

Mutazioni & Mutagenesi



Importanza delle mutazioni

Le mutazioni costituiscono uno degli strumenti più importanti per comprendere la funzione dei geni.

Per ottenere mutazioni si utilizzano:

- **agenti mutageni (raggi X, EMS)**

Mutazioni casuali, difficoltà di screening, no gene-specifico

- **mutagenesi in vitro sequenza-specifica**

Mutazioni sito-specifiche in modo da migliorare o alterare le caratteristiche delle proteine (ingegneria proteica), diverse strategie di screening

- **elementi inserzionali**

Mutazioni di tipo KnockOut, recessive, casuali

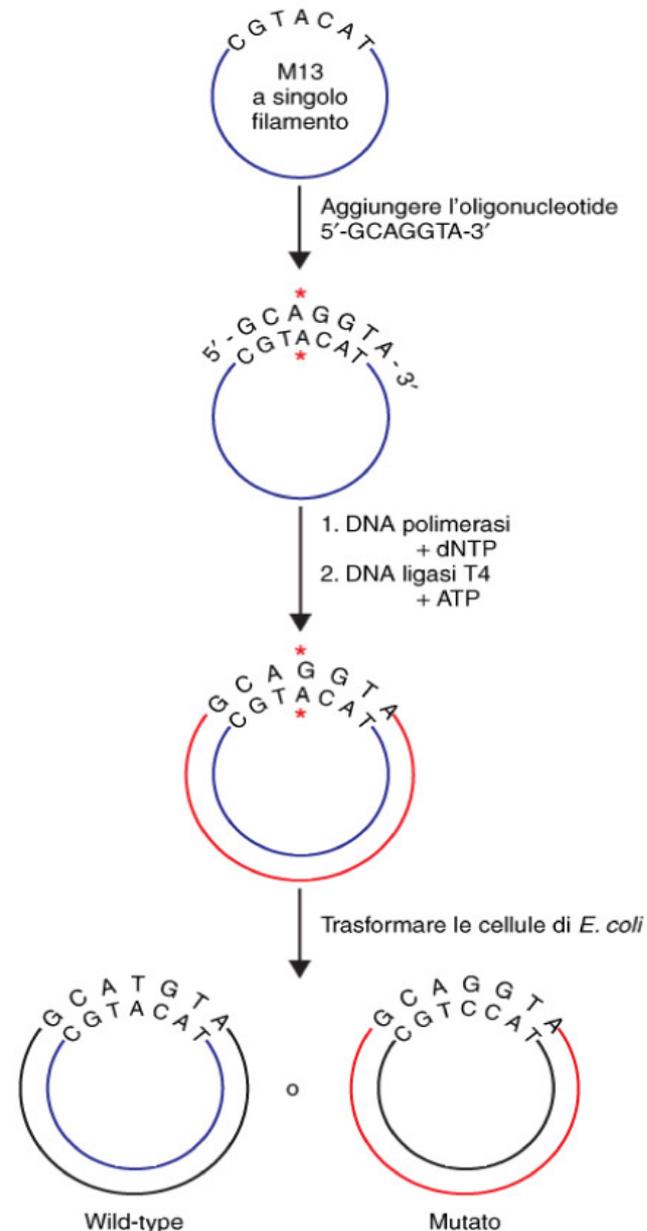
Tipi di Mutazioni

- **Puntiformi** (silenti, missenso, nonsenso)
- **Inserzioni/delezioni** (frameshift?? Se non 3N)

Mutagenesi sito-specifica per estensione del primer

Questo sistema utilizza uno stampo di DNAss del gene da mutagenizzare. Il primer si lega alla sua sequenza complementare introducendo una o più mutazioni specifiche. L' ibrido viene poi trattato con DNAPol. e dNTP, per sintetizzare un filamento complementare che porta le basi mutate. Il filamento ds così creato è trasformato in cellule di *E. coli*. In *E. coli* si avrà replicazione **sia di copie del plasmide wild type che del plasmide mutagenizzato.**

Screening con oligonucleotide ad alta stringenza, o.....



Mutagenesi sito-specifica con il metodo *dut⁻ ung⁻*

Un metodo più efficiente per effettuare mutagenesi sito-specifica è il metodo *dut⁻ ung⁻* in cui **il filamento wild type è selettivamente indirizzato verso la degradazione.**

Si ottiene facendo crescere il fago filamentoso M13 in un ceppo di *E. coli* che porta mutazioni nei geni *dut* e *ung*

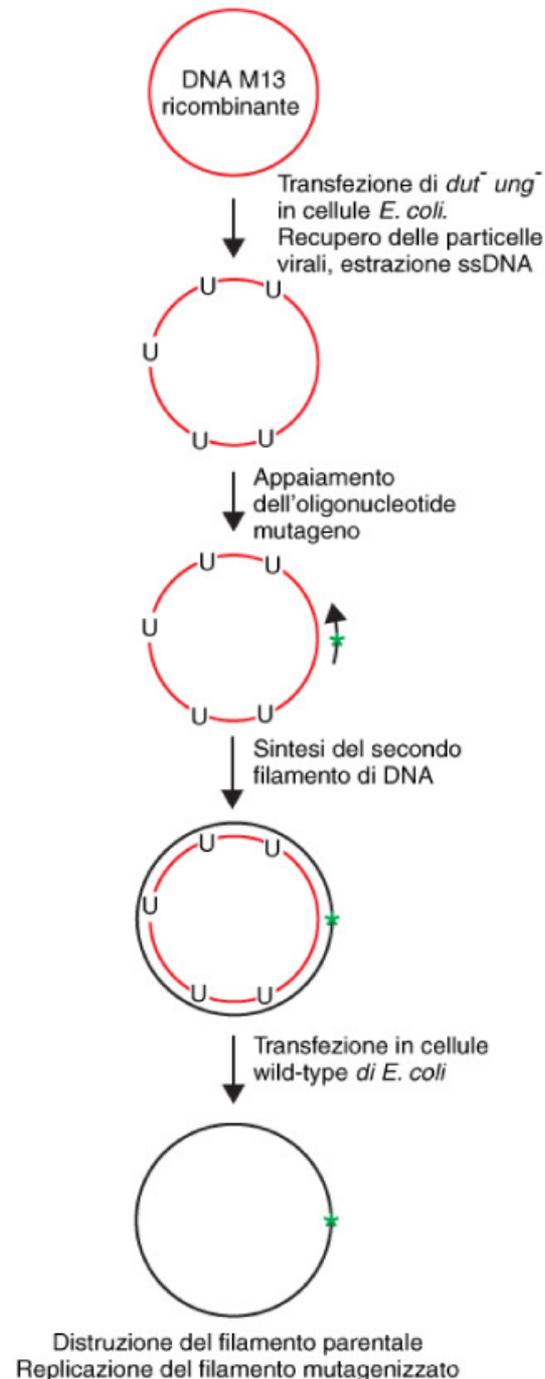
Il gene **DUT codifica per una UTPasi** la cui funzione è di degradare il dUTP nella cellula. La mutazione ***dut⁻*** provoca un'elevata concentrazione di **dUTP (U)** che si accumula nella cellula e tende a sostituirsi al dTTP (T) durante la replicazione del DNA

Il **gene UNG codifica per una uracil-N-glicosilasi** che normalmente rimuove l'uracile dal DNA

Mutagenesi sito-specifica con il metodo $dut^- ung^-$

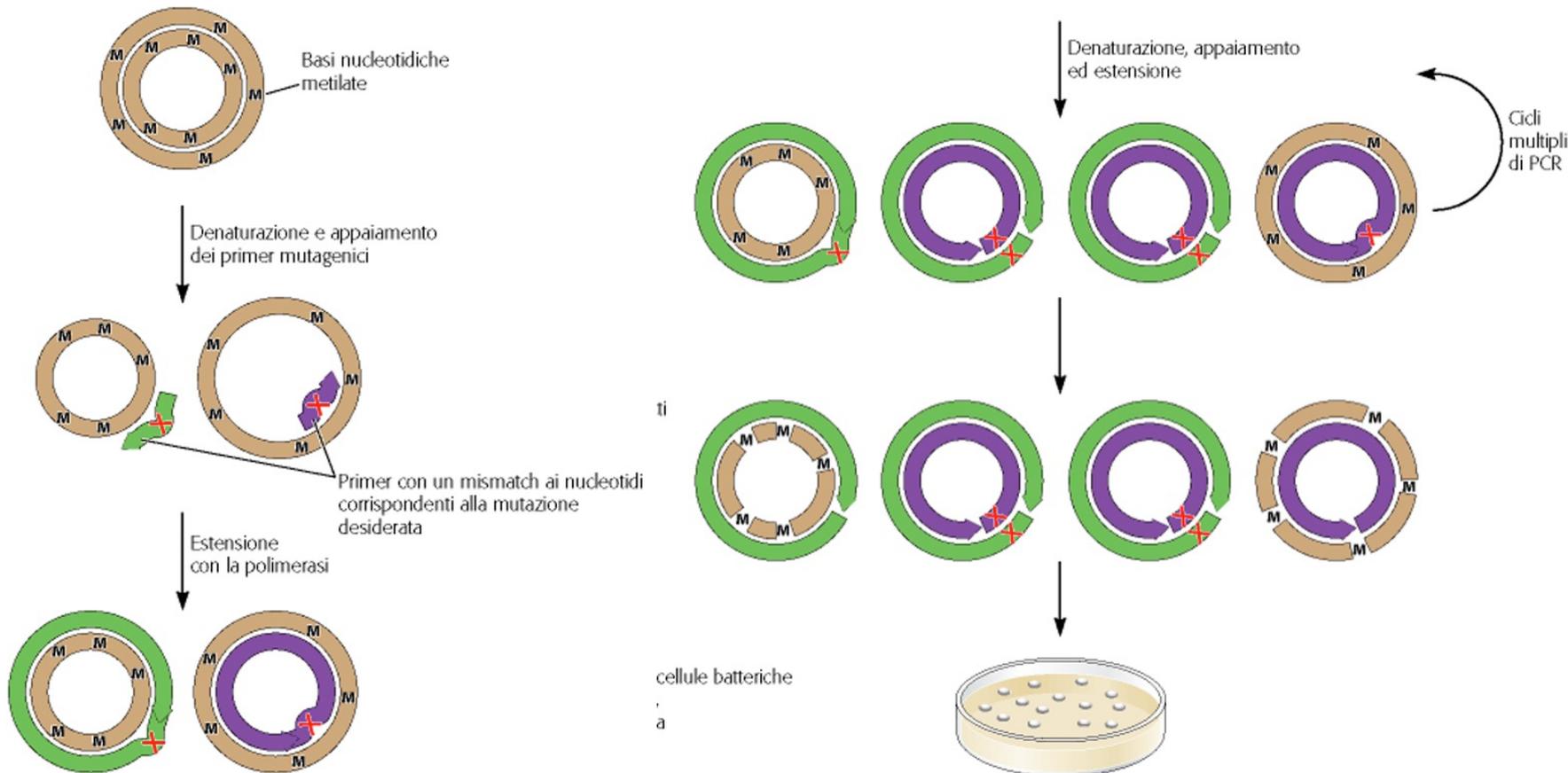
Dopo aver fatto crescere il plasmide ricombinante in un ceppo dut^- , ung^- si purifica il DNAss e si procede alla mutagenesi in vitro utilizzando il primer mutagenizzato. Si otterrà un plasmide ds in cui il filamento parentale sarà ricco in UTP mentre quello mutato avrà un normale contenuto di TTP.

Trasformando in un ceppo di *E. coli* WT per il gene UNG che codifica per una uracil-N-glicosilasi i residui di uracile contenuti nel filamento parentale saranno degradati distruggendo selettivamente il filamento stampo. In questo modo la maggioranza dei trasformanti ottenuti sarà di tipo mutante.

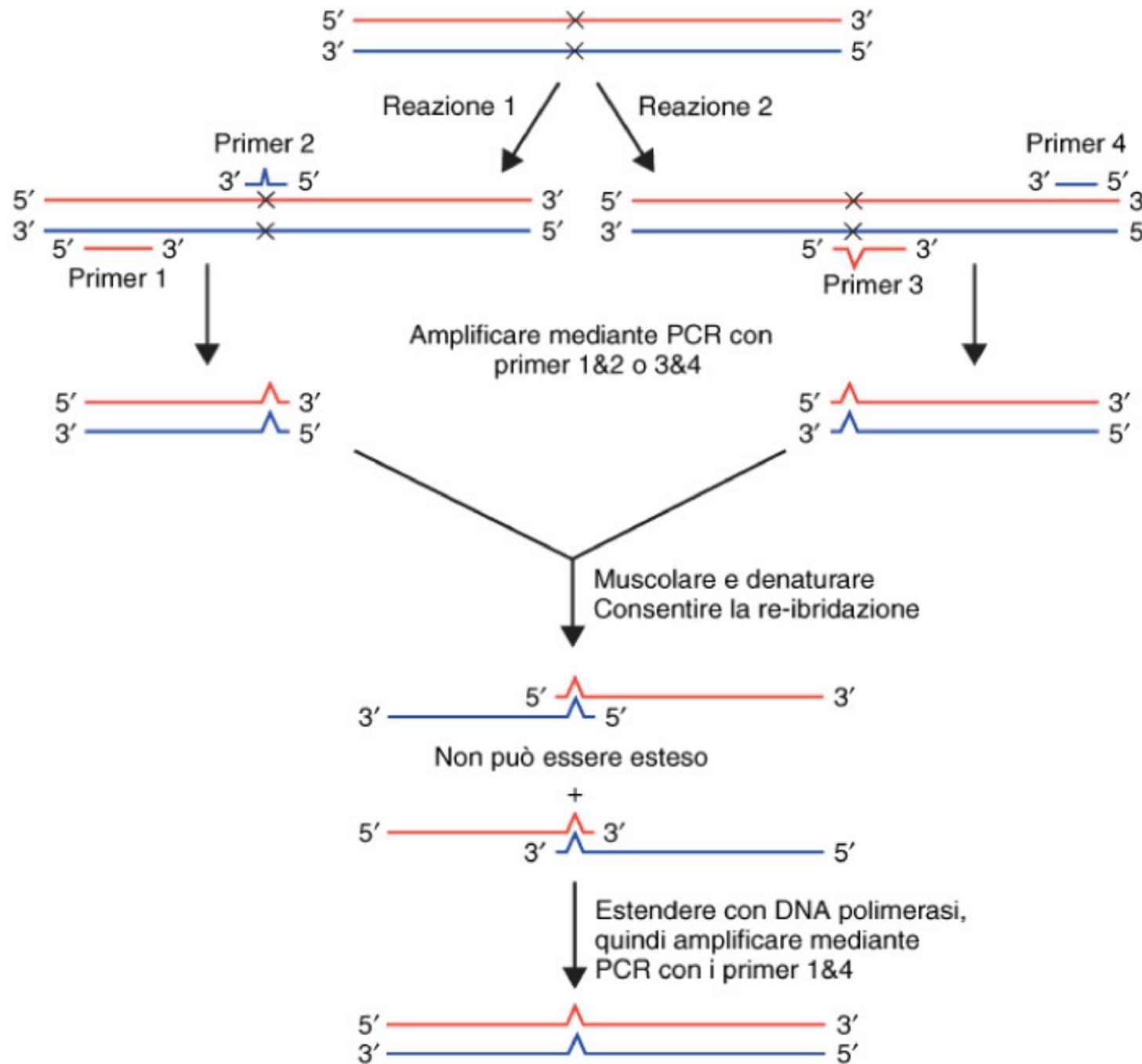


Screening mediante metilazione

I plasmidi sono clonati in un **ceppo di *E.coli* con attività dam metilasica** così che i siti GATC siano metilati. I plasmidi sono isolati e denaturati. I primer mutagenizzati sono appaiati al DNA clonato. Viene effettuata la PCR e come risultato si avranno **molecole mutagenizzate di neo sintesi non metilate e molecole stampo metilate**. La miscela di reazione viene **digerita con MboI, enzima di restrizione metilazione-specifico che taglia solo il filamento stampo parentale**. Il DNA clonato mutato viene usato per trasformare un ceppo di *E. coli* mutante per l'attività dam metilasica.



**Mutagenesi
sito-specifica
per PCR
all'interno di
un prodotto di
amplificazione**



(B)

