

Esercitazioni di laboratorio del corso di genetica

Gaia Faggin

Giacomo Fantoni

Filippo Gastaldello

Elisa Pettinà

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

27 dicembre 2020

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. Inoltre 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 *tetrad*i. L'analisi genetica delle tetrad in *S. cerevisiae* consente di osservare direttamente gli effetti delle singole divisioni meiotiche e di identificare più facilmente gli effetti 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

Nella prima esperienza si vuole verificare l'efficacia e la precisione della polimerasi (ci hanno detto il nome della polimerasi in particolare?) in presenza di sostanze tossiche e/o inibitorie. L'organismo modello utilizzato è stato il lievito *Saccharomyces Cerevisiae* in forma aploide. La capacità della polimerasi di rimanere efficace anche in presenza di sostanze inibitorie o tossiche. Viene utilizzata come sostanza inibitoria il cloruro di manganese $MnCl_2$. Il DNA prodotto verrà poi visualizzato attraverso *PCR* ed elettroforesi.

Polimerase chain reaction *PCR*

In vitro viene utilizzato il calore per separare le due eliche di DNA mentre in natura questo compito è affidato a un enzima elicasi. Si abbassa poi la temperatura per far legare il primer a una sequenza precisa per permettere alla PCR di trovare un 3'-OH da cui iniziare la replicazione. Questo processo verrà ripetuto più volte.

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. Il manganese può competere con il magnesio per l'accesso al sito allosterico? Se sì, può cambiarne l'efficienza? Proveremo a rispondere aggiungendo alla reazione di PCR cloruro di manganese.

DNA da amplificare

La sequenza di DNA da amplificare inoltre non sarà scelta a caso, ma sarà la sequenza che condiziona per un gene reporter. Nella cellula verrà inserito anche un plasmide linearizzato, pRDI22, che dovrà avere un'origine di replicazione riconoscibile dall'organismo ospitante e una regione centromerica, in modo da poter essere scambiato per un plasmide del lievito. Il plasmide conterrà il gene reporter, per conferirgli la capacità di essere replicato all'interno della cellula, e il gene leu, per cui il ceppo di lievito utilizzato è auxotrofo, questo permetterà di selezionarlo. Oltre all'auxotrofia per la leucina, che servirà a verificare l'efficacia di pRDI22, il ceppo utilizzato sarà auxotrofo per l'adenina, in questo modo, si può verificare il funzionamento di P53.

Risultati attesi

- Il manganese può influenzare, in positivo o negativo la PCR?
- Può il manganese introdurre delle mutazioni?

Per darci una risposta dobbiamo inserire il risultato della PCR in cellule vive, per verificare la funzionalità del gene applicato. 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 rosa/rosso.

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.

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 manganese 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. (La presenza di un certo tasso di mutazione anche nella soluzione senza manganese è imputabile all'affidabilità della PCR stessa)

Interazione geni-ambiente

Introduzione

Questo esperimento valuterà la qualità della trasmissione del DNA, ma concentrandosi sui meccanismi di riparazione dello stesso in diverse condizioni ambientali, piuttosto che prendere ad esempio la sola replicazione, come nelle esperienze precedenti. Cercheremo di comprendere le eventuali esposizioni ambientali su di un gene e la bontà della replicazione del DNA, focalizzandoci su errori di replicazioni che vengono o non vengono riparati.

Può succedere in vivo che una polimerasi catalizzi il nucleotide sbagliato durante il processo di replicazione, ma questa non viene considerata come una mutazione perché questo errore può essere ancora riconosciuto e risolto. I due modi in cui una cellula ripara i cosiddetti "mal appaiamenti"

o "mismatch", sono, da una parte, l'attività esonucleasica intrinseca alla polimerasi, dall'altra il sistema di riparazione dei mal appaiamenti. Se si vogliono 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 un sistema che permettesse di superare l'ambiguità causata da questa doppia linea di difesa contro i mal appaiamenti. Si è visto che in sequenze omonucleotidiche la polimerasi tende ad introdurre un nucleotide in più, anche a causa di una potenziale diversa topologia assunta dai due filamenti di DNA in presenza di lunghe sequenze ripetute. Se la sequenza da copiare omonucleotidica, soprattutto A e T diventa lunga, maggiore di 7, la correzione di bozze sembra essere totalmente inefficace, la polimerasi non si rende conto di absi extraelica che dà una distorsione dell'elica, già uscita dal sito catalitico. Rimane un solo meccanismo di riparazione, MMR appunto, ed è su questa osservazione che si basa il nostro esperimento.

Risultati

Non tutte le sequenze di DNA sono replicabili con la stessa efficacia, quelle che potrebbero rappresentare siti di mutazione vengono chiamate *at risk motifs*. Vogliamo testare, sfruttando queste sequenze più fragili se alcune condizioni nel terreno, come agenti mutageni, possono interferire con il sistema MMR. Per farlo in vivo abbiamo bisogno di un saggio reporter, nel nostro caso un gene importante nella biosintesi della lisina. Avremo a disposizione un ceppo il quale è stato sottoposto ad un intervento di ingegnerizzazione, non fatto da noi ma ereditato, nel quale il gene *lys2* è stato inattivato da uno stretch omonucleotidico di A (precisamente 14). Le A effettivamente inserite sono comunque 13. Scivolamento del modulo di lettura bisogna interpretarlo come uno shift di 13 A. Il quadro di lettura del nostro ceppo sarà quindi sfalsato a valle. dato che è posizionato abbastanza al centro della sequenza codificante, il nostro ceppo non sarà più in grado di crescere in un terreno senza lisina. Noi partiremo da un reporter che ha bisogno di lisina per crescere su piastra. Ma se ci fosse un errore di sintesi del DNA, nella quale la polimerasi lascia indietro una adenina, ecco che avremmo una discendenza nella quale le cellule hanno 12 adenine esogene, restaurando il quadro di lettura. Il mutante tornerà a crescere in un terreno senza lisina. Vederemo apparire effetto della reversione. La quantificazione della reversione ci consente di stimare il numero di malappaiamenti risolti grazie a MMR.

Considerazioni finali

La preparazione all'esperimento si è svolta nell'arco dei tre giorni.

Mating e saggio di complementazione

Introduzione

L'esperienza prevede l'utilizzo di tre diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in forma aploide e di studiare l'avvenuta 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 conteneva una patch con il ceppo BY4704 e un'altra con yIG397. La seconda piastra conteneva 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.

0.0.0.1 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>lis2</i>	<i>met15</i>	<i>trp1</i>		
E134	<i>α</i>	<i>ade5-1</i>	<i>his7-2</i>	<i>leu2-3</i>	<i>lis-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	<i>α</i>	<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

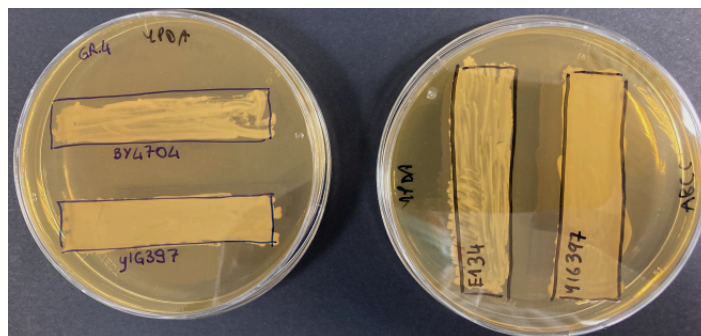


Figura 1: Patch di colture diploidi su terreno singolo

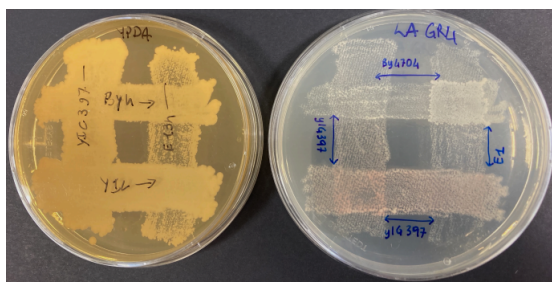


Figura 2: Colture di replica consecutiva su piastra non selettiva YPDA (destra) e selettiva hA (sinistra)

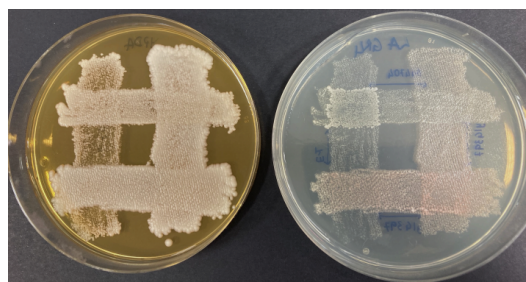


Figura 3: Colture face up di replica consecutiva su piastra non selettiva YPDA (destra) e selettiva hA (sinistra)

Considerazioni finali

Si notano i risultati dell'esperimento nelle figure 2 3. 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

Questa esperienza serve per andare a valutare 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 esperienza 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 glucosinlati 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;
- Taster con aplotipo AVV sono meno frequenti (3%), ma hanno la stessa capacità di percepire il gusto di quelli che vengono considerati taster più frequenti;
- Non-taster con aplotipo AVI.

Procedimento

Per verificare la presenza di SNPs è stata applicata 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. Quindi quello che dovremmo riuscire ad apprezzare dopo la corsa del gel di agarosio è che:

- Il taster presenterà le bande più basse;
- Il non taster presenterà le bande più alte;
- Il taster meno frequente presenterà entrambe le componenti.

Risultati

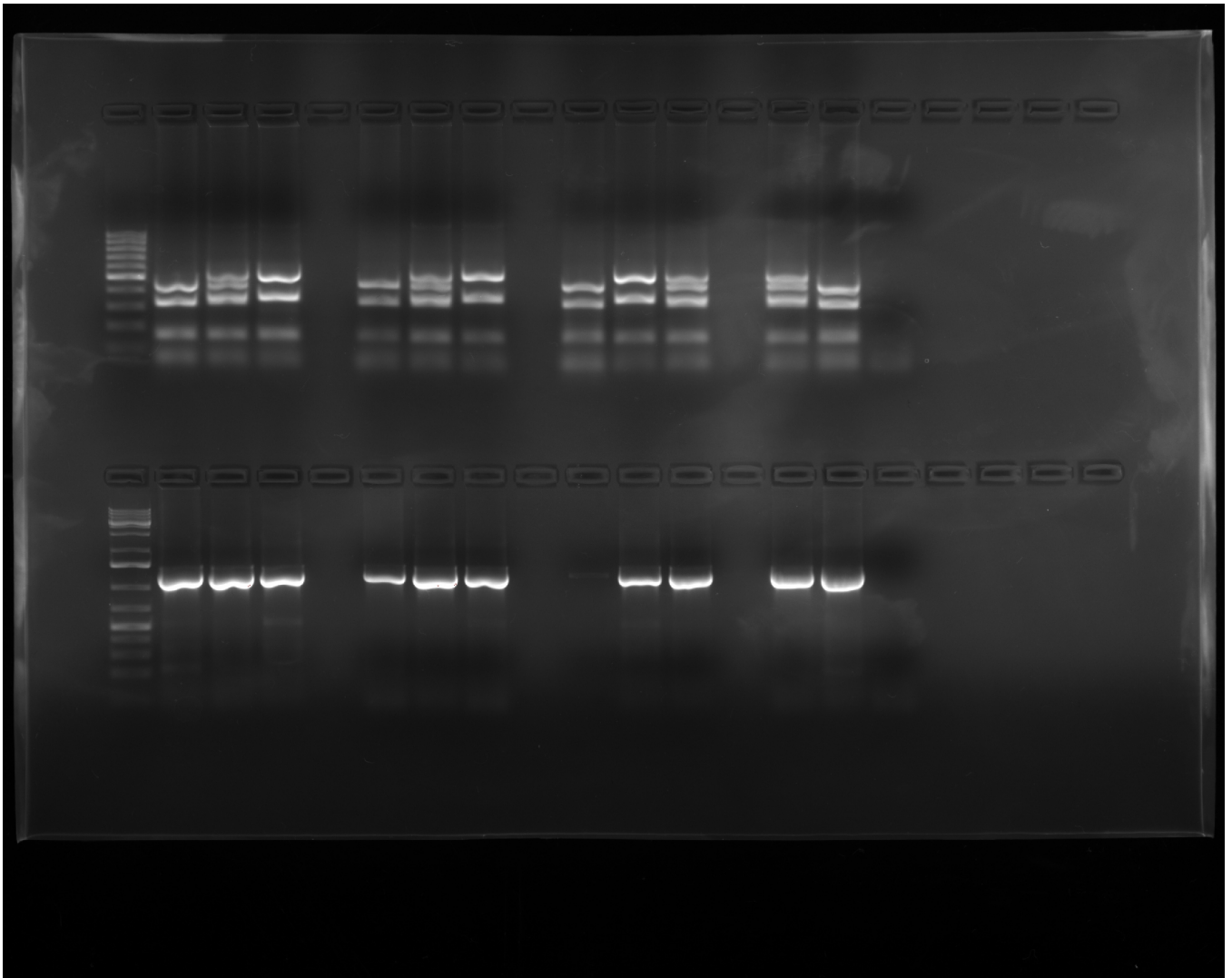


Figura 4: Elettroforesi su gel d'agarosio dei risultati della PCR

(IMMAGINI)

Considerazioni finali

Facendo riferimento alle figure 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 (Perchè?). Per entrambi si può comunque concludere che l'aplotipo AVV ha la componente di entrambi e per questo motivo è considerato eterozigote.