

# Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

## Lezione 32

### Interazioni genetiche

I geni non lavorano da soli, ma in un contesto di proteine che interagiscono. Tutte queste interazioni prendono il nome di interazioni genetiche.

Il lievito è un organismo molto utilizzato per fare screening genetici che permettono di identificare le interazioni genetiche.

### Essenzialità di un gene

Un gene è detto essenziale se quando rimosso provoca la morte della cellula o di un organismo. La rimozione di un gene non essenziale invece non comporta la morte della cellula o dell'organismo.

Molto spesso però l'essenzialità di un gene dipende dal contesto in cui è studiato. I geni possono essere quindi divisi in:

- **Non essenziali**; è un gene che può essere rimosso senza compromettere la vitalità cellulare in tutti i contesti genetici ed ambientali.
- **Poco essenziali**; sono geni non essenziali nella maggior parte dei contesti genetici ed ambientali.
- **Molto essenziali**; sono geni essenziali nella maggior parte dei contesti genetici ed ambientali.
- **Completamente essenziali**; sono geni indispensabili in tutti i contesti genetici ed ambientali. Questi sono geni generalmente coinvolti in processi cellulari di base, come replicazione, traduzione o metabolismo di base.

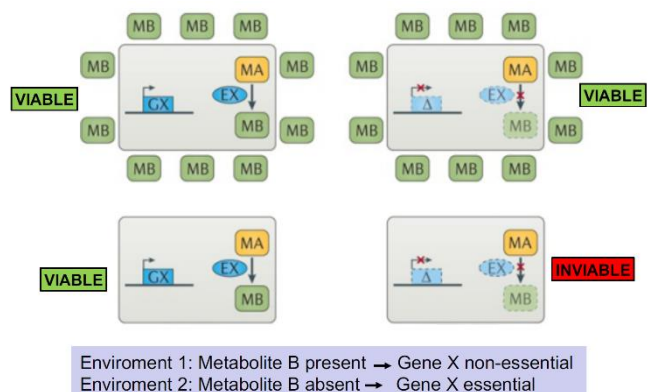
Il contesto genetico dipende dal concetto di *Evolvability* (parola che non ha traduzione italiana). Per evolvability si intende che ci sono altri geni che possono mutare e compensare mutazioni poco e molto essenziali. I geni poco essenziali sono quelli la cui mutazione è facilmente compensata da mutazioni in altri geni, mentre i geni molto essenziali sono quelli in cui è più difficile che si presentino mutazioni compensatorie in altri geni.

I geni completamente essenziali se rimossi non vengono compensati da mutazioni in altri geni.

### Esempio di gene essenziale che dipende da contesto ambientale

Ipotizziamo che in condizioni fisiologiche il gene X (GX) codifica per l'enzima X (EX), che catalizza la trasformazione di metabolita A (MA) in metabolita B (MB).

Se si rimuove il GX non si avrà più il prodotto EX, e quindi cesserà la trasformazione di MA in MB. Se

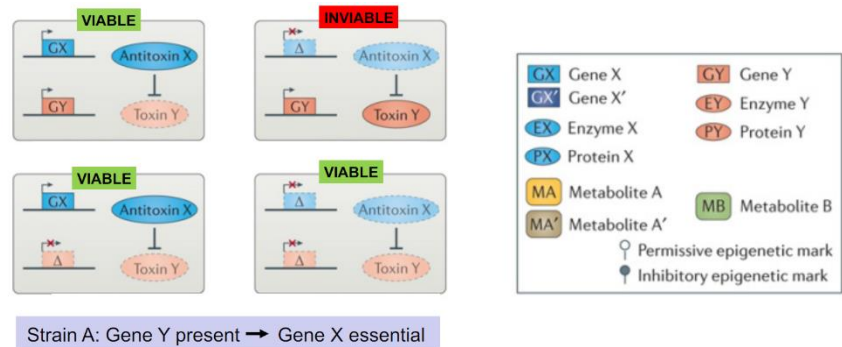


però MB viene fornito dall'esterno la cellula può sopravvivere, e quindi GX non è un gene essenziale. Se MB non è presente nell'ambiente la cellula *gxΔ* non sopravvive, per cui in questo contesto GX è un gene essenziale.

### Geni essenziali protettivi che dipendono dal contesto genetico

Un esempio di essenzialità derivante dal genotipo è quello del gene X GX che codifica per una antitossina X, ed il gene Y GY codifica per la tossina Y.

L'antitossina X inibisce la tossina Y e permette la vitalità della cellula. Quando viene tolto GX non si ha più l'azione inibitoria del suo prodotto antitossina X nei confronti della tossina Y, per cui la cellula non sopravviverà.

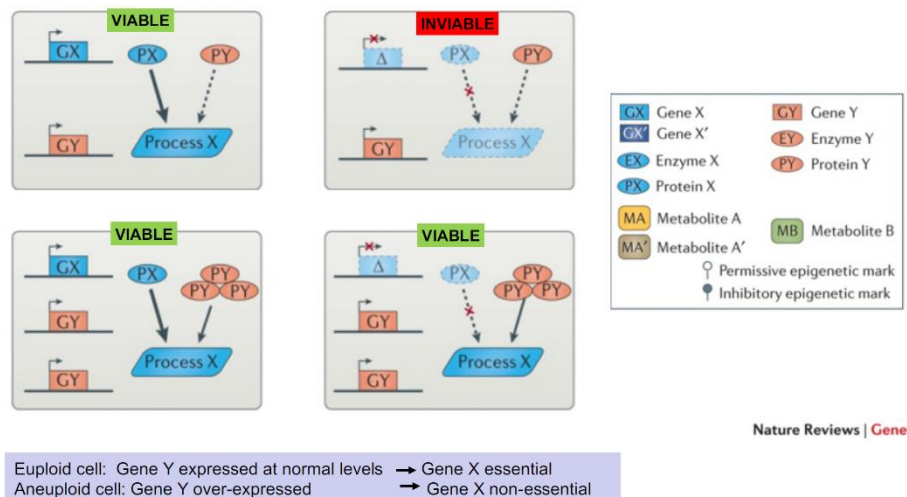


Se viene rimosso GY non si ha più il prodotto tossina Y, per cui la cellula sopravvive in presenza di questa mutazione. Se vengono rimossi sia GX che GY la cellula sopravviverà, perché non si ha più la produzione di tossina Y.

Un altro esempio è quello in cui GX e GY sono due geni i cui prodotti PX e PY partecipano ad un processo cellulare fondamentale, detto processo X. PX ha una azione preponderante nel processo X.

Se si rimuove GX non si avrà più PX, e quindi non avverrà il processo X. Si può però avere una mutazione compensatoria che porta

una over-produzione di PY (può essere una duplicazione del gene o una mutazione che ne aumenta la trascrizione, o rende più efficiente PY), che rende possibile il processo X anche senza PX. PX quindi non è essenziale nel momento in cui ci sono mutazioni compensatorie.



Nature Reviews | **Genet**

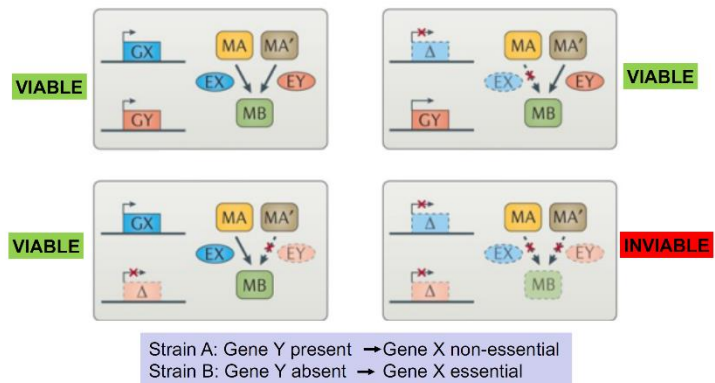
### Letalità sintetica

La letalità sintetica si ha quando un gene diventa essenziale in caso di perdita di un altro gene.

Ipotizziamo di avere i geni GX e GY che codificano per gli enzimi EX ed EY. Ciascuno di questi enzimi catalizza la formazione del metabolita MB, partendo però da due substrati diversi, rispettivamente EX opera su MA, mentre EY opera su MA'.

Se manca uno tra i geni GX e GY il prodotto MB verrà comunque prodotto dal gene rimasto, per cui si ha compensazione e la cellula mutata si mantiene vitale.

Se mancano entrambi i geni GX e GY non si produrrà più un enzima in grado di catalizzare la produzione di MB, per cui la cellula non sarà vitale.



## Essenzialità ed evoluzione

Si è visto che l'essenzialità può cambiare durante l'evoluzione, e dipende dall'intero macchinario molecolare della cellula. L'essenzialità non è quindi una proprietà intrinseca di un gene, ma dipende dal contesto.

Si è studiato che in *S.cerevisiae*, tra gli oltre 1000 geni essenziali almeno 88 sono compensabili, tramite l'acquisizione di mutazioni su altri geni, che permettono la vitalità della cellula.

## Interazioni genetiche

Le interazioni genetiche comprendono interazioni positive ed interazioni negative.

### Interazioni positive (eventi di soppressione)

Un esempio di interazione positiva si ha nel caso in cui un pathway presenti una proteina C che è attivata dalla proteina A ed inibita dalla proteina B. Nel caso in cui le componenti del pathway funzionino correttamente la cellula cresce correttamente.

Nel caso in cui ci sia una proteina A mutata *a*, per cui l'attivazione di C è alterata, la cellula avrà una crescita ridotta.

Nel caso in cui ci sia una mutazione nella proteina B, che diventa *b*, la cellula crescerà comunque perché non c'è inibizione di C, ed A continua ad attivare C.

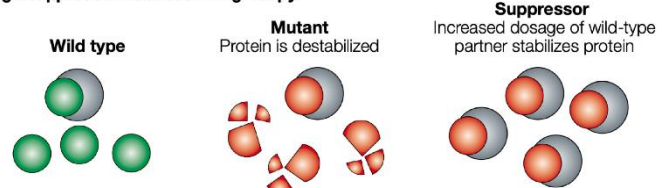
Se si ha un mutante *a*, quindi con una capacità di attivazione ridotta di C, in cui contemporaneamente si presenta una mutazione in *b*, che quindi non inibisce più C, la proteina C funzionerà e darà crescita cellulare.

Un aumento della quantità di C in una cellula che porta la mutazione in *a*, l'eccesso di C permetterà comunque una crescita cellulare, nonostante B sia funzionante.

Tra i vari tipi di mutazioni interazioni positive possibili troviamo:

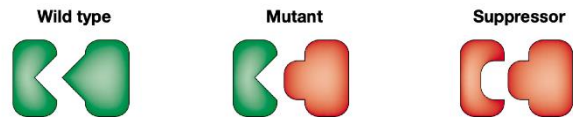
- *dosage suppressor*, soppressione da dosaggio genico. Un esempio di questo meccanismo vede la presenza di due proteine, A e B che interagiscono. Una mutazione nella proteina A, che diventa A', la destabilizza, e si riduce la capacità di interazione con B, dando un fenotipo mutato. In questo caso può verificarsi una seconda mutazione che causa l'aumento della produzione della proteina B, che in alta concentrazione è capace di stabilizzare A' e ripristinare il fenotipo WT.

#### a Dosage suppressor: rescues in high copy



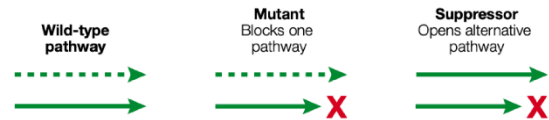
- *interaction suppressor*. In un ceppo WT si hanno due proteine che interagiscono, A e B. Si ha una mutazione in A che ne altera la struttura, che diventa A'; questa mutazione impedisce l'interazione tra A' e B, generando il fenotipo mutante. Si può a questo punto verificare una mutazione in B, che diventa B', che ristabilisce la capacità di interazione con A'. Il complesso A'B' a questo punto è nuovamente funzionante, e non causa alterazione nel fenotipo cellulare rispetto al WT.

**b Interaction suppressor: allele specific, gene specific**



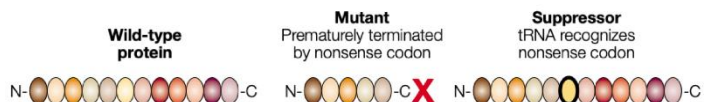
- *Bypass suppressor*. Questo tipo di soppressione si ha quando un pathway della cellula subisce una mutazione, dando un fenotipo mutante. In queste condizioni può verificarsi una mutazione in un gene di un altro pathway, che un secondo pathway alternativo a compensare per la mancanza del primo.

**c Bypass suppressor: pathway specific, rescues null allele**



- *Nonsense suppressor*. Si verifica quando in una proteina WT si ha una mutazione nonsense che causa la comparsa di un codone di terminazione nella sequenza, impedendo la produzione di una proteina funzionante. Si può verificare a questo punto la mutazione di un tRNA che rileva il codone antisense, ed inserisce l'aminoacido corretto continuando la traduzione e dando un prodotto funzionante.

**d Nonsense suppressor: allele specific, gene non-specific**



## Screening per soppressori genetici

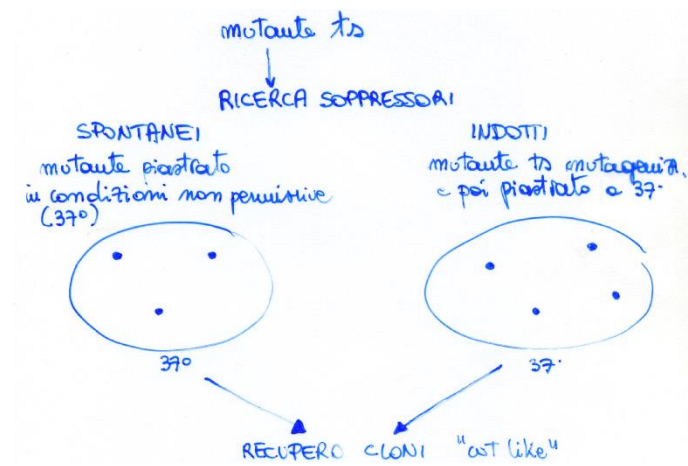
È possibile progettare esperimenti che ci permettono di identificare l'interazione di proteine mediante eventi di soppressione.

### Interaction suppressor

Quando due proteine A e B interagiscono, può verificarsi una mutazione di A, che diventa A', che rende il ceppo termosensibile. Vuol dire che A' e B interagiscono come nel WT fino ad una certa temperatura, mentre al superamento della temperatura critica si ha perdita di funzione, perché la mutazione ha destabilizzato A'. Può però verificarsi una mutazione in B' che permette nuovamente l'interazione con A' anche oltre alla temperatura critica, ridando un fenotipo WT-like.

Quando si ha un mutante termosensibile ts, si possono cercare i soppressori aspettando una mutagenesi spontanea oppure inducendo mutazioni mediante agenti mutageni.

I cloni ts sopravvissuti dopo selezione a temperatura non permissiva avranno acquisito mutazioni che hanno ripristinato un fenotipo WT-like. Questi cloni vanno isolati e studiati per comprendere quale gene è mutato ripristinando il fenotipo WT. Il gene mutato che ha ripristinato il fenotipo WT probabilmente da un prodotto che interagisce con la proteina mutata in origine a dare fenotipo ts, oppure è un secondo evento di mutazione sullo stesso gene mutato in ts.



In tutti i cloni sopravvissuti a temperatura non permissiva si deve valutare se la mutazione che ha convertito il fenotipo ts in fenotipo WT-like sia *intragenica* oppure *extragenica*.

Una mutazione intragenica si ha quando il fenotipo mutante, dato dalle proteine A' e B, ritorna ad essere un fenotipo WT-like a causa di una seconda mutazione su A', che diventa A''. Il complesso A''B dà fenotipo WT al pari di AB.

La mutazione è extragenica quando la mutazione avviene in un gene diverso dal gene A', ad esempio il gene B, che diventa B'. A'B' danno un fenotipo WT-like, simile a quello del complesso AB WT.

Gli eventi intragenici devono essere distinti da quelli extragenici, in quanto al ricercatore spesso interessano eventi extragenici che permettono di identificare prodotti genici interagenti.

Un metodo consiste nel fare incrociare il un clone WT-like con un clone WT. Si produce così il diploide, che viene fatto poi sporulare, in modo da ottenere quattro cellule figlie aploidi.

Se la soppressione è intragenica, dalla sporulazione del diploide si troveranno **sempre** due spore WT-like e due spore WT. L'unico evento che può separare le due mutazioni sul singolo gene è un evento di ricombinazione, che comunque avverrà con una bassa probabilità.

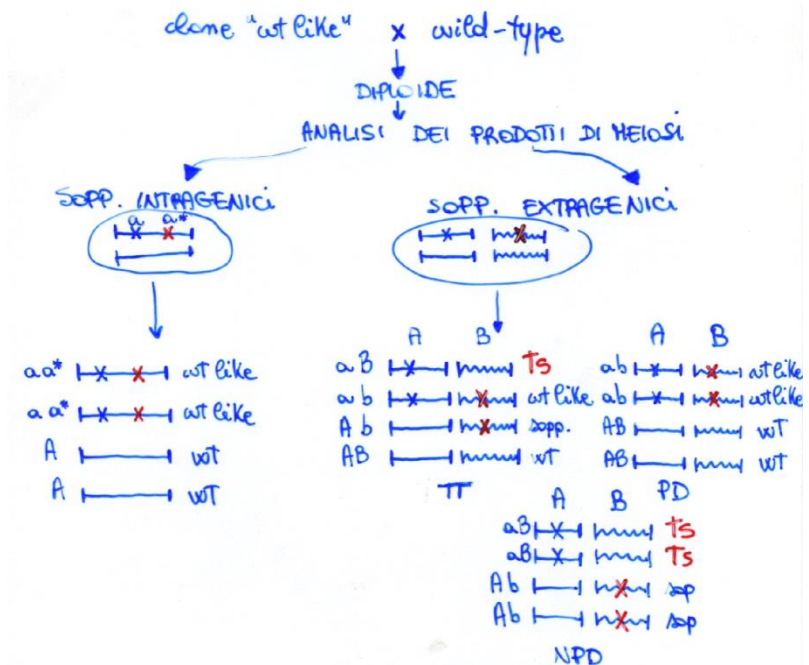
Se la soppressione è extragenica si osserva una progenie complessa dopo l'incrocio del WT-like A'B' col WT AB e meiosi del diploide. Si possono osservare **tre tipi di tetraide** ottenute dalla sporulazione del diploide:

- **Tetratipo:** si ha quando i cromosomi segregano secondo il pattern A'B (ts), A'B' (WT-like), AB' (suppressor) ed AB (WT).
- **Parentale:** si ha quando i cromosomi segregano secondo lo stesso genotipo delle cellule parentali da cui si è originato il diploide; si avranno quindi due cellule A'B' (WT-like), e due cellule AB (WT).
- **Non-Parentale:** quando i cromosomi segregano in maniera opposta rispetto alle cellule parentali, si avranno due cellule A'B (ts) e due cellule AB' (suppressor).

Le cellule suppressor hanno un fenotipo che dipende dalla sola mutazione di soppressione, senza la mutazione ts. Possono avere un fenotipo WT-like oppure un fenotipo diverso, in base all'alterazione causata dalla mutazione.

### Clonazione gene suppressor

Si vuole quindi clonare il gene B, che quando mutato sopprime la mutazione in A. A questo scopo è utile capire se la mutazione di soppressione è dominante o recessiva. Per fare questo si incrocia il ceppo WT-like aploide A'B' con il ceppo ts aploide A'B, per dare luogo ad un diploide. Si valuta quindi il fenotipo del diploide, che conterrà due alleli A'A', un B' ed un B. Se il fenotipo del diploide è ts allora la mutazione suppressor è recessiva. Se il fenotipo diploide è WT-like la mutazione suppressor è dominante.

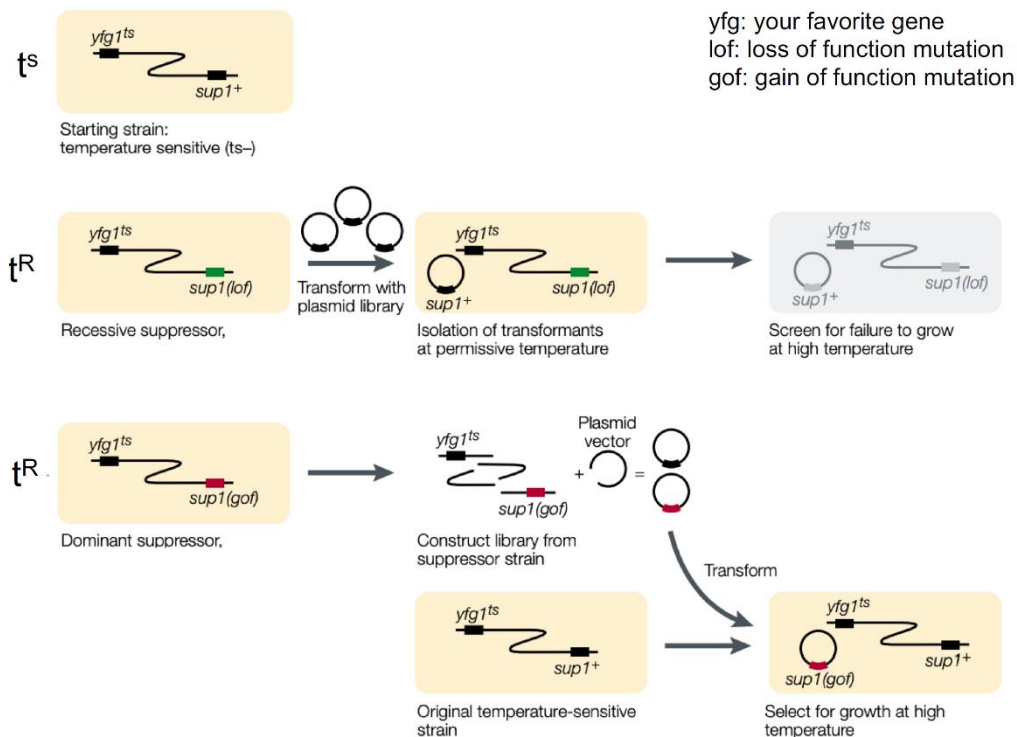




In base al fenotipo rilevato si può procedere in uno dei due modi seguenti per clonare il gene suppressor.

Se la **mutazione suppressor è recessiva**, si può isolare il gene trasformando il ceppo WT-like A'B' con una libreria plasmidica di lievito WT. I trasformanti vengono isolati a temperatura permissiva, poi la coltura si mette a temperatura non permissiva. I cloni che sono stati trasformati dal plasmide contenente il gene B WT tornano ad essere termosensibili, quindi non cresceranno in coltura. Si identificano quindi i cloni termosensibili e si sequenziano per identificare il gene B. La mutazione B' è recessiva perché l'inserimento del gene B WT causa la ricomparsa del fenotipo ts.

Se la **mutazione suppressor è dominante**, si crea la libreria genomica dal ceppo WT-like A'B'. Questa libreria conterrà un plasmide con il gene mutato suppressor B'. A questo punto si prende il ceppo ts A'B e si trasforma con la libreria genomica. Si selezionano i trasformanti a temperatura permissiva, e successivamente si seleziona a temperatura non permissiva. Le colonie che cresceranno a temperatura non permissiva avranno probabilmente integrato il plasmide contenente il gene B', che è dominante e ripristina il fenotipo WT-like anche in presenza del gene B WT. Si sequenzia quindi il plasmide per identificare il gene B'.



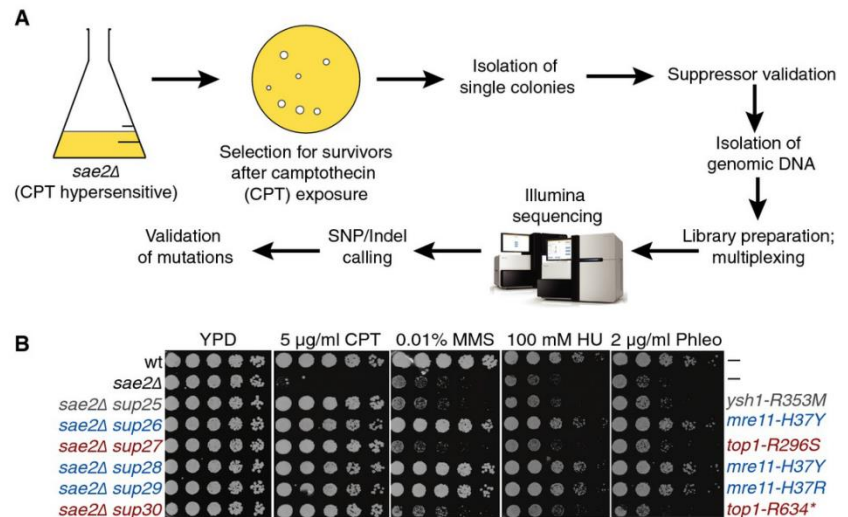
### Esperimento con sequenziamento

Ceppi *sae2Δ* sono sensibili alla camptotecina. Quando si coltivano ceppi *sae2Δ* si possono ritrovare colonie vitali, che hanno in qualche modo sviluppato mutazioni che permettono di resistere alla camptotecina, sopprimendo il fenotipo camptotecina sensibile.

“Questi cloni sono incrociati con un ceppo WT aploide, per dar luogo al diploide. Dalla sporulazione del diploide si identifica se la mutazione suppressor è intragenica o extragenica. Siccome il ceppo è *sae2Δ*, il gene *sae2* non è presente e quindi non ci possono essere mutazioni intrageniche.”

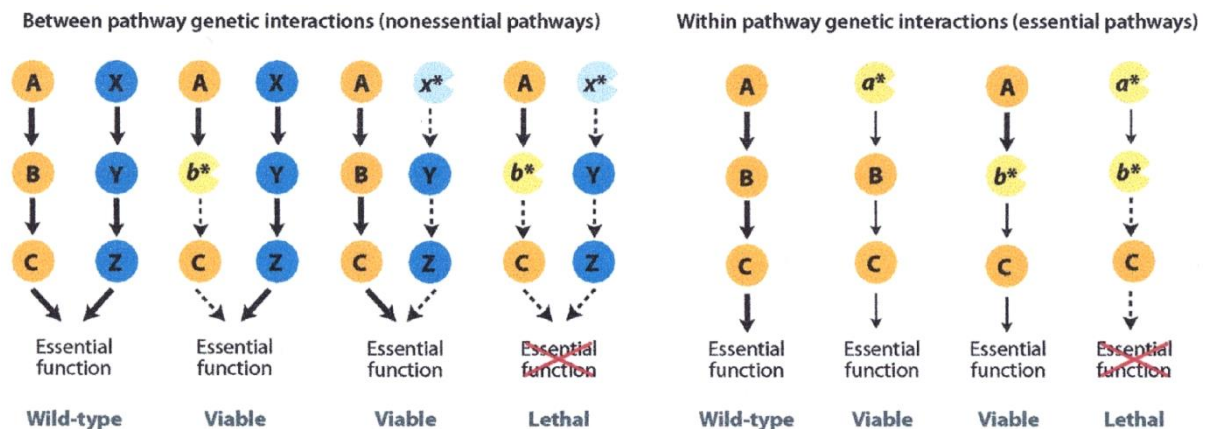
Le colonie sopravvissute vengono isolate e sequenziate, e le mutazioni responsabili della resistenza alla camptotecina identificate e validate.

Questo metodo si può utilizzare sia con mutazioni dominanti che recessive. Le mutazioni così trovate vanno sempre validate trasformando cloni *sae2Δ* con ognuno dei geni soppressori isolati mediante sequenziamento.



## Interazioni genetiche negative

L'interazione genetica negativa si verifica quando una mutazione, che causa o meno l'espressione di un fenotipo mutato, con la quale la cellula è vitale si associa ad una seconda mutazione, la cui co-presenza peggiora il fenotipo mutato, o non è compatibile con la sopravvivenza della cellula. Da questo il nome **letalità sintetica**.



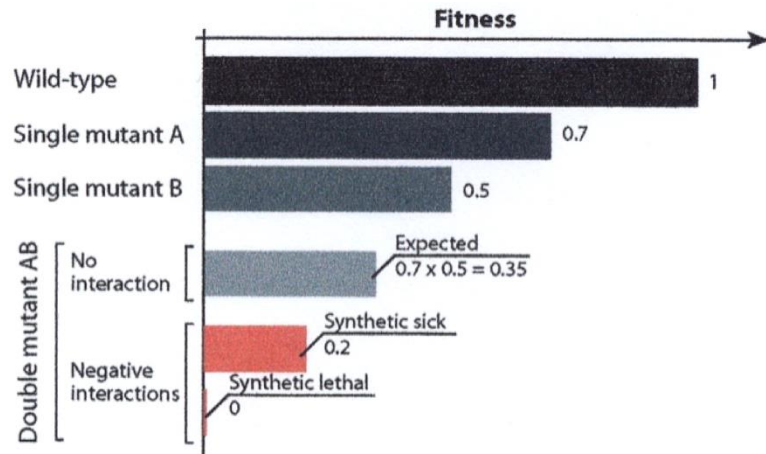
Ad esempio in una cellula aploide con genotipo AB, può presentare una mutazione su A (A') o B (B'), che se presenti singolarmente, ad esempio in cloni A'B oppure AB', sono compatibili con la vita, mentre se presenti contemporaneamente, come A'B', sono incompatibili con la sopravvivenza della cellula.

Anche questo tipo di interazione ci permette di comprendere come i prodotti genici interagiscono, e sono utili ad esempio per studiare interazioni tra proteine nei pathway, oppure dei pathway tra loro.

Il concetto di letalità sintetica presuppone che le mutazioni prese singolarmente non compromettano completamente la vitalità cellulare. Si parla di interazione negativa quando il fenotipo risultante è peggiore di quello che sarebbe atteso dal fenotipo osservato sulle cellule che presentano solo una delle due mutazioni, cioè inferiore al prodotto tra le fitness rilevate sullo stesso ceppo con una singola mutazione.

L'interazione genetica negativa è molto rilevante quando una sola delle mutazioni sulla cellula ha un effetto minimo o nullo sulla fitness, mentre la presenza di entrambe le mutazioni causa una forte riduzione della fitness.

Il concetto di letalità sintetica è stato molto studiato in lievito, perché molto utile a studiare interazione tra proteine, e perché l'interazione genetica negativa si verifica più di frequente dell'interazione genetica negativa.



### Studio della letalità sintetica

Ci sono due sistemi principali di screening per l'interazione negativa: uno utilizza appositi sistemi automatizzati mentre l'altro è un processo manuale realizzabile in laboratorio su ceppi di lievito.

La difficoltà del processo è che si vuole identificare un doppio mutante che non è vitale, ma se non replica non è possibile studiare un ceppo di lievito.

Si usa quindi il **sistema dei settori**.

Si parte da un ceppo di partenza con una mutazione di partenza A', di cui si vogliono studiare le interazioni genetiche negative, quindi l'interazione con altri geni che se mutati ne compromettono la vitalità

\*\*\*\*\* SPIEGATO NELLA MANIERA CORRETTA DOPO

Il ceppo di partenza ha anche una mutazione in *ade2*, che rende le colonie di colore rosso. Il ceppo ha anche una mutazione nel gene *ura3*.

Questo ceppo è detto SECT-, che fa colonie rosse.

Questo ceppo è trasformato con un plasmide senza centromero, che porta la versione WT del gene mutato A', cioè A. Il plasmide porta anche i geni URA3 e ADE2 WT. Questo ceppo è detto SECT+, e fa colonie bianche.

Se il ceppo SECT+ è coltivato in un terreno che contiene uracile ed adenina, questo tenderà a perdere il plasmide perché non c'è pressione selettiva, per via della presenza di uracile e adenina. I cloni che perdono il plasmide sono rossi, perché perdono la copia funzionante di ADE2, si formano quindi dei settori rossi nelle colonie.

Il ceppo SECT+ in coltura viene mutagenizzato, per creare mutazioni che possano alterare il fenotipo quando associate con A', che è la mutazione che si sta studiando.

Il ceppo SECT+ dopo mutagenesi viene piastrato su un terreno con uracile e adenina. Ciò che cerchiamo è trovare cloni che acquisiscano un fenotipo SECT-, quindi che fanno colonie tutte rosse. Queste colonie infatti potrebbero essere rosse perché hanno perso il plasmide. \*\*\*\*\* HA CORRETTO NELLA LEZIONE DOPO, COME SOTTO.



\*\*\* Riflessione\*\*\*

La parte precedente descritta dalla prof ha la falla che le colonie SECT- fanno colonie rosse perché non hanno il plasmide. Ma in realtà se il lievito perde il plasmide perde anche il gene A che compensa la mutazione A', e quindi sarà A'. Se è vero che queste colonie sono quelle giuste perché contengono anche una seconda mutazione che è letale accoppiata ad A', noi non dovremmo vederle. Se invece le colonie mantengono il plasmide è vero che sopravvivono alla seconda mutazione, ma faranno colonie bianche.

Per identificarle dovremmo mettere questi ceppi, letali sintetici ma con il plasmide, in FOA, cosicché dato che contengono il plasmide con URA3 le cellule non sopravvivano. Ma in questo caso le colonie sarebbero bianche.

Quindi in realtà dopo la mutagenesi dovremmo coltivare le cellule, selezionare le colonie bianche sopravvissute e poi fare un replica plate su FOA. Le colonie che muoiono hanno il plasmide, e dato che tutti i cloni sono bianchi vuol dire che il plasmide è necessario alla sopravvivenza, probabilmente perché c'è una mutazione su un secondo gene che è letale in un clone A', ma che è compensata dalla copia WT del gene A sul plasmide. Una evenienza simile si verifica in caso di accumulo di mutazioni ulteriori sul gene A', che ne annullano la funzione e richiedo la copia WT sul plasmide per la sopravvivenza.

\*\*\*\*\*fine\*\*\*\*\*

Un articolo (*Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in Saccharomyces cerevisiae*. M.C. Frigieri et al. 2007) spiega come fare screening di letali sintetici.

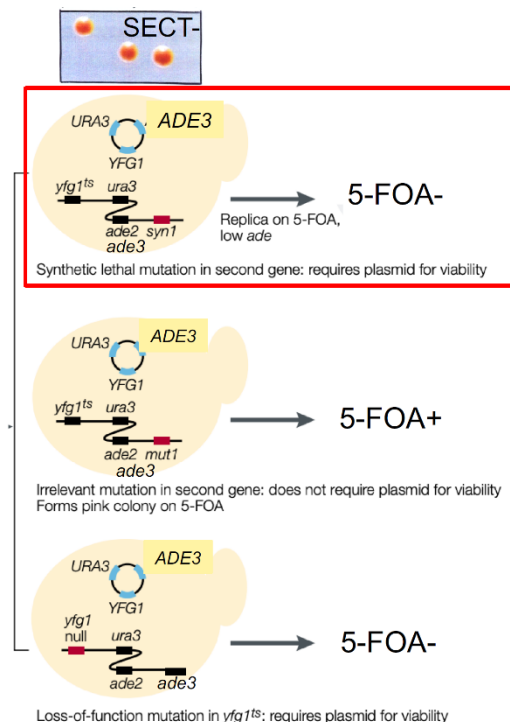
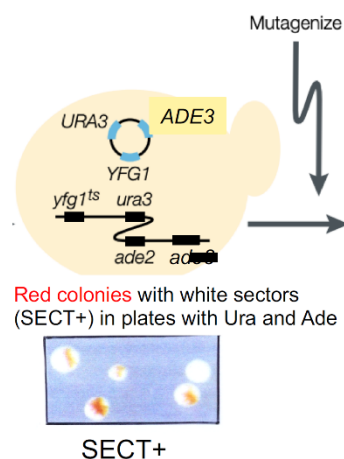
Si usano ceppi che hanno una mutazione ts nel gene da studiare, ad esempio *a*, che in forma WT è A. Questi ceppi hanno anche mutazioni *ade2Δ* ed *ade3Δ*, oltre alla rimozione di un marker di selezione, ad esempio *ura3Δ*.

Mutazioni in *ade2* con ADE3 funzionante causano la colorazione rossa delle colonie per accumulo del substrato dell'enzima *ade2*. ADE3 è un gene a monte di ADE2, quando si ha mutazione in *ade3* non si ha accumulo del prodotto rosso, per cui le colonie *ade2 ade3* sono bianche. Il ceppo è trasformato con un plasmide contenente la copia WT del gene con mutazione ts, cioè A. Il plasmide contiene anche una copia WT di ADE3 e del marcatore di selezione, in questo caso URA3.

Le colonie formate dal ceppo contenente il plasmide sono rosse, perché ADE3 è nel plasmide e non c'è nessuna copia funzionante di *ade2*.

Le colonie coltivate a temperatura permissiva ed in terreno contenente uracile ed adenina tendono a perdere il plasmide, perché non c'è pressione selettiva. Formano quindi colonie rosse (hanno il plasmide) con parti bianche (hanno perso il plasmide).

*ade2 ade3* BIANCO  
*ade2* ROSSO



Le colonie vengono mutagenizzate ed incubate in terreno ricco per 15 giorni. Si selezionano le colonie che hanno mantenuto il plasmide, cioè che sono tutte rosse con fenotipo SECT-, perché vuol dire che probabilmente c'è una seconda mutazione che rende necessaria la presenza del plasmide, che porta A. Le colonie così identificate vengono strisciate su terreno di coltura contenente 5-FOA, che seleziona contro il marcatore URA3, che è presente nel plasmide. Il 5-FOA è tossico per le cellule che hanno il gene URA3, quindi le colonie che portano il plasmide non cresceranno, e verranno identificate. Si selezionano quindi le colonie SECT- (colonie rosse che portano ADE3) e contemporaneamente sensibili a 5-FOA (colonie che portano URA3), perché probabilmente portano il plasmide che essenziale per compensare una seconda mutazione sul genoma insorta in seguito a mutagenesi, che quando combinata alla mutazione su *a* è letale per l'organismo.

Il lavoro seguente è quello di clonare il secondo gene mutato presente nelle colonie selezionate. Questo può essere fatto mediante sequenziamento, oppure mediante la trasformazione con una libreria di lievito WT.

Nel caso si decida di trasformare con una libreria di lievito, si andranno poi a selezionare le colonie che diventano SECT+ (ricominciano a fare settori bianchi) e che sopravvivono su 5-FOA, il che indica che la cellula può sopravvivere senza il primo plasmide, perché il secondo plasmide complementa la mutazione sintetica letale nel secondo gene. La trasformazione con libreria di lievito è valida solo se la seconda mutazione insorta è recessiva.

Importante prima di procedere con l'analisi è verificare che ci sia effettivamente una combinazione letale tra la mutazione di partenza *a* ed una seconda mutazione di partenza che è *b*.

Si incrocia quindi il ceppo SECT- 5-FOA sensibile con un ceppo WT, creando un diploide doppio eterozigote per le due mutazioni *a/A* e *b/B*. Se c'è effettivamente una mutazione *b* ci si aspettano tre tipi di tetrade, come nell'immagine.

Genotipo del diploide:

$$\frac{PRII}{pri1-2} \quad \frac{pipx}{PIPX}$$

Tipi di tetradi attese:

	1	2	3
a	<i>PRII PIPX</i> +	<i>PRII PIPX</i> +	<i>PRII pipx</i> +
b	<i>PRII PIPX</i> +	<i>PRII pipx</i> +	<i>PRII pipx</i> +
c	<i>pri1-2 pipx</i> -	<i>pri1-2 pipx</i> -	<i>pri1-2 PIPX</i> +
d	<i>pri1-2 pipx</i> -	<i>pri1-2 PIPX</i> +	<i>pri1-2 PIPX</i> +
	<b>N P D</b>	<b>T T</b>	<b>P D</b>

Questa ipotesi va verificata su terreno di coltura.

Una volta identificato il gene o i geni che danno letalità sintetica, va clonato il gene e se ne studia il meccanismo molecolare. Lo studio dei pathway al livello biochimico è importante in associazione agli studi genetici.

*Perché si usano le interazioni genetiche negative*

Le interazioni genetiche negative vengono studiate per vedere quali proteine interagiscono tra loro, non solo fisicamente ma anche tramite interazioni tra pathway.

