

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 34

Synthetic Genetic Array

Il Synthetic Genetic Array è un sistema di screening su larga scala, messo appunto da Charles Boone e Brenda Andrews. (*Systematic Genetic Analysis with Ordered Arrays of Yeast Deletion Mutants*. Amy Hin Yan Tong, Brenda Andrews, Mike Tyers, Charles Boone. 2001)

Questo sistema permette di incrociare un mutante che porta la query mutation con un array di circa 4700 mutanti di delezione. Nel diploide generato da ogni incrocio si induce la meiosi e se ne studia la progenie. La presenza di progenie meiotica non vitale permette di identificare la relazione funzionale tra i geni. Questo ha permesso di scoprire network di interazione tra geni.

Il vantaggio di questo sistema è l'automatizzazione. Il sistema robotizzato permette di trasferire le cellule sospese ad una piastra, oppure da una piastra ad un'altra.

Si usa un ceppo di lievito che porta la mutazione da studiare (*query mutation*), il gene NATMX che da resistenza alla nurseotricina, ed è un aploide MAT α .

Questo ceppo è incrociato con tutti i ceppi della libreria di delezione, ognuno un aploide MAT α , con gene KANMX, che da resistenza alla kanamicina, ed una tra le oltre 4700 mutazioni della libreria.

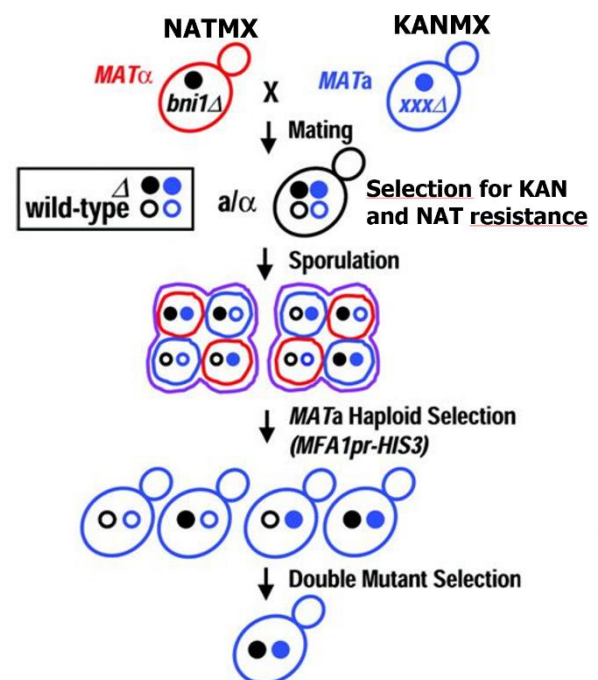
L'analisi si fa per quattro volte.

Dopo l'incrocio si deve selezionare il diploide, per cui si seleziona in un terreno contenente sia kanamicina che nurseotricina, dato che il diploide è l'unico che porta entrambe le resistenze.

I diploidi selezionati si coltivano su terreno di sporulazione, per cui si ottengono quattro spore da ogni diploide.

Si selezionano i ceppi aploidi MAT α , che portano HIS3, su terreno privo di istidina. Il gene HIS3 è sotto il controllo del promotore MFA1pr, che è un promotore espresso solo nelle cellule MAT α . Questo passaggio di selezione degli aploidi si fa perché la sporulazione dei diploidi non è efficiente al 100%.

Si testa la capacità di crescita delle spore doppie mutanti selezionate, quindi il sistema robotizzato sposta ogni spora dell'asco nuovamente su un terreno di coltura contenente sia kanamicina che nurseotricina.



Sulla piastra si identificherà la vitalità delle spore con doppia mutazione. Si valuta se la tetrad è tetratipo, parentale o non parentale. Va sempre verificato che la spora non vitale sia quella doppio mutante, verificando che le spore sopravvissute non siano kanamicina e nurseotricina resistenti.

Questa tecnica ha il vantaggio di essere automatizzata su larga scala, ma lo svantaggio di usare i mutanti da una libreria. Nel caso dello screening manuale a settori la varietà di mutazioni che si possono studiare è maggiore, ma è molto più lento da eseguire.

Nel tempo con SGA si è arrivati a testare 1712 query genes, con 334 alleli condizionali, per un totale di 5,4 milioni di coppie di geni.

Gene-compound synthetic lethality

L'analisi genetica gene-compound è utilizzata per studiare l'interazione tra un gene ed un composto chimico. Si usa un ceppo mutato ma vitale, a cui si somministra una sostanza chimica, e si verifica se appare letalità sintetica quando c'è la copresenza di una determinata sostanza chimica e la mutazione. Mima la letalità sintetica di una mutazione ad un secondo gene.

Il razionale è che il composto chimico interagisce con una proteina e la inibisce; l'inibizione di questa proteina in combinazione ad una mutazione già presente nel DNA causa la morte della cellula. Questo permette di identificare una interazione tra il bersaglio del farmaco ed il gene mutato.