

Soluzioni del Capitolo 15

15.1 a. 8; b. 5; c. 9; d. 7; e. 6; f. 3; g. 1; h. 4; i. 2.

15.2 Non è facile discriminare organismi unicellulari come eucarioti, batteri o archaea. Come afferma il problema, né la forma delle cellule né le loro dimensioni sono diagnostiche. Gli eucarioti hanno nuclei e mitocondri racchiusi nelle proprie membrane, mentre batteri e archaea, essendo procarioti, no. Tuttavia, poiché molti organismi unicellulari hanno pareti cellulari, non è sempre possibile guardare attraverso le pareti cellulari per visualizzare la presenza o l'assenza di nuclei e i mitocondri sono spesso difficili da vedere. L'osservazione di queste strutture al microscopio elettronico potrebbe discriminare gli eucarioti dagli altri due gruppi, ma non i batteri dagli archaea.

La natura del genoma non è completamente predittiva. La maggior parte dei batteri ha un singolo cromosoma circolare mentre gli eucarioti hanno più cromosomi lineari, ma alcuni batteri hanno cromosomi lineari o più cromosomi circolari. Tutti gli archaea conosciuti hanno cromosomi circolari, ma non vi è alcun motivo particolare per cui una specie di archaea, attualmente non caratterizzata, non potrebbe non avere un cromosoma lineare.

Ci sono molti altri confronti interessanti che potrebbero essere fatti tra questi tre gruppi: per esempio, (I) gli eucarioti e gli archaea iniziano la traduzione dalla metionina come amminoacido iniziale, e non dalla N-formilmetionina come i batteri; (II) eucarioti e batteri hanno lipidi di un tipo particolare mentre quelli degli archaea sono di un altro tipo; (III) tutti e tre i gruppi hanno geni interrotti da introni sebbene questi siano molto più comuni negli eucarioti rispetto agli altri due gruppi.

La misura più affidabile per caratterizzare gli organismi unicellulari è in realtà il confronto

delle sequenze del DNA con i membri noti di ciascun gruppo. Storicamente i batteri e gli archaea erano infatti raggruppati insieme fino a quando i confronti delle sequenze del DNA non hanno chiarito che appartenevano a due domini diversi che si erano separati molto tempo fa nell'evoluzione.

15.3 a. Per determinare il numero di nucleotidi necessari per identificare un gene, si devono calcolare quante basi rappresentano una sequenza unica in una molecola di DNA grande come il genoma di *E. coli* (4.6 Mb o 4 600 000 basi). In una sequenza ci sono 4 possibili basi per ogni posizione, quindi 4^n rappresenta il numero di combinazioni che si possono trovare in una sequenza lunga n basi. Per esempio, 42 è il numero delle combinazioni di una sequenza unica che può essere fatta con 2 posizioni. In media, una sequenza unica di due nucleotidi si troverà ogni 1/16 nucleotidi. Una sequenza di 11 nucleotidi dovrebbe comparire $1/4^{11}$ o una volta ogni 4×10^6 basi (4 Mb); una sequenza di 12 nucleotidi dovrebbe comparire unicamente $1/4^{12}$ o una volta ogni 16.8 Mb. Quindi per determinare una posizione unica nel genoma di *E. coli* di un frammento bisogna conoscere una sequenza di circa 12 nucleotidi.

b. Questo problema presuppone che gli amminoacidi ottenuti siano vicini all'interno della proteina. I 12 nucleotidi indicano una posizione unica nel genoma che dovrebbe codificare per 4 amminoacidi. Tuttavia, per il fatto che il codice genetico è degenerato, attualmente conoscete l'identità solamente di 8 di questi nucleotidi. Se avete una sequenza di sei amminoacidi, potreste probabilmente conoscere 12 unici nucleotidi. Siccome molti geni evolvono attraverso un pattern di duplicazione seguito da divergenza, qual-

che dominio proteico di 6 amminoacidi potrebbe comparire in più di una proteina.

c. Il gene trovato potrebbe essere specifico di quel ceppo, cioè far parte del pangenoma di *E. coli* ma non del genoma core.

- 15.4 a.** Poiché la replicazione da una singola origine è bidirezionale (ci sono due forcelle di replicazione), la velocità di sintesi è di 2000 nucleotidi (nt)/s. Siccome la dimensione del genoma di *E. coli* è di circa 4,6 Mb, il tempo minimo per replicare il cromosoma di *E. coli* è:

$$4\,600\,000 \text{ nt} / 2000 \text{ nt/s} = 2300 \text{ s};$$

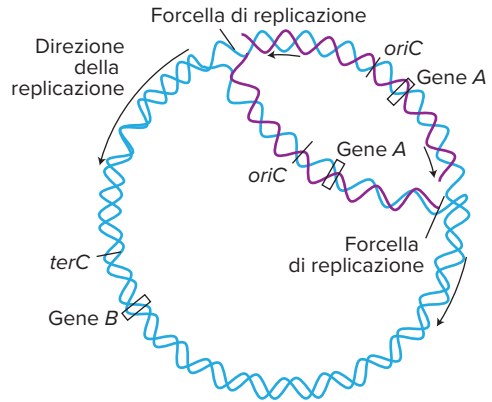
$$2300 \text{ s} / 60 \text{ s/min} = 38,33 \text{ minuti.}$$

b. In condizioni ottimali, l'origine della replicazione può "attivarsi" prima che il precedente ciclo di replicazione e divisione cellulare sia completo. Questo fatto implica che le cellule di *E. coli* che crescono in queste condizioni possono avere più copie delle regioni del cromosoma vicine all'origine della replicazione, come mostrato nella figura che segue. Si può visualizzare questo fenomeno con l'immagine di bolle di replicazione all'interno di altre bolle di replicazione. Immediatamente dopo la divisione cellulare, le cellule figlie appena nate hanno genomi già parzialmente replicati. Di conseguenza, queste cellule figlie possono finire di replicare tali genomi in meno dei 38 minuti necessari per copiare l'intero cromosoma.

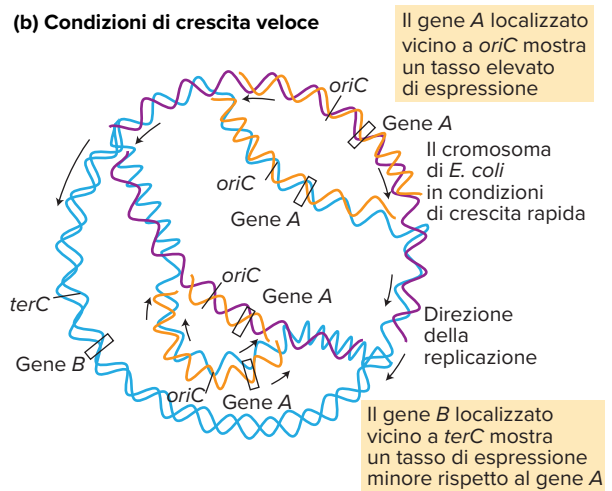
La figura che segue mette a confronto la replicazione del cromosoma *E. coli* in condizioni di crescita lenta (a sinistra) e crescita rapida (a destra). *oriC* indica l'origine di replicazione del cromosoma, da cui la bolla di replicazione cresce in entrambe le direzioni estendendo le due forcelle di replicazione. *terC* indica la posizione della terminazione della replicazione (ovvero, dove le forcelle di replicazione, che si muovono in direzioni opposte rispetto a *oriC*, si incontrano alla fine). Il gene *A* si trova vicino a *oriC*, mentre il gene *B* si trova vicino a *terC*.

Si può osservare nella figura che l'origine del cromosoma parentale si è attivata una volta e parte di questa molecola è stata replicata. Quindi, prima che le forcelle si incontrassero a *terC*, le origini delle due molecole figlie parziali si sono riattivate. Un risultato interessante della immediata riattivazione delle origini in condizioni di crescita rapida è che il dosaggio, e quindi il livello di espressione, dei geni vicini a *oriC* (come il gene *A*) è superiore a quello dei geni vicini a *terC* (come il gene *B*).

(a) Condizioni di crescita lenta



(b) Condizioni di crescita veloce



- 15.5 a.** Le caratteristiche uniche del genoma degli eucarioti includono: (I) cromosomi multipli, (II) cromosomi lineari, (III) centromeri, (IV) telomeri, (V) introni ed esoni, (VI) grandi regioni intergeniche, (VII) enhancer, (VIII) metilazione delle citosine, (IX) impacchettamento della cromatina nei nucleosomi.

b. I geni possono spostarsi tra i plasmidi e il cromosoma batterico e viceversa per trasposizione. In particolare, un gene affiancato da elementi IS può diventare un trasposone composto (vedi Figure 15.7 e 15.9).

- 15.6 a.** La Figura 15.5 mostra solo 28 genomi, mentre il pangenoma di più di 15 000 geni deriva dal sequenziamento di centinaia di genomi di *E. coli*.

b. Come discusso nel testo, il genoma di *E. coli* K12 ha 4288 geni annotati; questo valore è leggermente inferiore al genoma medio di *E. coli*, che contiene circa 4700 geni, come mostrato in Figura 15.6. Questi geni corrispondono al quadrante blu scuro della Figura 15.5. Il genoma core di *E. coli* è solo dell'ordine di ~1000 geni (vedi Figura 15.6).

15.7 I batteri che crescono in ambienti altamente salini probabilmente producono proteine che non si aggregano in condizioni di elevato contenuto di sale. Un'analisi metagenomica dei batteri nei laghi salati potrebbe identificare i geni che potenzialmente codificano per tali proteine.

Per testare la funzione delle proteine candidate si può procedere in uno dei tre modi descritti di seguito.

- (I) Si potrebbero eliminare uno alla volta i geni dai batteri isolati dagli ambienti salini che codificano le proteine candidate, usando i metodi di targeting genetico descritti in Figura 15.30. Se il prodotto genico è coinvolto nel mantenimento della solubilità delle proteine in ambienti ad alto contenuto di sale, i batteri mutanti non sarebbero più in grado di crescere in tale ambiente.
- (II) Si potrebbero costruire plasmidi ricombinanti che contengono geni che codificano per le proteine candidate e usarli per trasformare batteri che normalmente non potrebbero crescere in condizioni di alto contenuto di sale. Si dovrebbero quindi selezionare i trasformanti capaci di crescere in queste condizioni. Questo approccio non funzionerebbe se fossero necessarie più di una di queste proteine per consentire questa crescita.
- (III) Si potrebbero costruire plasmidi ricombinanti che codificano per proteine di fusione, in cui un tag proteico viene aggiunto alle sequenze che codificano per una proteina candidata, facilitandone la purificazione. Si potrebbero quindi purificare le proteine di fusione da *E. coli* e verificare se si aggregano o meno in condizioni di alto contenuto di sale. Una variante interessante di questa idea è quella di aggiungere singole proteine di fusione a soluzioni contenenti aggregati proteici formati in condizioni di alto contenuto di sale. È possibile che la proteina di fusione possa invertire l'aggregazione.

15.8 a. I dati indicano che: (I) le persone obese e le persone non obese presentano differenze nel microbioma intestinale; (II) i microrganismi intestinali delle persone obese probabilmente favoriscono l'aumento di peso e grasso nei topi rispetto a quelli degli individui di peso normale; (III) è improbabile che i geni di una persona siano gli unici determinanti dei suoi microbiomi.

b. Gemelli in cui un gemello era obeso e uno era di peso normale sono stati utilizzati per eliminare (nel caso di gemelli identici) o minimizzare (nel

caso di gemelli fraterni) il genoma nucleare come fattore cruciale che determina l'obesità delle persone analizzate o la natura dei loro microbiomi intestinali. Le osservazioni su gemelli identici sono le più convincenti, perché i gemelli identici provengono da un singolo evento di fecondazione e quindi condividono tutti i loro geni. Il fatto che un gemello identico fosse obeso mentre l'altro fosse di peso normale significa che qualche fattore, diverso dal loro genoma nucleare, era responsabile della differenza di peso; allo stesso modo, è probabile che le differenze nei comportamenti dei microbiomi di questi gemelli siano dovute a fattori diversi dai geni nucleari.

c. I risultati sarebbero stati sicuramente più convincenti se nello studio fossero state utilizzate più coppie di gemelli (soprattutto gemelli identici). Forse sono state utilizzate così poche coppie di gemelli perché era difficile trovare gemelli in cui uno fosse obeso e uno di peso normale. In tal caso, il motivo per cui i gemelli di solito hanno un peso corporeo simile potrebbe essere dovuto al fatto che vivono in ambienti simili e/o che possiedono geni simili, uno o entrambi i quali possono (o meno) influenzare i loro microbiomi.

d. No, i risultati non significano che i geni umani non abbiano alcun ruolo nel peso corporeo e nel contenuto di grasso. Come spiegato nella parte (b), la non somiglianza nei gemelli identici mostra che i geni non possono essere l'unico determinante delle differenze di peso corporeo, ma i geni possono comunque svolgere un ruolo. Per valutare l'importanza relativa dei geni e dell'ambiente in questi fenotipi, si dovrebbero esaminare molte coppie di gemelli identici e fraterni e misurare quantitativamente le loro differenze di peso corporeo e contenuto di grasso. Se i geni svolgono un ruolo in questi caratteri, ci si aspetta che i gemelli identici siano più simili dei gemelli fraterni, poiché i primi condividono tutti i loro geni mentre i secondi condividono solo la metà dei loro geni. Il Capitolo 24 descrive i metodi per stimare i diversi contributi dei geni e dell'ambiente a un dato carattere complesso.

e. È possibile che i microbiomi umani trapiantati nei topi si modifichino in modo significativo durante il periodo di crescita nei topi. Alcune delle specie batteriche potrebbero essersi estinte completamente e le specie batteriche sopravvissute potrebbero avere dimensioni di popolazione diverse nei topi rispetto a quando si trovavano negli esseri umani. Se fosse così, le conclusioni dello studio ne sarebbero indebolite.

15.9 a. Il microbioma della pelle di una persona potrebbe indicare quali fermate della metropolitana usa più spesso. Le persone che usano spesso particolari stazioni della metropolitana non solo contribuiscono alla presenza di microbi in queste stazioni, ma, quando toccano oggetti in quell'ambiente, raccolgono anche sulla loro pelle i microbi specifici di quel luogo (portati da tutti coloro che ci vanno). Queste informazioni potrebbero essere utilizzate, in teoria, per dimostrare che un sospettato di reato o una vittima di reato ha frequentato una particolare fermata della metropolitana.

b. Possiamo studiare solo quei batteri che possiamo coltivare in laboratorio. Molti batteri non crescono sui terreni tipici utilizzati per la coltura di *E. coli* e altre specie.

15.10 a. Per trovare ceppi originali resistenti al linezolid, si deve prendere un isolato di pneumococco di tipo selvatico (sensibile al linezolid) e posizionarlo su piastre di Petri contenenti linezolid: un metodo di selezione diretta per i batteri resistenti al linezolid desiderati. Si troveranno colonie resistenti molto rare in mezzo a un numero molto elevato di batteri originariamente sensibili, senza utilizzare il piastramento in replica o il trattamento con mutageni.

Trovare derivati sensibili al linezolid dei mutanti resistenti al linezolid è molto più difficile. Si deve operare uno screening per trovare i rari batteri desiderati, perché non cresceranno in presenza dell'antibiotico come fanno i batteri resistenti. Si può usare il piastramento in replica per identificare le colonie batteriche desiderate che crescono in assenza del farmaco e non in sua presenza. Meglio in questo caso utilizzare la mutagenesi con mutageni chimici per aumentare la frequenza delle mutazioni desiderate.

b. In generale, i meccanismi che influenzano la tossicità batterica di un antibiotico includono: importazione dell'antibiotico nella cellula o la sua rimozione dalla cellula; modificazioni chimiche dell'antibiotico e quindi sua attivazione o disintossicazione; interazioni dell'antibiotico con i suoi bersagli cellulari.

In termini di mutanti resistenti al linezolid, si possono immaginare mutazioni con perdita di funzione o con guadagno di funzione che influenzano l'importazione di antibiotici. Per esempio, una mutazione con perdita di funzione in un gene che codifica per un recettore o una pompa che importa l'antibiotico nella cellula impedirebbe all'antibiotico di entrare nella cellula. Meno probabilmente, una mutazione con guadagno di funzione

che, aumentando l'efficienza di un sistema che esporta l'antibiotico fuori dalla cellula, abbassasse la concentrazione intracellulare di linezolid renderebbe le cellule mutanti più resistenti al farmaco. Allo stesso modo, le mutazioni con guadagno di funzione nei geni che codificano per proteine che partecipano a un sistema che normalmente disintossica l'antibiotico aumenterebbero la resistenza della cellula. Per aumentare la resistenza al linezolid sono possibili anche mutazioni con perdita di funzione nei geni i cui prodotti proteici modificano il linezolid in modi che ne aumentano la tossicità. Infine, è possibile che una mutazione possa interrompere un RNA o un componente proteico della subunità ribosomiale 50S in modo che non possa più essere legato dal linezolid. Tali mutazioni non potrebbero essere mutazioni con perdita di funzione in termini di funzione del componente nella traduzione, perché la cellula morirebbe se non potesse sintetizzare le proteine.

Queste sono solo alcune delle possibilità. I derivati sensibili al linezolid potrebbero essere dovuti a una reversione della mutazione originale. In alternativa, potrebbero essere causati dall'opposto di uno qualsiasi dei tipi di mutazioni sopra descritti. Per esempio, una mutazione con guadagno di funzione in un gene che codifica per una proteina che serve a importare l'antibiotico nella cellula aumenterebbe la concentrazione intracellulare di linezolid e renderebbe le cellule più sensibili all'azione del farmaco a concentrazioni extracellulari inferiori dell'antibiotico.

15.11 La provetta di partenza contiene 2×10^8 cellule/mL di batteri. La prima fase della serie di diluizioni è una diluizione 10^{-2} (0,1 mL della provetta iniziale in 9,9 mL di diluente = 0,1 mL/10,0 mL = 1/100). Il secondo passaggio della diluizione è di nuovo 10^{-2} , quindi a questo punto la diluizione totale è 10^{-4} . Il terzo passaggio è una diluizione 10^{-1} (1 mL/10,0 mL = 1/10) per una diluizione totale di 10^{-5} . Quindi si seminano 0,1 mL (10^{-1} mL) di questa diluizione sulla piastra di Petri. Pertanto, si stanno seminando $10^{-5} \times 10^{-1} \text{ mL} \times (2 \times 10^8 \text{ cellule/mL}) = 2 \times 10^2$ cellule sulla prima piastra di Petri, che a questo punto dovrebbe far crescere 200 colonie. Il quarto passaggio della serie è un'altra diluizione 10^{-1} , per una diluizione totale di 10^{-6} . Piastrando di nuovo 0,1 mL di questa diluizione, ci si aspettano $10^{-6} \times 10^{-1} \text{ mL} \times (2 \times 10^8 \text{ cellule/mL}) = 2 \times 10^1$ cellule = 20 colonie su questa seconda piastra.

15.12 In questo problema, i terreni minimi non contengono fonti di carbonio, quindi la crescita dei

batteri su un terreno minimo richiede l'aggiunta degli zuccheri indicati. Nel terreno arricchito (cioè terreno ricco + X-gal), è più facile presumere che lo zucchero sia il glucosio. Si noti che X-gal è un substrato per l'enzima β -galattosidasi, ma non può fungere da fonte di carbonio.

a. (IV) Le cellule Lac^+ sono in grado di utilizzare il lattosio come unica fonte di carbonio per la crescita, mentre le cellule Lac^- non sarebbero in grado di crescere se l'unico zucchero nel mezzo fosse il lattosio. Il terreno IV è quindi selettivo, perché le cellule Lac^+ possono crescere su di esso ma le cellule Lac^- no. Si noti che questo terreno selettivo richiede un'integrazione con l'amminoacido metionina perché il ceppo batterico originale è $\text{Lac}^- \text{Met}^-$.

b. (III) Uno screening è diverso da una selezione. Per uno screening genetico, si deve essere in grado di esaminare il fenotipo di ogni singola cellula o colonia. Per lo screening delle cellule Lac^+ , è quindi necessario un terreno su cui possano crescere sia le cellule Lac^+ sia Lac^- , ma su cui abbiano fenotipi visibili diversi. In una selezione, si permette la crescita solo di cellule con determinati genotipi (min + lac seleziona per le cellule Lac^+ e contro le cellule Lac^-). Il terreno ricco (III) contiene glucosio, quindi consente la crescita sia delle cellule Lac^+ sia di quelle Lac^- ; il terreno III non è quindi selettivo. Tuttavia, l'X-gal in queste piastre distingue tra i due fenotipi (le cellule Lac^+ sono blu; le cellule Lac^- sono bianche).

c. (II) Per selezionare le cellule Met^+ , il mezzo dovrebbe mancare di metionina perché i batteri debbano essere in grado di sintetizzare la metionina per crescere. Il terreno II è l'unica opzione priva di metionina. Questo terreno contiene anche glucosio, in modo che le cellule Met^+ crescano a prescindere che siano Lac^+ o Lac^- .

- 15.13 a.** Come previsto, in 10^8 cellule non sono stati recuperati revertanti del ceppo A o del ceppo B. Se il tasso di reversione è 1 su 10^7 cellule, la probabilità che si verifichino due reversioni indipendenti nello stesso cromosoma batterico nel ceppo A è $(1 \times 10^{-7})^2 = 1 \times 10^{-14}$. Nel ceppo B, la possibilità di tre reversioni indipendenti è $(1 \times 10^{-7})^3 = 1 \times 10^{-21}$. Nell'esperimento, le colture sono state coltivate abbastanza a lungo da generare solo 10^8 cellule, statisticamente non abbastanza a lungo per la reversione. (Cioè, per avere una ragionevole possibilità di ottenere almeno 1 revertante di uno dei ceppi, per il quale è necessario un minimo di 10^{14} cellule.) Poiché le colonie di tipo selvatico sono state recuperate quando i ceppi A e B sono stati coltivati insieme e non

quando sono stati coltivati separatamente, i tipi selvatici devono essere nati attraverso un meccanismo diverso dalla reversione che ha coinvolto il trasferimento genico.

[I calcoli riportati sopra sono alquanto semplificati perché presuppongono che le reversioni indipendenti avvengano simultaneamente. In realtà, le probabilità di avere 2 o 3 reversioni in una cultura in crescita sono leggermente superiori. Per esempio, potremmo immaginare uno scenario in cui una prima reversione si verifica all'inizio della crescita della coltura (quando ci sono poche cellule), e la seconda più tardi nella crescita della coltura, quando contiene molte più cellule. Tuttavia, la possibilità che si verifichi la prima reversione quando la coltura ha pochissime cellule è minima. In ogni caso, queste considerazioni non cambiano molto la conclusione che sarebbe estremamente improbabile che una coltura di sole 10^8 cellule accumuli reversioni in 2 o 3 geni diversi.]

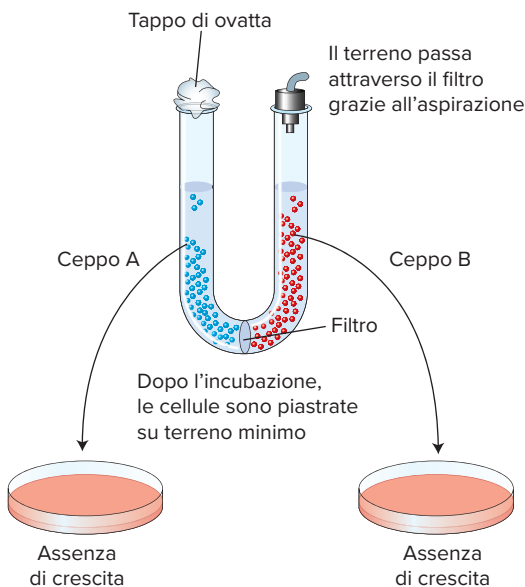
b. Nel 1953, circa un anno dopo che Lederberg e Tatum avevano dimostrato l'esistenza del trasferimento genico tra i ceppi batterici A e B, William Hayes ha dimostrato che questo trasferimento era asimmetrico, il che significa che un ceppo era il donatore e l'altro era il ricevente. Questo fu scoperto includendo i marcatori di sensibilità/resistenza agli antibiotici nel ceppo A e nel ceppo B. Per esempio, supponiamo che il ceppo A sia resistente alla streptomicina, mentre il ceppo B sia sensibile allo stesso farmaco. Hayes ha analizzato gli ex-coniuganti $\text{Met}^+ \text{Bio}^+ \text{Thr}^+ \text{Leu}^+ \text{Thi}^+$ ottenuti per appurare se erano resistenti alla streptomicina. Quasi nessuno lo era. Se il ceppo A era sensibile alla streptomicina e il ceppo B resistente, invece, quasi tutti gli ex-coniuganti erano resistenti alla streptomicina. Nell'insieme, questi due risultati implicavano che il ceppo A fosse il donatore e il ceppo B il ricevente. (Presumibilmente, nel ceppo Hfr utilizzato da Hayes il gene per la resistenza/sensibilità alla streptomicina si trovava molto lontano dall'origine del trasferimento, oppure era presente su un plasmide che non è stato trasferito nel ricevente. Quindi, per il carattere resistenza/sensibilità alla streptomicina, il fenotipo dell'ex-coniugante rifletteva il genotipo del ricevente.)

- 15.14 a.** Per essere sicuri che avvenga il trasferimento genico, sono necessari altri marcatori oltre alla resistenza all'ampicillina; solo in questo modo è possibile discriminare tra cellule donatrici, cellule riceventi e cellule che risultano dal trasferimento genico. Per esempio, supponiamo che le cellule donatrici fossero sensibili alla streptomicina oltre a

essere resistenti all'ampicillina e che le cellule riceventi fossero resistenti alla streptomycin oltre a essere sensibili all'ampicillina. Le cellule che sono cresciute su piastre contenenti entrambi gli antibiotici devono essere il risultato del trasferimento genico, purché la frequenza del trasferimento genico sia superiore alla frequenza della reversione.

b. La trasduzione è il trasferimento di geni batterici mediato dal fago. Il DNA è protetto dall'esposizione agli enzimi quando risiede all'interno della testa proteica del fago. La trasformazione è il trasferimento genico mediante DNA nudo, che non è racchiuso in alcuna struttura protettiva. Il DNA trasferito per trasformazione sarà quindi suscettibile alla degradazione da parte della DNasi. Se il trasferimento dell'allele *amp^r* avviene dopo il trattamento con DNasi, deve essere in corso la trasduzione.

c. Questo famoso esperimento, detto del tubo a U, è schematizzato nella figura che segue. La membrana separa le soluzioni contenenti il ceppo A e il ceppo B; la membrana consente a piccole molecole come gli zuccheri di fluire tra le due metà del tubo a U, ma cellule o molecole di dimensioni maggiori dei pori rimangono bloccate. La membrana impedirebbe la coniugazione perché le cellule non potrebbero toccarsi, ma consentirebbe la trasformazione e la trasduzione. Pertanto, se non si formassero colonie ricombinanti, la coniugazione sarebbe esclusa, ma la trasformazione e la trasduzione sarebbero possibili. Per distinguere tra queste due ultime possibilità, si potrebbe usare una membrana in cui i pori sono più piccoli delle dimensioni di un batteriofago ma più grandi di un frammento di DNA.



15.15 Si incrocia una cellula mutante con 3-4 copie del plasmide F e una cellula wild type ricevente F^- . Se la mutazione si trova sul plasmide F, ci si aspetta che il ceppo ricevente nel quale è stato trasferito il plasmide contenga un alto numero di copie. Se la mutazione è invece presente su un gene cromosomale, il fenotipo alto numero di copie non può essere trasferito nel ceppo ricevente. Con questo tipo di esperimento potrebbe esserci una potenziale complicazione: quando incrociate F^+ con F^- , alcune delle cellule F^+ saranno convertite in cellule Hfr, in grado quindi di trasferire DNA batterico. Per superare questo problema può essere compiuto un esperimento alternativo: potreste isolare il DNA del plasmide F da una cellula mutante, poi trasformare questo plasmide in nuove cellule riceventi. Esaminando poi il numero di copie del fattore F nelle cellule trasformate, potreste affermare se il carattere è stato trasportato dal plasmide.

15.16 Durante la trasformazione il DNA del donatore viene frammentato in piccoli pezzi di circa 20 kb. Inoltre, nel trasformante il DNA del donatore sostituisce solo una piccola percentuale del cromosoma del ricevente. Pertanto, solo i geni che sono vicini tra loro sul cromosoma possono essere co-trasformati. L'intero cromosoma di *E. coli* è lungo circa 4,6 Mb. Se *purC* e *pyrB* si trovano a metà del cromosoma l'uno dall'altro, distano circa 2,3 Mb l'uno dall'altro, rendendo impossibile la loro co-trasformazione.

15.17 I geni *purE* e *pepN* saranno co-trasformati con frequenza minore se il ceppo patogeno b di *H. influenzae* viene usato come ceppo ospite donatore. C'è una bassa probabilità che i due geni possano trovarsi sullo stesso frammento di DNA perché sono separati da più di 8 kb di DNA rispetto al ceppo *H. influenzae* Rd non patogeno.

15.18 Usare il plasmide per trasformare un ceppo ricevente che non produce la tossina, poi saggiare per la produzione di tossina. Questo esperimento implica che il plasmide contenga tutti i geni necessari a produrre la tossina, che non sono presenti nel batterio ricevente.

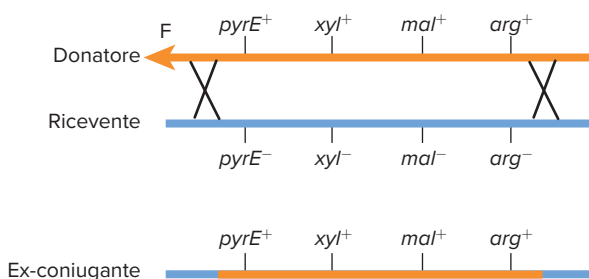
15.19 a. Il ceppo partner dovrebbe essere F^- , Str^r e mutante per tutti i marcatori da trasferire dal ceppo Hfr (ovvero Pyr^- , Met^- , Xyl^- , Tyr^- , Arg^- , His^- , Mal^-). Si noti che per eseguire questo esperimento di coniugazione è necessario un marcatore (Str^r in questo caso) che consente di uccidere le cellule del donatore e di esaminare solo gli ex-coniuganti in cui altri geni vengono trasferiti nel ricevente. È sempre una buona idea sapere in an-

tipico che il marcatore utilizzato per uccidere le cellule del donatore (cioè il gene che conferisce resistenza/sensibilità alla streptomicina [Str] in questo problema) si trova più lontano dall'origine del trasferimento rispetto a qualsiasi gene di cui misurare il trasferimento. Il motivo è quello di assicurarsi di considerare solo gli ex-coniuganti in cui i geni del donatore vengono trasferiti al ricevente Str^r .

b. Selezionando per gli ex-coniuganti Pyr^+ si seleziona un marker precoce trasferito dal donatore al ricevente. La frequenza con cui vengono trasferiti i geni oltre *pyrE* diminuisce con la distanza da questo marcatore iniziale; questo fenomeno è chiamato gradiente di trasferimento. Il gradiente di trasferimento è dovuto alla fragilità del ponte di coniugazione tra le cellule e anche alla fragilità del DNA trasferito. Più un gene è lontano da *pyrE*, più è probabile che la connessione tra donatore e ricevente o il DNA stesso vengano interrotti prima che quel gene possa essere trasferito. Ricordiamo che questo fenomeno spiega i diversi plateau di trasferimento in Figura 15.19b. L'ordine dei geni è: *pyrE xyl mal arg met tyr his*.

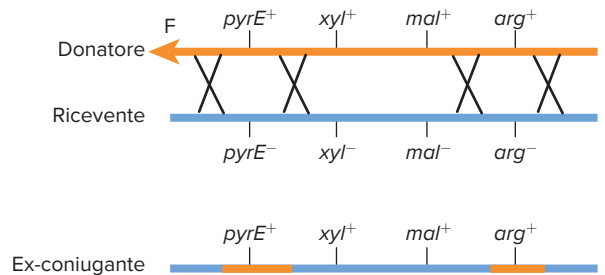
- 15.20** Come mostrato nel diagramma che segue, il trasferimento di Pyr^+ e Arg^+ richiede almeno 2 crossing-over: uno a sinistra di *pyrE* (più vicino all'origine del trasferimento del fattore F) e uno a destra di *arg* (più lontano dall'origine del fattore F). (Da notare che in tutti i diagrammi che seguono il DNA del donatore [arancione] è lineare e il cromosoma ricevente [blu] è un cerchio. Anche il cromosoma ex-coniugante con le regioni blu e arancione è un cerchio.)

2 crossing-over



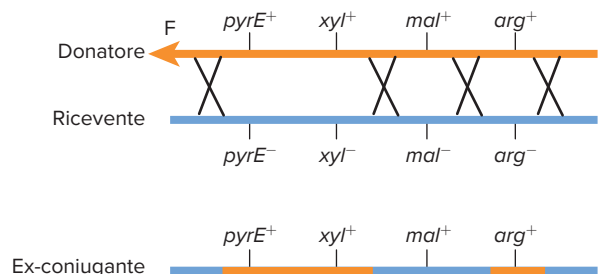
Ulteriori crossing-over all'interno di questi due punti, purché si verifichino in numero pari, risulteranno anche in ex-coniuganti $\text{Pyr}^+ \text{Arg}^+$. Per esempio, come mostrato nel diagramma seguente, gli ex-coniuganti $\text{Pyr}^+ \text{Arg}^+ \text{Xyl}^- \text{Mal}^-$ possono essere generati da 4 crossing-over.

4 crossing-over

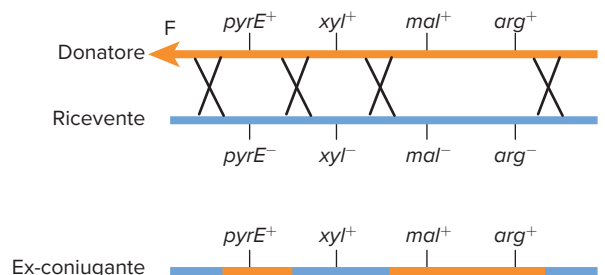


Altri due tipi di ex-coniuganti, $\text{Pyr}^+ \text{Arg}^+ \text{Xyl}^- \text{Mal}^-$ e $\text{Pyr}^+ \text{Arg}^+ \text{Xyl}^+ \text{Mal}^-$, possono essere generati anch'essi da 4 crossing-over:

4 crossing-over

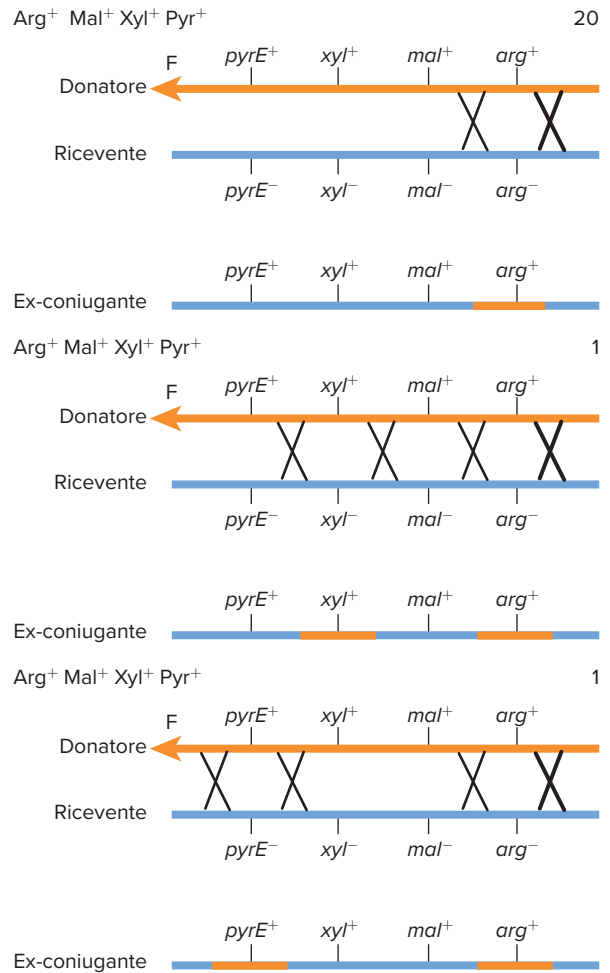
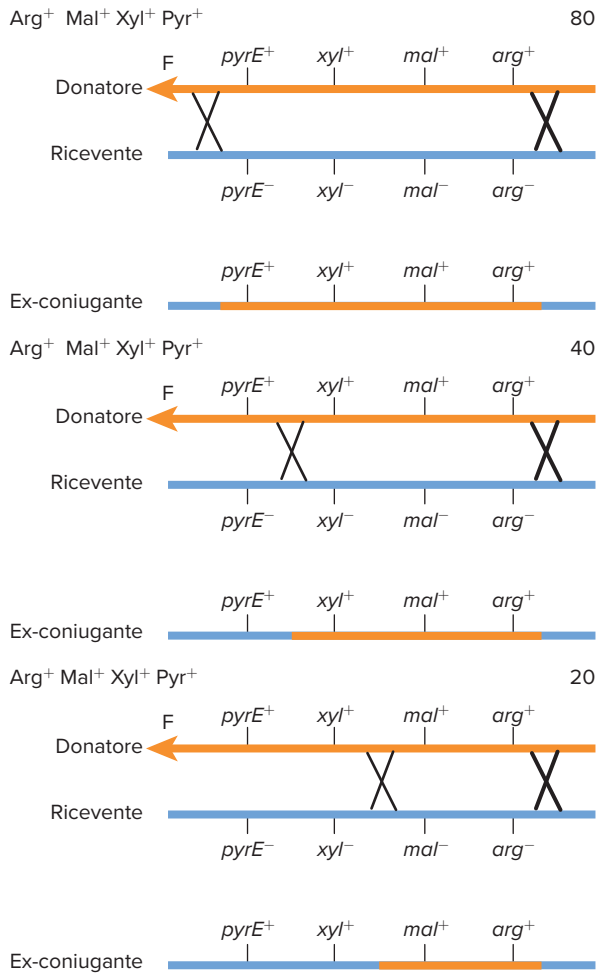


4 crossing-over



Poiché è molto meno probabile che si verifichino 4 crossing-over rispetto a 2 crossing-over, di gran lunga la maggior parte degli exconjuganti $\text{Pyr}^+ \text{Arg}^+$ sarà anche $\text{Xyl}^+ \text{Mal}^+$.

- 15.21 a.** Gli ex-coniuganti sono stati tutti selezionati per essere Arg^+ , quindi 1 crossover si è verificato a destra di *arg* (cioè più lontano dall'origine del trasferimento del fattore F). Nei quattro tipi di ex-coniuganti più frequenti (con 80, 40, 20 e 20 colonie), un secondo crossing-over si è verificato in punti diversi più vicini al fattore F, mentre i due tipi di ex-coniuganti poco frequenti (una colonia ciascuno) hanno richiesto 3 crossing-over aggiuntivi più vicini al fattore F, per un totale di 4 crossing-over. Questi vari eventi di crossing-over sono illustrati nei diagrammi che seguono. (Da notare che in tutti i diagrammi il DNA del donatore [arancione] è lineare e il cromosoma ricevente [blu] è circolare, così come il cromosoma ex-coniugante.)

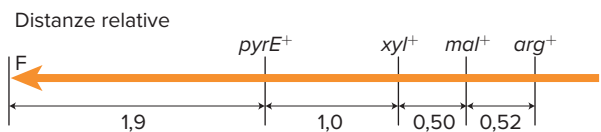


b. Poiché tutti gli ex-coniuganti sono Arg⁺, l'intera lunghezza del DNA del donatore (arancione) mostrato nelle figure nella parte (a) – almeno fino al gene *arg* – doveva essere trasferita nel ricevente. L'altro crossing-over necessario per il trasferimento dell'allele *arg*⁺ è tra il gene *arg* stesso e l'origine del fattore F ("F" nei diagrammi qui sopra). Questo secondo crossing-over può verificarsi in qualsiasi posizione casuale lungo la lunghezza del DNA arancione a destra dell'origine e a sinistra del gene *arg*. La frequenza con cui si verifica il secondo (o terzo o quarto) crossing-over tra uno qualsiasi degli altri geni è proporzionale alla distanza, il numero di coppie di basi, tra questi geni. Pertanto, i numeri relativi dei crossing-over che si verificano tra due geni qualsiasi indicano le distanze relative tra i geni.

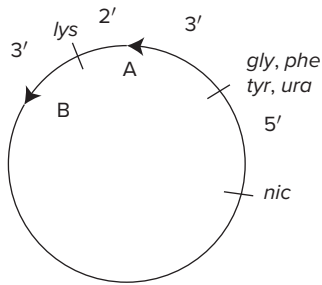
Il numero di ex-coniuganti in cui si è verificato un crossing-over tra *arg* e *mal* è (20 + 1 + 1) = 22; tra *mal* e *xyl* è (20 + 1) = 21; tra *xyl* e *pyrE* è (40 + 1 + 1) = 42. Pertanto, espresse come frazione della maggiore delle tre distanze, le distanze relative tra i geni sono: 22/42 = 0,52 (*arg* ↔

mal); 21/42 = 0,50 (*mal* ↔ *xyl*); 42/42 = 1,0 (*xil* e ↔ *pyrE*). In altre parole, le distanze *arg* ↔ *mal* e *mal* ↔ *xyl* sono quasi le stesse e ciascuna è circa la metà della distanza *xyl* ↔ *pyrE*.

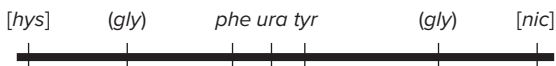
c. Allo stesso modo è possibile determinare anche la distanza relativa tra *pyrE* e l'origine del fattore F. Si può vedere dal diagramma nella parte (a) che il numero di ex-coniuganti in cui si è verificato un crossing-over tra *pyrE* e l'origine del fattore F è (80 + 1) = 81; normalizzato alla distanza *xil* ↔ *pyrE*, 81/42 = 1,9. Pertanto, la distanza *pyrE* ↔ F è 1,9 × la distanza *xyl* ↔ *pyrE*.



15.22 a. Il tempo di trasferimento di 4 marcatori (*gly*, *phe*, *tyr*, *ura*) è indistinguibile e per questo non è possibile collocarli in ordine sulla mappa, ma si possono posizionare i marcatori *lys*, *nic* e il cluster dei quattro geni.

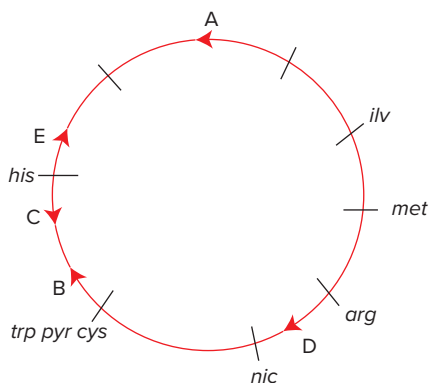


b. *Phe* è co-trasdotto più frequentemente con *ura* che con *tyr*. Da notare inoltre che tutti i trasduttanti *Tyr*⁺ sono anche *Ura*⁺. Questi due fatti indicano che l'ordine è *phe-ura-tyr*. La relazione di questi tre geni con gli altri marcatori e con il gene *gly* è ancora sconosciuta e questo viene rappresentato indicando *gly* tra parentesi tonde e a fianco i marker *lys* e *nic* tra parentesi quadre.



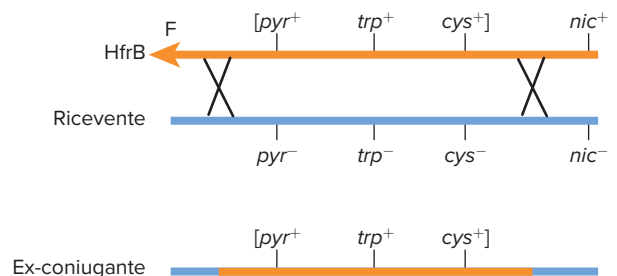
c. Per mappare il gene *gly* in relazione a qualche altro marcatore, si selezionano trasduttanti per Gly⁺ e si marcano gli altri marcatori per determinare quali geni sono co-trasdotti con Gly⁺ con frequenza più alta. I trasduttanti Gly⁺ si possono selezionare su terreno minimo con aggiunta di lys + phe + tyr + ura, poi la crescita dei singoli trasduttanti viene testata su un terreno mancante di uno o più amminoacidi.

15.23 a. L'ordine dei geni è *pab ilv met arg nic (trp pyr cys) his lys* (vedi il diagramma che segue). Questo ordine viene stabilito solo osservando il momento dell'ingresso dopo l'inizio dell'accoppiamento; questo parametro è direttamente correlato alla distanza di un gene dall'origine del trasferimento nel dato ceppo Hfr. Da notare le punte di freccia che indicano la posizione e l'orientamento dell'origine del trasferimento nei ceppi Hfr A-E. (Vedi la risposta al Problema 22 per una spiegazione della direzionalità delle punte di freccia.)



b. Dopo l'accoppiamento con HfrB, avvenuto abbastanza a lungo per il trasferimento di *nic*, e quindi la selezione per Trp⁺, la maggior parte degli exconiuganti (790/1000) ha ricombinato anche negli alleli *pyr*⁺ *cys*⁺ del donatore. Questo risultato rafforza la conclusione dell'esperimento di accoppiamento interrotto nella parte (a) che i tre geni (*trp*, *pyr* e *cys*) sono strettamente associati. Il motivo è che tutti gli exconiuganti Trp⁺ devono aver subito un crossing-over su entrambi i lati del gene *trp* e il trasferimento frequente anche di *pyr*⁺ e *cys*⁺ insieme a *trp*⁺ indica che la maggior parte di questi crossing-over deve essersi verificata al di fuori della regione *pyr-trp-cys*. La bassa frequenza di crossing-over all'interno della regione *pyr-trp-cys* significa che la maggior parte sequenze di DNA trasferite nel ricevente dal donatore si trova a sinistra e a destra di questa regione di tre geni. Questa situazione è schematizzata nella figura che segue. Si noti che, anche se sappiamo che è trascorso un tempo sufficiente per consentire il trasferimento del gene *nic*⁺ dal donatore al ricevente, non abbiamo valutato il fenotipo associato a questo gene. Pertanto, il crossing-over a destra nella figura potrebbe essere stato a sinistra o a destra del gene *nic*; è mostrato arbitrariamente a sinistra di *nic*.

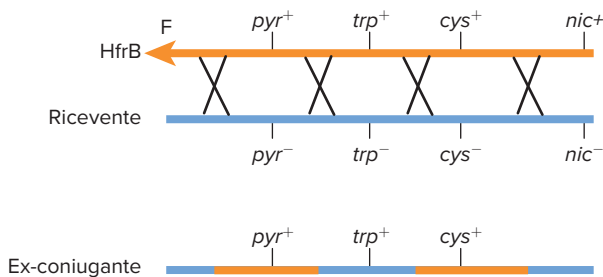
Gli ex-coniuganti Pyr⁺ Trp⁺ Cys⁺ sono i più frequenti



Nella maggior parte degli esperimenti di coniugazione, la classe meno numerosa di ricombinanti rivela il gene centrale. Di solito, la classe meno numerosa di ricombinanti rappresenta quelli prodotti da quattro crossing-over invece di due. In questi ex-coniuganti, dopo che si sono verificati i quattro crossing-over, i due geni esterni avranno il genotipo del genitore Hfr e il gene nel mezzo avrà il genotipo del genitore F⁻. Tuttavia, questo particolare problema ha una svolta interessante perché la più piccola classe di ex-coniuganti non può essere prodotta da quattro crossing-over. Nei dati della tabella, nessuna delle due classi di ex-coniuganti che hanno due geni dell'Hfr ricombinati nel cromosoma F [(Trp⁺

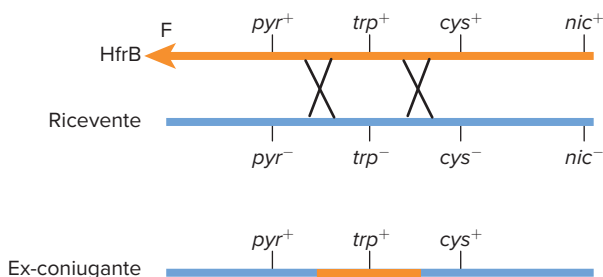
$Pyr^+ Cys^-$) o ($Trp^+ Pyr^- Cys^+$)] rappresenta la classe meno numerosa di ex-coniuganti. Invece, la classe meno numerosa è rappresentata da $Trp^+ Pyr^- Cys^-$, in cui solo il gene trp^+ dell'Hfr è stato trasferito nel cromosoma F⁻ per ricombinazione. Questo risultato indica che il gene trp è quello centrale. La classe ex-coniugante prodotta da quattro crossing-over non è stata recuperata perché era Trp^- , e sono stati selezionati gli ex-coniuganti Trp^+ . La figura che segue illustra questo punto. La classe di crossing-over quadrupla da questo incrocio è $Pyr^+ Trp^- Cys^+$, ma tali ex-coniuganti non potrebbero mai essere recuperati. (Nella figura seguente e in tutti i diagrammi successivi, il posizionamento di pyr e cys rispetto a nic è stato scelto in modo casuale.)

Gli ex-coniuganti $Pyr^+ Trp^+ Cys^+$ non recuperati



Invece, la classe di ex-coniuganti meno numerosa ($Pyr^- Trp^+ Cys^-$) è quella in cui i due crossing-over necessari per produrla sono i crossing-over meno probabili (frequenza più bassa). Poiché pyr , trp e cys sono tutti strettamente associati, i crossing-over con frequenza più bassa saranno quelli che si verificano tra i due geni esterni e il gene centrale dei tre [cioè, tra (pyr e trp) e tra (trp e cys)], con conseguente trasferimento dell'allele Hfr del gene centrale (trp^+) nel ceppo F⁻:

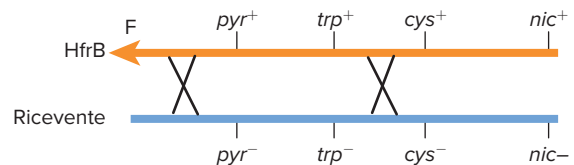
Gli ex-coniuganti $Pyr^- Trp^- Cys^-$ sono i più rari



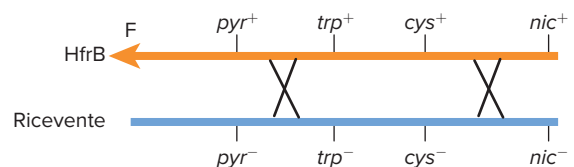
I crossing-over tra queste coppie di geni strettamente linked sono meno frequenti dei crossing-over a sinistra di tutti e tre i geni (tra l'origine del trasferimento del fattore F e il più a sinistra dei tre geni) o dei crossing-over a destra di tutti e tre i geni (una posizione da qualche parte a destra

di cys). Questo deve essere il caso perché, come spiegato sopra, i dati ci dicono che esiste meno DNA (un numero inferiore di coppie di basi) tra i tre geni strettamente linked di quello che esiste nelle regioni a sinistra o a destra. Gli ex-coniuganti in cui si è verificato un raro crossing-over all'interno della regione $pyr-trp-cys$ e un crossing-over più frequente al di fuori di quella regione rappresentano le due classi più frequenti:

Gli ex-coniuganti $Pyr^+ Trp^+ Cys^-$ sono frequenti



Gli ex-coniuganti $Pyr^- Trp^+ Cys^-$ sono frequenti



Pertanto, i dati indicano che l'ordine è $pyr trp cys$ (ovvero trp è il gene centrale). Non sappiamo se pyr o cys sia più vicino a nic . Sorprendentemente, non possiamo determinare alcuna distanza genica relativa da questi dati. Il motivo è che le tre classi di doppio crossing-over le cui origini sono state appena schematizzate variano tutte nelle posizioni di entrambi i crossing-over. Pertanto, le frequenze di ciascuna delle classi riflettono i crossing-over in due intervalli e non possiamo confrontarli. Possiamo determinare le distanze relative solo quando uno degli intervalli in due classi diverse è lo stesso (vedi Problema 21).

15.24 L'esperimento descritto in questo problema richiede un assetto genetico simile a quello di tutti gli esperimenti di coniugazione. Si ha bisogno di un ceppo donatore Hfr con marcatori da trasferire (come alleli wild-type che conferiscono prototrofia); si dovrebbe anche essere in grado di contro-selezionare il donatore (per esempio, potrebbe essere sensibile a un determinato antibiotico). Il ceppo ricevente dovrebbe essere auxotrofo ed essere anche resistente all'antibiotico usato

per uccidere il donatore. Si mescolano i ceppi del donatore e del ricevente, posizionando migliaia di cellule miste in un punto di una piastra di terreno ricco per consentire la coniugazione. Il piastramento in replica su un terreno selettivo consentirà quindi di osservare gli ex-coniuganti che si sono formati durante la coniugazione. Se la coniugazione e la ricombinazione avvengono correttamente, si potranno vedere diverse centinaia di piccole colonie ex-coniuganti che crescono in ogni punto.

Per ottenere una cellula ex-coniugante stabile da un accoppiamento tramite Hfr è necessaria la ricombinazione, mediata da *recA*, di alcuni dei geni del donatore all'interno del cromosoma della cellula F-ricevente. Pertanto, questo test rileva i mutanti *recA*⁻ nella cellula F in base all'incapacità di formare ex-coniuganti stabili nel mezzo selettivo. Si noti che il mezzo selettivo permette la crescita solo degli ex-coniuganti che hanno ricevuto marcatori dal ceppo donatore, ma né le cellule del donatore né le cellule riceventi originali sarebbero in grado di moltiplicarsi in queste condizioni.

- 15.25** Il trasferimento nei batteri dei geni della virulenza accanto ai geni dei fagi suggerisce che il trasferimento sia avvenuto attraverso la trasduzione specializzata (vedi Figura 15.25). Questo meccanismo di trasferimento genico orizzontale inizia con l'infezione di una cellula ospite batterica patogena con un batteriofago temperato (vedi Figura 15.23). Il DNA del batteriofago viene incorporato come profago nel cromosoma batterico, trasformando la cellula batterica in un lisogeno. In questo scenario, il sito di integrazione del profago nel cromosoma dell'ospite patogeno è vicino a un'isola di patogenicità contenente i geni di virulenza.

Quando il DNA del profago viene escisso dal cromosoma del lisogeno, si verifica un errore, creando una molecola di DNA che ha alcuni geni del batteriofago e alcuni geni dell'isola patogena del batterio ospite. Questa molecola di DNA può essere incorporata in una nuova particella di batteriofago. Quando questo batteriofago infetta un nuovo ospite non patogeno, la ricombinazione tra questa molecola di DNA e il genoma del nuovo ospite trasferisce sia i geni fagici sia i geni patogeni nell'ospite. La cellula ospite acquisirebbe quindi proprietà patologiche e i geni fagici e i geni patogeni sarebbero adiacenti.

- 15.26** La trasduzione generalizzata si verifica durante il ciclo litico, quando un fago impacchetta nella

sua testa un segmento del cromosoma batterico frammentato invece del proprio genoma (fagico), quindi trasferisce quel frammento di DNA in un altro batterio infettato. La trasduzione specializzata si verifica quando, dopo l'induzione, un lisogeno viene escisso dal cromosoma batterico in maniera imprecisa, in modo tale che un segmento di DNA batterico adiacente a un genoma fagico parziale sia inglobato nella particella fagica. Nella trasduzione generalizzata, qualsiasi frammento del cromosoma batterico può essere impacchettato nella testa del fago purché sia della dimensione corretta. Nella trasduzione specializzata solo il DNA adiacente al sito di inserimento del lisogeno può essere impacchettato nella particella fagica.

- 15.27** In entrambe le parti di questa domanda, si prevede di trasformare le cellule batteriche con una libreria di plasmidi. Ciascun clone risultante sarà un merodiploide, cioè una cellula diploide parziale che contiene un cromosoma batterico completo e un plasmide che ha solo uno o pochi geni.

a. È probabile che una mutazione non senso causi una perdita della funzione genica. Quindi si può trasformare il ceppo mutante con una libreria di plasmidi composta derivata da un ceppo selvatico. Le colonie in cui il fenotipo mutante viene revertito a wild-type dovrebbero contenere un plasmide con una copia wild-type del gene in cui è stata trovata la mutazione non senso. Si dovrebbe quindi purificare il plasmide ricombinante da questo ceppo revertito e sequenziare l'inserito del DNA batterico per verificare che corrisponda al gene con la mutazione non senso. Si noti che questa strategia si basa sull'idea che in quasi tutti i casi le mutazioni con perdita di funzione sul cromosoma saranno recessive rispetto all'allele wild-type sul plasmide.

b. Si genera una libreria plasmidica di DNA genomico dal ceppo mutante contenente la mutazione a guadagno di funzione e si usa la libreria per trasformare i batteri di tipo selvatico. I trasformanti con il fenotipo mutante dovrebbero contenere un plasmide con il gene mutante. Qui, il presupposto di base è che un allele a guadagno di funzione sul plasmide sia dominante rispetto all'allele wild-type sul cromosoma batterico. Quindi si purifica il plasmide ricombinante dai batteri con il fenotipo mutante e si sequenzia l'inserito del DNA batterico per identificare il gene interessato dalla mutazione.

- 15.28** La soppressione multicopia è un fenomeno importante, spesso osservato dai genetisti dei batte-

ri. Può verificarsi con diversi possibili meccanismi. Per esempio, supponiamo che due geni codifichino enzimi correlati e che il secondo enzima possa catalizzare la stessa reazione biochimica del primo, ma solo in modo non efficiente. In tal caso, più copie del secondo gene potrebbero sopprimere anche le mutazioni nulle nel primo gene fornendo una quantità sufficiente dell'enzima inefficiente.

Il problema chiede di suggerire due modi per determinare se la Proteina X o la Proteina Y corrispondano al gene mutante che causa l'auxotrofia Trp^- descritta nel problema. Di seguito si descrivono quattro di questi metodi.

- (1) Il fenotipo Trp^- nel ceppo mutante originale potrebbe essere mappato in una posizione sul cromosoma batterico rispetto ad altri geni utilizzando uno qualsiasi dei vari metodi descritti, in particolare coniugazione o co-trasformazione/co-trasduzione con altri marcatori in posizioni note. La mutazione dovrebbe mappare sul gene X o sul gene Y.
- (2) Il gene su ciascuno dei due plasmidi potrebbe essere modificato (per esempio, sostituendo la maggior parte del registro di lettura aperto del gene con un gene di resistenza agli antibiotici) e quindi utilizzando ciascun gene modificato per generare una mutazione con perdita di funzione nel gene X o gene Y mediante gene targeting (vedi Figura 15.30). Qualunque nuovo mutante con perdita di funzione abbia un fenotipo mutante Trp^- corrisponde al gene nel mutante originale.
- (3) L'esperimento di "reversione", condotto in merodiploidi con plasmidi a copia singola (per esempio, plasmidi F'), contenenti una copia selvatica del gene X o del gene Y, potrebbe determinare quale gene corrisponde al fenotipo mutante Trp^- . (L'idea qui è che la ragione per cui il plasmide sbagliato ha corretto il fenotipo Trp^- nell'esperimento originale è che il plasmide era presente in molte copie in ciascun batterio; si presume che questo effetto non si sarebbe osservato se il gene sbagliato fosse stato presente su un plasmide trovato in una sola copia per cellula batterica.)
- (4) Sia il gene X sia il gene Y potrebbero essere amplificati mediante PCR dal mutante Trp^- determinando la sequenza dei geni. In confronto alle sequenze geniche in un ceppo di *E. coli* wild-type, potrebbero essere rilevate

mutazioni nell'uno o nell'altro gene che potrebbero inattivare la funzione genica.

15.29 a. Il modo più semplice per inserire il plasmide nelle cellule di *S. parasanguis* è la trasformazione. Gli streptococchi incorporano il DNA in modo naturale, come si è visto nei primi esperimenti di Griffiths con *Streptococcus pneumoniae*, ma la trasformazione artificiale potrebbe essere utilizzata per aumentare l'efficienza delle cellule che incorporano il plasmide. È fondamentale che la trasformazione avvenga a bassa temperatura, in modo che il plasmide con l'origine sensibile alla temperatura (repA^{ts}) possa replicarsi nelle cellule trasformate. Si selezionano poi le cellule trasformate contenenti il plasmide mediante piastramento su terreni contenenti kanamicina ed eritromicina.

Quindi, si aumenta la temperatura alle condizioni restrittive per consentire alle cellule di crescere. Il plasmide non è in grado di replicarsi ad alte temperature, ma il trasposone si inserirà in posizioni casuali nel genoma batterico. Queste inserzioni conterranno il gene erm^r . Per identificare i batteri con inserti, si piastrano ad alta temperatura su terreno contenente eritromicina ma non kanamicina. Con il piastramento in replica ci si assicura che le singole colonie siano suscettibili alla kanamicina. Ogni singola colonia $\text{Erm}^r \text{Kan}^s$ dovrebbe avere un'inserzione IS256 in una posizione genomica diversa.

b. L'uso di questo plasmide come base per la mutagenesi basata sui trasposoni presenta numerosi vantaggi.

- (1) Come spiegato nella parte (a), è possibile eseguire facilmente lo screening dei ceppi che hanno un inserto potenzialmente mutageno del trasposone nel cromosoma batterico.
- (2) La frequenza dei ceppi con inserzioni di trasposoni sarà alta tra le cellule che si analizzano perché (I) il plasmide non può essere mantenuto ad alta temperatura a causa dell'origine sensibile alla temperatura e (II) le cellule che sono $\text{Erm}^r \text{Kan}^s$ si sono molto probabilmente formate per trasposizione di IS256 nel cromosoma batterico.
- (3) La presenza del trasposone consente ai ricercatori di identificare rapidamente nuove mutazioni che potrebbero inibire la capacità dei batteri di causare la placca dentale perché il trasposone "marca" il gene mutante [vedi parte (c) qui sotto].

c. La PCR inversa (Figura 15.29) potrebbe essere utilizzata per purificare il DNA adiacente al-

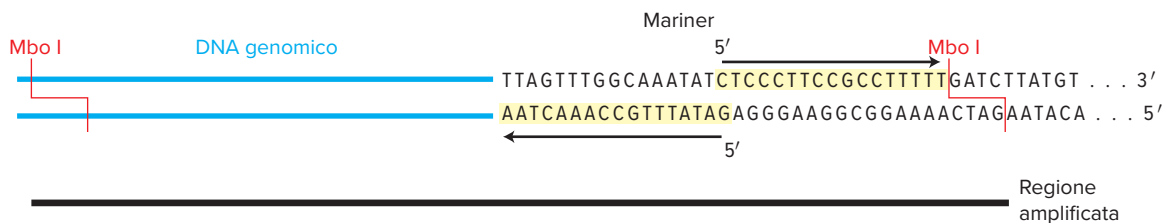
l'IS256 nei ceppi mutanti e il prodotto di amplificazione potrebbe essere sequenziato per determinare il particolare gene interrotto dall'inserzione.

- 15.30 a.** Il sito *MboI* vicino all'estremità di *Mariner* e il successivo sito *MboI* nel DNA genomico adiacente verrebbero tagliati dall'enzima di restrizione come indicato dalle linee rosse nel diagramma che segue. Si aggiunge poi la DNA ligasi a una soluzione diluita dei frammenti di DNA risultanti. Tra i prodotti della ligasi c'è un piccolo DNA circolare in cui le estremità coesive *MboI* mostrate nel diagramma sono riunite insieme. (La bassa

concentrazione di frammenti di DNA nella miscela di legatura riduce la probabilità che vengano uniti frammenti di restrizione diversi.)

A questo punto si usa la PCR per amplificare la regione mostrata nella figura. Due primer PCR, presenti all'interno dell'elemento *Mariner*, che amplificherebbero (nel frammento circolarizzato) un prodotto che include il DNA genomico adiacente sono:

5' CTCCTTCCGCCTTTT 3'
e 5' GATATTGCCAACTAA 3'
(vedi lo schema seguente)



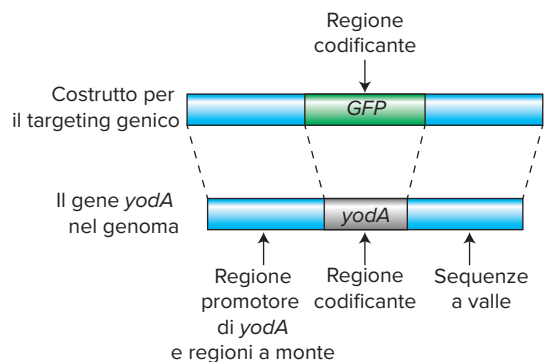
In effetti, qualsiasi coppia di primer corrispondente alle sequenze all'interno dell'elemento *Mariner* sul lato sinistro del sito *MboI* funzionerebbe. Il motivo è che ogni primer sintetizzerà il DNA lungo l'intero stampo circolare. È preferibile tuttavia che i due primer non siano complementari perché ciò interferirebbe con l'efficienza della reazione PCR.

b. Il frammento di DNA amplificato è mostrato come una linea nera spessa nel diagramma precedente. La sequenza della regione blu del DNA genomico identifica il sito di inserimento del trasposone. (Si noti che lo stampo per l'amplificazione è un frammento circolarizzato di DNA, ma il prodotto della PCR è lineare.)

- 15.31 a.** Il costrutto di DNA che verrebbe utilizzato per scambiare le sequenze codificanti *yodA* con quelle di GFP è mostrato nella figura che segue. La regione codificante per GFP, in verde nella figura, parte dal codone di inizio per questa proteina e termina con il codone di stop. Le sequenze GFP corrispondono al cDNA perché i geni di *E. coli* non hanno introni e quindi *E. coli* non ha il macchinario di splicing. Alcune migliaia di coppie di basi al 5' e al 3' della regione codificante sarebbero necessarie per un efficiente targeting genico.

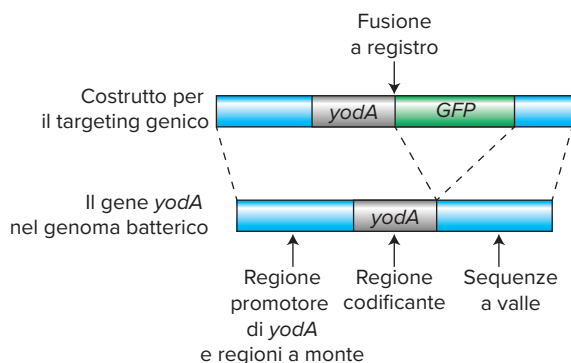
Si noti che le regioni necessarie per l'espressione genica, in particolare il promotore del gene *yodA* e le sequenze Shine-Dalgarno coinvolte nell'inizio della traduzione, dovranno rimanere al lo-

ro posto nel cromosoma batterico dopo lo scambio genico. In definitiva, le cellule contenenti il gene *yodA* alterato presentano una fluorescenza verde quando è presente il cadmio perché la trascrizione dal promotore *yodA* avviene solo quando l'ambiente contiene questo metallo pesante.



b. Il gene *yodA* non è più funzionale dopo il gene targeting perché l'ORF del gene è completamente sostituita da quella della GFP; non viene prodotta alcuna proteina YodA.

c. Se il costrutto di targeting genico fosse modificato modo che le sequenze codificanti GFP fossero fuse, all'estremità 5' o all'estremità 3', a registro con le sequenze codificanti *yodA*, la proteina di fusione potrebbe funzionare sia come YodA sia come YodA GFP (fluorescente). Un esempio di costrutto del gene di fusione *yodA:GFP* per il targeting genico (con GFP fuso all'estremità 3' di *yodA*) è mostrato nel diagramma che segue:



15.32 In primo luogo, si confrontano le sequenze di basi dei 79 geni misteriosi con il database GenBank usando BLAST, per trovare somiglianze con geni con funzione nota. Queste somiglianze potrebbero essere rilevate nella regione codificante e definire i domini funzionali delle proteine, oppure, per i geni non codificanti, potrebbero essere nelle sequenze di basi degli RNA, che definiscono le regioni funzionali della molecola di RNA. Presumibilmente, i ricercatori che hanno realizzato Syn 3.0 hanno già svolto questo lavoro di bioinformatica.

L'approccio genetico tipico per studiare le funzioni dei 79 geni consiste nell'utilizzare il targeting genico per creare 79 ceppi, ciascuno con un allele amorfo di uno dei geni (vedi Figura 15.30). È quindi possibile analizzare ogni ceppo in diversi modi per ottenere informazioni su ciò che il prodotto genico assente potrebbe normalmente fare. Per esempio, i batteri sono vitali in condizioni di crescita normali? O in qualsiasi condizione di crescita? I ceppi mutanti richiedono un particolare supplemento nel terreno minimo (sono auxotrofi) o una particolare temperatura di crescita (sono sensibili alla temperatura)?

Per qualsiasi ceppo mutante senza un fenotipo mutante distinguibile, si può valutare la "letalità sintetica" nei doppi mutanti: batteri con un allele amorfo del gene misterioso (m^-) e un allele amorfo, ma vitale, di un altro gene la cui funzione è nota (gene *a*, e l'allele mutante è quindi a^-). I ceppi che sono m^- o a^- sono vitali; se i batteri doppio mutanti, $m^- a^-$, sono non vitali o mostrano qualche altro fenotipo mutante, allora la funzione del gene misterioso potrebbe essere almeno parzialmente ridondante con la funzione del gene *a*.

15.33 a. La penicillina uccide i batteri impedendo loro di sintetizzare la parete cellulare dopo che si sono divisi. In altre parole, la penicillina uccide solo le cellule che stanno crescendo, ma non le cellule che non stanno crescendo. I rari auxotrofi per la cisteina non si dividono in un mezzo privo di ci-

steina, quindi sopravvivono per qualche tempo in presenza di penicillina. Queste cellule non cresceranno, ma non moriranno. Le cellule prototrofe cresceranno in assenza di cisteina e la penicillina le ucciderà.

b. Per lo screening degli auxotrofi per la cisteina, le cellule che sopravvivono alla selezione della penicillina devono essere piastrate su terreno minimo integrato con cisteina, e quindi replicate su un terreno minimo. Le colonie che crescono sulla prima piastra ma non crescono sul terreno minimo sono gli auxotrofi per la cisteina.

c. La procedura di arricchimento non funzionerebbe se il ceppo di partenza contenesse un plasmide con il gene *pen^r* perché tutte le cellule sarebbero resistenti alla penicillina, indipendentemente dal fatto che siano auxotrofi per la cisteina o meno. L'enzima penicillinasi codificato da questo gene scinde la penicillina e la inattiva.

15.34 Si coltiva il ceppo resistente sul terreno con penicillina radioattiva, quindi si purificano i batteri. Le cellule mutanti *penB* o *mtr* conteranno poca radioattività perché impediscono alla penicillina di entrare nella cellula (*penB*) o ne pompino fuori la maggior parte dopo che è entrata (*mtr*). I mutanti *penA* o i batteri che producono penicillinasi saranno radioattivi perché in entrambi i casi la penicillina radioattiva è presente nelle cellule. Si potrebbe anche verificare se la radioattività nelle cellule sia contenuta nella penicillina intatta o nella forma degradata esaminando il contenuto delle cellule mediante cromatografia.

15.35 Si potrebbe sequenziare il DNA dei batteri trovati in uno qualsiasi di questi ambienti, e quindi ricercare ORF che codificano per proteine con amminoacidi o strutture tridimensionali caratteristiche degli enzimi di sintesi delle tossine. Se vengono scoperti uno o più geni con una sequenza per la sintesi della tossina, i geni clonati potrebbero essere usati per produrre in *E. coli* le proteine codificate (vedi Capitolo 17). È ipotizzabile che il trasferimento orizzontale di questi geni in *E. coli* permetta alle cellule trasformate di produrre nuove tossine. In alternativa, la proteina o le proteine possono essere purificate da *E. coli* e le sue (loro) proprietà possono essere studiate.

15.36 a. A differenza degli antibiotici, i fagi non possono entrare nelle cellule umane. Questo fatto ridurrebbe al minimo gli effetti collaterali che potrebbero essere associati alla tossicità del farmaco per le cellule umane. Un altro vantaggio dei fagi è che sono specie-specifici per quanto riguarda i

loro ospiti. Pertanto, a differenza degli antibiotici ad ampio spettro, è improbabile che il trattamento con i fagi elimini molte specie nel microbioma di un paziente.

b. I fagi sono specie-specifici nei loro ospiti; sarà quindi difficile trovare fagi che infettino e uccidano agenti patogeni specifici. Inoltre, l'introduzione di fagi nell'uomo può causare una pericolosa reazione immunitaria.

c. Se i batteri diventano resistenti alle infezioni da parte di un fago specifico, devono essere utilizzati fagi diversi che uccidono gli stessi agenti patogeni.

15.37 a. I batteri possono produrre veleni (battericidi) che uccidono altre specie di batteri, ma non se stessi. Per esempio, le specie *Streptomyces* che producono la tetraciclina, devono avere una particolare struttura della subunità ribosomiale 30S che non può legare la tetraciclina. Allo stesso modo, le altre specie di *Streptomyces* che producono kanamicina devono avere una particolare struttura della subunità ribosomiale 30S che non può legare la kanamicina. La produzione di battericidi consente a una specie batterica di competere con successo per risorse limitate, uccidendo altre specie nell'ambiente.

b. Ricordiamo che la penicillina uccide i batteri legando la proteina transpeptidasi e impedendo

a questo enzima di ricostruire lo strato di peptidoglicani della parete cellulare batterica dopo la divisione cellulare (Figura 15.33). Le cellule umane non hanno una parete cellulare con uno strato di peptidoglicani, quindi la penicillina non uccide le cellule umane.

c. Le parti del ribosoma umano che legano i tRNA carichi o sono responsabili dell'allineamento dell'mRNA devono avere strutture diverse rispetto alle stesse parti del ribosoma 30S nei batteri. Queste differenze implicano che nessuno dei due farmaci può legare il ribosoma umano.

d. I batteri potrebbero sviluppare resistenza sia alla tetraciclina sia alla kanamicina accumulando mutazioni con perdita di funzione nei geni i cui prodotti consentono alle piccole molecole di entrare nella cellula (come *penB*) o mutazioni con guadagno di funzione nei geni (come *mtr*) per proteine che pompano le piccole molecole fuori dalla cellula. Mutazioni nei geni per le componenti delle subunità ribosomali 30S che legano i tRNA carichi potrebbero impedire il legame della tetraciclina senza danneggiare la funzione del ribosoma. Allo stesso modo, mutazioni nei geni per quelle componenti ribosomali 30S che allineano l'mRNA potrebbero impedire il legame della kanamicina senza danneggiare la funzione del ribosoma.