

Esercitazioni di laboratorio del corso di genetica

Gaia Faggin

Giacomo Fantoni

Filippo Gastaldello

Elisa Pettinà

Github: <https://github.com/giacThePhantom/LabGenetica>

4 gennaio 2021

Organismo Modello *Saccharomyces cerevisiae*

Panoramica

Il microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, comunemente conosciuto come lievito del pane è un organismo eucariote unicellulare. È stato ampiamente utilizzato per studiare la genetica degli eucarioti, ma il suo utilizzo risale all'antichità. Veniva infatti usato per la produzione di pane, birra e, in tempi più moderni, di bicarbonati. Nel 1857 Pasteur lo identifica come il microorganismo responsabile della fermentazione, mentre il suo utilizzo nell'analisi genetica inizia nel 1935. Le numerose ricerche compiute su esso hanno permesso di caratterizzare accuratamente i suoi geni. Allo stesso tempo, la natura unicellulare del lievito lo rende adatto alle tecniche molecolari sviluppate per i batteri. Questo organismo permette pertanto di combinare la genetica classica e la biologia molecolare, rendendolo un modello potente per lo studio dei sistemi genetici eucarioti

Vantaggi come organismo genetico modello

Il lievito, oltre ad essere un organismo eucariote con sistemi genetici simili a quelli di altri organismi più complessi come l'uomo, è anche unicellulare, cosa che lo rende semplice da maneggiare come i batteri. Ha tempi di coltura veloci in laboratorio: una divisione cellulare avviene in 90 minuti, in condizioni normali di crescita. Essendo comunque un organismo eucariote possiede comunque un nucleo distinto con cromosomi lineari multipli assemblati in cromatina e il citoplasma è dotato dell'intero spettro di organelli intracellulari e di strutture citoscheletriche. Può esistere sia in forma aploide che diploide. Quando si trova in forma aploide le cellule possiedono un solo allele in ogni locus. Questo allele verrà pertanto espresso, rendendo impossibile un mascheramento dell'espressione di altri alleli da parte di alleli dominanti. Questo permette una facile identificazione degli alleli recessivi nelle cellule aploidi. In un secondo momento si può complementare il lievito rendendolo diploide in modo da studiare l'interazione di questi alleli con altri. Un'altra caratteristica del lievito è che al termine della meiosi tutti i gameti prodotti si trovano in un *asco* e rimangono separati dai gameti prodotti nelle altre divisioni meiotiche. Le quattro cellule contenute in un asco sono dette *tetradi*. L'analisi genetica delle tetradi in *S. cerevisiae* consente di osservare direttamente gli effetti delle singole divisioni meiotiche e di identificare più facilmente gli eventi di crossing-over. Numerosi analisi genetiche hanno identificato migliaia di mutanti e molte potenti tecniche molecolari sviluppate per manipolare le sequenze genetiche nei batteri sono state adattate per essere usate nel lievito. Infine le cellule del lievito possiedono molti geni presenti anche nell'uomo e in altri eucarioti complessi con funzionalità identiche o simili. Si nota pertanto come lo studio genetico delle cellule di lievito spesso contribuisce alla comprensione di meccanismi di organismi più complessi, uomo compreso.

Il ciclo vitale del lievito

Saccharomyces cerevisiae può pertanto esistere sotto forma di cellule aploidi o diploidi.

Forma aploide

La forma aploide compare tipicamente in condizioni di carenza di nutrienti. Il lievito si riproduce per via mitotica, producendo due cellule aploidi identiche al genitore per gemmazione.

Forma diploide

La forma diploide nasce dopo riproduzione sessuata del lievito. Si distinguono due tipi sessuali: a e α . Due cellule appartenenti a tipi sessuali diversi si uniscono e fondono i nuclei, dando origine a una cellula diploide, in grado di generare cellule diploidi geneticamente identiche per gemmazione. La carenza di sostanze nutritive induce le cellule a subire meiosi, formando quattro nuclei aploidi in cellule diverse e infine 4 spore aploidi.

Cambiamenti di forma

Durante la progressione del ciclo cellulare le cellule di *Saccharomyces cerevisiae* cambiano forma. Immediatamente dopo il rilascio dalla cellula madre, la figlia ha una forma leggermente ellittica. Durante il ciclo cellulare sviluppa una piccola gemma da cui si origina una nuova cellula. La spora cresce fino a raggiungere le stesse dimensioni della cellula madre da cui origine, viene rilasciata e ricomincia il ciclo. Essendo l'insorgenza di una nuova gemma strettamente legata all'inizio della replicazione del DNA, osservazioni al microscopio sono in grado di fornire molte informazioni riguardo gli eventi interni alla cellula.

Genoma del lievito

Saccharomyces cerevisiae contiene 16 paia di cromosomi eucariotici. Il genoma contiene 12 milioni di paia di basi oltre a 2-3 milioni di paia di geni di *rRNA*. È stato il primo organismo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato. In esso sono stati identificati circa 6000 geni. La sua analisi genomica è potenziata dal fatto che quando un DNA lineare con estremità omologhe viene introdotto nel lievito si osserva un incremento notevole della frequenza di ricombinazione omologa. Questa proprietà può essere usata per causare precise mutazioni nel genoma. Il 25% dei geni sono in comune con l'uomo. La dimensione media dei geni è di 1.5Kbp, con una media di 0.03 introni per gene. Possiede inoltre pochi trasposoni.

Plasmidi del lievito

Plasmide 2 μ Le cellule del lievito in natura possiedono un plasmide circolare 2 μ . È lungo 6300 paia di basi e viene trasmesso durante mitosi e meiosi alle cellule figlie. Possiede un'origine di replicazione riconosciuta dal sistema di replicazione del lievito ed è in grado di replicarsi in modo autonomo nella cellula. Modifiche al plasmide lo hanno reso un vettore efficiente per il trasferimento di geni nel lievito.

Plasmidi batterici Plasmidi batterici modificati possono essere usati come vettori per il trasferimento dei geni. Alcuni di questi sono in grado di dare ricombinazione omologa con il cromosoma del lievito trasferendo le loro sequenze al genoma di *Saccharomyces cerevisiae*.

Ambiti di utilizzo

Saccharomyces cerevisiae viene utilizzato in vari ambiti:

- Studio dell'invecchiamento.
- Studio dell'apoptosi.
- Controllo del ciclo cellulare.
- Ricombinazione.
- Studi sull'interazione tra proteine.
- Genetica dei tipi sessuali: studio della risposta agli ormoni riproduttivi del tipo sessuale opposto.

Mutagenesi *in vitro*

Introduzione

Questo esperimento vuole verificare l'efficacia e la precisione della polimerasi in presenza di sostanze tossiche e/o inibitorie. L'organismo modello utilizzato è il lievito *Saccharomyces Cerevisiae* in forma aploide. Viene utilizzata come sostanza inibitoria il cloruro di manganese $MnCl_2$. Il DNA prodotto viene poi visualizzato attraverso *PCR* ed elettroforesi.

Polimerase chain reaction *PCR*

La *PCR* è una tecnica *in vitro* in cui viene utilizzato il calore per separare le due eliche di DNA. In natura questo compito viene svolto da un'elicasi. Un successivo abbassamento della temperatura permette il legame di un primer a una sequenza precisa di DNA. Questo permettere alla *PCR* di trovare un 3'-OH da cui iniziare la replicazione. Varie ripetizioni del processo permettono di amplificare il DNA.

Effetti del cloruro di manganese

Gli ioni magnesio sono usati come catalizzatori della polimerizzazione favorendo la sostituzione nucleofila del 3'-OH libero del primer con il fosfato del nucleotide. Ci si chiede se il manganese sia in grado di competere con il magnesio per l'accesso allosterico e come possa cambiarne l'efficienza. Per verificare questo fatto viene svolta una *PCR* in presenza di diverse concentrazioni di cloruro di manganese.

DNA da amplificare

La sequenza di DNA da amplificare codifica per un gene reporter. Nella cellula verrà inserito per trasformazione un plasmide linearizzato *pRDI22*. Questo plasmide contiene oltre al gene reporter, il gene *leu* un'origine di replicazione e una regione centromerica. Il gene *leu* viene inserito in quanto il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* è auxotrofo per la leucina. Questo permette di selezionare le colonie in cui il plasmide è stato trasformato. Il ceppo per l'adenina è auxotrofo per l'adenina in modo da verificare il funzionamento del gene *p53*, il nostro gene reporter.

Risultati attesi

L'esperimento si propone di osservare l'effetto del manganese sulla replicazione, in particolare:

- Se il manganese può influenzare i risultati della *PCR*.
- Se il manganese può introdurre mutazioni.

Trasformando cellule con il risultato della *PCR* si verifica la funzionalità del gene amplificato. Se il gene reporter è replicato in maniera corretta, i lieviti con questo gene cresceranno di colore bianco, se il DNA viene mutato, il lievito crescerà con colorazione tra il rosso e il rosato.

Risultati

Sono state usate quattro diverse concentrazioni di manganese cloruro, $0M$, $0.25M$, $0.5M$ e $1M$, più una provetta di controllo negativo senza DNA per verificare la purezza dei reagenti.

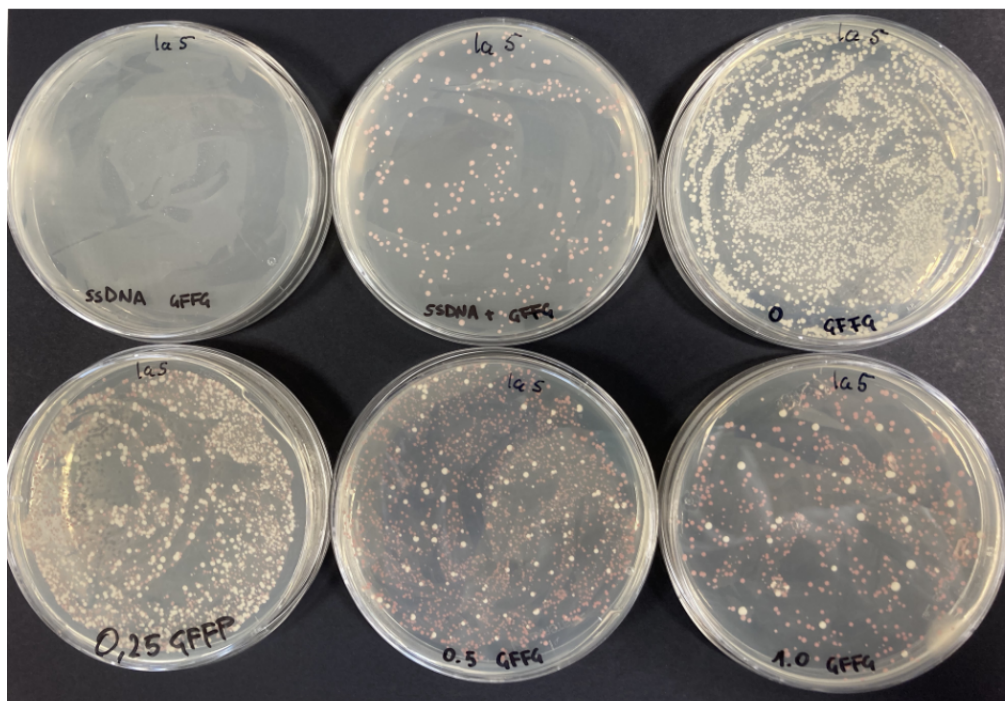


Figura 1: Colonie formatesi a diverse concentrazioni di $MnCl_2$

Concentrazione di $MnCl_2$	$0M$	$0.25M$	$0.5M$	$1M$
Conta totale	2672CFU	1822CFU	1778CFU	599CFU
Colonie mutate	236CFU	1044CFU	1672CFU	5564CFU
Tasso di mutazione	8.83%	57.3%	94%	94.16%

Tabella 1: Conta delle colonie

Considerazioni finali

I risultati ottenuti, come si vede nella tabella 1, dimostrano come, non solo il cloruro di manganese riesca a competere con il magnesio per l'accesso al sito allosterico, ma anche quanto riesca a influire

sia sull'efficienza della replicazione, che sulla sua precisione. Al crescere della concentrazione di manganese cloruro infatti, la conta totale di cellule in piastra, diminuisce, mentre aumenta la percentuale delle cellule mutate. Il tasso di mutazione nella coltura trasformata con il plasmide amplificato in assenza di manganese è imputabile all'affidabilità della *PCR*.

Effetto dell'esposizione a $CdCl_2$ e MMR di mutanti al sistema di riparazione dei mal appaiamenti "Mismatch Repair"

Introduzione

Questo esperimento vuole valutare la qualità della trasmissione del DNA concentrandosi sui meccanismi di riparazione dello stesso in diverse condizioni ambientali. Si cercherà di comprendere le eventuali esposizioni ambientali su di un gene e la bontà della replicazione del DNA, focalizzandosi su errori di replicazione che vengono - o non vengono - riparati.

I genotipi dei ceppi

Può succedere in vivo che una polimerasi catalizzi il nucleotide sbagliato durante il processo di replicazione, ma questo errore può essere ancora riconosciuto e risolto. I due modi in cui una cellula ripara i *mismatch* sono l'attività di proofreading polimerasica ed il sistema di riparazione dei mal-appaiamenti (MMR). Volendo studiare mutazioni causate da mismatch, a questo punto sorge un'ambiguità: la mutazione potrebbe essere stata causata dal fallimento dell'attività esonucleasica della polimerasi, da un errore nel nucleotide incorporato erroneamente o del DNA *mismatch repair* (MMR). Si è costruito pertanto un sistema che permettesse di superare l'ambiguità causata da questa doppia linea di difesa contro i mal appaiamenti. Si è visto che in lunghe sequenze omonucleotidiche la polimerasi tende ad introdurre un nucleotide in più. Se la sequenza omonucleotidica da copiare è ricca soprattutto in A e T e diventa lunga di 7 nucleotidi, il sistema di proofreading sembra essere totalmente inefficace. Perciò un solo meccanismo di riparazione rimane efficace: MMR appunto. Su questa osservazione che si basa l'esperimento. Non tutte le sequenze di DNA sono replicabili con la stessa efficacia, quelle che potrebbero rappresentare siti di mutazione vengono chiamate *at risk motifs*. Si vuole testare, sfruttando queste sequenze più fragili, se alcune condizioni nel terreno, come agenti mutageni, possono interferire con il sistema MMR. La sostanza mutagena scelta è il cadmio cloruro ($CdCl_2$). In vivo si ha bisogno di un saggio reporter, per questo esperimento viene utilizzato il gene *lys2* coinvolto nella biosintesi della lisina. Si ha a disposizione un ceppo il quale è stato precedentemente sottoposto ad un intervento di ingegnerizzazione, nel quale il gene *lys2* è stato inattivato da uno *stretch* omonucleotidico di 14A. Il quadro di lettura del nostro ceppo sarà quindi sfalsato a valle a causa delle 13 adenine esogene, inserite al centro della sequenza codificante, impedendo al ceppo di vivere in un terreno privo di lisina. Oltre al ceppo appena descritto detto *wild type* (WT), vengono sfruttati altri tre ceppi: $\delta msh2$, nel quale è stato inattivato il gene *msh2*, $\delta msh6$ nel quale è stato reso inattivo il gene *mlh1* ed infine, $\delta msh6$, con gene *msh6* spento. Questi tre geni silenziati codificano ciascuno per una proteina che fa parte del complesso proteico coinvolto del sistema di riparazione dei mismatch. Di seguito si riportano i genotipi.

- WT (*MATalpha*, *ade5-1 his 7-2 leu 2-3, 112 trp1-289 ura3-52 lys2::insE-A14*).
- $\delta msh2$ (isogenico al WT tranne per la *msh2::kanMX*).
- $\delta mlh1$ (isogenico al WT tranne per la *mlh1::kanMX*).
- $\delta msh6$ (isogenico al WT tranne per la *msh6::kanMX*).

Preparazione dell'esperimento

L'esperimento è stato preparato nell'arco dei tre giorni. Per prima cosa, partendo dalle colonie di ciascun ceppo di lievito fornite, si sono preparate due *patches* su una piastra YPDA, seguendo lo schema riportato sul protocollo, usando stecchi sterili. Si è lasciato incubare a 30°C durante la notte. Il giorno dopo le piastre con i *patches* di ceppi mutanti sono state replicate su cinque diverse piastre con la tecnica di replica plating, usando un panno di velluto. Una piastra contiene un terreno *SD complete*, da usare come controllo; un'altra con *SD lys*, deficiente di lisina; altre due piastre *SD lys CdCl₂*, rispettivamente con una dose di cadmio cloruro di 0.5µM e 5µM; un'ultima piastra contenente *SD his*, un terreno privo di istidina. Si sono lasciate queste piastre ad incubare a 30°C e quattro giorni dopo si è potuto apprezzare il risultato.

Risultati ottenuti

Come ci si aspettava, nella piastra contenente un media completo (figura 5) tutti i diversi ceppi sono cresciuti senza rilevazione di sostanziali differenze. Nella piastra con terreno senza lisina (figura 6) possiamo invece osservare che il ceppo WT non è riuscito a crescere, con apparizione di 17 colonie totali. I ceppi $\delta msh2$ e $\delta mlh1$ hanno visto una crescita importante, mentre il ceppo $\delta msh6$ leggermente minore alle due precedenti. Un risultato molto simile, con una differenza di quantità di colonie sostanziale solo per WT, è stata registrata per la piastra con una dose di cadmio cloruro pari a 0,5µM (figura 2) e per quella contenente 5µM di *CdCl₂*. Una differenza visibile tra le due piastre contenenti *CdCl₂* e quella *SD lys* è che le colonie nelle prime due sono leggermente più piccole, anche se in numero maggiore, circa il doppio. Diversamente dalle altre, la piastra in cui era assente l'istidina, ha visto una crescita minima di tutti di ceppi: crescita nulla per WT e circa 20 colonie per *patch* per i ceppi $\delta msh2$ e $\delta mlh1$. Si osservano ora colonie di ceppi mutanti cresciuti su terreni diversi.

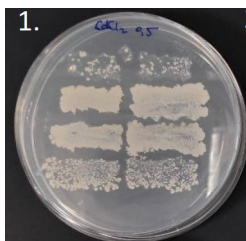


Figura 2: Terreno con *CdCl₂* 0.5µM e deficiente di lisina

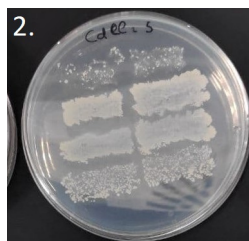


Figura 3: Terreno con *CdCl₂* 5µM e deficiente di lisina

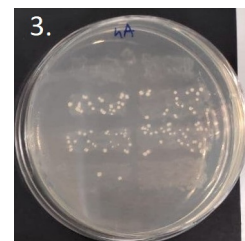


Figura 4: Terreno deficiente di istidina

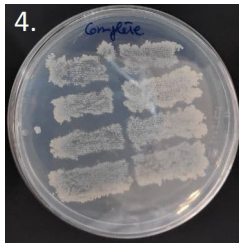


Figura 5: Terreno completo

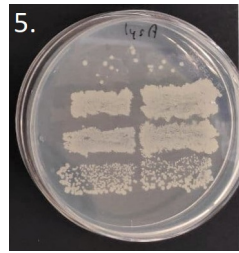


Figura 6: Terreno deficiente di lisina

Conclusioni

La quantificazione della reversione del gene *lys2* consente di stimare il numero di mal appaiamenti risolti grazie a *MMR*. Il ceppo nella prima linea di ogni piastra è il ceppo *WT*, di cui si è discusso ampiamente all'inizio di questa sezione. Il motivo per cui *WT* non riesce a crescere in un terreno privo di lisina è lo shift del quadro di lettura causato dall'inserimento di 13 adenine. Se però ci fosse un errore di sintesi del DNA, nella quale la polimerasi lascia indietro una adenina, si avrebbe una discendenza nella quale le cellule hanno 12 adenine esogene, restaurando il quadro di lettura mantenendo le stesse triplette in tutto il genoma a valle dell'inserzione e il mutante tornerebbe a crescere in un terreno senza lisina. Questo effetto lo si vede in ogni piastra nella prima riga con l'apparizione di colonie revertanti. Affinché la cellula si "lasci sfuggire" un nucleotide, *MMR* deve commettere un errore. Ciò spiega perché nelle piastre in cui è presente il cadmio cloruro si vedono più colonie revertanti del ceppo *WT*: essendo le colonie raddoppiate in piastre contenenti il mutageno, si può affermare che il sistema di *MMR* è stato compromesso dal cadmio cloruro, permettendogli di fare più errori e permettere una crescita maggiore. Per quanto riguarda gli altri ceppi, la differenza non è così sostanziale perché il loro *MMR* era già compromesso. Possono nascere altre considerazioni da questi risultati. Uno riguarda sicuramente i mutanti $\delta msh6$. Il tasso di reversione è minore rispetto agli altri due ceppi mutanti perché la proteina codificata dal gene silenziato non riveste un ruolo di fondamentale importanza nell'economia del sistema di *MMR*, facendo parte di un eterodimero facoltativo con la proteina *MSH2*. *MSH2* infatti può dimerizzare sia con *MSH6*, che con *MSH3*, non rendendo così vitale la funzione di *MSH6*. Un'altra osservazione può essere condotta sulla differenza non presente tra le due piastre con concentrazione presente di *CdCl₂*. Perché nella piastra con concentrazione di $5\mu\text{M}$ non si è vista una crescita molto maggiore? Con ogni probabilità, il *CdCl₂* ad una concentrazione così alta supera una soglia di tossicità che impedisce la proliferazione cellulare. Non solo, un piccolo ruolo potrebbe essere rivestito anche dalla tecnica di replica plating: le piastre replicate per ultime potrebbero contenere in partenza un minor numero di cellule di lievito. Le ultime parole potrebbero essere spese per la piastra contenente '*SD hisA*', cioè media sintetico senza istidina. C'è una bassa crescita cellulare perché i ceppi sono auxotrofi, tra le varie cose, anche per l'istidina. Si può considerare questa piastrazione come un'ulteriore controllo riguardo la nostra sicurezza di stare considerando solo i meccanismi di mismatch repair. Il gene *his* non è stato inattivato inserendo nella sequenza codificante un lungo stretch omonucleotidico come *lys2* e in questo caso l'attività di proofreading compie il lavoro di prima difesa contro gli errori di replicazione. Anche in questo caso però possiamo osservare come sia il *MMR* a fare la differenza in termini stocastici: nei ceppi in cui il *MMR* è inibito si può apprezzare una crescita cellulare di

colonie revertanti.

Mating e saggio di complementazione

Introduzione

Questo esperimento prevede l'utilizzo di tre diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in forma aploide e di studiarne un eventuale complementazione. I ceppi presentavano auxotrofie specifiche e differenziate tra di loro, in modo da riuscire a creare terreni selettivi che permettessero di escludere tutte le cellule che non avessero effettuato complementazione.

Ceppi utilizzati

BY4704 *Mata*, *ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63*

yIG397 MATα, ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-100 URA3::exRGC::p-cyc1::ADE2::ura3-1

E134 *MATα, ade5-1 his7-2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 lys2::insE-A14*

Ottenere cellule diploidi

Le piastre contenenti le cellule pronte per compiere la complementazione si ottengono attraverso *Replica plating*. Vengono poste sul velluto due piastre contenenti due patches. La prima piastra presenta una patch con il ceppo *BY4704* e un'altra con *yIG397*. La seconda piastra presenta invece una patch con il ceppo *E134* e un'altra con *yIG397*. Le piastre vengono disposte in modo che le patches di ogni piastra siano perpendicolari tra di loro a formare un "hashtag" (#). Le zone di incontro tra le patch diverse sono le zone dove avviene complementazione. Si ottengono pertanto zone di complementazione per:

- *BY4704-E134*.
- *E134-yIG397*.
- *yIG397-yIG397*.
- *yIG397-BY4704*.

Selezione delle cellule diploidi

Dopo aver effettuato le impronte sul velluto queste vengono replicate su piastre contenenti terreni diversi: uno completo di controllo (YPDA) e uno selettivo. Il terreno selettivo viene scelto in base al genotipo per sfruttare il fenomeno di complementazione.

Analisi del genotipo

Lo scopo dell'analisi del genotipo è evidenziare auxotrofie che verrebbero mascherate dalla complementazione.

Ceppo	Mat	Genotipo							
BY4704	<i>a</i>	<i>ade2</i>	<i>his3</i>	<i>leu2</i>	<i>lys2</i>	<i>met15</i>	<i>trp1</i>		
E134	<i>α</i>	<i>ade5-1</i>	<i>his7-2</i>	<i>leu2-3</i>	<i>lys-2</i>		<i>trp1-289</i>	<i>ura3-52</i>	

Ceppo	Mat	Genotipo						
BY4704	<i>a</i>	<i>ade2</i>	<i>his3</i>	<i>leu2</i>	<i>lis2</i>	<i>met15</i>	<i>trp1</i>	
yig397	α	<i>ade2-1</i>	<i>his3-11</i>	<i>leu2-3</i>			<i>trp1-1</i>	<i>can1-100</i>

Ceppo	Mat	Genotipo						
E134	α	<i>ade5-1</i>	<i>his7-2</i>	<i>leu2-3</i>	<i>lis-2</i>		<i>trp1-289</i>	<i>ura3-52</i>
yig397	α	<i>ade2-1</i>	<i>his3-11</i>	<i>leu2-3</i>			<i>trp1-1</i>	<i>can1-100</i>

Risultati aspettati

Complementazioni possibili Si nota come nelle patch *yIG397-yIG397* e *E134-yIG397* non avviene complementazione in quanto presentano lo stesso tipo sessuale. Le complementazioni che possono avvenire sono pertanto tra:

- *BY4704-E134*
- *yIG397-E134*

Scelta del terreno selettivo per la selezione del diploide Analizzando le auxotrofie delle forme aploidi mascherate durante la complementazione si può determinare un terreno che permetta unicamente la sopravvivenza dell'organismo diploide che ha subito complementazione.

BY4704-E134 Le auxotrofie mascherate nell'organismo diploide sono quelle per:

- Adenosina.
- Istidina.
- Metionina
- uracile.

L'organismo diploide, oltre ad essere sensibile alla canamicina rimane auxotrofo per:

- Leucina.
- Lisina.
- Triptofano.

Un possibile terreno selettivo per il diploide *BY4704-E134* sarebbe privo di:

- Adenosina.
- Metionina
- Canamicina.
- Istidina.
- Uracile.

Mentre conterrebbe:

- Leucina.
- Lisina.
- Triptofano.

BY4704-yIG397 Le auxotrofie mascherate nell'organismo diploide sono quelle per:

- Metionina
- Lisina.

L'organismo diploide perde inoltre la sensibilità alla canamicina. Rimarrebbe inoltre auxotrofo per:

- Adenina.
- Leucina.
- Uracile.
- Istidina.
- Triptofano.

Si nota inoltre come non è possibile, con queste conoscenze genotipiche determinare un terreno capace di selezionare il diploide eliminando entrambi gli organismi aploidi da cui si è generato.

Risultati

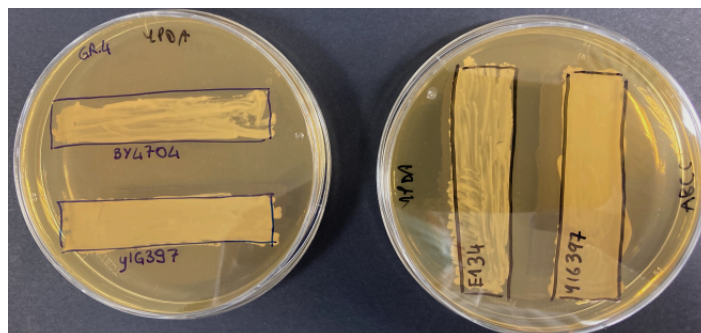


Figura 7: Patch di colture diploidi su terreno singolo

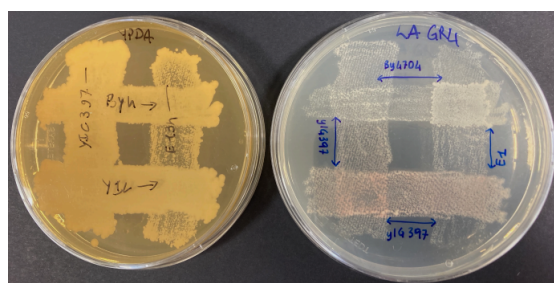


Figura 8: Colture di replica consecutiva su piastra non selettiva YPDA (destra) e selettiva hA (sinistra)

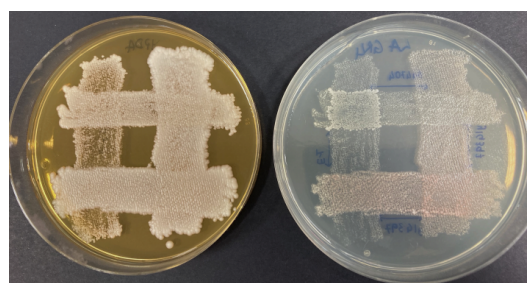


Figura 9: Colture face up di replica consecutiva su piastra non selettiva YPDA (destra) e selettiva hA (sinistra)

Considerazioni finali

Si notano i risultati dell'esperimento nelle figure 8 e 9. Queste mostrano infatti l'incubazione delle colture ottenute dopo replica plating. Si nota come la crescita della coltura non è stata influenzata nel terreno completo, con alta densità per tutti i ceppi e le complementazioni. Nel terreno selettivo hA, in assenza di istidina si nota una scarsa presenza dei ceppi BY4704 e E134, auxotrofi per istidina, mentre si nota crescita dove le loro patch si incontrano. Questa coltura dimostra l'avvenuta complementazione dei due ceppi e la buona riuscita dell'esperimento.

Metodi alternativi per selezionare BY4704-yIG397

L'impossibilità di selezionare attraverso il genotipo pone la necessità di trovare un altro metodo per isolarlo. Una proposta nata durante il lavoro è stata quella di mettere in eccesso il ceppo BY4704 in modo da massimizzare la probabilità che tutto il ceppo yIG397 venga complementato. Successivamente si può eliminare BY4704 sfruttando la sua sensibilità alla canamicina. Questo metodo presenta però una criticità importante: non assicura in alcun modo che tutto il yIG397 sia complementato, tenta unicamente di renderlo molto probabile.

Analisi *RFLP* di polimorfismi a singolo nucleotide

Introduzione

Questo esperimento valuta la variabilità genetica dovuta a singoli polimorfismi di singoli nucleotidi (*SNPs*). Per *SNPs* si intende una variazione genetica e rappresenta un cambio di nucleotide all'interno della nostra sequenza. In linea di massima gli *SNPs* possono essere visti come delle mutazioni dato che sono comunque una variazione nella sequenza, ma a cambiare è la presenza con cui si presentano nella popolazione. Le mutazioni, infatti, sono molto più rare rispetto agli *SNPs* che si trovano in almeno nell'1% della popolazione. Inoltre, gli *SNPs* non sono sempre associati a delle patologie, infatti, nella maggior parte dei casi vanno a determinare alcune nostre caratteristiche. Durante questa esperimento si è andati a valutare la capacità di una persona di percepire più o meno il gusto dell'amaro tramite lo studio del recettore *TAS2R38*.

Recettore *TAS2R38*

Questo recettore è in grado di andare a percepire i glucosinilati che sono dei composti presenti in alcuni alimenti che mangiamo, come i broccoli. *TAS2R38* si trova sul cromosoma 7 e al suo interno presenta cinque differenti polimorfismi, ma i tre più comuni si trovano in determinate posizioni della proteina all'aminoacido 49, 263 e 296. Questi tre polimorfismi danno origine a due fenotipi, ma a tre aplotipi:

- Taster con aplotipo *PAV*. di percepire il gusto di quelli che vengono considerati taster più frequenti.
- Taster con aplotipo *AVV* sono meno frequenti (3%), ma hanno la stessa capacità
- Non-taster con aplotipo *AVI*.

Procedimento

Per verificare la presenza di *SNPs* è stata amplificata una porzione del gene *TAS2R38* mediante una *PCR*. Per andare a discriminare i diversi genotipi si è deciso di utilizzare un enzima di restrizione (*Fun4H1*). Si sono caricate le *PCR* digerite con enzimi di restrizione e sotto ciascuna di queste è stata caricata la *PCR* non digerita. Per poter visualizzare meglio i risultati è stato aggiunto anche un colorante blu.

Risultati aspettati

Dalla *PCR* non digerita con enzima di restrizione non ci si aspetta di avere alcuna indicazione su variazioni a livello nucleotidico. Nelle *PCR* digerite con enzimi di restrizione, invece, ci si aspetta di vedere alcune differenze. Se tutti i cinque siti di restrizione sono integri ci si aspetta un determinato tipo di bandeggio, mentre se in alcuni casi l'enzima di restrizione non riuscisse a riconoscere il sito di restrizione quello che si nota è un bandeggio completamente differente. Ci si aspetta che si presentino tutte e tre le condizioni, dato che i campioni che abbiamo provengono da tre individui con diverso aplotipo. Dopo la corsa su gel di agarosio si riesce ad osservare che:

- Il taster *PAV* presenta le bande più basse.

- Il non taster *AVI* presenta le bande più alte.
- Il taster meno frequente *AVV* presenta entrambe le componenti.

Risultati

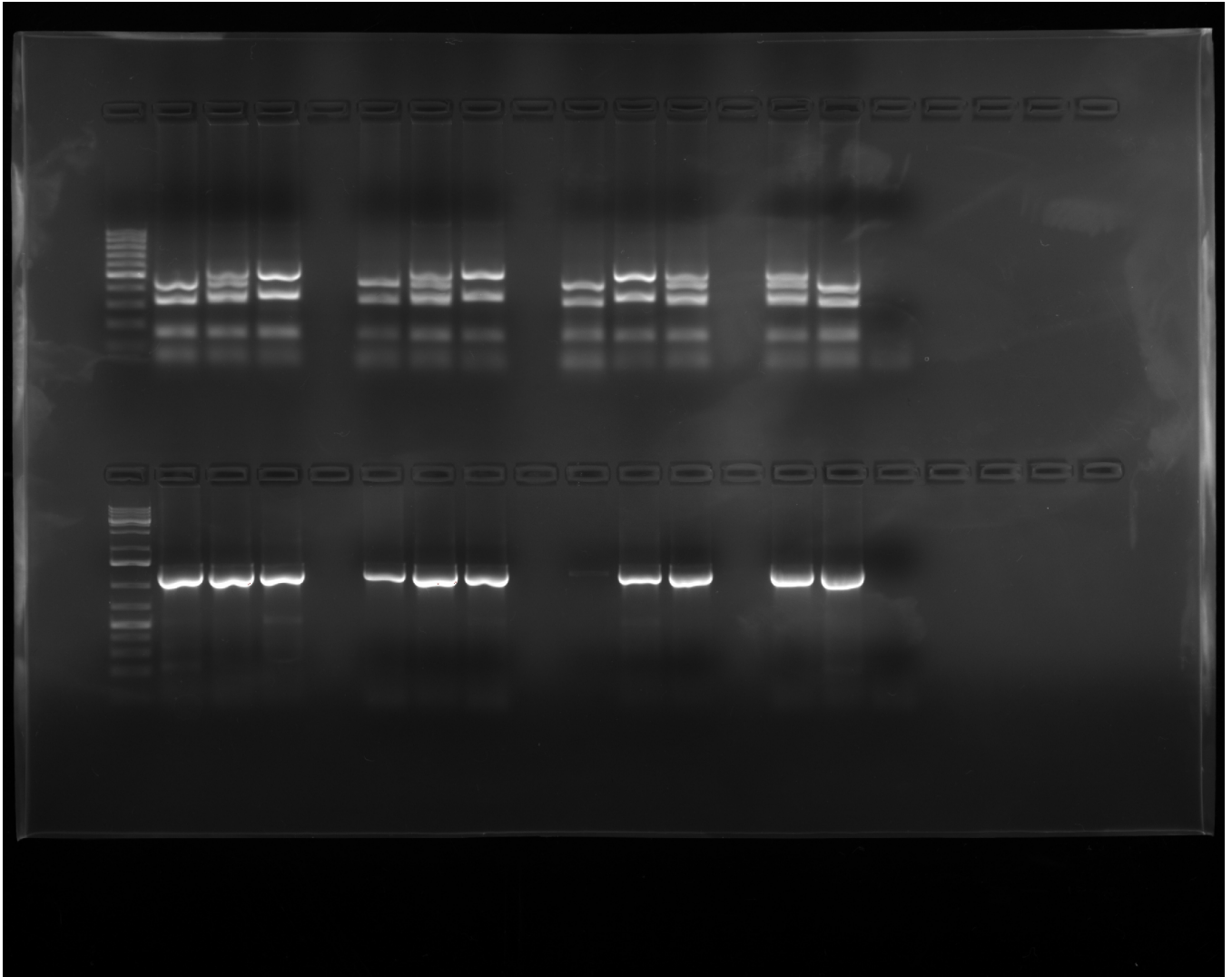


Figura 10: Elettroforesi su gel d'agarosio dei risultati della PCR

Considerazioni finali

Facendo riferimento agli ultimi due gruppi (figura 10) si possono fare alcune considerazioni finali su la riuscita o meno dell'esperienza. Come previsto, dalla *PCR* non digerita non si ha avuto alcuna indicazione sulle variazioni a livello nucleotidico. Per quanto riguarda il primo dei due gruppi si può dire che l'esperienza è avvenuta con successo, in quanto si sono ottenuti i risultati attesi. Unica nota va fatta sulla corsa del DNA dell'individuo taster in quanto era presente meno colorante. Per quanto riguarda il secondo gruppo non ci sono stati problemi per l'individuo taster e l'individuo taster meno frequente, ma purtroppo non si è potuta apprezzare la corsa del non taster. Per entrambi si può comunque concludere che l'aplotipo *AVV* ha la componente di entrambi e per questo motivo è considerato eterozigote.