

# Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

## Lezione 31

### Analisi genetica diretta

L'analisi genetica diretta si utilizza quando si ha un fenotipo mutato e si vuole comprendere quale gene provoca quel determinato fenotipo.

Se non si trova un mutante con il fenotipo ricercato si può cercare di generarne uno, mediante mutagenesi. La mutagenesi può essere indotta da un agente mutageno oppure spontanea.

È necessario generare molti organismi mutati. In genere si vuole far mutare poco l'organismo WT, in modo da avere una o poche mutazioni che determinano il fenotipo. Mutagenesi più pesanti causano molte mutazioni e rendono più difficile risalire alla mutazione causante il fenotipo osservato.

Secondo la prof le condizioni ideali di mutagenesi con metil metan sulfonato sono quelle in cui sopravvive circa il 50% dei ceppi coltivati. Ogni tipo di agente mutageno ha una sua specificità riguardo alle mutazioni che causa.

Se si decide di usare la mutagenesi spontanea si deve mettere a punto un sistema di screening che permetta la crescita del mutante.

*Il fenotipo è dovuto ad un singolo gene mutato?*

Dopo aver selezionato i cloni col fenotipo cercato, è necessario valutare se il fenotipo è causato da mutazioni in un singolo gene. Nel lievito questo è semplice, perché i cloni aploidi mutati possono essere incrociati con il ceppo WT, dando dei diploidi eterozigoti per la mutazione. Si induce meiosi e sporulazione nel diploide, e si separano le 4 spore da questo prodotte.

Se il fenotipo è dovuto a mutazioni su un solo gene, ogni diploide eterozigote indotto a sporulazione produrrà quattro spore di cui 2 che presentano il fenotipo mutante e due WT. Non è detto comunque che il gene mutato sia lo stesso in tutti i cloni con fenotipo mutato.

*La mutazione è recessiva o dominante?*

I cloni di cui si è certi che il fenotipo sia dovuto ad una mutazione su un solo gene vengono nuovamente incrociati con un ceppo WT. Si genera il diploide eterozigote per la mutazione, e se ne valuta il fenotipo. Se il diploide mostra il fenotipo mutato vuol dire che la mutazione è dominante, in caso contrario la mutazione è recessiva.

*Complementazione in mutanti con mutazioni recessive*

Quando il fenotipo è dovuto a mutazioni recessive si possono costruire dei gruppi di complementazione, che permettono di identificare se il fenotipo è legato ad un solo gene o a più geni.

I gruppi di complementazione si realizzano facendo incrociare tra loro i cloni che mostrano il fenotipo mutante. Se in due cloni il fenotipo è dovuto a mutazione sullo stesso gene, il diploide così ottenuto mostrerà ancora il fenotipo, perché non c'è un allele sano a compensare la mutazione visto che entrambe le cellule di partenza avevano la mutazione sullo stesso gene.

Se il diploide generato dall'incrocio di due mutanti mostra fenotipo WT, vuol dire che le mutazioni nei due ceppi di origine hanno interessato geni diversi.

Dopo aver identificato i gruppi di complementazione si può clonare il gene, o i geni, causanti il fenotipo. I geni si clonano per complementazione, per cui si trasformano i mutanti con una libreria genomica di lievito WT e si isolano le cellule che mostrano un recupero del fenotipo WT dopo trasformazione. Questi trasformanti porteranno un plasmide che contiene come inserto il gene di interesse.

Solo nelle mutazioni recessive si può complementare.

### *Complementazione per identificare mutazioni dominanti*

Nelle mutazioni dominanti ciò che si fa è costruire una libreria genomica dal genoma del mutante. Con la libreria genomica così ottenuta si trasformano colonie WT, e si cercano le cellule in cui compare il fenotipo mutato. Queste cellule conterranno un plasmide che porta come inserto il gene con mutazione dominante.

Per fare in modo che i frammenti della libreria contengano un gene per intero si usano enzimi di restrizione efficienti, ma a basse concentrazioni in modo da avere pochi tagli e frammenti lunghi.

La mutazione è detta recessiva quando l'eterozigote mostra fenotipo WT, mentre è dominante quando l'eterozigote mostra fenotipo mutato.

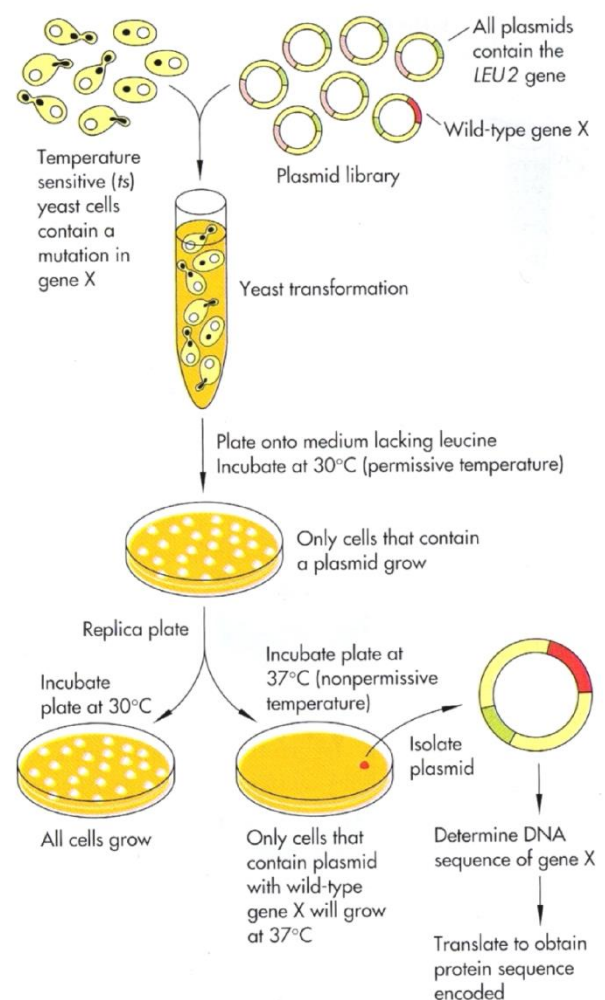
Le mutazioni recessive sono di solito per perdita di funzione, parziale o totale. Le mutazioni dominanti di solito comportano una acquisizione di funzione.

Importante è il concetto di aploinsufficienza, in cui l'eterozigote mostra il fenotipo mutato perché un solo gene funzionante non è sufficiente a produrre quantità sufficienti del suo prodotto. La mutazione si presenta quindi come dominante. Ad esempio nella discheratosi congenita.

Le mutazioni recessive sono le più comuni.

### **Mutanti termosensibili**

Identificato un mutante termosensibile per uno specifico fenotipo, si può effettuare la complementazione mediante una libreria di lievito WT. Le cellule trasformate vengono selezionate su un terreno di selezione, in base al marcatore di selezione presente nel plasmide. Dai trasformanti selezionati vengono fatte due replica plate, che vengono



incubate una a temperatura permissiva ed una a temperatura non permissiva, a cui si esprime il fenotipo termosensibile.

Le cellule che sopravvivranno a temperatura non permissiva avranno probabilmente integrato il plasmide che porta il gene utile a complementare la mutazione ts. Dalle colonie sopravvissute viene estratto il DNA per identificare quale è il gene che complementa la mutazione. Non è sempre necessario sequenziare tutto l'inserto, bastano le estremità ed il resto della sequenza si può identificare dai database online.

Nell'inserto potrebbero essere presenti più di una open reading frame, per cui va identificata quale di queste effettivamente complementa la mutazione. Ognuna delle orf trovate si inserisce in un plasmide col quale si trasforma il ceppo ts, si esegue la stessa selezione vista in precedenza e se si trovano colonie trasformate sopravvissute a temperatura non permissiva si sarà identificata la orf responsabile del fenotipo.

## Genome shuffling

La tecnica del genome shuffling permette di identificare l'organismo che mostra un determinato fenotipo, ma non permette di fare analisi genetica. Lo scopo del genome shuffling è identificare il mutante e poi usarlo per scopi industriali. Non interessa comprendere il meccanismo molecolare alla base del fenotipo.

Nel genome shuffling un ceppo WT di partenza viene sottoposto a mutagenesi random. Si possono anche far fondere le cellule di lievito.

Si selezionano i ceppi mutati per un particolare fenotipo per poi ricominciare il processo di mutagenesi e selezione, portando all'evoluzione di un ceppo con il fenotipo desiderato.

Si ottiene quindi una progenie complessa di cloni.

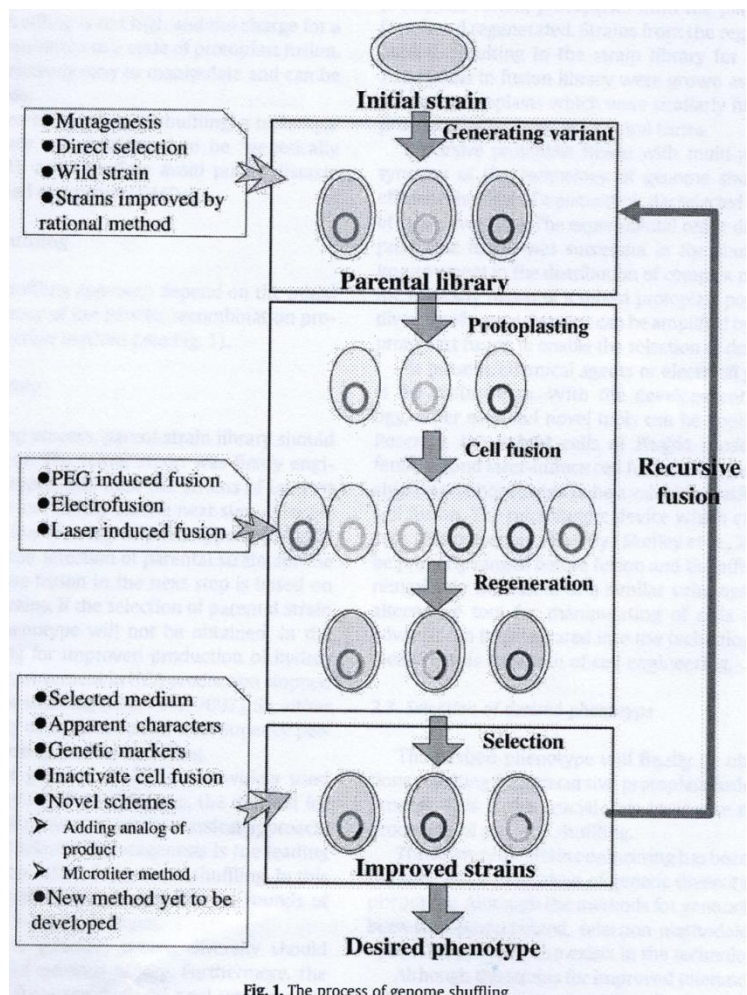


Fig. 1. The process of genome shuffling.