

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 29

Mutazioni

È importante distinguere tra mutazione e mutante. Una mutazione è la alterazione della sequenza primaria del materiale genetico. Un mutante è un organismo o un ceppo che porta una o più mutazioni.

In genetica si può parlare di analisi genetica diretta ed analisi genetica inversa.

- Analisi genetica diretta: l'organismo mutante è studiato per capire quale gene provoca un fenotipo che si discosta dalla norma. Il gene mutante trovato viene sequenziato per trovare la mutazione che causa il fenotipo.
- Analisi genetica inversa: parte dal gene che si sta studiando, da cui si generano varianti mutate. Le varianti mutate del gene vengono espresse in nell'organismo modello e se ne studia il fenotipo risultante.

Analisi genetica inversa

Quando si decide di studiare un gene di interesse generando varianti mutate (analisi genetica inversa), bisogna fare delle valutazioni sul gene.

- Considerare se il gene è essenziale o meno per la vitalità cellulare. L'essenzialità di un gene in lievito può essere identificata mediante apposite banche dati, create rimuovendo un gene (una ORF) alla volta da ceppi di lievito.
- Se il gene non è essenziale il primo step può essere la delezione del gene
- Si possono fare mutazioni random oppure specifiche sul gene.
- Si seleziona il fenotipo manifestato dal mutante
- Si indentifica se il fenotipo è recessivo o dominante
- Si sequenzia il gene per identificare la mutazione (sia se introdotta random, sia se sito specifica, per identificare se la mutazione specifica è stata introdotta correttamente)

Delezione

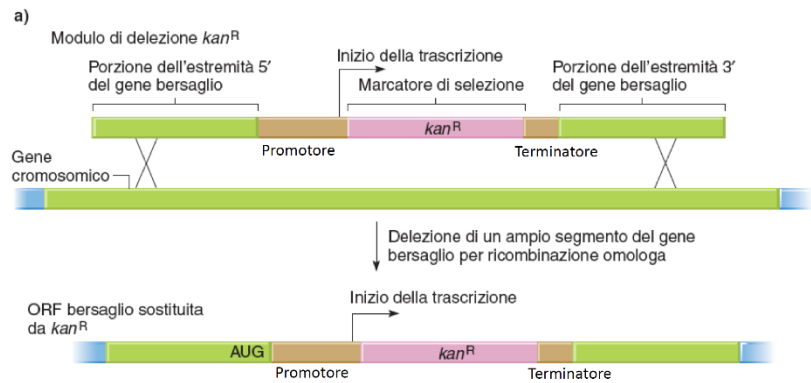
La delezione di un gene di lievito si può fare con una tecnica detta *one step PCR*. Il gene viene identificato. Si costruisce una cassetta di delezione che contiene le porzioni 5' e 3' del gene bersaglio. La sequenza centrale del gene è rimossa, e sostituita con un promotore, un marker di selezione, ed un terminatore del gene.

Se il gene non è essenziale si può usare un ceppo aploide. La cassetta prima realizzata si integra nel genoma mediante ricombinazione omologa, sostituendo il gene bersaglio.

È stato stabilito che per considerare un gene come deletato va rimossa almeno il 95% della regione codificante, mentre non è necessario togliere promotore e terminatore.

Quando si fa la delezione di un gene vanno sempre considerati i geni vicini, perché è importante non interferire con questi geni. Il lievito ha i geni molto vicini tra loro, quindi è importante scegliere in maniera attenta la regione da rimuovere.

La rimozione accidentale di parte dei geni vicini al gene bersaglio causa confusione nell'interpretazione di un fenotipo, perché non è possibile distinguere se il fenotipo è causato dalla rimozione del gene bersaglio o dalla rimozione di parte dei geni vicini al bersaglio.



Delezione con PCR

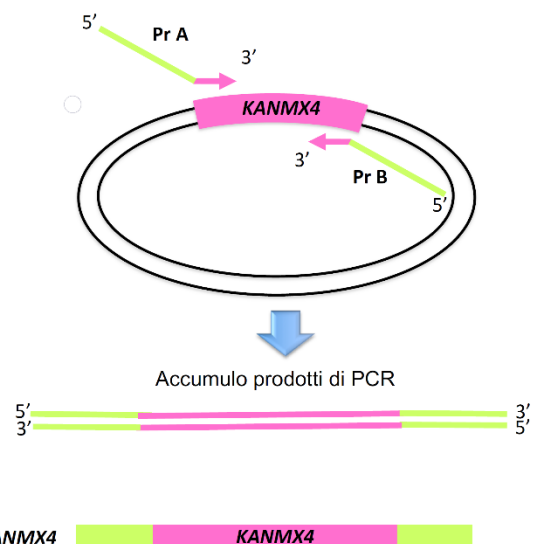
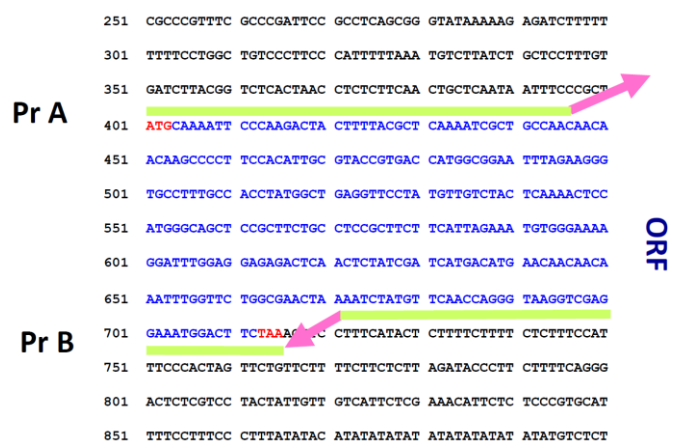
Si disegnano due oligonucleotidi con due porzioni ciascuno: una complementare alle regioni 5' e 3' del gene bersaglio, l'altra complementare al gene del marcatore di selezione, ad esempio la *kanamicina*.

Questi oligonucleotidi vengono usati durante la PCR, assieme a materiale genetico, ad esempio un plasmide, che contiene il gene del marcatore. Dall'amplificazione del gene del marcatore con questi oligonucleotidi si ottiene la cassetta di delezione.

Ottenuta la cassetta di delezione si può trasformare il lievito. Si decide di usare ad esempio un ceppo diploide. La cassetta di delezione è un frammento di DNA lineare, che non replica autonomamente e deve integrarsi nel genoma. Le regioni di omologia alle estremità 5' e 3' permettono la ricombinazione omologa col gene bersaglio.

La cassetta generalmente si integra in uno solo degli alleli del ceppo diploide, difficilmente si integra su entrambi.

Dopo l'integrazione vanno selezionati i ceppi che hanno integrato la cassetta, e ciò viene



sml1Δ::KANMX4

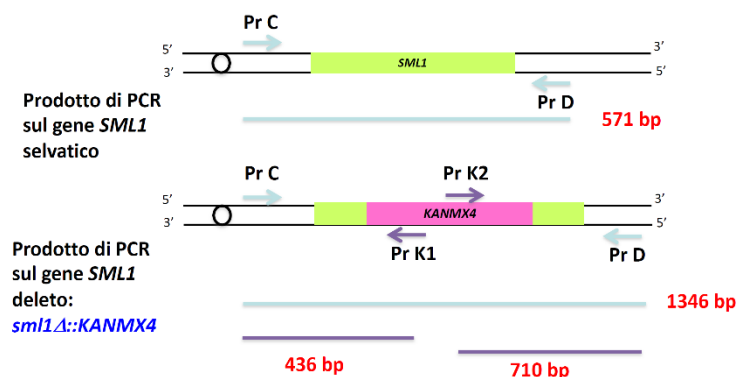
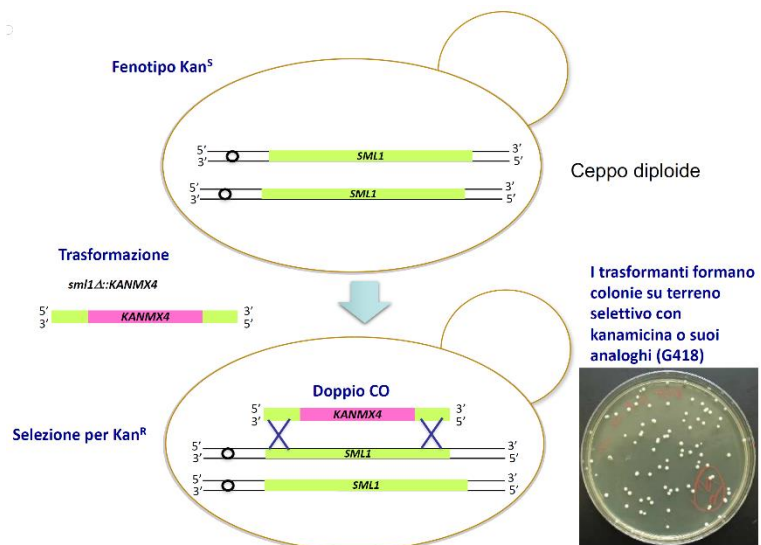
fatto su un terreno di coltura che contiene la molecola marker, a cui la cassetta di delezione conferisce resistenza, in questo caso l'antimicotico *kanamicina*.

Le cellule sopravvissute sono resistenti al marcatore di selezione e probabilmente hanno integrato la cassetta di delezione. La cassetta può integrarsi al locus desiderato, in base alle regioni di omologia, oppure in un altro locus. Nel secondo caso il gene che si voleva deletare sarà ancora presente sul cromosoma.

Vanno quindi controllati i trasformanti, che si può fare mediante PCR. Si estrae il DNA genomico dalle colonie sopravvissute e si cerca la presenza di sequenze specifiche di DNA usando primer appositi. È possibile disegnare primer a monte e a valle del gene che si vuole deletare, al di fuori della regione riconosciuta dalla cassetta di delezione.

Gli oligonucleotidi si appaieranno alle sequenze complementari ed amplificheranno il DNA che si interpone tra queste. La lunghezza del DNA amplificato è distinguibile mediante elettroforesi e permette di comprendere se la cassetta si è integrata nel locus target, oppure se è ancora presente il gene WT.

Su un ceppo diploide si dovrebbero rilevare due bande: una della dimensione WT ed una della dimensione della cassetta di delezione, se uno solo dei due alleli è stato sostituito dalla cassetta.

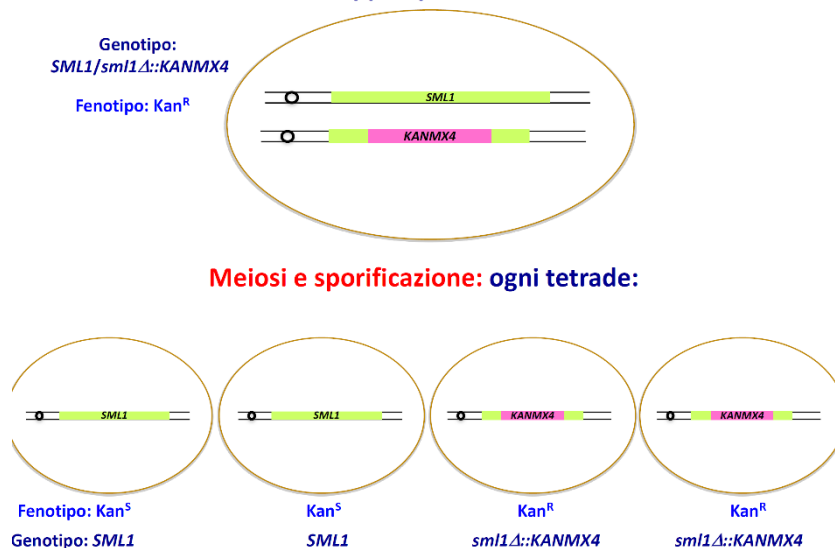


Si possono utilizzare anche dei primer accessori, che si appaiano al gene della kanamicina. Questi permettono di identificare se la cassetta di delezione si è effettivamente integrata al locus target.

Produrre un ceppo aploide *sm1Δ::KANMX4*

Analisi del fenotipo mutante

Dopo aver generato il mutante diploide si desidera studiare l'organismo aploide che porta la delezione. Di può quindi indurre la meiosi nel diploide, che attraverso la sporulazione permette di ottenere quattro spore aploidi, di cui due portano la mutazione mentre le altre due hanno il gene WT.



Si usa un micromanipolatore per separare le singole spore. Se il gene studiato non è essenziale, ogni spora dovrebbe dar luogo ad una cellula aploide vitale.

Nel caso in cui il gene deletato non sia un gene essenziale, si fa un replica plate delle cellule aploidi su un terreno contenente la molecola marcatore. Si selezioneranno in questo modo le colonie che hanno ereditato il cromosoma contenente la cassetta di delezione. Sono 2 spore vitali su 4 per ogni cellula diploide mutata che ha fatto meiosi.

Se il gene studiato è essenziale, si osserverà che solo la metà delle spore saranno vitali, cioè quelle che portano il cromosoma WT della cellula madre. Queste spore dovrebbero essere tutte kanamicina sensibili, per cui si fa un replica plate su terreno contenente kanamicina (o G418), e non si dovrebbero osservare spore. Se si rilevano spore sopravvissute vuol dire che c'è una mutazione in un altro gene che è comparsa nel diploide, e segrega in maniera diversa dalla resistenza alla kanamicina.

Mutazioni puntiformi random e sito specifiche

Mutazioni sito specifiche

Ci sono diverse tecniche di mutagenesi sito diretta.

Si utilizza il gene di interesse clonato in un plasmide. Si denatura il plasmide e si usa un primer che si appaia al gene di interesse e contiene una mutazione nella sua sequenza, che causa un mismatch.

Si allunga poi il primer con DNA di neosintesi, grazie all'uso di una DNA polimerasi, dNTP e DNA ligasi, completando la replicazione in vitro ed ottenendo il DNA con il mismatch.

Il DNA con mismatch è usato per trasformare E.coli, aggiungendo anche un marcatore di selezione al plasmide. Si selezionano le cellule per il marcatore di selezione (di solito un antibiotico come la ampicillina). Non è detto che tutte le colonie che hanno integrato il plasmide portino la mutazione, perché E.coli ha meccanismi di riparazione dei mismatch che correggono il mismatch sostituendo uno dei due nucleotidi erroneamente appaiati. Tra le colonie che avranno integrato il plasmide se ne avranno alcune con la mutazione ed altre col gene WT.

Vanno quindi isolati i singoli trasformanti separatamente, sequenziandone il genoma per identificare se è presente il DNA plasmidico mutato oppure no.

La mutagenesi sito diretta si può utilizzare quando si conosce la funzione della proteina e la localizzazione del sito specifico, su cui poi si va a programmare una mutazione.

Mutazioni random

La mutagenesi random si utilizza quando non si ha ben chiaro il funzionamento della proteina studiata.

Mutagenesi con agenti mutagenizzanti

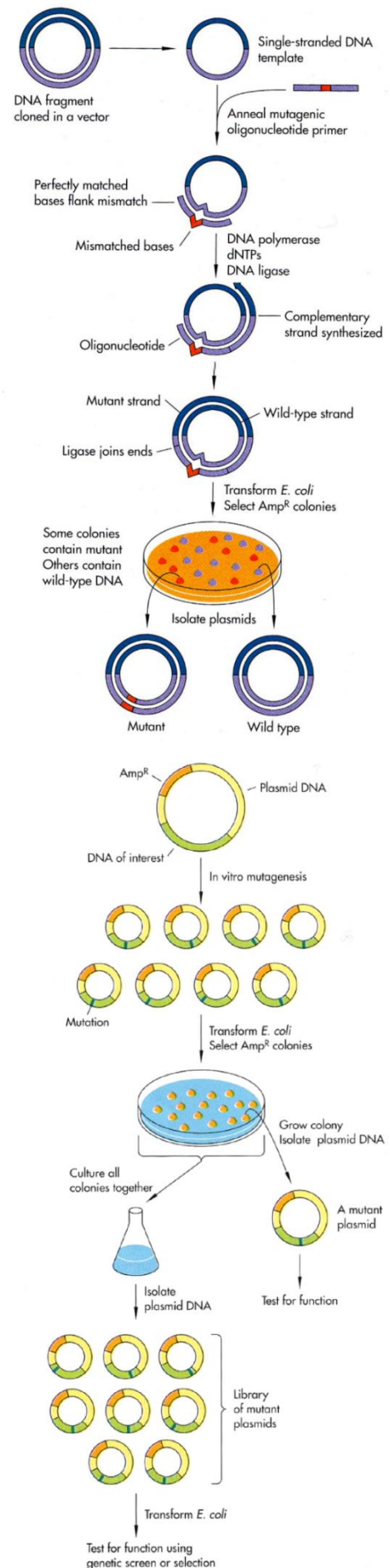
Il protocollo di mutagenesi random prevede la clonazione del gene di interesse in un plasmide. Questo DNA viene trattato ad esempio con idrossilammmina, che introduce lesioni al DNA.

Il plasmide viene utilizzato per trasformare cellule di E.coli, che poi vengono selezionate con il marcatore di selezione, che permette di isolare le cellule trasformate.

I trasformanti sopravvissuti conterranno delle mutazioni.

Si estrae quindi il DNA dalle cellule e si crea una libreria di DNA del plasmide di partenza, che può contenere la mutazione oppure no. La libreria può essere utilizzata per trasformare un ceppo di lievito aploide con il plasmide (se il gene da studiare è un gene di lievito; per far questo già all'inizio dell'esperimento devono essere usati plasmidi shuttle, capaci di funzionare sia in E.coli che in lievito).

Dopo aver selezionato i ceppi trasformati con questa libreria se ne analizza il fenotipo. Si usano metodi di screening o selezione. I trasformanti in questo caso vanno tenuti separati, perché si vuole identificare il trasformante con un fenotipo particolare, da sequenziare per comprendere la mutazione



sottostante al fenotipo. Nel caso si usa il lievito come organismo modello è utile utilizzare ceppi aploidi che portano la delezione del gene che si vuole studiare, in modo che il gene inserito col plasmide sia il solo a poter essere espresso; questo permette di identificare anche mutazioni recessive, che sono la maggior parte.

Questo metodo di mutagenesi comunque non è molto efficiente quindi non viene ormai molto utilizzato.

Mutagenesi con PCR degenerata (error prone)

È il sistema di mutagenesi tra i più utilizzati attualmente. Questo sistema prevede l'inserimento di mutazioni durante la fase di amplificazione PCR di un trascritto.

Si possono usare delle DNA polimerasi error prone, senza attività esonucleasica 3'5', oppure condizioni del medium di reazione alterate rispetto a quelle per la PCR a basso tasso di errori.

Il risultato è un prodotto di PCR lineare può contenere mutazioni. Il lievito non può essere trasformato direttamente con l'amplificato, ma i prodotti di PCR vanno clonati in un plasmide, in vitro.

La clonazione è possibile perché ad esempio i primer di amplificazione portano una regione riconosciuta da un enzima di restrizione (e le mutazioni lì non ci vanno?), che generano estremità (lei dice 'blunt'??) che possono legarsi al plasmide, su un sito di taglio dello stesso enzima di restrizione.

Questa è detta reazione di *ligation*. Non è detto che le reazioni di ligation abbiano sempre un buon risultato.

La PCR degenerata si fa in molti passaggi indipendenti, per riuscire ad avere una libreria di molecole lineari che possono contenere mutazioni.

Mutagenesi con plasmide replicativo

Per ovviare all'inefficienza della ligation è possibile far svolgere questa funzione al lievito. In questo caso i prodotti di PCR mutati possono essere clonati all'interno di un plasmide replicativo, che contiene anche la copia WT del gene che è stato mutagenizzato.

Si usa quindi un enzima di restrizione che taglia all'interno del gene contenuto nel plasmide, lasciando le estremità del gene sul plasmide. Il plasmide così prodotto viene co-trasformato assieme al gene mutato facente parte della libreria di varianti mutate.

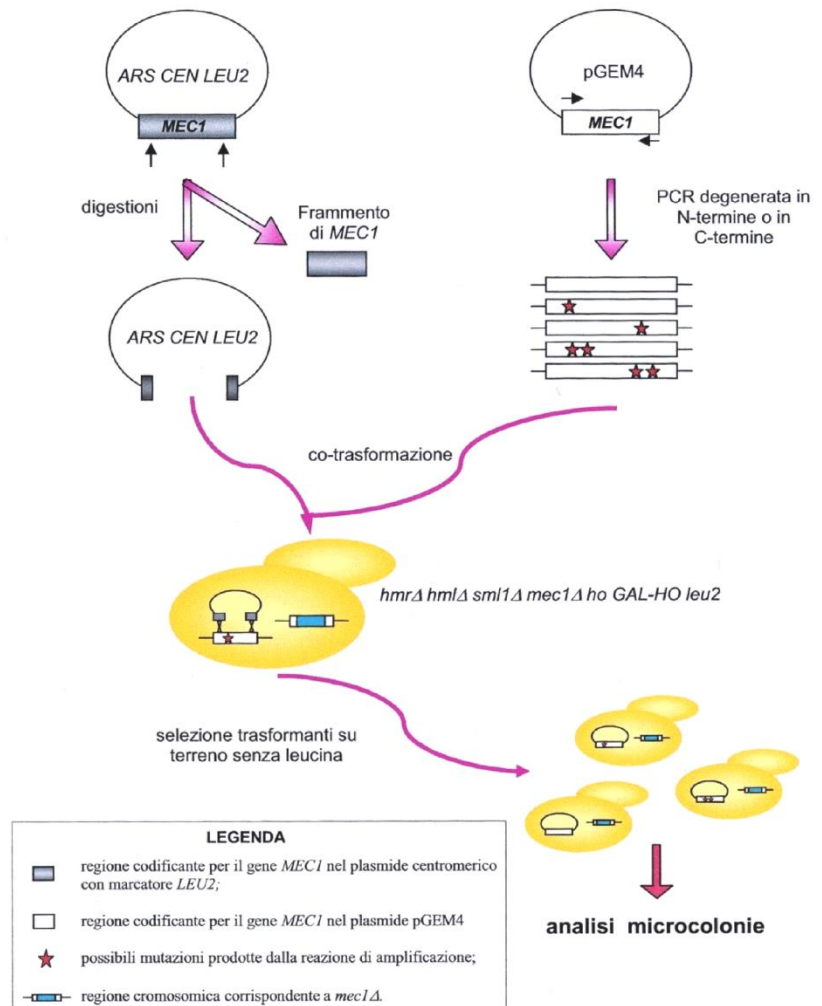
Il ceppo usato è *mec1Δ* e *leu2Δ*. *mec1Δ* perché il gene che si sta studiando è MEC1, e si vuole esprimere solo la copia inserita nel plasmide, mentre *leu2Δ* per usare il marcatore LEU2 nel plasmide.

La co-trasformazione porta all'interno della cellula trasformata il plasmide (in forma lineare perché tagliato) e i prodotti di PCR mutagenizzati provenienti dalla libreria.

Il lievito appaia il prodotto di PCR alle sequenze complementari presenti alle estremità del plasmide, e con un doppio evento di crossing-over si ha l'integrazione del frammento nel plasmide. Questo avviene attraverso ricombinazione omologa.

Per evitare che il plasmide si richiuda si può utilizzare una fosfatasi che rimuove il fosfato alle estremità 5', in modo che la DNA ligasi del lievito non lo richiuda direttamente e ci sia più tempo per fare gap repair con il prodotto di PCR. Si selezionano quindi i trasformanti che hanno integrato il plasmide. I trasformanti potranno avere o meno integrato nel plasmide prodotto di PCR.

Si può così isolare il DNA plasmidico dai singoli trasformanti e sequenziarlo. I trasformanti vanno trattati ognuno singolarmente, perché ciascuno può essere il mutante di interesse.



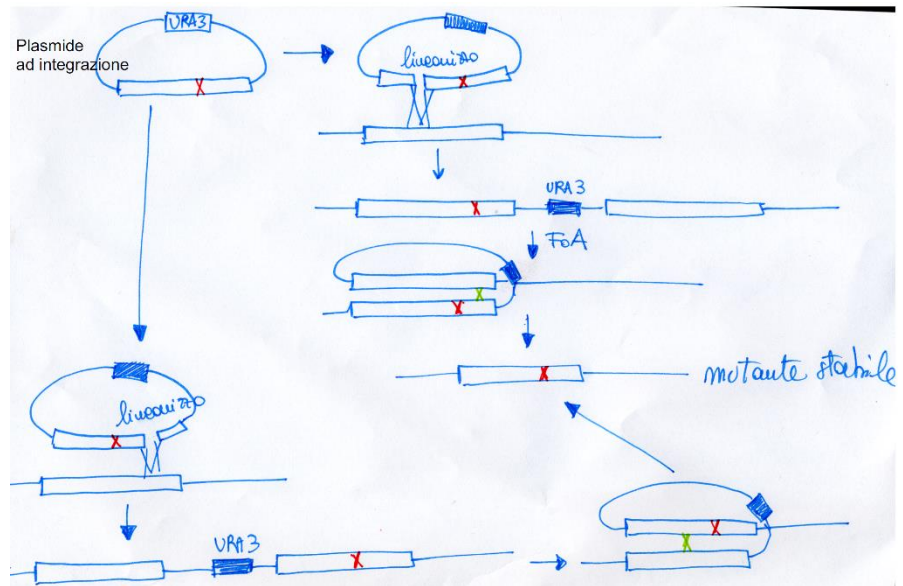
Il ceppo così ottenuto è instabile, perché la sopravvivenza dipende da un plasmide, che per essere mantenuto richiede che il ceppo sia coltivato in un terreno povero del prodotto codificato dal marker di selezione, in questo caso povero di leucina. I terreni poveri non sono ottimali per la coltura, e l'integrazione degli altri nutrienti è più costosa. Se però si usa un terreno ricco si rischia di perdere il plasmide, e con esso l'espressione del gene mutato.

Mutagenesi con plasmide integrativo

Si preferisce quindi creare dei ceppi stabili una volta trovata la variante mutata con il fenotipo ricercato. Per questo motivo trovato il trasformante adatto si sequenzia il plasmide, ricavando il gene mutato responsabile del fenotipo. Il gene così ottenuto può essere clonato in un plasmide di integrazione.

Il plasmide di integrazione non ha origine di replicazione, centromero e telomeri, quindi non è capace di replicarsi autonomamente nel lievito, e deve essere integrato nel genoma.

Il plasmide di integrazione porta un marker di selezione per lievito, ad esempio URA3, un marker di selezione per E.coli ed una origine di replicazione di E.coli. Il prodotto di PCR può essere integrato nel plasmide di integrazione.



Col plasmide contenente il nostro prodotto di PCR si trasforma il lievito, integrandosi nel genoma. Il plasmide integrativo si può integrare in diversi siti del genoma, sfruttando la ricombinazione omologa. Può integrarsi nel locus del gene mutato inserito, oppure al sito URA3 (se mutato con una mutazione missenso).

L'integrazione può essere diretta verso il sito del gene mutagenizzato. Sappiamo che l'integrazione necessita della formazione di un DSBs sul DNA.

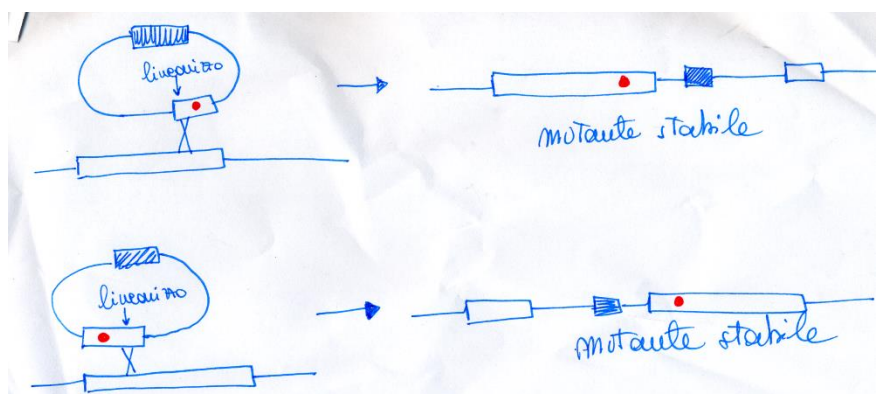
Per indirizzare l'integrazione si linearizza il plasmide usando un enzima di restrizione che effettua un solo taglio all'interno della sequenza codificante per il gene mutato.

Il plasmide inserito nella cellula WT di lievito si integrerà mediante ricombinazione omologa, inserendo tutto il DNA plasmidico nel genoma e duplicando il gene target.

Questo ceppo con DNA duplicato può non essere utile se quello che stiamo cercando è una mutazione recessiva.

Può essere indotto un evento di pop-out, che permette di rimuovere una delle due copie del gene di interesse e la sequenza plasmidica. Questo processo viene indotto nel lievito mediante l'uso di acido 5-fluoroorotico FOA.

Il FOA causa la morte delle cellule che esprimono URA3, per cui si selezionano le cellule *ura3Δ*. Spesso la perdita del gene URA3 avviene per via del crossing-over da parte delle due copie del gene duplicato, che ricombinano lasciando una sola copia del gene sul genoma (la copia mutata) e rimuovendo l'altra copia e il resto del DNA plasmidico. Si ottiene così



un trasformante stabile *ura3Δ*. Ci si accerta poi che nel mutante stabile si abbia una sola copia del gene, quella mutata.

Il crossing-over deve avvenire a valle della mutazione, altrimenti la mutazione non verrà mantenuta. In base quindi a dove è localizzata la mutazione sulla sequenza si decide la strategia con cui è più probabile il mantenimento della mutazione. Se la mutazione è a valle del gene (verso 3') si dovrà cercare di linearizzare il plasmide dopo la mutazione.

Mutagenesi con trasformazione e introduzione di marcatore

C'è una procedura che rimuove i problemi precedentemente visti e che permette la realizzazione del mutante direttamente in lievito.

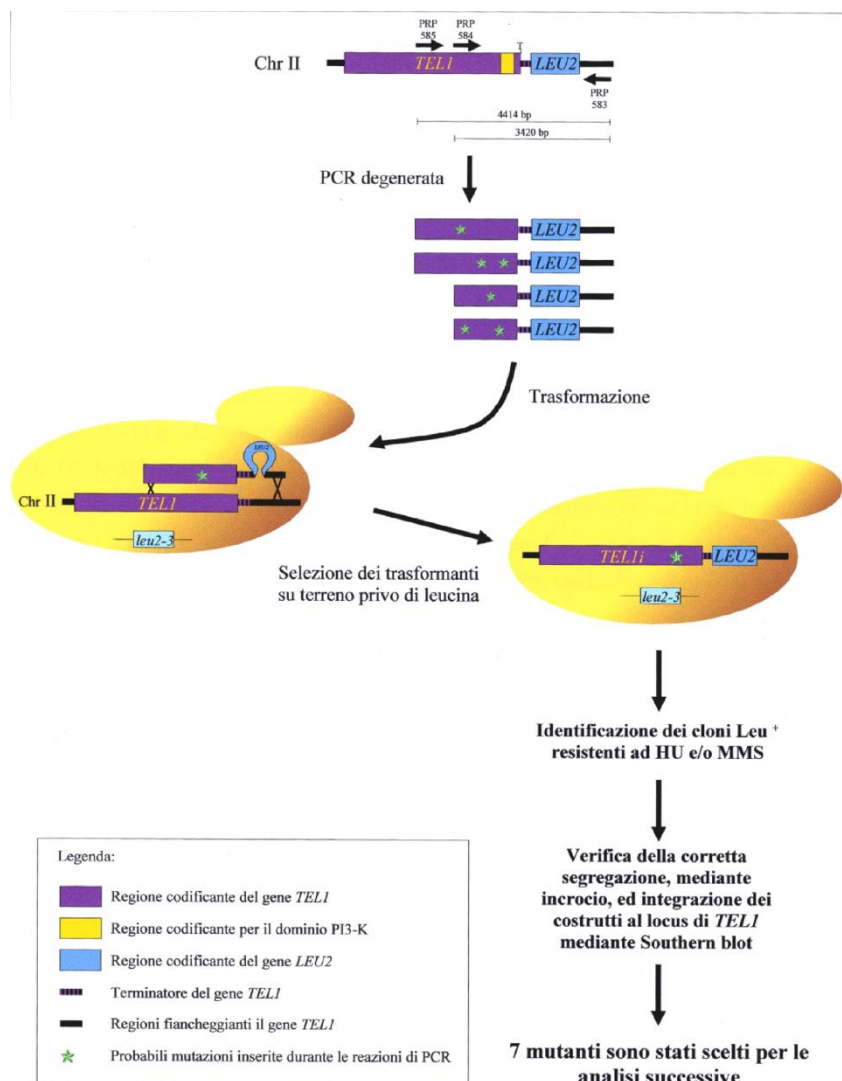
La procedura consiste nell'usare un ceppo di lievito in cui è stato inserito un marcatore di selezione accanto al gene di interesse, ad esempio TEL1 nell'immagine.

Si estrae quindi il DNA genomico e si amplifica con dei primer che si appaiano al locus TEL1 ed a valle del gene marcatore di selezione. Si amplifica quindi la regione tra i primer (che contiene parte del gene di interesse e tutto il marcatore di selezione) con PCR degenerata (error-prone).

I prodotti di PCR vengono utilizzati per trasformare direttamente un ceppo di lievito WT diploide. Il prodotto di PCR si appaierà alla sequenza complementare sul genoma di lievito, integrandosi mediante doppio crossing-over. Si ottiene quindi un ceppo che ha il gene di interesse probabilmente mutato (se la PCR ha dato mutazione) ed il marcatore di selezione.

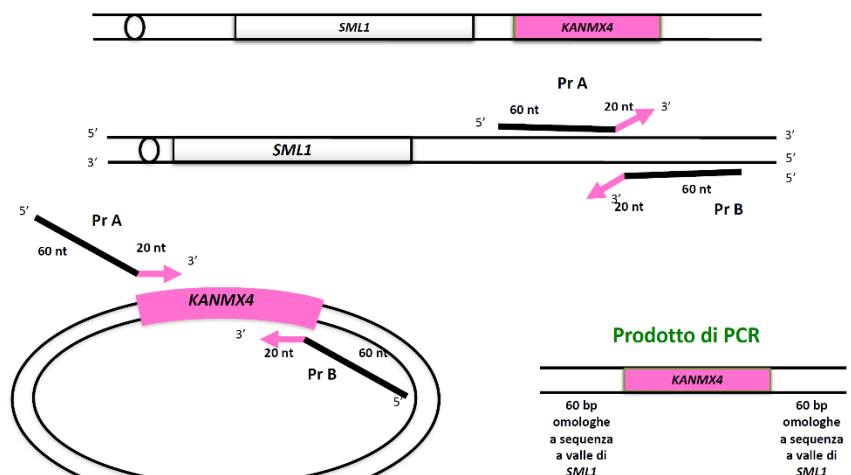
I mutanti così ottenuti vanno poi screenati o selezionati per il fenotipo.

Il vantaggio di questa tecnica è che richiede meno passaggi della precedente e che si possono fare esperimenti anche su geni essenziali, perché si trasforma un ceppo WT inserendo i prodotti di PCR che possono avere la mutazione oppure no.



Come inserire un marcatore di selezione adiacente ad un gene di interesse

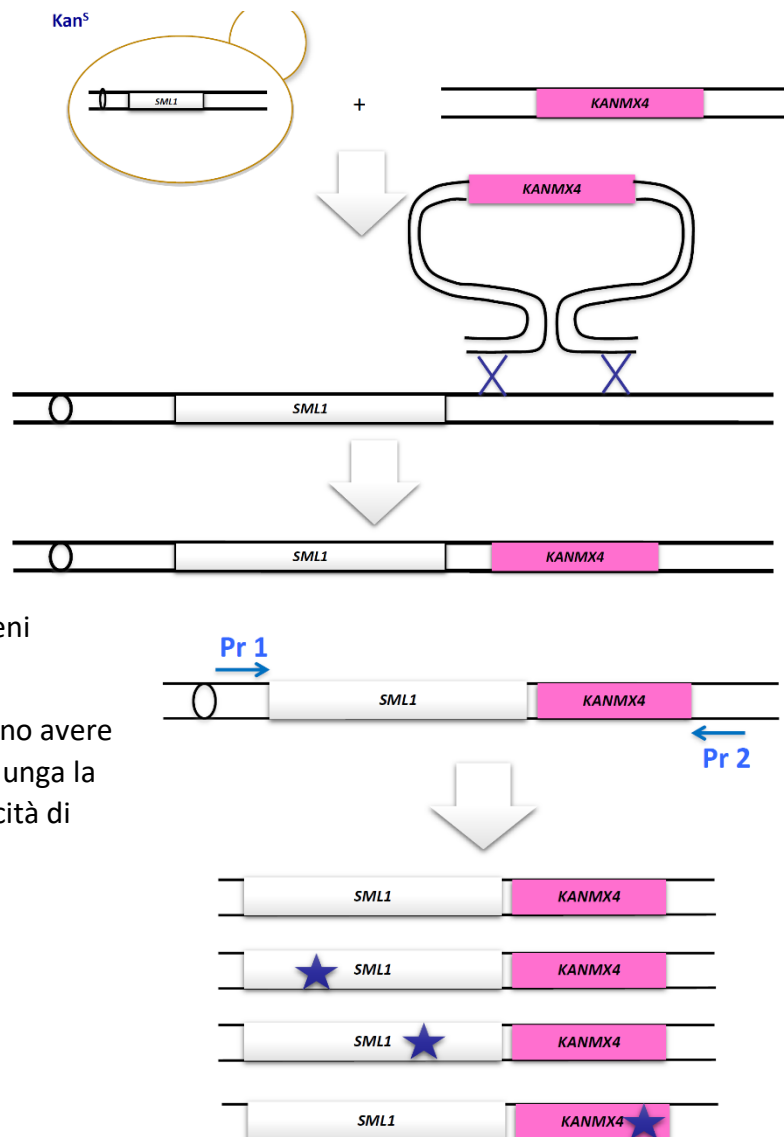
Vanno disegnati dei primer specifici che si appaiano ad una regione a valle del gene a fianco a cui si vuole inserire il marcatore. I due primer si appaiano ai due filamenti in maniera continua l'uno rispetto all'altro (dove finisce uno inizia l'appaiamento dell'altro sul filamento opposto). Questi primer hanno una regione che si appaia ciascuna ad una delle estremità del gene del marker di selezione che si vuole integrare.



Con questi particolari primer si amplifica il gene marcatore di selezione mediante PCR. Si otterrà un dsDNA che ha alle estremità due porzioni omologhe al genoma di lievito ed al centro la sequenza del marcatore di selezione.

Il prodotto di PCR viene usato per trasformare il lievito selvatico, inserendo il marcatore di selezione. Va sempre verificata la corretta integrazione del marcatore. È importante che il punto in cui si decide di fare integrare il marcatore non contenga geni porzioni regolatorie.

Le regioni di omologie nel primer devono avere almeno 45 basi, ma 60 è meglio. Più è lunga la regione omologa e maggiore è la capacità di ricombinazione.



Questa tecnica permette quindi di costruire il mutante direttamente da un ceppo WT ed una cassetta che comprende gene mutato e marcatore di selezione.

