

Soluzioni del Capitolo 18

- 18.1** a. 7; b. 6; c. 1; d. 9; f. 8; g. 2; h. 4; i. 3; j. 10; l. 5
- 18.2** a. Eucarioti.
b. Sia procarioti sia eucarioti.
c. Eucarioti.
d. Procarioti.
e. Sia procarioti sia eucarioti.
- 18.3** Vengono rimossi gli introni, la ribonucleasi taglia il trascritto primario al 3' e viene aggiunta la coda poli-A, poi viene aggiunto il cappuccio metilato al 5'.
- 18.4** a. Le acetiltransferasi istoniche sono co-attivatori; gli istoni acetilati riducono il contatto con il DNA.
b. Le metiltransferasi istoniche possono essere co-attivatori o co-repressori a seconda dei particolari amminoacidi delle code istoniche che metilano.
c. Le deacetilasi istoniche sono co-repressori; gli istoni deacetilati aumentano la loro affinità per il DNA.
d. Le demetilasi istoniche possono essere co-attivatori o co-repressori a seconda degli amminoacidi delle code istoniche che demetilano.
- 18.5** a. pol III.
b. pol II.
c. pol I.
d. pol II.
- 18.6** Il promotore deve essere localizzato nel frammento numero 5, tra M-H, poiché ognuno dei cloni, che mostra livelli basali di trascrizione, contiene questo frammento, e i cloni senza questo frammento non producono β -galattosidasi. L'enhancer è presente nel frammento numero 3, tra H-M, poiché quella sequenza si trova nei due cloni (sei e otto) che mostrano espressione elevata.
- 18.7** a. Legame per il DNA.
b. Legame per il DNA.
c. Dimerizzazione.
d. Attivatori trascrizionali.
e. Legame per il DNA.
- 18.8** La sequenza deleta a monte di *Sox9* nei genomi delle femmine XY con inversione sessuale deve contenere l'enhancer di *Sox9* che lega la proteina SRY. In questi individui XY, SRY non può legare il suo bersaglio, quindi la cascata di eventi di regolazione genica a valle di SRY che normalmente porterebbe alla mascolinità non si verifica; queste persone si sviluppano come femmine perché il sesso femminile è quello che si sviluppa di default.
- 18.9** a. (I) Per identificare gli enhancer di un gene, fondere il reporter con (z), frammenti di DNA genomico attorno al gene. Un frammento genomico che include un enhancer causerà l'espressione di GFP in almeno alcuni dei tessuti in cui il gene endogeno è normalmente espresso nei topi. (Il particolare pattern di espressione del reporter osservato dipenderà da quanti enhancer contiene il gene endogeno e quanti di questi enhancer sono stati fusi con il gene reporter.)
(II) Per esprimere GFP con specificità di tessuto, fondere il reporter con (y), un enhancer noto specifico del rene. GFP sarà espresso nel rene. Una risposta alternativa è (z), frammenti di DNA genomico che circondano un gene. Questo approccio funzionerà se è noto che il gene abbia espressione tessuto-specifica; è probabile che uno o più frammenti di DNA in prossimità del gene contengano un enhancer che determina questa espressione tessuto-specifica.
(III) Per identificare i geni espressi nei neuroni, fondere il reporter con (x), sequenze casuali del genoma del topo. Quelli che contengono enhancer attivi nei neuroni causeranno l'espressione di GFP nei neuroni; questi enhancer possono poi essere utilizzati per identificare i geni sotto il loro controllo.

b. Come esempio di espressione ectopica, supponiamo che il gene di interesse non sia espresso normalmente nei reni. Se si fonde il gene del topo con (y), un noto enhancer specifico del rene, il gene dovrebbe quindi essere espresso ectopicamente nei reni. Questo approccio dovrebbe funzionare con qualsiasi enhancer caratterizzato perché si potrebbe prevedere dove verrà espresso il gene di fusione.

Si potrebbe voler esprimere un gene ectopicamente per determinare se risulterà un fenotipo mutante. La natura di quel fenotipo a volte può rivelare informazioni sulla normale funzione del gene.

18.10 L'espressione costitutiva dei geni del galattosio nel lievito si osserverà se non c'è modo per prevenire il legame della proteina GAL4 al DNA. Quindi, una mutazione GAL80, in cui la proteina non è prodotta o è prodotta ma non può legarsi alla proteina GAL4, preverrà la repressione e guiderà a una sintesi costitutiva. Una mutazione GAL4, che inibisce il legame alla proteina GAL80, sarà pure costitutiva. Una mutazione del DNA al sito di legame per la proteina GAL4 darà, inoltre, sintesi costitutiva.

18.11 Se *Id* agisce da *quenching* deve interagire con MyoD, mentre se blocca l'accesso a un enhancer deve legare il DNA. Sperimentalmente si può verificare se lega la regione regolativa di un gene regolato da MyoD.

18.12 a. Assumiamo qui che il costrutto in questione abbia un enhancer, un promotore e sequenze codificanti per GFP e che questi tre elementi rimangano insieme mentre il DNA si sposta in posizioni diverse nel genoma. Per bloccare la funzione dell'enhancer, è necessario posizionare un isolatore tra l'enhancer e il promotore, cosa impossibile con questo disegno sperimentale.

b. Per identificare gli isolatori è possibile creare un costrutto contenente un enhancer come quello in Figura 18.17 e inserire sequenze genomiche casuali tra l'enhancer e il promotore che guida l'espressione di *RFP*. Se il frammento di DNA contiene un isolatore, i moscerini trasformati con il costrutto esprimeranno GFP, ma non RFP. Questo esperimento sarà in pratica limitato dal numero di ceppi diversi di drosofile transgeniche che si potrebbe produrre; cioè, probabilmente si potrebbe testare solo un numero limitato di frammenti casuali per verificare se contengono isolatori.

18.13 La RNA polimerasi trascrive ad alta efficienza in vitro il DNA eucariotico nudo. Il PEV e l'eterocromatizzazione inibiscono l'espressione genica.

18.14 a. Splicing differenziale: lo splicing dell'RNA di qualsiasi tipo si verifica solo negli eucarioti.

b. Regolazione positiva: si verifica sia nei procarioti sia negli eucarioti attraverso regolatori positivi nei procarioti e attivatori negli eucarioti.

c. Compattazione della cromatina: solo gli eucarioti hanno la cromatina.

d. Attenuazione della trascrizione attraverso la traduzione dell'RNA leader: solo procarioti. I trascritti vengono tradotti durante l'allungamento della trascrizione solo nei procarioti; negli eucarioti, la trascrizione nel nucleo è fisicamente separata dalla traduzione nel citoplasma.

e. Regolazione negativa: si verifica sia nei procarioti sia negli eucarioti attraverso i repressori.

f. Regolazione traduzionale da parte di piccoli RNA: si verifica sia nei procarioti sia negli eucarioti; nei procarioti attraverso gli sRNA e negli eucarioti attraverso i miRNA e siRNA e piRNA.

18.15 a. TBP lega direttamente il DNA al promotore (al TATA box).

b. I TAF legano il DNA del promotore indirettamente, attraverso il legame con il TBP.

c. Il complesso proteico mediatore collega le proteine attivatrici legate all'enhancer e i fattori basali legati al promotore; si potrebbe affermare che il mediatore non lega né l'enhancer né il promotore, o entrambi indirettamente.

d. La RNA pol II lega il promotore indirettamente attraverso i fattori basali.

e. Gli attivatori si legano direttamente al DNA enhancer.

f. I co-attivatori legano gli enhancer indirettamente legandosi agli attivatori.

g. Gli omodimeri jun-jun sono fattori di trascrizione che legano direttamente gli enhancer.

h. I repressori indiretti possono o meno legare il DNA (vedi Figura 18.12.) Quelli che agiscono attraverso la competizione legano direttamente il DNA enhancer; quelli che agiscono attraverso il *quenching* legano il DNA indirettamente attraverso attivatori; quelli che funzionano attraverso il "sequestro nel citoplasma" o l'eterodimerizzazione non legano affatto il DNA.

i. I repressori legano direttamente gli enhancer.

j. I co-repressori legano gli enhancer indirettamente attraverso i repressori.

18.16 a. La proteina Jmjd1a è un co-attivatore della trascrizione di *Sry*.

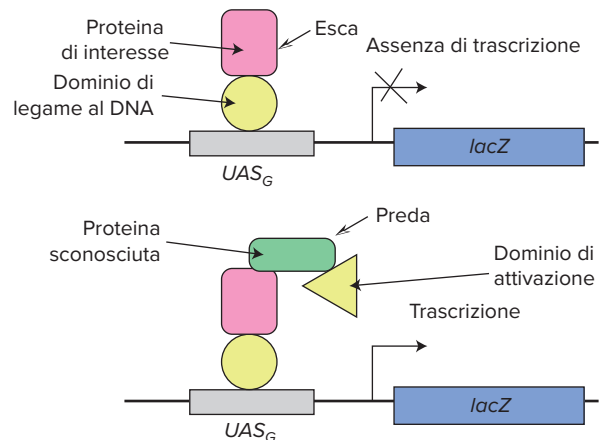
b. Usando gli anticorpi diretti contro le proteine attivatrici trascrizionali candidate, è possibile eseguire un esperimento CHIP-Seq per identificare quegli attivatori che si legano all'enhancer

del gene *Sry* nelle cellule delle gonadi embrionali di topo. Quindi, si potrebbe verificare se una di queste proteine si lega in modo specifico a *Jmjd1a* eseguendo un esperimento di co-immunoprecipitazione con estratti ottenuti dalle cellule di gonadi embrionali di topo. (Cioè, usando anticorpi diretti sia contro una proteina attivatrice che lega l'enhancer di *Sry* sia contro lo stesso *Jmjd1a*, si può verificare se esiste qualche complesso nelle cellule che contiene entrambe le proteine. Si usano estratti da questi tipi di cellule specifiche perché sono quelle in cui si prevede che si verificherà una tale interazione.)

c. La proteina *Jmjd1a* può essere guidata sulla cromatina del gene bersaglio *Sry*, da fattori che legano il gene o il suo enhancer con specificità di sequenza.

- 18.17** Gli eventi che possono influenzare il tipo o la quantità di proteine prodotte in una cellula eucariotica includono: elaborazione del trascritto (incluso lo splicing alternativo dell'RNA), esportazione dell'mRNA dal nucleo, stabilità dell'mRNA, cambiamenti nell'efficienza della traduzione (inclusa la regolazione da parte dei miRNA), stabilità del prodotto proteico, modificazione chimica post-traduzionale delle proteine e localizzazione del prodotto proteico in organelli specifici.
- 18.18** L'mRNA per questo gene è prodotto in tutti i tessuti esaminati, mentre la proteina viene sintetizzata solo nelle cellule muscolari. L'espressione di questo gene è regolata a livello traduzionale.
- 18.19 a.** Rapporto 9:7 di piante blu rispetto a bianche;
b. Rapporto 15:1 di blu a bianche.
- 18.20** L'mRNA di 1,2 kb nelle cellule dell'epidermide e l'mRNA di 1,3 kb nei neuroni potrebbero essere dovuti o a un differente sito di inizio per la trascrizione nei due tipi di cellule o a splicing alternativo del trascritto primario nei due tipi di cellule.
- 18.21** Le regioni non tradotte al 5' e al 3' possono essere clonate al 5' e al 3' di un gene reporter e reintrodotti in un embrione precoce di *Drosophila* per verificare se una delle due controlla la traducibilità della proteina reporter.
- 18.22** La proteina, nelle cellule del tessuto adiposo, potrebbe essere modificata post-traduzionalmente (per esempio, fosforilata o defosforilata), così che possa essere attiva solo nelle cellule del tessuto adiposo. Alternativamente, la proteina potrebbe richiedere un cofattore per essere attivata, e questo cofattore può essere trascritto solo nelle cellule del tessuto adiposo.
- 18.23** Il costrutto $UAS_G::lacZ$ è un gene reporter che "rileva" l'interazione tra la proteina di interesse

(l'esca) e una proteina codificata da un cDNA (la preda). Il dominio di legame al DNA di Gal4 porta la proteina esca all' UAS_G . Se il cDNA della preda codifica una proteina che interagisce con la proteina dell'esca, anche il dominio di attivazione Gal4 verrà reclutato sull' UAS_G . Le due proteine di fusione legate insieme costituiscono un attivatore completo: il dominio di legame al DNA e il dominio di attivazione. L'espressione della β -galattosidasi segnerà la presenza di una proteina preda che interagisce con la proteina esca:



Per identificare le proteine che interagiscono con una proteina di interesse (l'esca), si dovrebbero prelevare cellule di lievito precedentemente trasformate con il plasmide reporter ($UAS_G::lacZ$) e il plasmide esca (codificante la proteina di fusione tra la proteina di interesse e il dominio di legame di GAL4 al DNA) e trasformare queste cellule con una libreria di cDNA preda (in cui ogni clone può esprimere una proteina di fusione tra la proteina codificata dal cDNA e il dominio di attivazione di Gal4). Ogni colonia di lievito conterrà un plasmide preda diverso della genoteca. Se l'esca e la proteina preda interagiscono tra loro, il dominio di attivazione sarà portato a UAS_G e *lacZ* sarà espressa. Le colonie che esprimono la β -galattosidasi saranno blu sulle piastre contenenti X-gal. Il plasmide della preda può essere purificato e il suo cDNA identificato, consentendo di individuare una proteina che interagisce con la proteina di interesse.

- 18.24 a.** Si produce un anticorpo contro la proteina simile all'Argonauta e si usa per purificare i complessi tra questa proteina e gli RNA all'interno delle cellule umane. Per fare ciò, si devono prima isolare i complessi RNA-proteina dalle cellule e provare a stabilizzare questi complessi mediante cross-link covalenti con un reagente come la for-

maldeide. Bisogna quindi immunoprecipitare i complessi contenenti la proteina simile ad Argonauta usando l'anticorpo preparato. Dopo aver rimosso con le proteasi le proteine presenti in questi complessi, si convertono gli RNA immunoprecipitati in cDNA usando la trascrittasi inversa. Quindi si sequenziano i cDNA recuperati e si confrontano le sequenze con quelle di miRNA umani conosciuti.

b. In un topo privo della proteina simile ad Argonauta, qualsiasi mRNA che esso reprime sarebbe più abbondante rispetto a un topo di tipo selvatico. Si esegue quindi un'analisi di RNA-Seq, confrontando gli mRNA del topo mutante e la sua controparte di tipo selvatico più strettamente correlata. Si cercano mRNA che sono più rappresentati nel mutante rispetto al trascrittoma di tipo selvatico.

18.25 a. Le mutazioni nulle nel gene *Sxl* non hanno conseguenze per i maschi XY, ma sono letali per le femmine omozigoti XX. I maschi normalmente non esprimono *Sxl*. Il motivo per cui l'assenza di *Sxl* uccide gli animali XX (femmine), anziché trasformarli in maschi, è che il processo di compensazione del dosaggio (che parifica l'attività trascrizionale dei geni legati all'X nei maschi e nelle femmine) è a valle di *Sxl*. La proteina *Sxl* nelle femmine XX normali porta alla riduzione della trascrizione dei geni legati all'X. Al contrario, i geni legati all'X dei moscerini XX prive di *Sxl* sono sovraespressi e questo è letale.

Gli alleli *Sxl* attivi costitutivamente sono trascritti in entrambi i moscerini XY e XX. Poiché le femmine XX esprimono comunque *Sxl*, *Sxl* costitutivamente attivo non avrebbe alcun effetto nelle femmine, ma i maschi (XY) morirebbero. Nelle mosche XY con un allele costitutivamente attivo, la proteina *Sxl* ridurrebbe la quantità di espressione genica legata all'X a circa la metà di quella dei moscerini XY normali; il risultato è la letalità.

b. Come spiegato nella parte (a), gli effetti letali delle mutazioni *Sxl* sono tutti dovuti ad anomalie nella compensazione del dosaggio.

c. Gli alleli nulli di *tra* trasformano le mosche XX (femmine) in maschi sia morfologicamente sia

dal punto di vista comportamentale. Senza la proteina Tra, viene prodotto Dsx-M invece di Dsx-F e viene prodotto Fru-M invece di Fru-F. Questi moscerini maschi sono sterili perché mancano del cromosoma Y e quindi dei geni del cromosoma Y che contribuiscono alla fertilità maschile.

Gli alleli *tra* costitutivamente attivi trasformano le mosche XY (maschi) in femmine sia morfologicamente sia dal punto di vista comportamentale, perché vengono espressi Dsx-F e Fru-F invece di Dsx-M e Fru-M.

d. I mutanti *tra* sopravvivono al contrario di quelli *Sxl* perché *Sxl* controlla la compensazione del dosaggio, mentre *tra* no; il gene *tra* controlla il sesso morfologico e il comportamento. Nelle parti (a) e (b) si è visto che la letalità specifica del sesso associata ai mutanti *Sxl* riflette le anomalie nella compensazione del dosaggio.

e. Poiché Tra-2 è necessario per la funzione Tra, gli effetti della perdita di funzione di *tra-2* sarebbero equivalenti alla perdita di funzione di *tra*: i moscerini XX si trasformano in maschi morfologici e comportamentali (che sono sterili per l'assenza del cromosoma Y), mentre i moscerini XY sarebbero maschi normali.

f. Animali XX senza funzione di Tra sarebbero trasformati in maschi morfologici e comportamentali [vedi parte (c)]. Poiché i maschi *tra*–XX esprimono Fru-M, mostrerebbero un comportamento sessuale maschile e cercherebbero di accoppiarsi con le femmine.

18.26 a. Poiché i depositi di amiloide contengono sia la proteina TTR normale sia quella mutata, la malattia deve manifestarsi negli eterozigoti e quindi l'allele della malattia deve essere dominante rispetto all'allele normale.

b. Un filamento della molecola di RNA a doppio filamento deve essere un piccolo RNA interferente (siRNA) che guida un complesso proteico Argonauta sull'mRNA *TTR*. L'effetto del farmaco è quello di degradare gli mRNA *TTR*. Il problema con questo approccio è che verrebbero degradati sia gli mRNA *TTR* normali sia quelli mutanti, e la perdita della normale proteina TTR potrebbe causare effetti collaterali.