

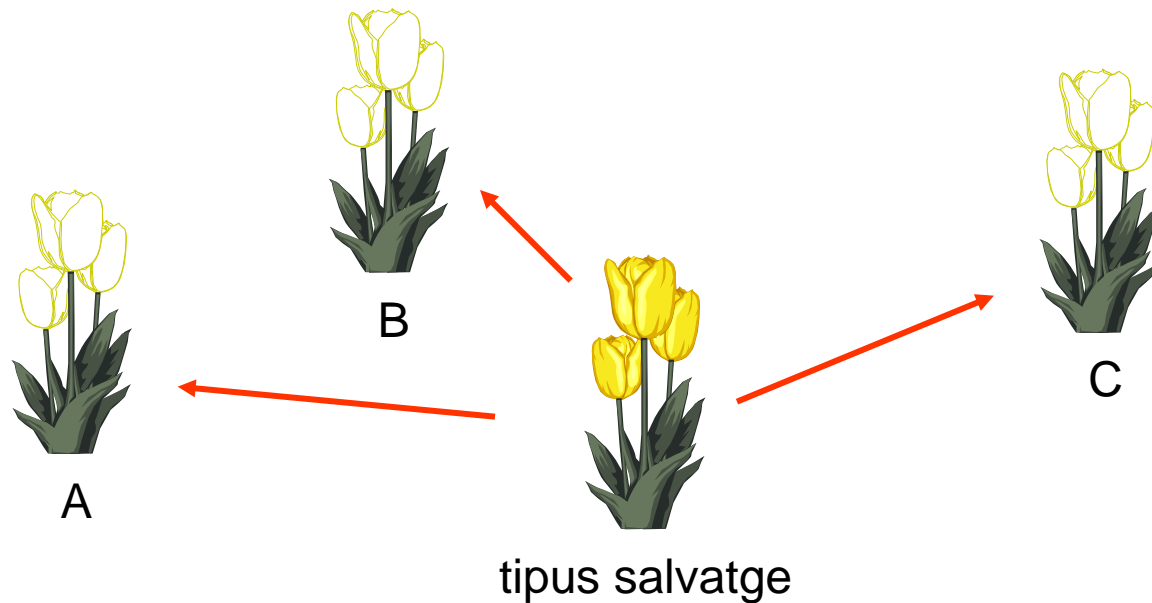
# TEMA 3

## Complementació i cartografia per delecions

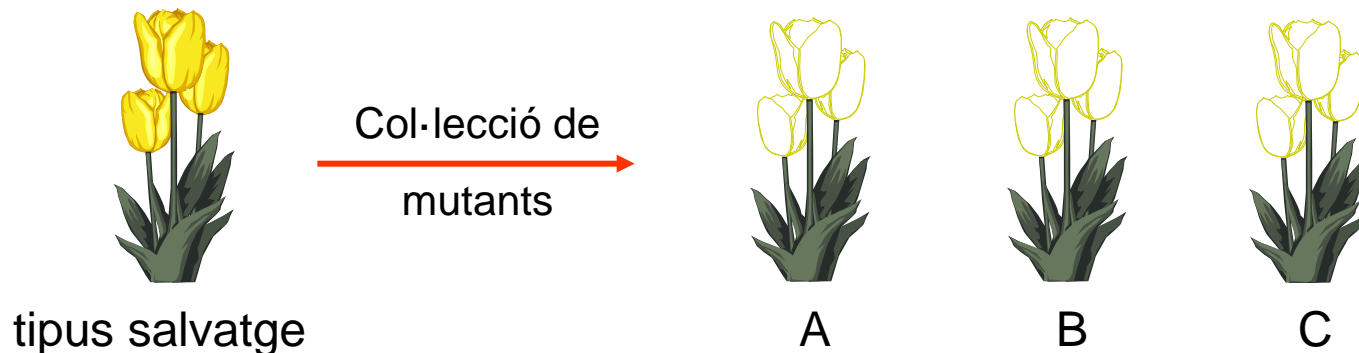
1. Prova de complementació
2. Obtenció de mapes utilitzant delecions en espècies amb cromosomes gegants
3. Ús combinat de delecions i hibridació in situ per cartografiar gens humans
4. Resolució de problemes

# 1. Prova de complementació

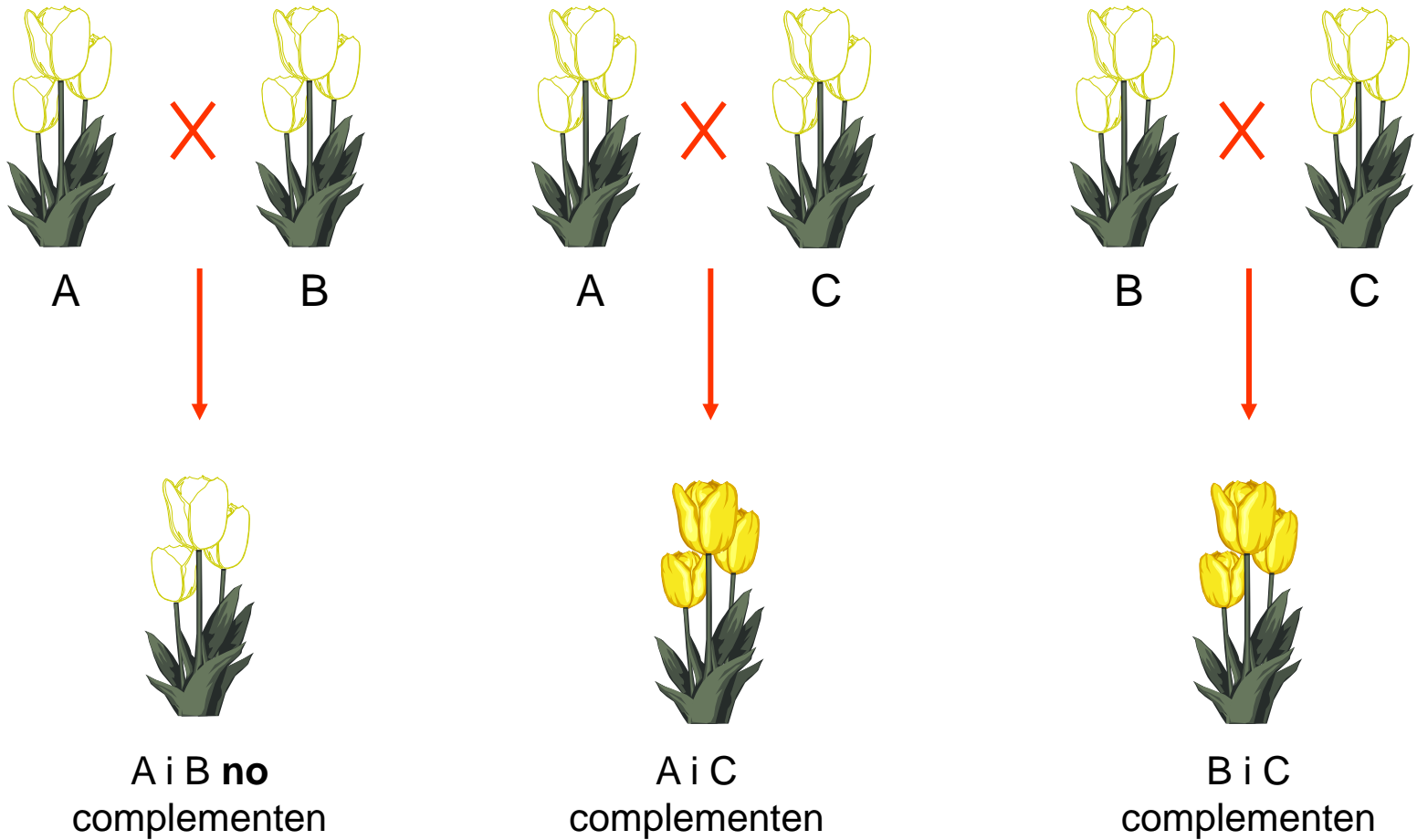
Molts programes d'investigació genètica tenen com a objectiu veure quins gens participen en un determinat procés biològic. Aquestes anàlisis solen començar amb una col·lecció de fenotips mutants respecte al procés biològic que volem estudiar (p.e.: el color dels pètals d'una flor), ja siga obtinguts de forma natural o artificialment per mutagènesi.



Un primer pas quan es té la col·lecció de mutants és determinar quants gens diferents hi estan implicats, és a dir, veure quantes mutacions de la col·lecció són al·lèliques i quantes pertanyen a diferents gens. Per a aquesta tasca s'utilitza la prova d'al·lelisme o prova de complementació.

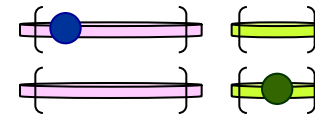
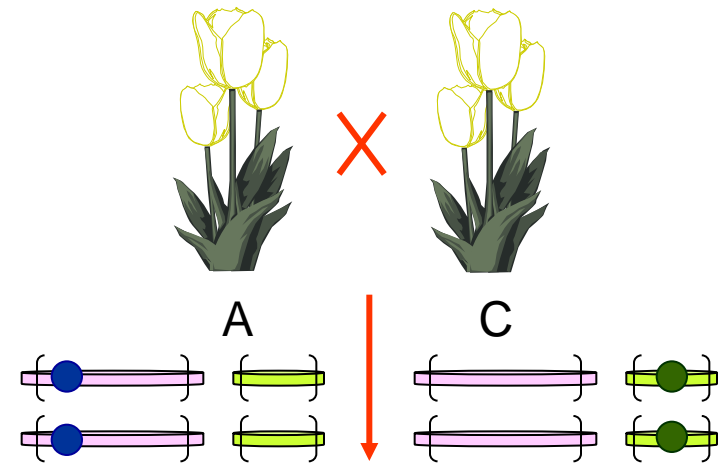
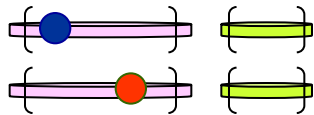
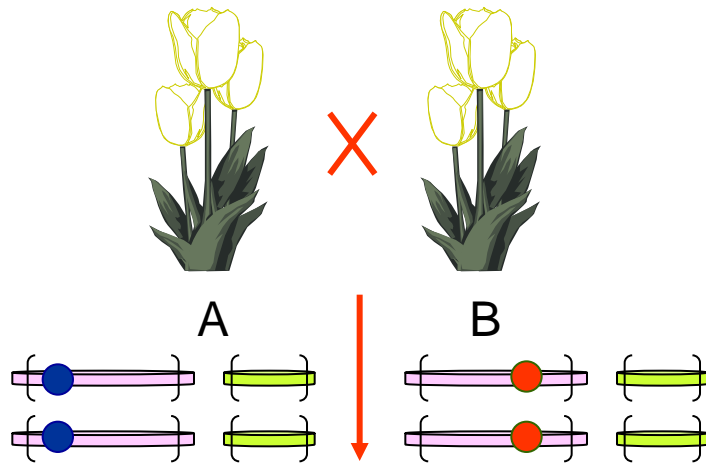


Existeixen **tres** gens implicats en la producció del pigment groc, només **dos** o tan sols **un**?

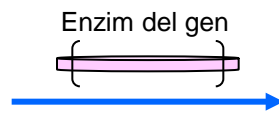


A i B són mutacions que afecten el mateix gen, mentre que C afecta un gen diferent.

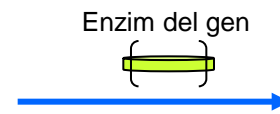
Aquesta prova només es pot aplicar si les mutacions són **recessives**.



Precursor  
incolor 1



Precursor  
incolor 2

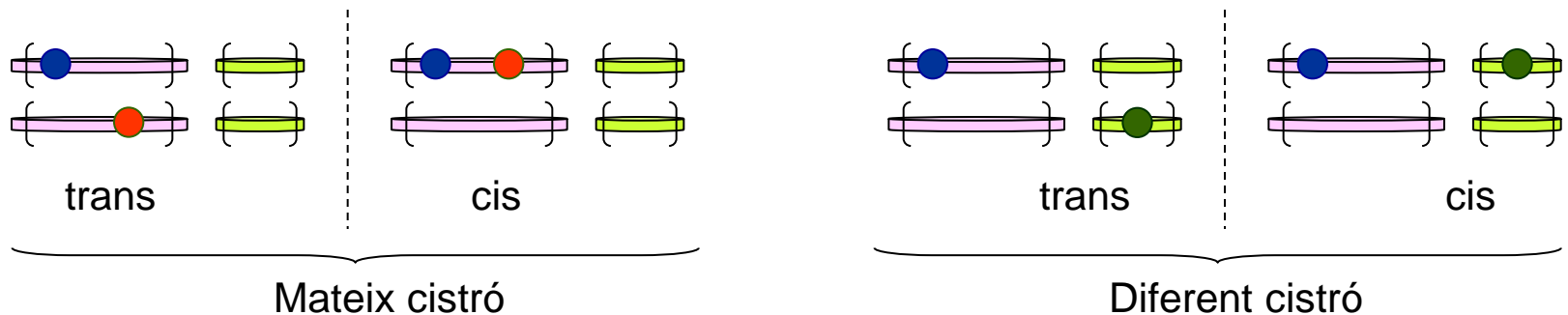


Producte  
final groc

## Origen del terme cistró:

A partir d'experiments d'aquest tipus (realitzats inicialment en virus per Benzer) es va trobar que el gen no era la unitat de mutació, encara que sí de funció. Es va encunyar la paraula cistró per designar la unitat de funció del gen (cistró és equivalent a gen, però és una nomenclatura molt utilitzada en proves de complementació).

La raó per la qual es va encunyar el terme cistró és perquè, en proves de complementació (anomenades aleshores proves cis-trans), dues mutacions del mateix gen no complementaven si es trobaven en posició trans, però no obstant això donaven el fenotip salvatge quan es trobaven en posició cis:

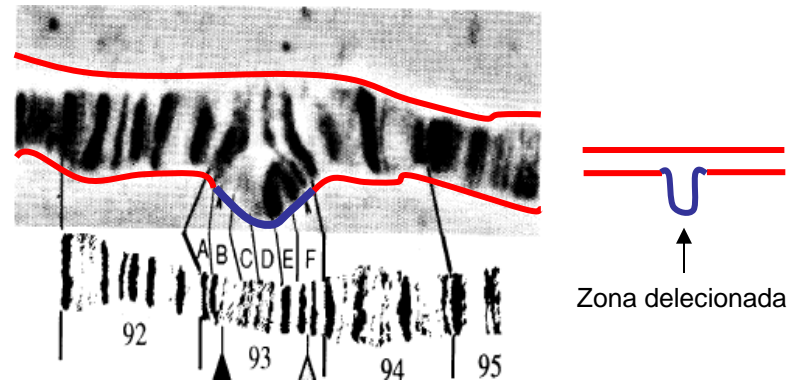
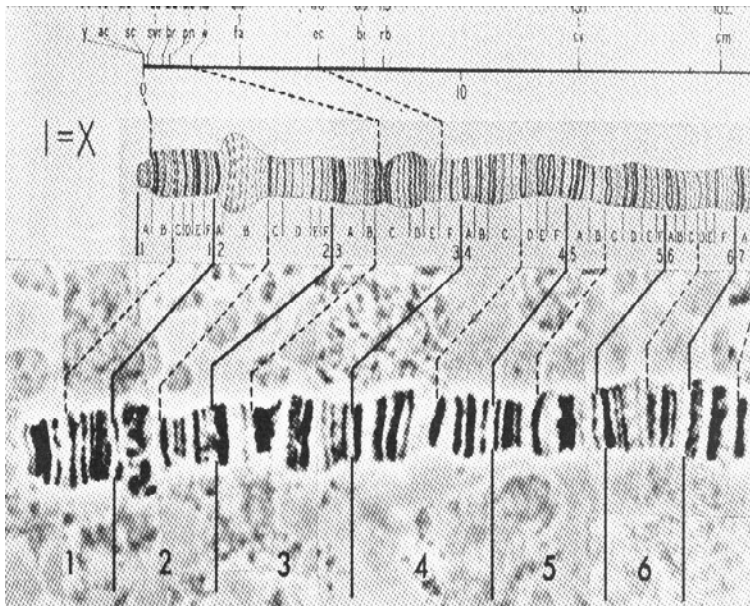


## 2. Obtenció de mapes utilitzant delecions en espècies amb cromosomes gegants

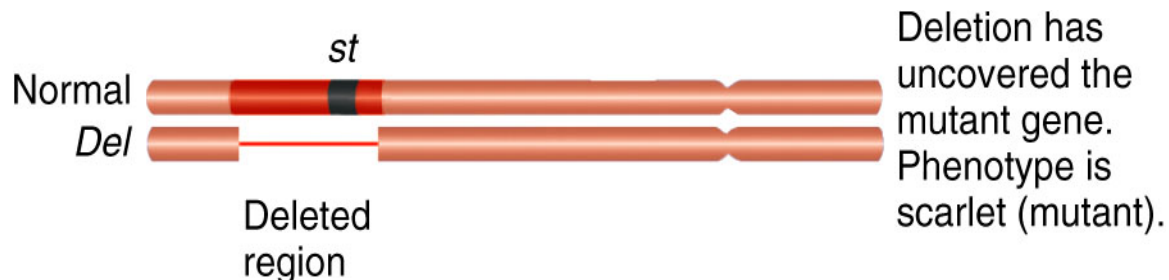
Les espècies amb cromosomes gegants han permès l'obtenció de mapes citogenètics molt precisos basats en el patró de bandes.

En aquestes espècies, les soques amb delecions han permès detectar amb gran precisió, al mapa citogenètic, el tros de cromosoma perdut.

Mapa genètic, mapa citològic i fotomapa de part del cromosoma X de *D. melanogaster*.



El mapeig per delecions aprofita el fenomen de pseudodominància en proves de complementació, ja que una mutació recessiva en heterozigosi amb una delecio que incloga el seu gen s'observarà a nivell fenotípic.



Procediment: S'encreua un individu homozigot per a una mutació recessiva amb un heterozigot per a la delecio.

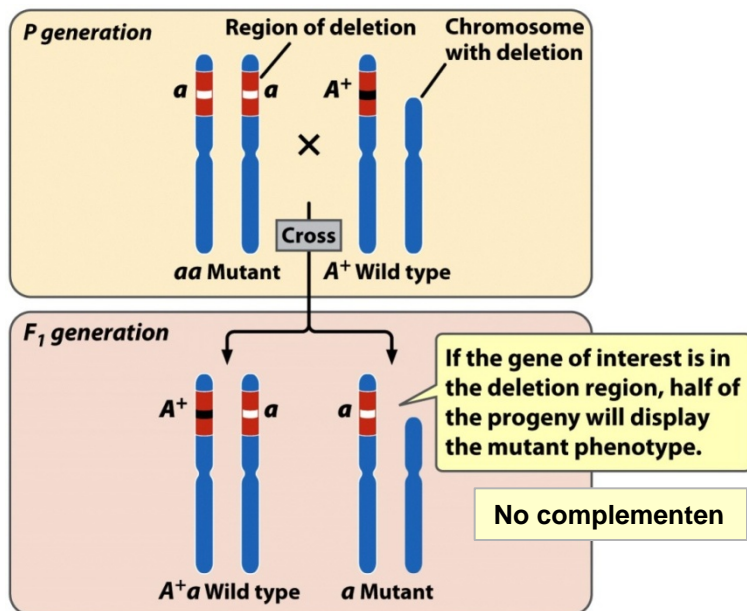


Figure 7-20a  
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition  
© 2009 W.H. Freeman and Company

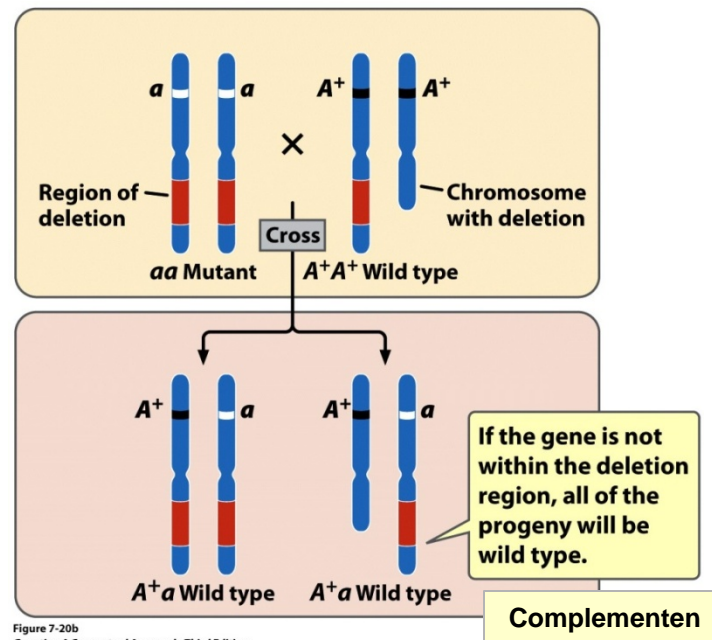
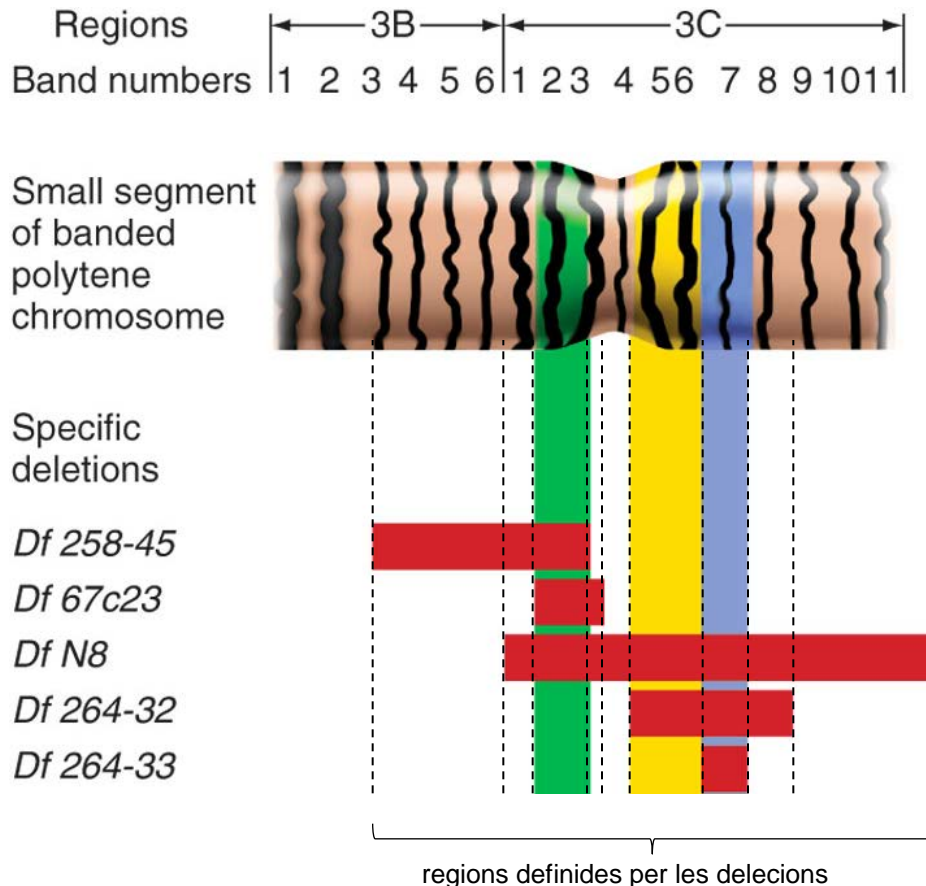


Figure 7-20b  
Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition  
© 2009 W.H. Freeman and Company

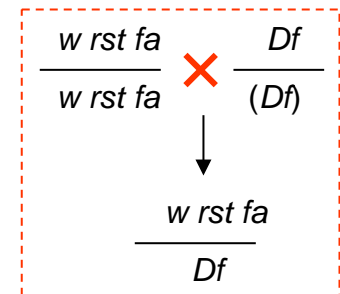


En espècies amb mapes citogenètics detallats dels cromosomes politènics es poden mapejar gens d'interès amb gran precisió.

Exemple: localització de la posició dels gens *w*, *rst* i *fa* de *D. melanogaster* a la regió 3B-3C del cromosoma 1, de la qual es disposa d'una col·lecció de mutants per delecció.



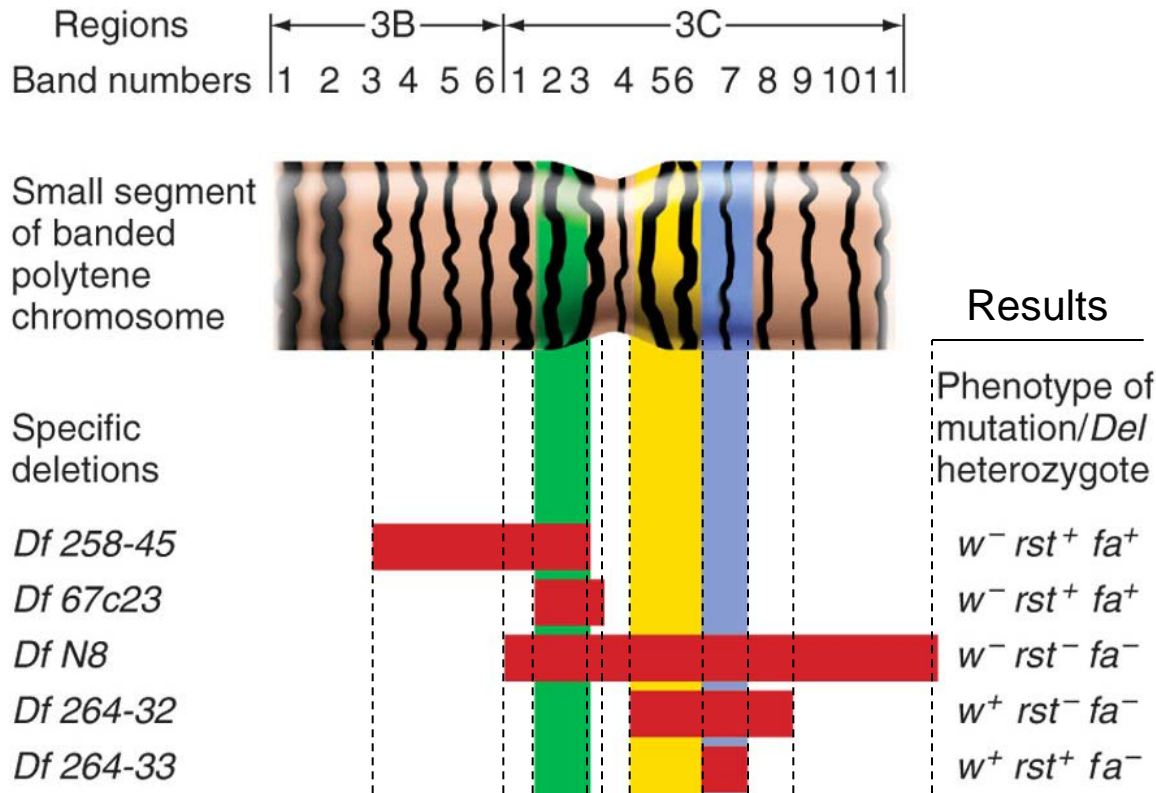
Es procediria a fer un encreuament amb cadascuna de les soques amb deletions:



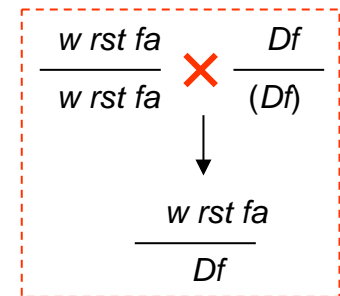
I determinaríem si es dóna o no complementació.

En espècies amb mapes citogenètics detallats dels cromosomes politènics es poden mapejar gens d'interès amb gran precisió.

Exemple: localització de la posició dels gens *w*, *rst* i *fa* de *D. melanogaster* a la regió 3B-3C del cromosoma 1, de la qual es disposa d'una col·lecció de mutants per delecció.



Es procediria a fer un encreuament amb cadascuna de les soques amb deleccions:



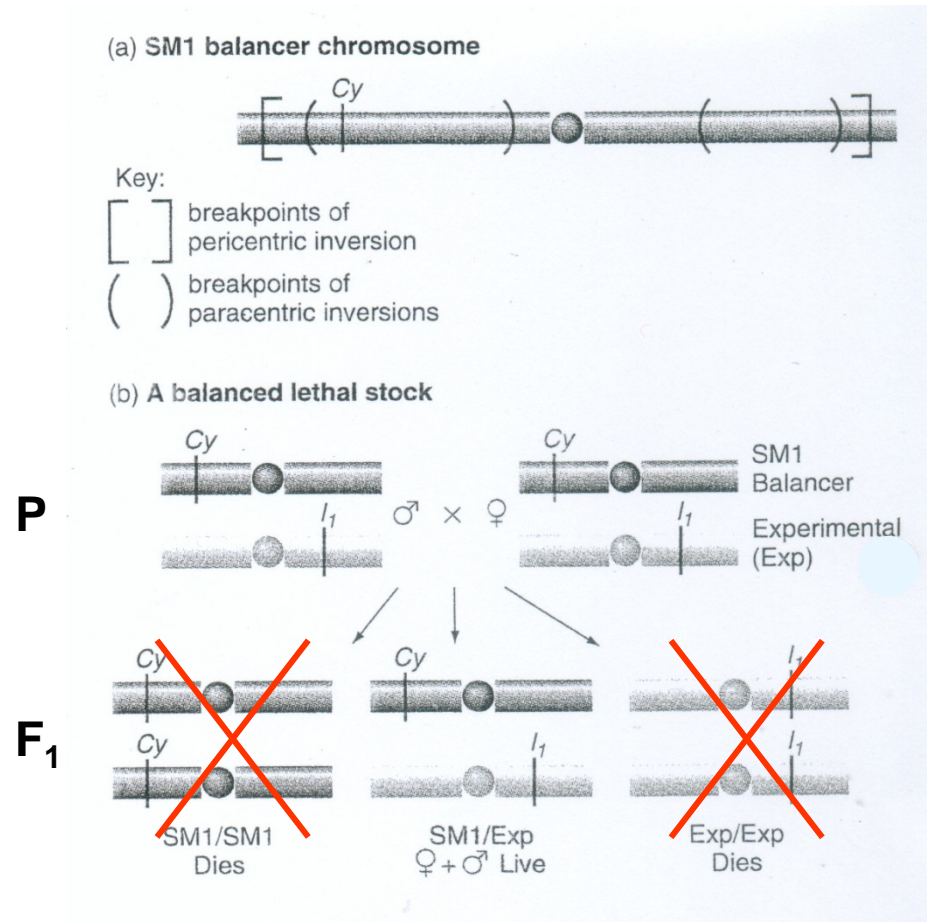
I determinaríem si es dóna o no complementació.

## Ús de cromosomes equilibradors:

Les delecions són generalment letals en homozigosi. És per això que les soques que porten delecions han de portar-les en heterozigosi juntament amb un altre cromosoma que s'anomena equilibrador. Els cromosomes equilibradors són cromosomes amb característiques especials :

- Porten alguna mutació letal recessiva per evitar l'homozigosi.
- Un marcador dominant que produeix un fenotip visible (freqüentment el marcador dominant és letal en homozigosi).  
Exemple: Cy, ales corbades.
- Una gran quantitat d'inversions imbricades per impedir la recombinació amb el cromosoma homòleg.

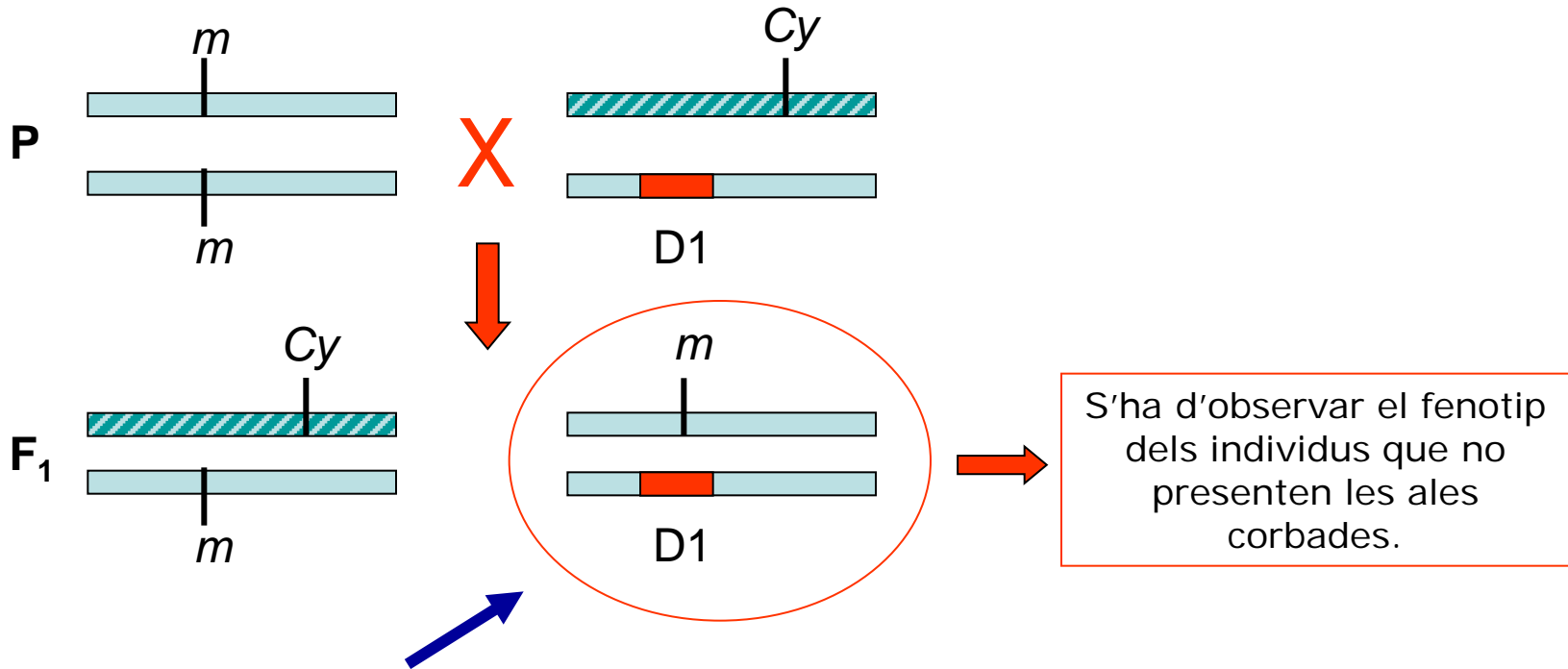
# Exemple del manteniment d'una soca amb letals recessius (p.e., delecions) mitjançant cromosomes equilibradors:



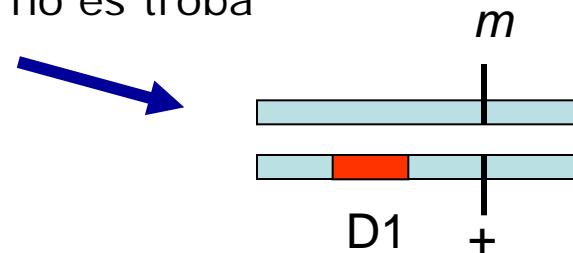
*Cy* és un marcador dominant letal recessiu.

*l<sub>1</sub>* pot ser una deleción.

# Esquema per mapejar una mutació per anàlisi de complementació fent servir delecions:



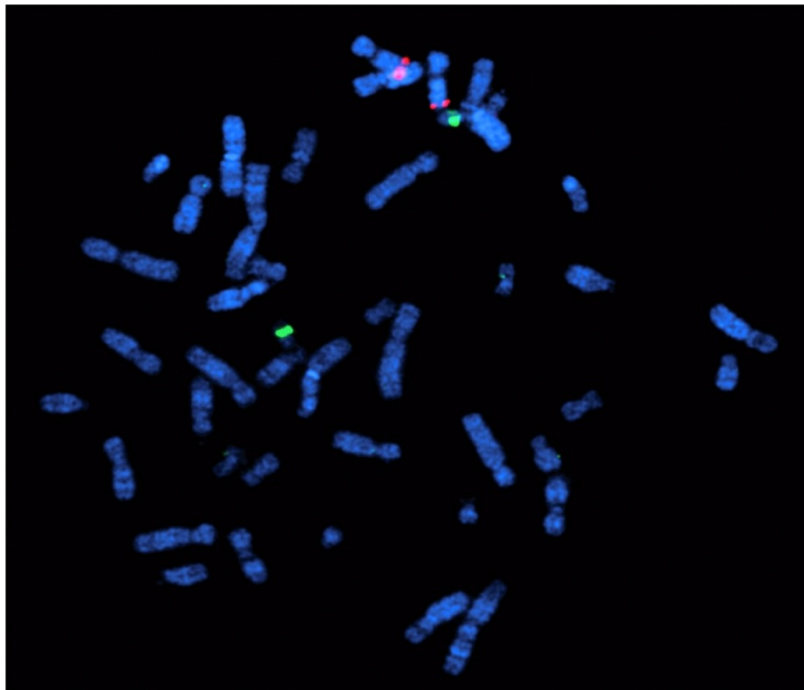
- 1) Si són mutants per a *m* (mostren pseudodominància), llavors la mutació es troba dins de la deleción.
- 2) Si són normals per a *m*, llavors no es troba en la regió delecionada.



### 3. Ús combinat de deleccions i hibridació in situ per cartografiar gens humans

La hibridació *in situ* és una tècnica molecular d'assignació de gens (seqüències gèniques, en realitat) a cromosomes i localitzacions cromosòmiques dins dels mateixos.

Per a això s'utilitzen seqüències del gen, anomenades sondes, que es marquen radioactivament o mitjançant molècules fluorescentes. Aquestes sondes hibriden amb la seqüència homòloga en les preparacions cromosòmiques.



Fluorescència roja: sonda d'un gen del cromosoma 9 humà.

Fluorescència verda: sonda d'un gen del cromosoma 22 humà.



# PRINCIPIS DE LA HIBRIDACIÓ *in situ*

- a) Sonda
- b) Marcatge
- c) Desnaturalització
- d) Incubació
- e) Eliminació d'excés de sonda

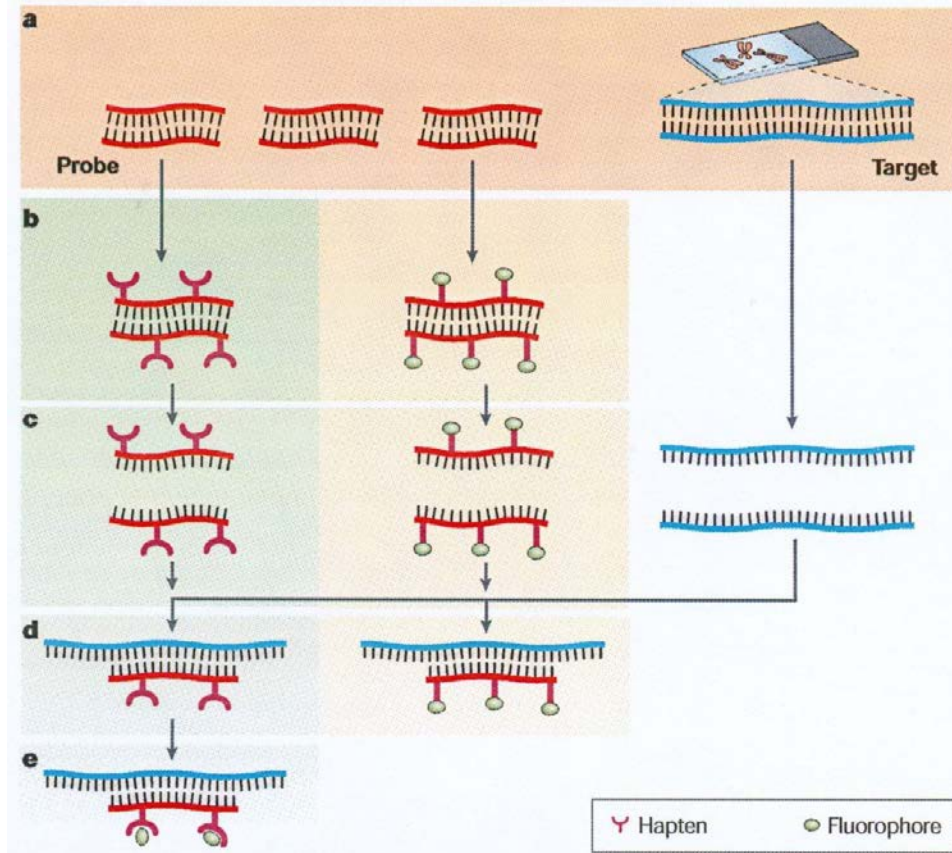


Figure 1| **Principles of fluorescence *in situ* hybridization.** **a** | The basic elements of fluorescence *in situ* hybridization are a DNA probe and a target sequence. **b** | Before hybridization, the DNA probe is labelled by various means such as NICK TRANSLATION, RANDOM-PRIMED LABELLING and PCR. Two labelling strategies are commonly used — indirect labelling (left panel) and direct labelling (right panel). For indirect labelling, probes are labelled with modified nucleotides that contain a HAPTEN, whereas direct labelling uses the incorporation of nucleotides that have been directly modified to contain a fluorophore. **c** | The labelled probe and the target DNA are denatured to yield ssDNA. **d** | They are then combined, which allows the annealing of complementary DNA sequences. **e** | If the probe has been labelled indirectly, an extra step is required for visualization of the non-fluorescent hapten that uses an enzymatic or immunological detection system. Whereas FISH is faster with directly labelled probes, indirect labelling offers the advantage of signal amplification by using several layers of antibodies, and might therefore produce a signal that is brighter compared with background levels. Finally, the signals are evaluated by fluorescence microscopy (not shown).