

Esercitazioni di laboratorio del corso di genetica

Gaia Faggin

Giacomo Fantoni

Filippo Gastaldello

Elisa Pettinà

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

26 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 2μ Le cellule del lievito in natura possiedono un plasmide circolare 2μ . 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*

Interazione geni-ambiente

0.0.1 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.

0.0.1.1

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).

0.0.1.2

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.

0.0.2 •

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.

0.0.3 •

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*, *ade2*Δ::*hisG* *his3*Δ200 *leu2*Δ0 *lys2*Δ0 *met15*Δ0 *trp1*Δ63

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

E134 *MAT*α, *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.
- yIG379-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.

0.0.3.1 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>mat15</i>	<i>trp1</i>		
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>	

Ceppo	Mat	Genotipo							
BY4704	<i>a</i>	<i>ade2</i>	<i>his3</i>	<i>leu2</i>	<i>lis2</i>	<i>mat15</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.
- Mat????
- 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.
- Istidina.
- Mat????
- Uracile.
- Canamicina.

Mentre conterrebbe:

- Leucina.
- Lisina.
- Triptofano.

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

- Mat????
- Lisina.

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

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

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

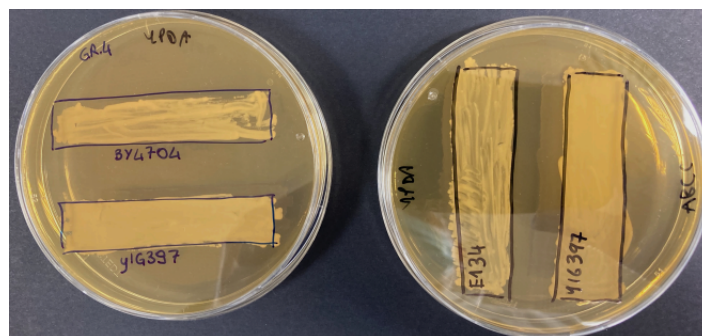


Figura 1: Patch di colture diploidi su terreno singolo

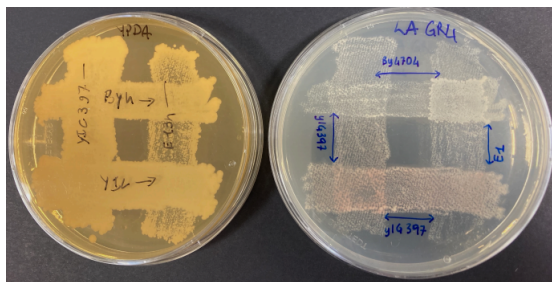


Figura 2: Colture di replica consecutiva su piastra non selettiva YPDA (destra) e selettiva hA (sinistra)

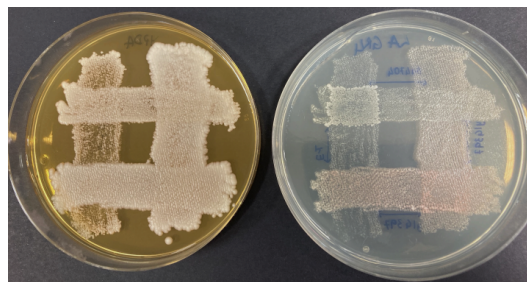


Figura 3: Colture face up di replica consecutiva su piastra non selettiva YPDA (destra) e selettiva hA (sinistra)

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