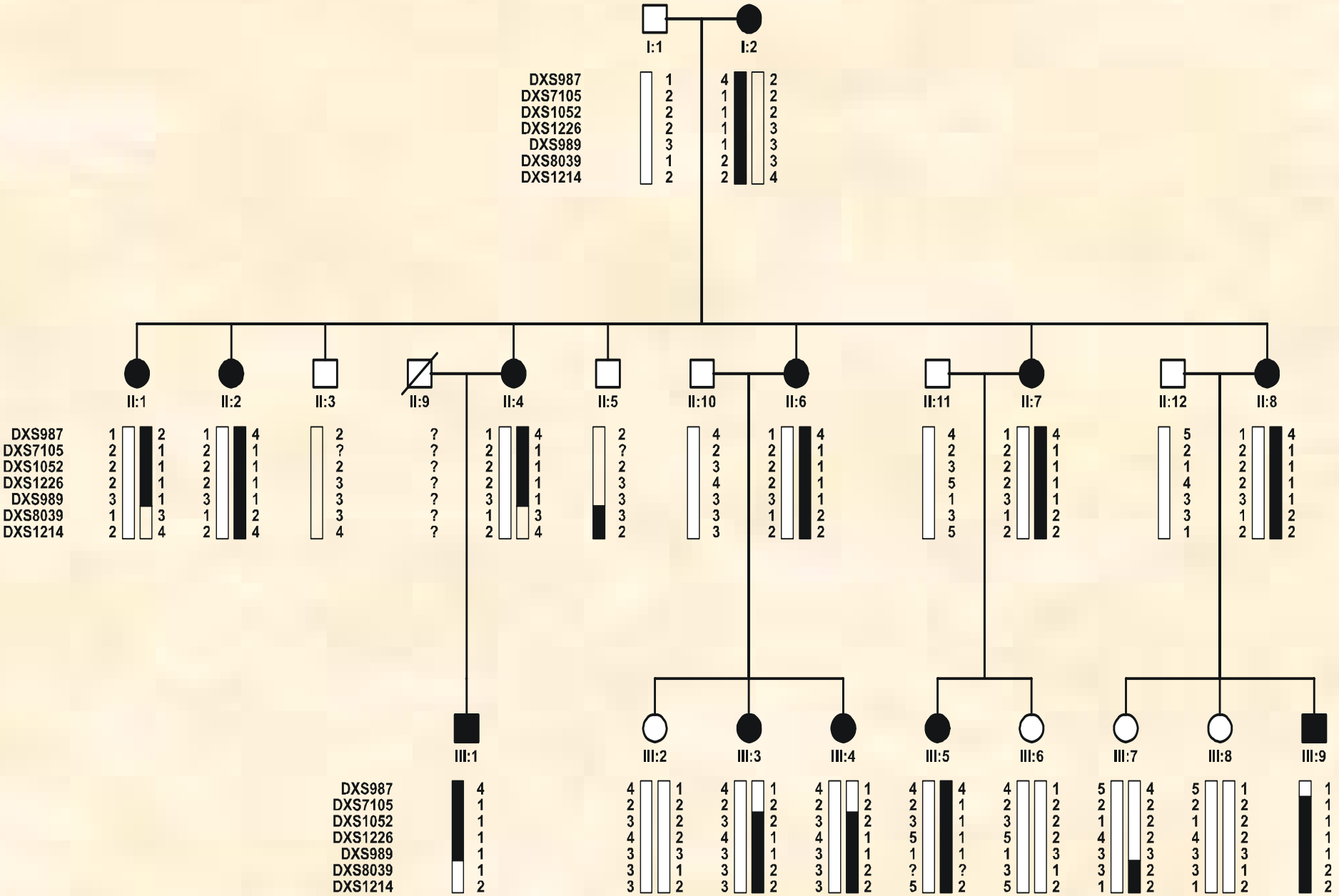
# CLONAGGIO POSIZIONALE

- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- Identificare i cloni di tutta l'area
- Trovare tutti i geni dell'area
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"

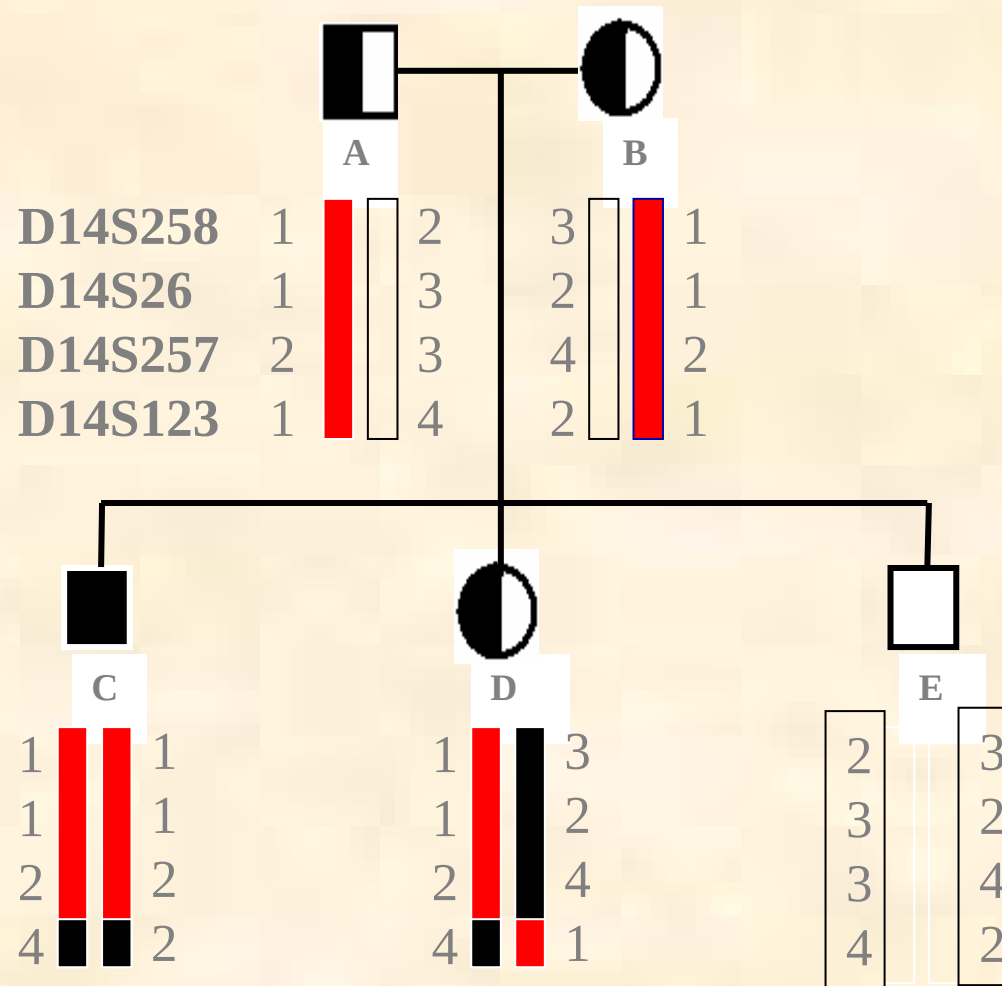
| Children Tested |              | Recombination Fraction |         |        |        |        |        |        |
|-----------------|--------------|------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Number          | Distribution | 0.00                   | 0.01    | 0.02   | 0.03   | 0.04   | 0.05   | 0.075  |
| 1               | 1 NR:0 R     | 0.301                  | 0.297   | 0.292  | 0.288  | 0.283  | 0.279  | 0.267  |
|                 | 0 NR:1 R     | —∞                     | −1.699  | −1.398 | −1.222 | −1.097 | −1.000 | −0.824 |
| 2               | 2 NR:0 R     | 0.602                  | 0.593   | 0.585  | 0.576  | 0.567  | 0.558  | 0.534  |
|                 | 1 NR:1 R     | —∞                     | −1.402  | −1.106 | −0.934 | −0.814 | −0.721 | −0.557 |
|                 | 0 NR:2 R     | —∞                     | −3.398  | −2.796 | −2.444 | −2.194 | −2.000 | −1.648 |
|                 | Z 2:0        | 0.301                  | 0.292   | 0.284  | 0.275  | 0.266  | 0.258  | 0.236  |
|                 | Z 1:1        | —∞                     | −1.402  | −1.106 | −0.934 | −0.814 | −0.721 | −0.557 |
|                 | 3 NR:0 R     | 0.903                  | 0.890   | 0.877  | 0.863  | 0.850  | 0.837  | 0.802  |
| 3               | 2 NR:1 R     | —∞                     | −1.106  | −0.813 | −0.646 | −0.530 | −0.442 | −0.290 |
|                 | 1 NR:2 R     | —∞                     | −3.101  | −2.504 | −2.156 | −1.911 | −1.721 | −1.381 |
|                 | 0 NR:3 R     | —∞                     | −5.097  | −4.194 | −3.666 | −3.291 | −3.000 | −2.472 |
|                 | Z 3:0        | 0.602                  | 0.589   | 0.576  | 0.562  | 0.549  | 0.533  | 0.501  |
|                 | Z 2:1        | —∞                     | −1.402  | −1.106 | −0.934 | −0.814 | −0.721 | −0.557 |
|                 | 4 NR:0 R     | 1.204                  | 1.187   | 1.169  | 1.151  | 1.133  | 1.116  | 1.069  |
| 4               | 3 NR:1 R     | —∞                     | −0.809  | −0.521 | −0.358 | −0.247 | −0.163 | −0.022 |
|                 | 2 NR:2 R     | —∞                     | −2.805  | −2.211 | −1.868 | −1.627 | −1.442 | −1.113 |
|                 | 1 NR:3 R     | —∞                     | −4.800  | −3.902 | −3.378 | −3.007 | −2.721 | −2.205 |
|                 | 0 NR:4 R     | —∞                     | −6.796  | −5.592 | −4.887 | −4.388 | −4.000 | −3.296 |
|                 | Z 4:0        | 0.903                  | 0.886   | 0.868  | 0.850  | 0.832  | 0.814  | 0.768  |
|                 | Z 3:1        | —∞                     | −1.110  | −0.822 | −0.659 | −0.547 | −0.464 | −0.321 |
| 5               | Z 2:2        | —∞                     | −2.805  | −2.211 | −1.868 | −1.627 | −1.442 | −1.113 |
|                 | 5 NR:0 R     | 1.505                  | 1.483   | 1.461  | 1.439  | 1.417  | 1.395  | 1.336  |
|                 | 4 NR:1 R     | —∞                     | −0.512  | −1.229 | −1.071 | 0.036  | 0.116  | 0.245  |
|                 | 3 NR:2 R     | —∞                     | −2.508  | −1.919 | −1.580 | −1.344 | −1.163 | −0.846 |
|                 | 2 NR:3 R     | —∞                     | −4.504  | −3.609 | −3.090 | −2.724 | −2.442 | −1.937 |
|                 | 1 NR:4 R     | —∞                     | −6.499  | −5.300 | −4.600 | −4.104 | −3.721 | −3.028 |
| 6               | 0 NR:5 R     | —∞                     | −8.495  | −6.990 | −6.109 | −5.485 | −5.000 | −4.120 |
|                 | Z 5:0        | 1.204                  | 1.182   | 1.160  | 1.138  | 1.115  | 1.093  | 1.035  |
|                 | Z 4:1        | —∞                     | −0.813  | −0.530 | −0.372 | −0.265 | −0.186 | −0.056 |
|                 | Z 3:2        | —∞                     | −2.805  | −2.211 | −1.868 | −1.627 | −1.442 | −1.113 |
|                 | 6 NR:0 R     | 1.806                  | 1.780   | 1.754  | 1.727  | 1.700  | 1.674  | 1.603  |
|                 | 5 NR:1 R     | —∞                     | −0.216  | 0.063  | 0.217  | 0.320  | 0.395  | 0.511  |
| 7               | 4 NR:2 R     | —∞                     | −2.211  | −1.627 | −1.292 | −1.061 | −0.884 | −0.579 |
|                 | 3 NR:3 R     | —∞                     | −4.207  | −3.317 | −2.802 | −2.441 | −2.163 | −1.670 |
|                 | 2 NR:4 R     | —∞                     | −6.203  | −5.007 | −4.312 | −3.821 | −3.442 | −2.761 |
|                 | 1 NR:5 R     | —∞                     | −8.198  | −6.697 | −5.821 | −5.201 | −4.721 | −3.852 |
|                 | 0 NR:6 R     | —∞                     | −10.194 | −8.388 | −7.331 | −6.581 | −6.000 | −4.943 |
|                 | Z 6:0        | 1.505                  | 1.479   | 1.453  | 1.426  | 1.399  | 1.371  | 1.302  |
| 8               | Z 5:1        | —∞                     | −0.517  | −0.238 | −0.084 | 0.019  | 0.093  | 0.211  |
|                 | Z 4:2        | —∞                     | −2.512  | −1.928 | −1.593 | −1.361 | −1.185 | −0.877 |
|                 | Z 3:3        | —∞                     | −4.207  | −3.317 | −2.802 | −2.441 | −2.164 | −1.670 |
|                 | 7 NR:0 R     | 2.107                  | 2.077   | 2.046  | 2.015  | 1.983  | 1.953  | 1.870  |
|                 | 6 NR:1 R     | —∞                     | 0.081   | 0.356  | 0.505  | 0.603  | 0.674  | 0.779  |
|                 | 5 NR:2 R     | —∞                     | −1.915  | −1.335 | −1.005 | −0.777 | −0.605 | −0.312 |
| 9               | 4 NR:3 R     | —∞                     | −3.910  | −3.025 | −2.514 | −2.158 | −1.884 | −1.403 |
|                 | 3 NR:4 R     | —∞                     | −5.906  | −4.715 | −4.024 | −3.538 | −3.163 | −2.494 |
|                 | 2 NR:5 R     | —∞                     | −7.902  | −6.405 | −5.534 | −4.918 | −4.442 | −3.585 |
|                 | 1 NR:6 R     | —∞                     | −9.897  | −8.095 | −7.043 | −6.298 | −5.721 | −4.676 |
|                 | 0 NR:7 R     | —∞                     | −11.893 | −9.786 | −8.553 | −7.678 | −7.000 | −5.767 |
|                 | Z 7:0        | 1.806                  | 1.776   | 1.745  | 1.714  | 1.682  | 1.650  | 1.569  |
| 10              | Z 6:1        | —∞                     | −0.220  | 0.055  | 0.204  | 0.302  | 0.371  | 0.478  |
|                 | Z 5:2        | —∞                     | −2.216  | −1.636 | −1.306 | −1.078 | −0.907 | −0.613 |
|                 | Z 4:3        | —∞                     | −4.207  | −3.317 | −2.802 | −2.441 | −2.164 | −1.670 |

# CLONAGGIO POSIZIONALE

- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- Identificare i cloni di tutta l'area
- Trovare tutti i geni dell'area
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"



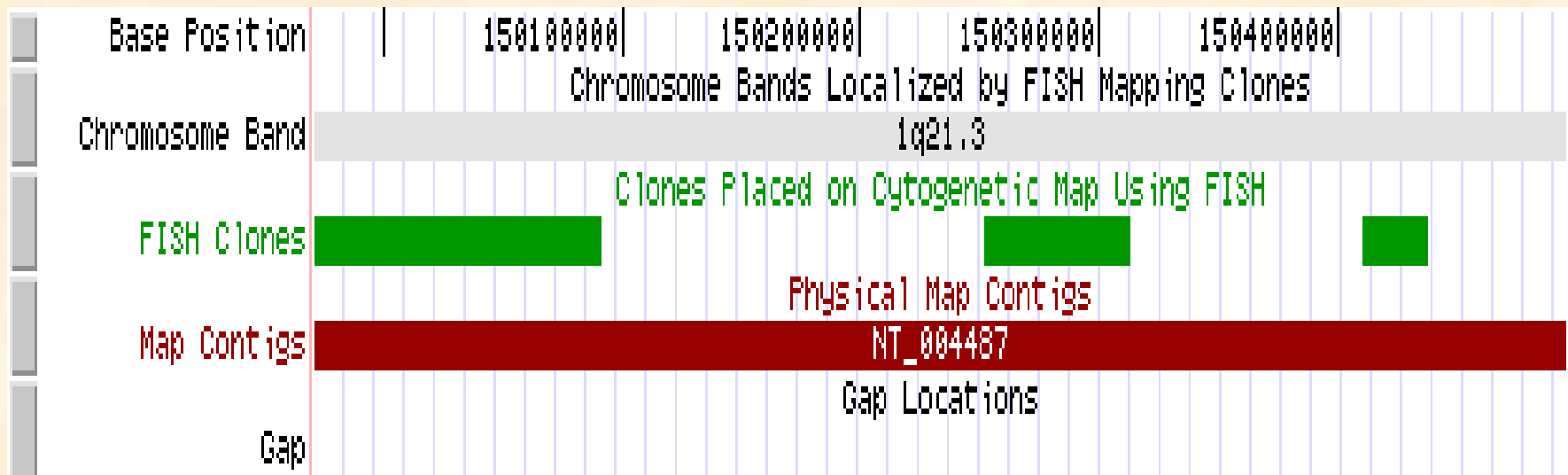
# STUDIO DI LINKAGE



# CLONAGGIO POSIZIONALE

- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- **Identificare i cloni di tutti l'area**
- Trovare tutti i geni dell'area
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"

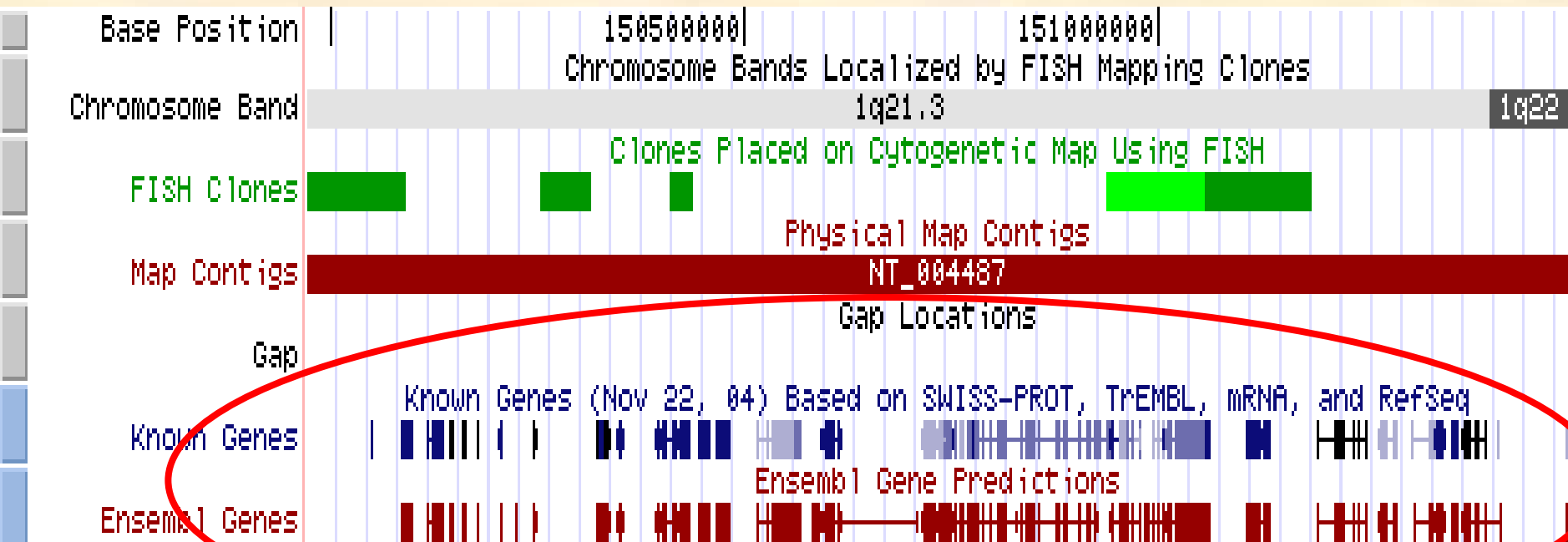
## Quali cloni nella regione di linkage?



# CLONAGGIO POSIZIONALE

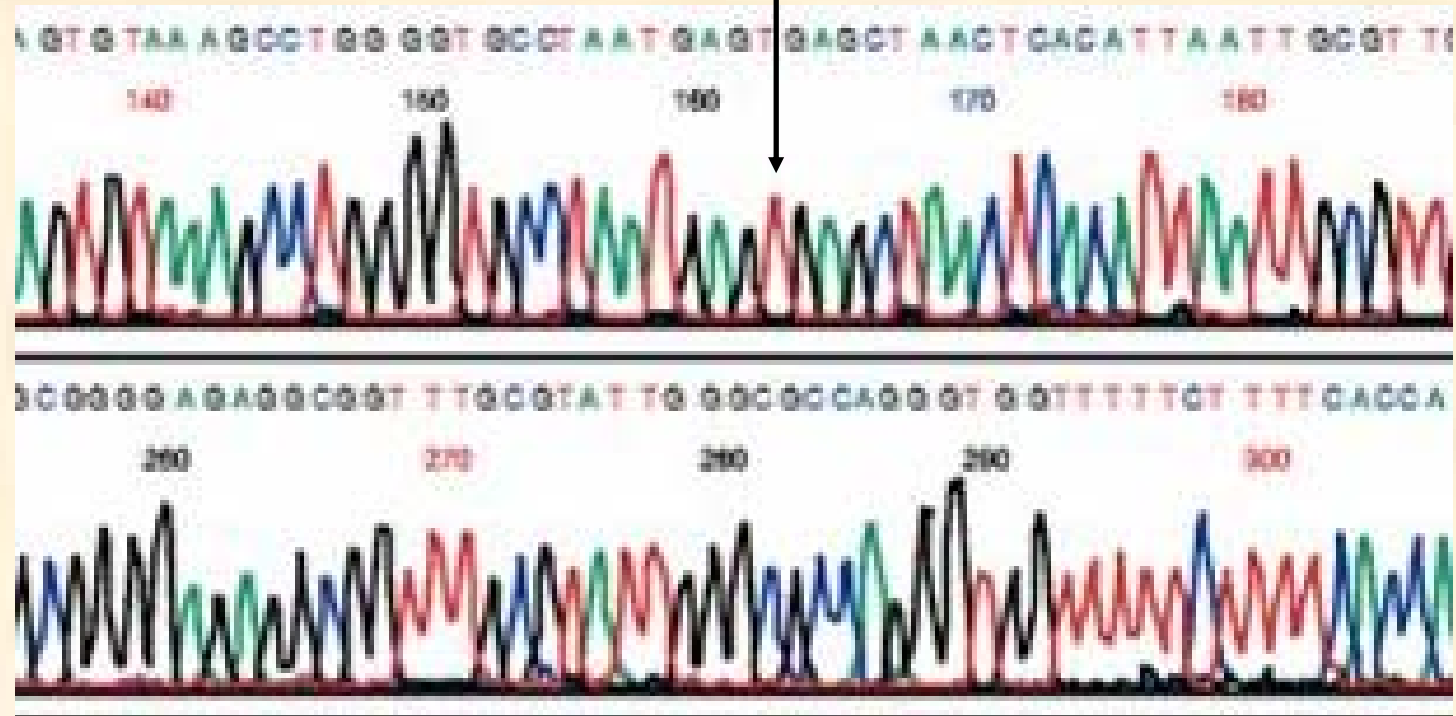
- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- Identificare i cloni di tutta l'area
- **Trovare tutti i geni dell'area**
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"

## Quali geni nella regione di linkage?

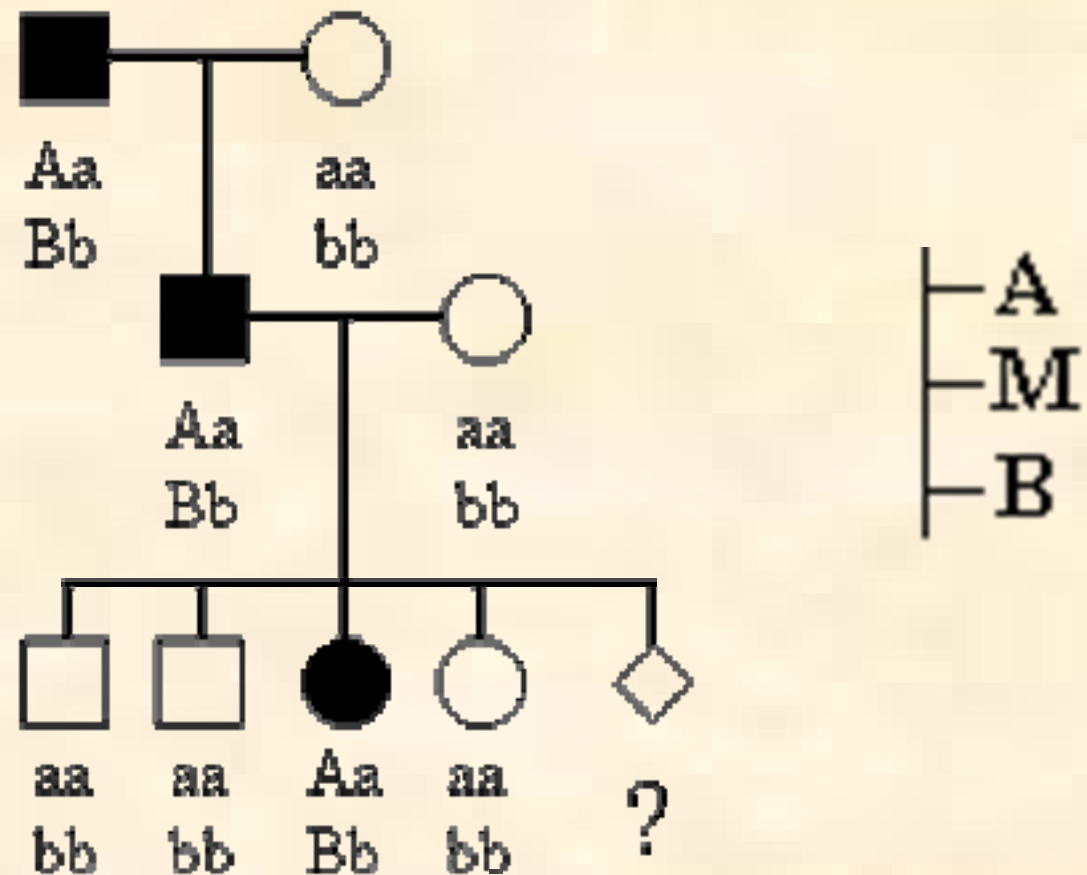


# CLONAGGIO POSIZIONALE

- Reclutare famiglie estese
- Scansione dell'intero genoma
- Testare più loci della stessa regione nelle stesse famiglie e usare i ricombinanti per definire l'intervallo minimo dove cercare il gene
- Identificare i cloni di tutta l'area
- Trovare tutti i geni dell'area
- Trovare mutazioni presenti nei pazienti affetti
- "Eureka!"



# Diagnosi indiretta per LINKAGE



# IL MAPPAGGIO GENETICO

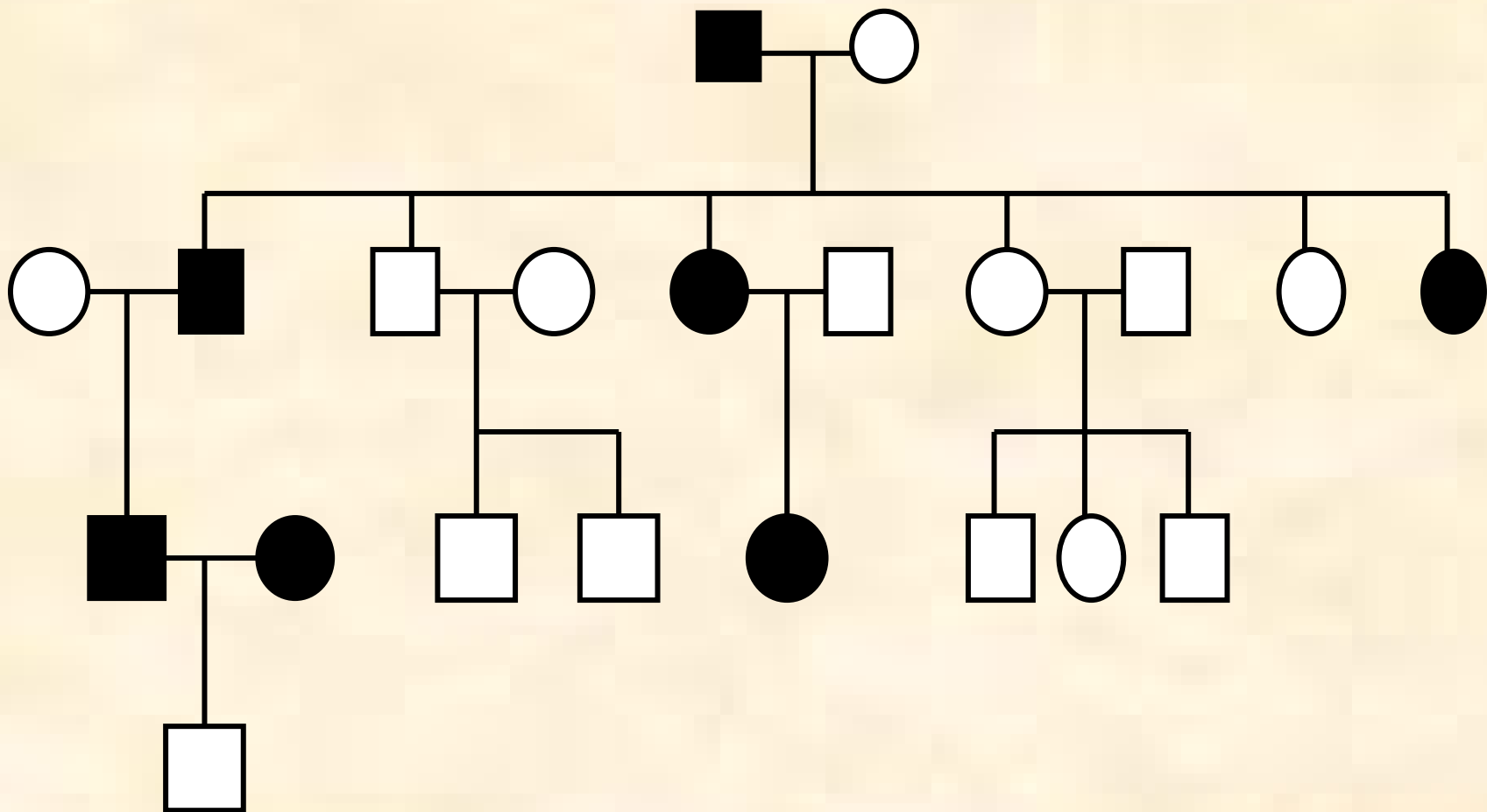
- ❖ Caratteri mendeliani
- ❖ Caratteri complessi

# IL MAPPAGGIO GENETICO

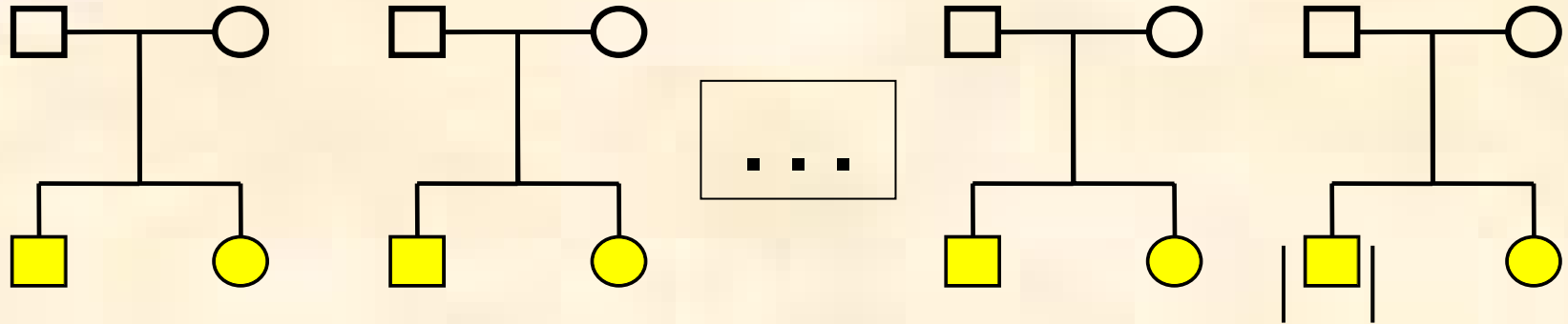
- ❖ Caratteri mendeliani

- ❖ Caratteri complessi

# STUDIO DI LINKAGE NON PARAMETRICO



# AFFECTED SIB-PAIR (ASP)



|                        | IBD=2 | IBD=1 | IBD=0 |
|------------------------|-------|-------|-------|
| Marker <u>unlinked</u> | 25%   | 50%   | 25%   |
| Marker <u>linked</u>   | 40%   | 55%   | 5%    |

**TEST STATISTICO:** ASP condividono più alleli al marker di quanto atteso



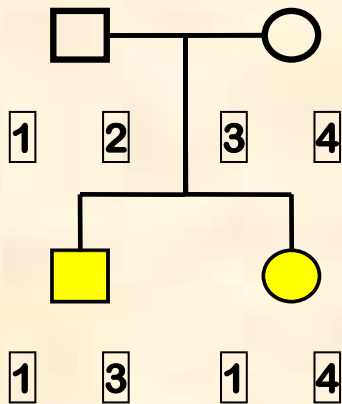
il marker è in linkage con il locus del GDS

# ATTENZIONE!!!

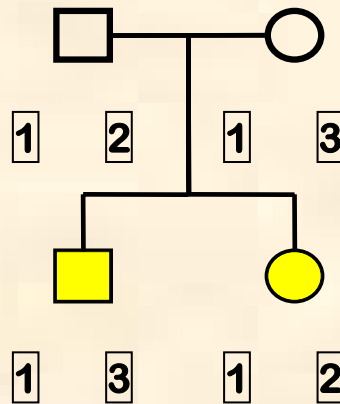
Identici di fatto non è uguale a identici per discendenza

## IBD vs IBS

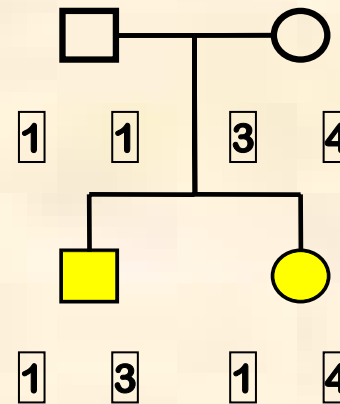
---



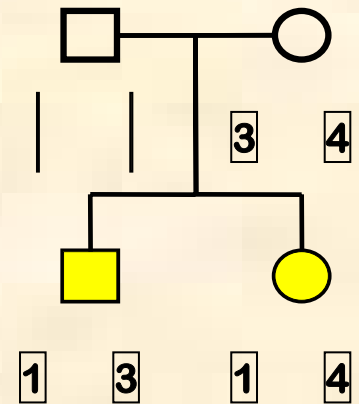
allele 1 è IBD  
(e IBS)



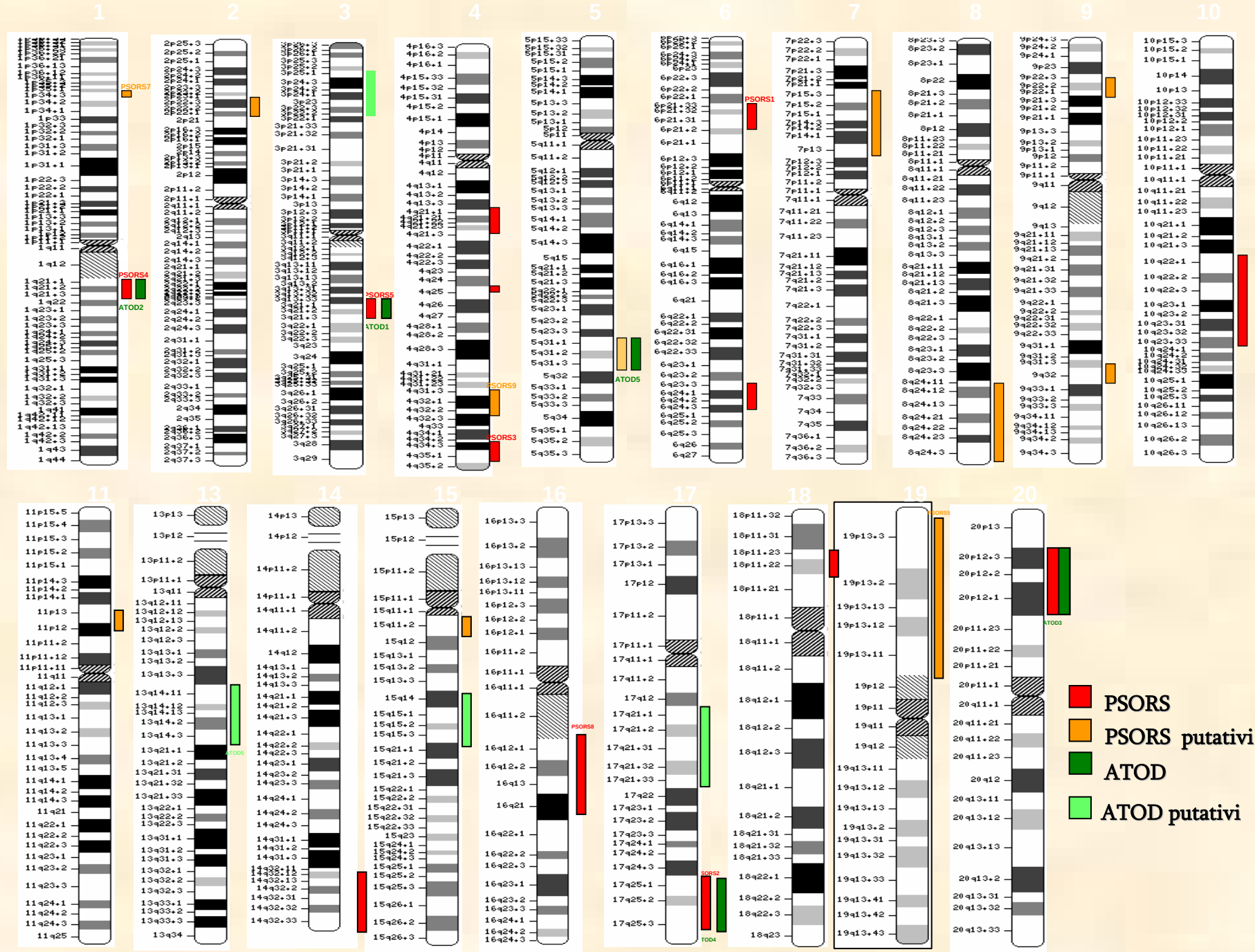
allele 1 è IBS  
(no IBD)



allele 1 è IBS  
(IBD ?)



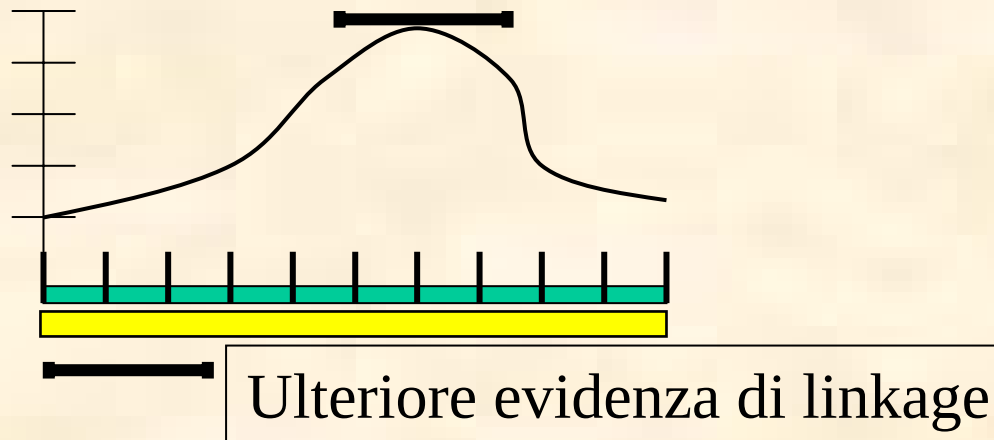
allele 1 è IBS  
(IBD ?)



# Mappatura fine della regione

---

- Si analizzano le regioni che hanno mostrato linkage (nella scansione del genoma)
- Si incrementa il numero di marcatori della regione in studio
- Riduzione della regione da 10 a 5cM ( $\approx 5$  Mbasi)

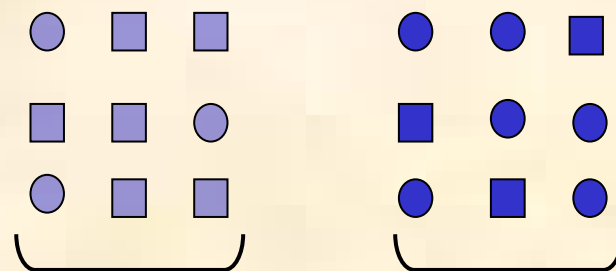
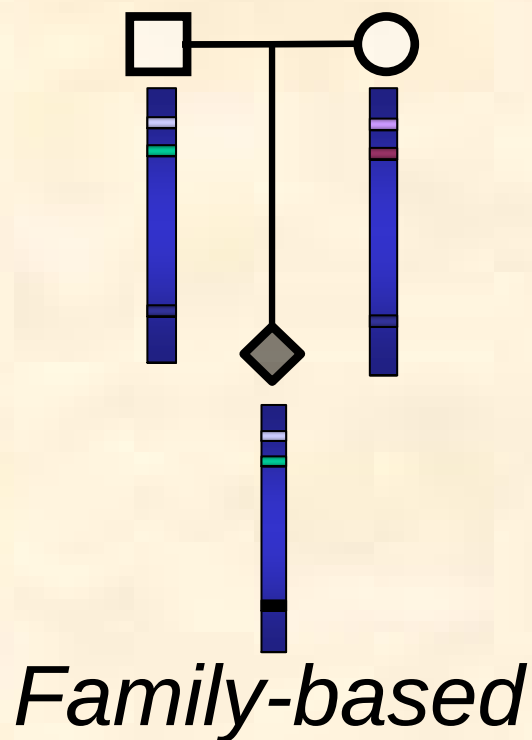


# **Association Studies**

- **Compare allele frequencies in a set of affected individuals to a set of controls**
- **The genetic Case-control association design is an important tool for mapping complex trait genes, but it may be influenced by population admixture / heterogeneity**
- **The control populations should be matched according to ethnicity as well as other potential confounding factors**

# Definizione del genotipo: la ricerca del gene

Studi di **associazione**:

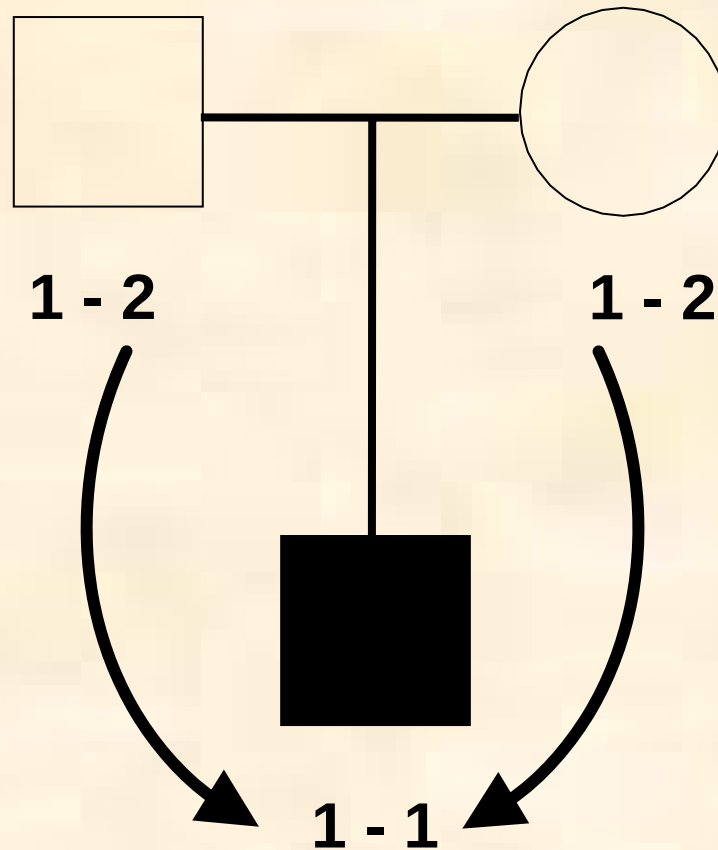


affetti vs non affetti

Caso-controllo

# TDT Design

---



**A1 è trasmesso al malato ed è associato alla malattia**

# Associazione Genetica = Linkage Disequilibrium

- Più il gene malattia è vicino al marcatore, più a lungo l'associazione **allele** marcatore/malattia persisterà

Disease locus

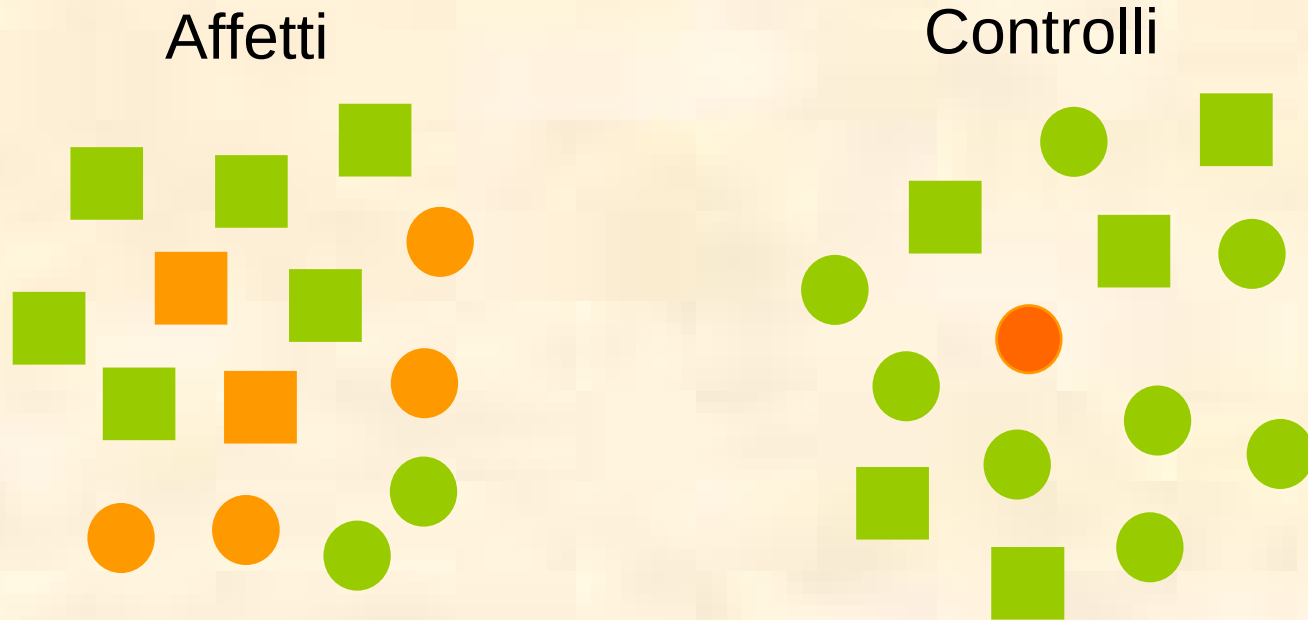


Locus 1

Locus 2

- Differenti popolazioni possono avere differenti “varianti” al locus marcatore

Gli studi di associazione ricercano differenze tra un gruppo di soggetti affetti e un gruppo di soggetti sani



Utilizzano il Linkage Disequilibrium per identificare segmenti ancestrali di cromosomi rimasti inalterati poichè non soggetti a ricombinazione

# Il Linkage Disequilibrium

LA MUTAZIONE AVVIENE SU UN CROMOSOMA ANCESTRALE



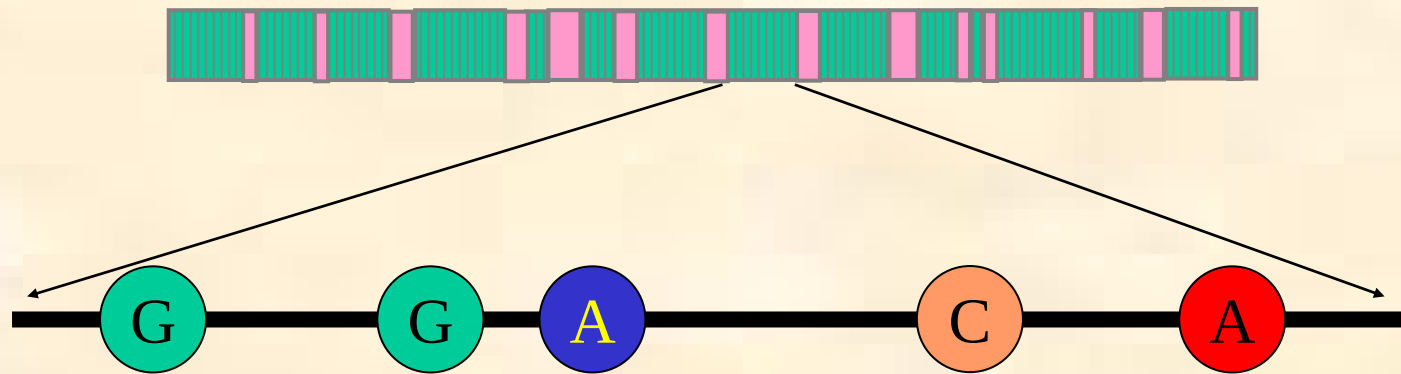
**Il 65-85% del DNA è costituito da blocchi cromosomici  
inscindibili che contengono fino a 12-20 SNPs**

**Questi blocchi sono separati gli uni  
gli altri da hot spot di ricombinazione**

**Ridotta variabilità (**LD**), maggiore facilità  
di mappare geni di suscettibilità**

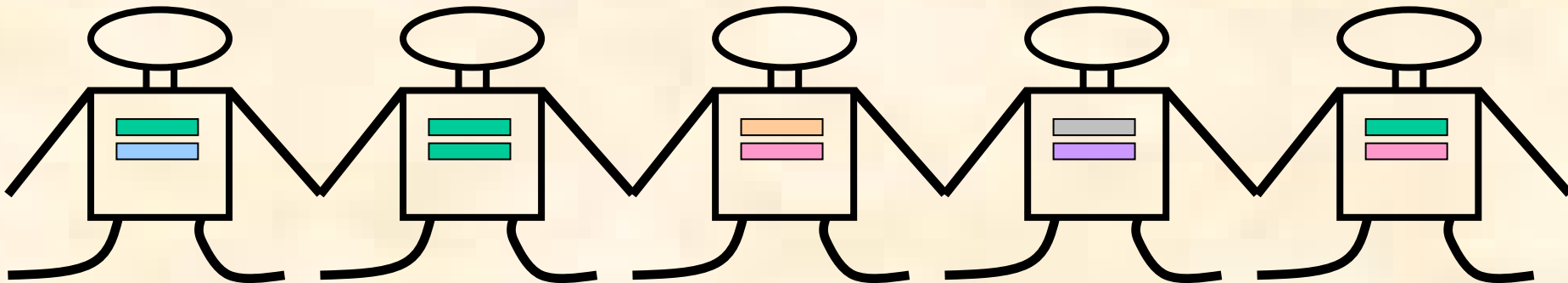
**Il numero di SNPs da caratterizzare diminuisce,  
poiché non sono indipendenti tra loro**



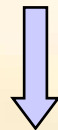


Ciascun blocco, in un individuo, può essere identificato da una specifica combinazione di alleli (SNPs).

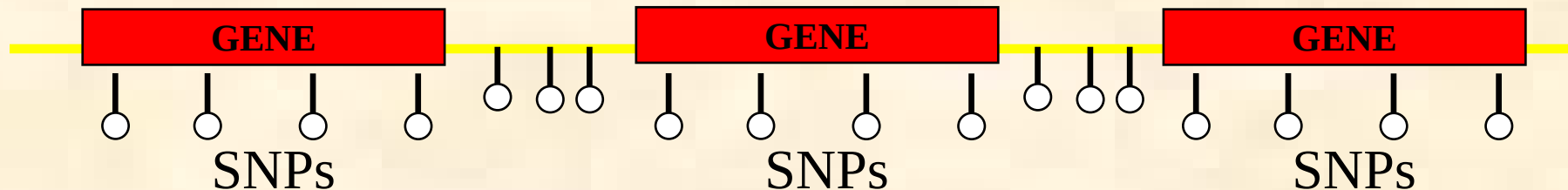
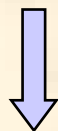
|          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|
| <b>A</b> | <b>G</b> | <b>A</b> | <b>C</b> |
| <b>T</b> | <b>T</b> | <b>A</b> | <b>C</b> |
| <b>T</b> | <b>T</b> | <b>C</b> | <b>C</b> |
| <b>A</b> | <b>T</b> | <b>C</b> | <b>T</b> |
| <b>A</b> | <b>G</b> | <b>C</b> | <b>T</b> |
| <b>A</b> | <b>G</b> | <b>C</b> | <b>T</b> |



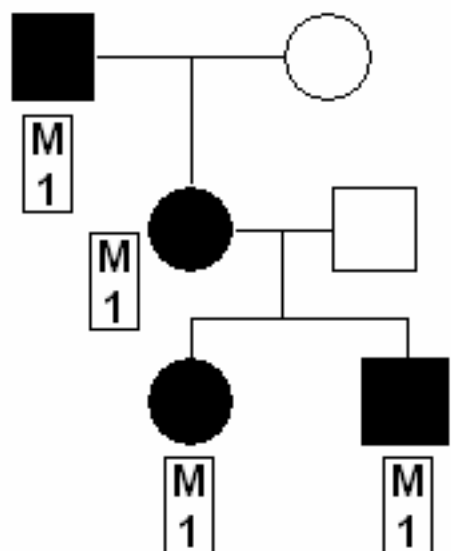
Una volta identificata una regione di suscettibilità, si selezionano i geni e le regioni regolative conservate e si analizzano *solo* gli SNPs in essi compresi



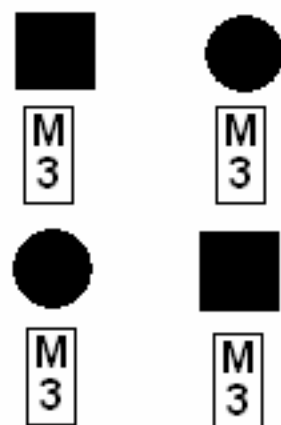
Il numero degli SNPs da tipizzare si riduce ulteriormente



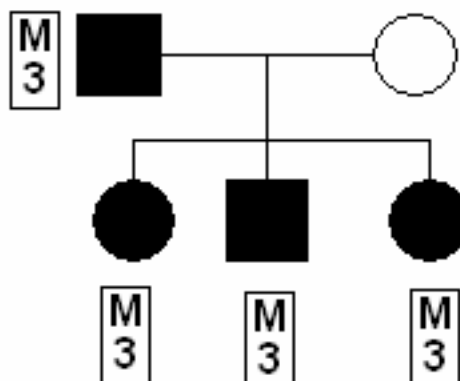
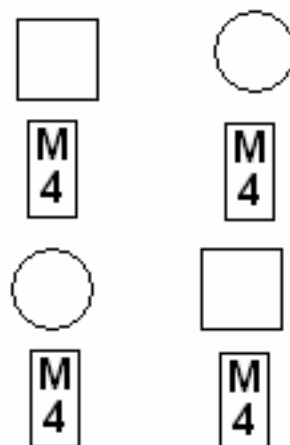
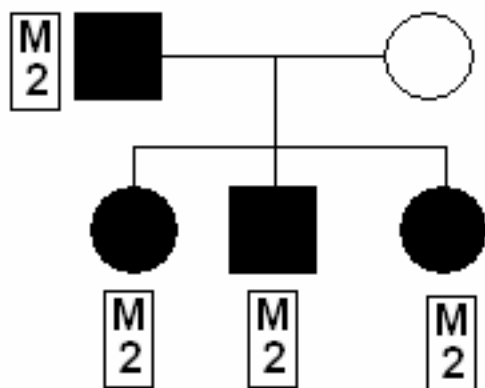
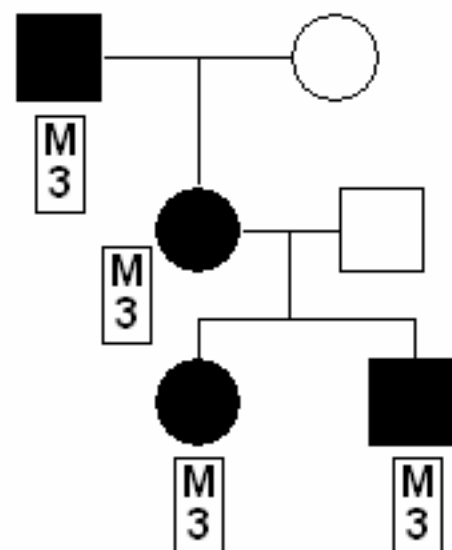
## LINKAGE



## ASSOCIAZIONE



## LINKAGE DISEQUILIBRIUM



# Associazione Genetica

=

## Linkage Disequilibrium

- Più il gene malattia è vicino al marcatore, più a lungo l'associazione **allele** marcatore/malattia persisterà

Disease locus



Locus 1

Locus 2

- Differenti popolazioni possono avere differenti “varianti” al locus marcatore