

Soluzioni del Capitolo 16

- 16.1** a. 4; b. 6; c. 2; d. 1; e. 7; f. 3; g. 5.
- 16.2** Il DNA mitocondriale umano è lungo 16 500 bp; ogni cellula ha in media 1000 mitocondri; ogni mitocondrio ha in media 6 copie del suo genoma. Pertanto, una cellula umana ha in media $16\,500 \text{ bp/mtDNA} \times 1000 \text{ mitocondri} \times 6 \text{ mtDNA/mitocondrio} = 99\,000\,000 \text{ bp}$ di mtDNA in totale. Il genoma nucleare *diploide* ha 6 000 000 000 di bp (6 miliardi di bp). Di conseguenza, $99\,000\,000 \text{ bp} / 6\,099\,000\,000 \text{ bp} = 0,0162 = 1,62\%$ mtDNA.
- 16.3** a. Entrambi.
b. Entrambi.
c. Nessuno dei due.
d. Solo l'mtDNA varia molto di dimensioni fra le specie.
- 16.4** Per tradurre gli mRNA mitocondriali sono necessari meno tRNA che per tradurre gli mRNA trascritti dai geni nucleari perché le regole del vacillamento sono diverse nei due casi. Le basi vacillanti dei tRNA mitocondriali possono in genere riconoscere più basi diverse rispetto alle basi vacillanti dei tRNA citoplasmatici. Per esempio, la U non modificata presente nelle posizioni vacillanti di otto diversi anticodoni dei tRNA mitocondriali [(1) 5'UAG; (2) 5'UAC; (3) 5'UGA; (4) 5'UGG; (5) 5'UGU; (6) 5'UGC; (7) 5'UCG; e (8) 5'UCC] consente a ciascuno di questi tRNA di riconoscere quattro diversi codoni [(N = A, G, C o U): (1) 5'CUN (Leu); (2) 5'GUN (Val); (3) 5'UCN (ser); (4) 5'CCN (Pro); (5) 5'ACN (Thr); (6) 5'GCN (Ala); (7) 5'CGN (Arg); e (8) 5'GGN (Gly)]. Al contrario, sono solitamente necessarie almeno due diverse specie di tRNA citoplasmatico per coprire i quattro codoni corrispondenti a ciascuno di questi amminoacidi, utilizzando le regole di vacillamento del codice genetico per la traduzione degli mRNA dei geni nucleari.
- 16.5** a. Le tRNA sintetasi per la produzione di tRNA mitocondriali carichi sono codificate da geni del

genoma nucleare umano. Questi geni vengono trascritti nel nucleo e gli mRNA risultanti vengono tradotti sui ribosomi nel citoplasma. Le proteine tRNA sintetasi vengono quindi importate nei mitocondri, dove possono operare per aggiungere l'amminoacido corretto al tRNA mitocondriale. (Si è scoperto che nell'uomo esistono geni nucleari separati per le tRNA sintetasi citoplasmatica e per quelle mitocondriali, con due eccezioni: esistono una singola glicina-tRNA sintetasi e una singola lisina-tRNA sintetasi che caricano l'amminoacido sui tRNA^{Gly} e tRNA^{Lys} sia citoplasmatici sia mitocondriali. Inoltre, i mitocondri necessitano solo di 19 enzimi tRNA sintetasi anziché 20 perché il tRNA^{Gln} viene caricato dall'acido glutammico [Glu] tRNA sintetasi; nei mitocondri, l'acido glutammico sul tRNA^{Gln} caricato viene successivamente modificato enzimaticamente in glutamina [Gln].)

b. La metionil-tRNA sintetasi mitocondriale funziona solo nei mitocondri, dove riconosce il tRNA^{Met} mitocondriale, il cui anticodone può legare l'AUA.

- 16.6** a. I geni mitocondriali per alcuni tRNA (tRNA^{Trp}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Met} e tRNA^{Ile}) devono aver subito una mutazione.
- b. Per rispondere a questa domanda, è necessario consultare le regole del vacillamento (Figura 8.21b).
- (1) L'anticodone di tRNA^{Trp} prodotto dal genoma nucleare ha la sequenza 5'CCA; l'anticodone potrebbe essere cambiato in 5'UCA (xm5U o xm5s2U) nei mitocondri, così che tRNA^{Trp} possa riconoscere i codoni 5'UGA e 5'UGG.
- (2) Gli anticodoni delle specie di tRNA^{Arg} costituiti dal genoma nucleare che riconoscono i codoni 5'AGA3' e 5'AGG3' possono avere la sequenza 3'UCU5' (xm5U o xm5s2U al 5'U)

o 3'UCC5'. Nei mitocondri, questi due codoni fungono ora da codoni di stop. Forse i geni tRNA^{Arg} con questi due anticodoni sono stati eliminati dall'mtDNA. (La tabella del codice genetico indica che esistono quattro codoni Arg aggiuntivi, quindi i geni mitocondriali potrebbero usare solo i quattro codoni 5'CGN3' [N = qualsiasi base] per specificare Arg.)

- (3) I codoni 5'AUA3' e 5'AUU3' specificano Ile nel genoma nucleare. Nel genoma mitocondriale, 5'AUA3' specifica Met e 5'AUU3' specifica o per Met, iniziatore della proteina, o per Ile. Nel genoma nucleare, 5'AUU/C/A3' sono tutti codoni per Ile e 5'AUG3' è l'unico codone Met. L'anticodone di tRNA^{Met} prodotto dal genoma nucleare deve essere 3'UAC5'. Forse l'anticodone del tRNA^{Met} mitocondriale è cambiato in 3'UAU5' (xm5U o xm5s2U) o 3'UAI5', così da riconoscere il codone 5'AUA3'. L'anticodone del tRNA^{Ile} prodotto dal genoma nucleare è 3'UAC5', e poiché il codone 5'AUG3' è ancora un segnale di inizio nei mitocondri, il gene tRNA^{Ile} non è cambiato. Tuttavia, i codoni 5'AUG3' che sono decodificati nel citoplasma da tRNA^{Met} sono decodificati da tRNA^{Ile} nei mitocondri. Le specie del tRNA^{Ile} prodotte dal genoma nucleare hanno gli anticodoni 3'UAI5' o 3'UAG5'. Poiché gli anticodoni 3'UAI5' possono decodificare tutti e tre i codoni Ile, forse il tRNA^{Ile} con l'anticodone 3'UAG5' è cambiato in 3'UAC5' nei mitocondri in modo che riconosca i codoni 5'AUG3'.

16.7 a. Trp His Ile Met

mRNA 5'UGGCAU/CAUU/C/AAUG

nDNA mRNA-like 5'TGGCAT/CATT/C/AATG

nDNA template 3'ACCGTA/GTAA/G/TTAC

b. Trp His Ile Met

mRNA 5'UGA/GCAU/CAUC/AAUG/A

mtDNA mRNA-like 5'TGA/GCAT/CATC/TATG/A

mtDNA template 3'ACT/CGTA/GTAG/ATAC/T

16.8 a. 2; b. 1; c. 5; d. 3; e. 4.

- 16.9 a.** Ogni cellula ha 2 copie del genoma nucleare. Ogni cellula ha anche 1000 mitocondri \times 10 mtDNA/mitocondrio = 10 000 copie di mtDNA; ogni cellula ha 50 cloroplasti \times 20 cpDNA/cloroplasto = 1000 copie di cpDNA. Per ogni copia del genoma nucleare, ci sono 5000 copie di mtDNA e 500 copie di cpDNA. Pertanto, se ottenessimo 100 letture di una sequenza di DNA nucleare a copia singola, otterremmo $5000 \times 100 = 500\,000$ letture di una sequenza di mtDNA e $500 \times 100 = 50\,000$ letture di una sequenza di cpDNA.

b. La risposta alla parte (a) dimostra che un semplice criterio per determinare se una sequenza fa parte del genoma nucleare o di un genoma di un organello è il numero di letture; ogni sequenza di un genoma di un organello sarà rappresentata in molte più letture di ogni sequenza del genoma nucleare. Tuttavia, altri criteri indipendenti possono permettere di distinguere queste sequenze.

- (I) I DNA degli organelli di una specie vegetale precedentemente non caratterizzata dovrebbero mostrare somiglianza con i DNA degli organelli di altre specie vegetali. Questo criterio, sebbene semplice e solitamente efficace, non è assoluto perché durante l'evoluzione alcuni geni degli organelli sono stati ricollocati nel nucleo. Pertanto, non è sempre garantito che un gene trovato nell'mtDNA o nel cpDNA in una specie si trovi nei genomi degli organelli di una specie diversa.
- (II) L'organizzazione dei geni degli organelli e nucleari è diversa. I geni mitocondriali e dei cloroplasti sono molto più densamente stipati rispetto ai geni del genoma nucleare; i geni mitocondriali nella maggior parte delle specie non hanno introni e i geni mitocondriali in molte specie differiscono dai geni nucleari in termini dei codoni di inizio e fine impiegati nei loro codici genetici.
- (III) Se vengono effettuate letture sufficienti, l'analisi computerizzata assemblerà sequenze di DNA nucleare in lunghi contig lineari. La situazione è chiaramente diversa nel caso dei cpDNA, perché le letture di cpDNA si riuniranno in cerchi che probabilmente non saranno più lunghi di ~ 200 kb. Alcuni mtDNA vegetali sono anche circolari (come nel caso di tutti gli animali), ma altri mtDNA vegetali sono in realtà lineari. Le lunghezze degli mtDNA possono essere anche piuttosto variabili, da meno di 10 kb a più di 2400 kb. Se le read dell'mtDNA non si riconducono a un circolo e invece sono ricostruite solo come contig lineari, potrebbe essere difficile differenziarle dal DNA nucleare sulla base di questo singolo criterio.

- 16.10 a.** È necessario apportare diverse modifiche a un gene nucleare come *ARG8* affinché venga trascritto e il suo mRNA tradotto nei mitocondri.

Innanzitutto, devono essere rimossi tutti gli introni. (Alcuni geni nell'mtDNA di lievito hanno introni, ma i meccanismi di splicing nei mitocondri e nel nucleo non sono gli stessi e dipendono da tipi di sequenze diversi del trascritto pri-

mario.) La rimozione degli introni può essere eseguita iniziando con il cDNA, piuttosto piuttosto che con le sequenze genomiche.

Successivamente, alcuni dei codoni nel gene nucleare dovrebbero essere modificati perché il codice genetico è leggermente diverso nel nucleo rispetto ai mitocondri. La Tabella 16.1 mostra i cambiamenti nel codice genetico specifico dei mitocondri umani, non dei mitocondri del lievito. I cambiamenti effettivi nel codice genetico mitocondriale del lievito sono: (I) AUA codifica per Met, non per Ile; (II) UGA codifica per Trp, invece di codificare lo stop; (III) qualsiasi codone le cui prime due lettere sono CU codifica per Thr, non per Leu. Pertanto, rispetto al punto (I), un codone AUA nel gene nucleare dovrebbe essere cambiato con un codone per Ile diverso. Per quanto riguarda il punto (II), UGA non potrebbe essere utilizzato come codone di stop, perché causerebbe l'inserimento di Trp nella proteina. L'uso di UGA per i codoni Trp nel gene *ARG8* ha un ulteriore vantaggio sperimentale: ciò impedirebbe l'espressione del nuovo gene nel caso in cui fosse di nuovo trasferito nel nucleo. Infine, per il punto (III), qualsiasi codone che inizia con CU dovrebbe essere cambiato in un codone alternativo per Leu.

Terzo, il registro di lettura aperto del gene nucleare alterato dovrebbe essere posto sotto il controllo di un promotore, un sito di inizio traduzionale e un sito di terminazione trascrizionale che funzionano nei mitocondri. La natura di questi siti regolativi differisce fra i geni mitocondriali e nucleari.

I ricercatori che hanno condotto questi esperimenti hanno utilizzato un sintetizzatore di DNA per creare un registro di lettura aperto *ARG8* senza introni e con le corrette alterazioni del codice genetico. Questo risultato è stato possibile perché il gene *ARG8* è piuttosto piccolo, ma sarebbe anche possibile raggiungere questo obiettivo alterando un cDNA *ARG8* mediante mutagenesi in vitro. I ricercatori hanno quindi sostituito il registro di lettura aperto di un gene mitocondriale clonato con quello di *ARG8* modificato da loro creato. Questo passaggio ha messo le sequenze *ARG8* nella posizione corretta rispetto alle sequenze regolative mitocondriali. Successivamente, i ricercatori hanno introdotto il gene clonato nei mitocondri di lievito utilizzando il bombardamento con microproiettili (il cannone biolistico).

b. Un ceppo di lievito con mitocondri che esprimono *ARG8* ha almeno due vantaggi.

In primo luogo, il trasferimento di *ARG8* nell'mtDNA fornisce un fenotipo che dipende dall'espressione genica mitocondriale. Un tale ceppo di lievito consente ai ricercatori di selezionare per una funzione del sistema genetico mitocondriale nei mutanti che non sono in grado di respirare (cioè, i mutanti che non possono crescere sul glicerolo). Se il gene nucleare *ARG8* fosse eliminato, o anche mutato, le cellule di lievito potrebbero sopravvivere su un mezzo privo di arginina solo se avessero mitocondri che producono questo enzima.

In secondo luogo, poiché l'espressione di questo gene *ARG8* è ora controllata da autentiche regioni regolative mitocondriali come i promotori, gli scienziati potrebbero utilizzare questo ceppo per studiare le sequenze regolative mitocondriali. Per esempio, potrebbero cercare auxotrofi per arginina che non possono più produrre arginina a causa di mutazioni che hanno cancellato la funzione del promotore. Sequenziando tali mutazioni nell'mtDNA, i ricercatori potrebbero capire molto sulla funzione degli elementi regolativi del genoma mitocondriale.

16.11 (a) e (d) sono caratteristiche dei cloroplasti e dei mitocondri che sono simili alle caratteristiche dei batteri, ma dissimili da quelle delle cellule eucariotiche. Mentre i codoni alternativi (b) sono usati nei mitocondri di molte specie, tali variazioni del codice "universale" si trovano anche nei geni nucleari degli eucarioti unicellulari come i ciliati e alcuni lieviti. La maggior parte dei batteri utilizza il codice genetico universale, a eccezione di alcune specie che utilizzano i codoni di arresto UAG per specificare la pirrolisina (vedi Problema 8.60). Gli introni (c) si trovano nei geni nei genomi dei cloroplasti e anche nei genomi mitocondriali di alcune specie come il lievito ma non nell'mtDNA degli animali; al contrario, gli introni si presentano solo molto raramente nei genomi batterici.

16.12 Affinché una nuova mutazione mitocondriale si esprima fenotipicamente a livello di un singolo mitocondrio, dovrebbe essere presente in un numero sufficiente di copie dell'mtDNA; per causare un fenotipo mutante a livello di una cellula, dovrebbe essere presente nella cellula un numero sufficiente di mitocondri che esprimono il fenotipo; per esprimersi fenotipicamente all'interno di un tessuto o di un organo, dovrebbe essere presente un numero sufficiente di cellule che esprimono il fenotipo mutante per influenzare la funzione di quel tessuto od organo. La definizione

di un numero sufficiente dipenderebbe dalla mutazione specifica nel gene specifico e dal tipo di cellula osservata.

Le mutazioni mitocondriali di nuova induzione hanno maggiore probabilità di influenzare il fenotipo a livello di un tessuto o di un organo quando si verificano o segregano nei precursori delle cellule germinali femminili (oogoni). Ogni oocita ha circa 100 000 mitocondri, che discendono tutti da solo circa 10-20 mitocondri presenti in ciascun oogonio. Durante la proliferazione delle cellule germinali, un mtDNA mutante potrebbe facilmente proliferare fino a diventare una grande frazione della popolazione dell'mtDNA di un oocita, e quindi dello zigote risultante dopo la fecondazione.

16.13 a. Le cellule umane contengono solo due copie di DNA genomico nucleare, ma una cellula tipica contiene centinaia di copie di mtDNA. Pertanto, in situazioni in cui il campione di DNA è sostanzialmente degradato o in cui le cellule disponibili sono pochissime (entrambe le situazioni si verificano spesso in medicina legale), è possibile recuperare abbastanza mtDNA per identificare gli individui.

b. Lo svantaggio della tipizzazione degli individui con mtDNA rispetto al DNA nucleare è che è impossibile distinguere gli individui all'interno della prole dalla stessa madre. Una nonna, una madre, una figlia e un figlio avrebbero tutti la stessa sequenza di mtDNA (a eccezione di rare mutazioni o casi insoliti di eteroplasmia).

16.14 Se la mutazione fosse molto negativa per la cellula, o a causa della perdita di metabolismo energetico nel caso dei mitocondri, o a causa della perdita di capacità fotosintetica nel caso dei cloroplasti, una cellula che fosse omoplasmica per la mutazione morirebbe. Per cui, il genoma mutante potrà essere trovato solo in cellule eteroplasmiche.

16.15 Possono esservi diversi meccanismi: (I) la piccola dimensione dello spermatozoo esclude di fatto gli organelli; (II) le cellule possono degradare gli organelli o il DNA degli organelli del genitore maschile; (III) le prime divisioni mitotiche distribuiscono gli organelli maschili alle cellule che non diventeranno parte dell'embrione; (IV) lo stesso processo di fecondazione può impedire alla cellula paterna di fornire un qualsiasi organello (nell'uovo entra solo il nucleo dello spermatozoo); (V) in alcune specie lo zigote distrugge l'organello paterno dopo la fecondazione.

16.16 Ogni generazione di reincrocio aumenta la frazione del genoma nucleare dal ceppo fertile maschi-

le. D'altra parte, poiché la progenie ibrida costituiva sempre il genitore femminile dei reincroci successivi, i genomi degli organelli del ceppo sterile maschile originale venivano ereditati dalla progenie dei reincroci secondo una linea ininterrotta di discendenza. Se la sterilità maschile ha continuato a manifestarsi in tutte le successive generazioni di reincrocio, nonostante la continua diminuzione della proporzione del genoma del ceppo sterile maschile originale, si può dedurre che è un gene di un organello, e non un gene nucleare, a essere responsabile fenotipo di sterilità maschile. In effetti, esperimenti successivi hanno dimostrato che questo fenomeno di sterilità maschile è dovuto a mutazioni nei genomi mitocondriali che impediscono la formazione del polline.

16.17 a. L'eredità paterna dell'mtDNA è esclusa perché tre delle quattro piantine hanno ereditato l'mtDNA dall'oocita (pianta 1). L'eredità materna è possibile perché le piantine 1-3 hanno entrambi gli alleli materni (pianta 1) e sebbene la piantina 4 abbia solo uno degli alleli materni (pianta 1), tale risultato potrebbe essere dovuto alla segregazione in un oocita del solo mtDNA contenente questo allele. L'eredità biparentale è possibile perché le piantine 1-4 hanno tutte un allele comune a entrambi i genitori, quindi alcuni dei loro mtDNA potrebbero provenire dal polline.

b. Per distinguere tra eredità materna e biparentale dell'mtDNA, si può rendere la pianta 2 il genitore materno e la pianta 1 il genitore paterno. Se l'eredità è strettamente materna, tutte le piante discendenti avranno solo la variante dell'mtDNA osservata nella pianta 2. Se l'eredità è biparentale, le piante discendenti dovrebbero avere entrambi gli alleli.

c. Per determinare se la pianta 2 è effettivamente omoplasmica, è necessario isolare l'mtDNA da tutti i tessuti della pianta 2 e assicurarsi che con un'analisi PCR venga rilevata solo una singola variante. Questo esperimento avrebbe una maggiore sensibilità se si sequenziassero entrambe le varianti dell'mtDNA e si progettasse una coppia di primer capace di amplificare solo la variante assente nella foglia della pianta 2. Il motivo per cui questo esperimento è necessario è che la singola foglia saggiata originariamente potrebbe provenire da una regione della pianta divenuta omoplasmica per una singola variante a causa della segregazione citoplasmatica.

d. Le proporzioni diverse delle due varianti del mtDNA nelle quattro piantine sono dovute alla segregazione citoplasmatica nella linea germinale

della pianta 1 o durante la crescita delle piantine. Indipendentemente dal fatto che l'eredità dell'mtDNA sia materna o biparentale, le diverse proporzioni delle due varianti nelle piantine potrebbero riflettere le proporzioni presenti nei singoli oociti della pianta 1. [Come spiegato nella parte (a), questa proporzione potrebbero essere del 100% di un determinato tipo nell'oocita che ha dato origine alla piantina 4.] In alternativa, o in aggiunta, i risultati potrebbero essere spiegati dalla segregazione citoplasmatica durante la crescita delle piantine. Nello zigote, cellule diverse con proporzioni diverse dell'mtDNA a causa di eventi di segregazione citoplasmatica precoci potrebbero proliferare a velocità diverse. Poiché i mitocondri si dividono quando le cellule si dividono, il risultato potrebbe essere un cambiamento nella proporzione delle varianti dell'mtDNA che erano originariamente presenti nell'uovo fecondato.

16.18 a. La fermentazione genera ATP indipendentemente dai mitocondri. Il lievito mutante *cox2-1* non può crescere sul glicerolo perché il glicerolo non è fermentabile e i mutanti mancano della funzione mitocondriale (trasporto di elettroni), quindi devono fare affidamento sulla fermentazione per produrre energia.

b. Per rispondere a questa domanda, si ricordi che nel lievito l'eredità dell'mtDNA è biparentale, ma che la segregazione citoplasmatica avverrà rapidamente dopo alcuni cicli di divisione mitotica del lievito eteroplasmico, perché le cellule figlie ereditano solo poco mtDNA (Figura 16.12). Di conseguenza, le cellule di lievito sono generalmente omoplasmiche.

I dati suggeriscono che *cox2-1* è un gene mitocondriale. I diploidi formati dall'accoppiamento tra *cox2-1* e ceppi wild-type hanno circa metà di mitocondri di *cox2-1* e metà normali (sono quindi originariamente eteroplasmici). Dopo essere cresciute mitoticamente per qualche tempo, circa la metà delle cellule diploidi ha mitocondri normali e metà ha mitocondri mutanti; ogni tipo è ora omoplasmico. I diploidi che hanno mitocondri mutanti *cox2-1* non possono crescere su glicerolo non fermentabile e non possono sporulare. I diploidi con i mitocondri normali possono crescere sul glicerolo e, quando sporulano, tutte e 4 le spore hanno mitocondri normali, quindi possono crescere tutti sul glicerolo. Poiché il tipo di accoppiamento è controllato dai geni nucleari, il fatto che metà delle spore siano di tipo *a* e metà di tipo α sottolinea il fatto che i geni nucleari segregano normalmente nelle spore.

Le osservazioni non sono coerenti con *cox2-1* come gene nucleare. Se questo fosse il caso, infatti, tutti i diploidi eterozigoti *cox2-1/+* dovrebbero rimanere eterozigoti e tutte le cellule diploidi sarebbero in grado di crescere su glicerolo se *cox2-1* fosse recessivo su *+*, o nessuna lo sarebbe se *cox2-1* fosse dominante su *+*. Inoltre, in questo scenario tutti i diploidi *cox2-1/+*, al momento della meiosi, dovrebbero segregare 2 spore *cox2-1* (incapaci di crescere su glicerolo): 2 spore *+* (capaci di crescere su glicerolo). Invece, tutte le spore aploidi potevano crescere sul glicerolo, il che è coerente con l'ipotesi alternativa che *cox2-1* sia un gene mitocondriale.

c. I mutanti *pet111-1* si comportano esattamente come ci aspetteremmo da una mutazione recessiva in un gene nucleare [vedi parte (b)]. Si noti che questi mutanti non possono crescere su glicerolo ma possono crescere su glucosio, in modo simile al mutante *cox2-1* descritto nella parte (a). Questo fenotipo indica che le cellule mutanti *pet111-1* hanno una funzione mitocondriale difettiva, anche se i dati mostrano che il gene responsabile è nucleare. La spiegazione è che il prodotto del gene selvatico *pet111-1+* è una delle tante proteine codificate da geni nucleari e tradotte nel citoplasma, che vengono importate nei mitocondri dove svolgono ruoli necessari per vari aspetti della funzione di questi organelli.

16.19 a. I ricercatori avevano lo scopo di identificare lieviti con mutazioni nei geni mitocondriali che li rendevano resistenti al cloramfenicolo. Il lievito è stato coltivato su glicerolo perché in questa condizione le cellule dipendono per la crescita dai loro mitocondri.

b. Il cloramfenicolo inibisce la sintesi proteica nei mitocondri legandosi al ribosoma mitocondriale e bloccando l'azione della peptidil transferasi. I ribosomi mitocondriali contengono RNA e proteine prodotte sia dai geni mitocondriali sia dai geni nel nucleo, le cui proteine vengono importate nei mitocondri. La resistenza al cloramfenicolo potrebbe essere conferita da mutazioni nei geni mitocondriali o nucleari, che codificano per componenti del ribosoma che rendono quegli RNA o quelle proteine incapaci di interagire con il cloramfenicolo.

c. Se la mutazione di resistenza al cloramfenicolo fosse in un gene nucleare, tutte le cellule diploidi resistenti originali (C^rC^s) rimarrebbero resistenti attraverso le divisioni cellulari e le colonie sensibili al cloramfenicolo non potrebbero essere isolate. Il motivo è che tutte le cellule diploi-

di rimarrebbero eterozigoti $C^r C^s$ con C^r dominante su C^s .

16.20 a. L'ipotesi che l'ereditarietà degli mtDNA paterni dipenda da un allele autosomico dominante di un gene nucleare è coerente con l'insolita osservazione che i maschi affetti trasmettono la malattia mitocondriale a circa la metà dei loro figli e delle loro figlie.

b. Se questa ipotesi è corretta, potrebbe essere che normalmente il prodotto del gene autosomico prevenga la trasmissione paterna dei mitocondri.

16.21 a. La madre (I-1) potrebbe essere stata eteroplasmica con una percentuale molto piccola di mtDNA mutante. In alternativa, una mutazione spontanea potrebbe essersi verificata nel genoma mitocondriale dell'oogonio della madre, nell'uovo che ha dato origine all'individuo II-2, o precocemente nello zigote dell'individuo II-2. A causa della segregazione citoplasmatica, una mutazione che si è verificata in un genoma dell'mtDNA potrebbe arrivare a rappresentare una grande proporzione di mtDNA in alcuni discendenti mitotici della cellula in cui si è verificata la mutazione.

b. Per distinguere tra eteroplasmia e una nuova mutazione, si potrebbe analizzare l'mtDNA delle cellule somatiche di vari tessuti nella madre (I-1). Se la madre era eteroplasmica, la maggior parte dei suoi tessuti dovrebbe mostrare almeno una piccola frazione di mtDNA mutante. Se la mutazione si è verificata nella sua linea germinale ed è stata ereditata da II-2, o se si è verificata nello zigote, le cellule somatiche della madre non mostreranno alcun mtDNA difettivo.

Un terzo scenario meno probabile ma plausibile per la parte (a) è che l'individuo I-1 sia omoplastico per una mutazione che causa MERRF, ma portatore di una mutazione in un gene nucleare che sopprime l'effetto della mutazione mitocondriale. Questo tipo di scenario dovrebbe essere preso in considerazione se l'analisi condotta nella parte (b) mostrasse che l'mtDNA di I-1 era tutto mutante.

16.22 Una caratteristica della mutazione mitocondriale è l'eredità materna. La maggior parte della progenie di una femmina affetta è colpita. Nessuno della progenie dei maschi affetti è colpito. Un'altra indicazione dell'eredità mitocondriale è la differenza dei livelli di espressione del fenotipo mutante nella progenie, dovuta alle varie quantità di eteroplasmia o nell'uovo o nelle cellule dell'embrione.

16.23 Lo zigote che ha formato questi gemelli era eteroplasmico, con genomi mitocondriali sia di tipo selvatico sia mutante. All'inizio dello sviluppo embrionale, due masse cellulari si separarono per diventare i due gemelli identici. Il rapporto tra mtDNA di tipo selvatico e mutante nelle due masse cellulari potrebbe essere stato diverso. Inoltre, durante lo sviluppo dei gemelli, i rapporti tra mtDNA wild-type e mutante possono variare in tessuti diversi a causa di una segregazione casuale durante le divisioni mitotiche. Il gemello più colpito probabilmente aveva una percentuale maggiore di mitocondri mutanti in tessuti come muscoli e cervello che dipendono in particolare dall'energia fornita dai mitocondri.

16.24 Se il paziente è di sesso maschile, può essere rassicurato sul fatto che nessuno dei suoi figli sarebbe affetto dalla malattia (supponendo che la sua compagna non sia affetta da MERRF). Se la paziente è di sesso femminile, molto probabilmente è eteroplasmica. C'è un'elevata probabilità che suo figlio possa essere affetto da MERRF, ma non c'è modo di quantificare la probabilità che il bambino sia affetto né la gravità della malattia, a causa degli eventi casuali nella distribuzione dell'mtDNA attraverso molti cicli di divisione cellulare che influenzeranno il rapporto tra mtDNA wild-type e mutante nell'uovo e nei vari tessuti del feto. È relativamente facile mediante l'amniocentesi e la PCR verificare la presenza del DNA mitocondriale mutante nel feto. Tuttavia, questi risultati non sono diagnostici perché la distribuzione dell'mtDNA wild-type e mutante può variare considerevolmente nei vari tessuti. Per esempio, le cellule fetali disperse nel liquido amniotico possono essere prive di mtDNA mutante, ma le cellule in altri tessuti fetali potrebbero possedere alcuni genomi mitocondriali mutanti.

16.25 a. Le tre malattie possono essere causate dalla delezione di geni mitocondriali diversi con un effetto differente sulla funzione mitocondriale. È anche possibile che tutte e tre le sindromi possano avere la stessa causa genetica, ma le differenze potrebbero essere dovute all'eteroplasmia e alla segregazione citoplasmatica.

b. L'origine della replicazione deve essere contenuta al di fuori del DNA deletato in queste sindromi. (Cioè, al di fuori dei 7,6 kb rimossi nella più grande di queste delezioni.) La delezione dell'origine della replicazione dell'mtDNA comporterebbe un mtDNA mutante che non è in grado di replicarsi e quindi andrebbe perso, per cui nessuna cellula sarebbe eteroplasmica.

(Nota: per semplicità, questo problema è stato scritto partendo dal presupposto che l'mtDNA nell'uomo abbia una sola origine di replicazione. In realtà, la replicazione dell'mtDNA è piuttosto complessa. L'origine principale della replicazione si trova nella regione tra i geni per il citocromo b e il piccolo RNA ribosomiale [vicino alla parte superiore della mappa in Figura 16.2], ma in alcune circostanze la replicazione dell'mtDNA può iniziare in altre posizioni. Tuttavia, sembra che le delezioni che causano queste tre sindromi non includano la regione di origine principale.)

c. Una possibilità per spiegare la mancanza di eredità materna della PEO è che le cellule della linea germinale che portano le delezioni dell'mtDNA sono svantaggiate sia per la replicazione sia per l'oogenesi rispetto ai segreganti omoplasmici che non hanno il DNA deleto. Di conseguenza, o la linea germinale sarebbe popolata principalmente da cellule senza le delezioni, o solo i segreganti omoplasmici produrrebbero uova vitali. Una donna che ha l'mtDNA deleto nelle sue cellule somatiche (e quindi ha sintomi di PEO) potrebbe non avere mtDNA mutante nelle cellule della linea germinale o nelle uova che produce.

16.26 a. La ORF del gene NAD6 ha una proporzione insolitamente alta di codoni UUA e UUG, quindi la traduzione di questa proteina è più rallentata di quella di altre proteine.

b. NAD6 è una subunità di uno dei complessi della catena di trasporto degli elettroni, quindi se questa proteina si trova in basse quantità, solo pochi complessi saranno in grado di assemblarsi e il mitocondrio non potrà generare molto ATP.

c. È molto probabile che i ricercatori vogliano cambiare il gene nucleare che codifica per l'amminoacil-tRNA sintetasi che accoppia la leucina al tRNA mutante. Questa protein sintetasi viene importata nei mitocondri. Per esempio, i ricercatori hanno cambiato il promotore di questo gene in modo da aumentare la quantità della sintetasi, compensando in teoria l'inefficiente amminoacilazione. Nelle cellule in coltura di un paziente MELAS, i risultati di questa mutazione del promotore sono promettenti in termini di parziale ripristino della funzione mitocondriale.

16.27 a. Il prodotto del gene nucleare viene importato nei mitocondri e opera nella stessa via del prodotto del gene mitocondriale. Alcuni complessi proteici che operano nella fosforilazione ossidativa (come il complesso della citocromo c ossidasi) includono una subunità codificata dal gene nucleare (come *SURF1*) e una subunità codifica-

ta da un gene mitocondriale (come *MT-CO3*). La perdita di una delle due funzioni geniche provoca il fallimento del trasporto degli elettroni e quindi i sintomi della sindrome di Leigh.

b. No, il pedigree mostrato non consente di distinguere tra eredità del gene nucleare e mitocondriale.

Una possibilità coerente con i dati è che la sindrome di Leigh sia causata da una mutazione recessiva in un gene nucleare autosomico (*SURF1*); entrambi i genitori sarebbero eterozigoti.

L'altra possibilità è una mutazione dell'mtDNA (come in *MT-CO3*) con la madre eteroplasmica; la sua proporzione complessiva di mtDNA mutante, o specifica del tessuto, è inferiore alla soglia per i sintomi della malattia. La distribuzione tissutale e/o la proporzione complessiva dell'mtDNA mutante è sufficientemente alta in 2 dei suoi 3 figli da consentire loro di mostrare i sintomi della malattia.

c. Sapendo che la malattia è mitocondriale, da una parte si può informare il maschio affetto che non può trasmetterla ai suoi figli, e dall'altra si possono informare sia la femmina affetta sia la sorella non affetta che potenzialmente potrebbero trasmetterla alla progenie. Se la malattia fosse causata da un raro allele recessivo di un gene nucleare, la sorella non affetta potrebbe testare il suo DNA genomico per determinare se è o meno una portatrice. In tal caso, tutti e tre i fratelli potrebbero testare i loro partner per la presenza di una mutazione nel gene prima di decidere di avere figli.

16.28 Una possibilità è che i sintomi diversi di tutte queste malattie riflettano semplicemente un continuum quantitativo di perdita della funzione mitocondriale. In alternativa, potrebbe essere che tessuti specifici, come muscoli e nervi, possono essere influenzati in modo differente da alterazioni leggermente diverse nella funzione mitocondriale. Una speculazione interessante in questo senso è che alcune proteine prodotte nelle cellule muscolari e nervose dal genoma nucleare e importate nei mitocondri potrebbero essere in grado di compensare parzialmente la perdita di alcune funzioni codificate nell'mtDNA, meglio di altre.

16.29 Gli scienziati potrebbero mettere a punto un protocollo di PCR per discriminare gli SNP nell'mtDNA del donatore nucleare rispetto all'oocita donatore di citoplasma. I ricercatori eseguirebbero questi test su cellule di diversi tessuti di Mito e Tracker. Probabilmente questi SNP si

troverebbero nelle regioni ipervariabili dell'mtDNA presenti negli esseri umani e in altri primati. Si noti tuttavia che questi test PCR non sarebbero del tutto conclusivi. Senza testare ogni singola cellula in Mito e Tracker, i ricercatori non possono essere del tutto certi che non siano presenti alcune molecole di mtDNA dell'ovocita donatore nucleare.

Un metodo correlato potrebbe essere una variante del sequenziamento dell'intero genoma ad

alto rendimento. Come si può rilevare in base ai dati del Problema 2, il DNA preparato dalle cellule avrebbe molte più copie di mtDNA che di DNA nucleare. Finché gli mtDNA del donatore nucleare e quello dell'ovocita donatore di citoplasma sono diversi, questo metodo dovrebbe facilmente discriminare se qualsiasi mtDNA in Mito o Tracker deriva dalla madre donatrice del nucleo. (Questo metodo ha tuttavia il limite che non viene testato il mtDNA in tutte le cellule di Mito e Tracker.)