

Soluzioni del Capitolo 17

17.1 a. 10; b. 8; c. 5; d. 2. e. 7; f. 1; g. 9; h. 6; i. 3; j. 4.

17.2 Il primo passaggio dell'espressione genica è il legame della RNA polimerasi al promotore. Se il controllo principale dell'espressione genica avvenisse in stadi successivi della trascrizione o della traduzione, le cellule a volte sprecherebbero energia producendo RNA che non verrebbero utilizzati. I batteri chiaramente evolvono sotto il vincolo di conservare l'energia che ottengono dai nutrienti dei loro ambienti.

17.3 a. I, II, III. I primi due, I e II, riflettono la velocità con cui viene avviata la trascrizione di diversi operoni. Questa velocità dipenderà dall'affinità intrinseca del promotore di ciascun operone per l'RNA polimerasi: alcuni promotori sono più forti di altri. (Sebbene non sia nell'elenco, anche il legame di proteine che legano il DNA, con specificità di sequenza, come repressori o regolatori positivi, alle sequenze di DNA vicino ai promotori regola i livelli di mRNA.) Inoltre, i promotori sono riconosciuti da RNA polimerasi diverse, alcuni fattori sigma potrebbero essere necessari affinché l'RNA polimerasi riconosca alcuni promotori e non altri. Il punto III indica che il livello al quale un mRNA si accumula nella cellula dipende non solo dalla sua velocità di trascrizione, ma anche dalla sua velocità di degradazione. Diversi mRNA possono essere degradati a velocità diverse a causa di differenze nelle loro strutture, riconosciute dalle varie ribonucleasi della cellula.

b. IV, V, VI. Il punto IV è piuttosto interessante. Negli operoni i geni distali, più lontani dal promotore, possono essere trascritti in modo meno efficiente o più tardivamente rispetto ai geni prossimali, più vicini al promotore. Se l'mRNA dell'operone è lungo, la RNA polimerasi impiegherà alcuni minuti per raggiungere i geni distali. L'RNA polimerasi a volte potrebbe staccarsi

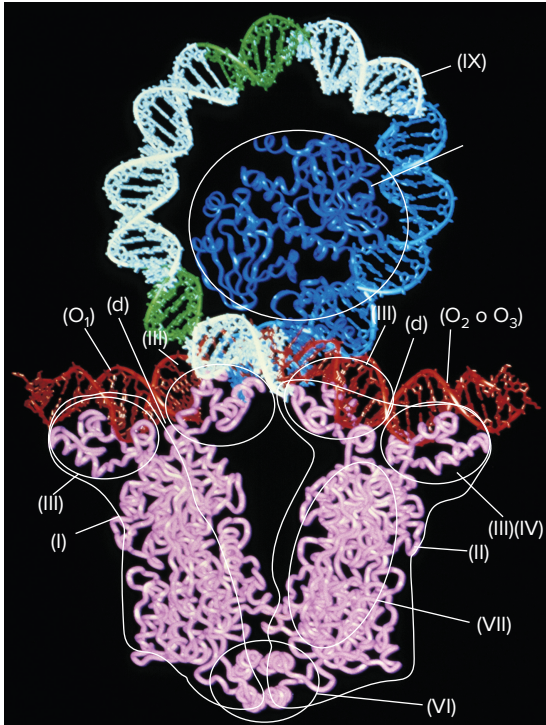
dal DNA o incontrare segnali di terminazione della trascrizione prima di trascrivere i geni distali. Poiché nei batteri la trascrizione e la traduzione sono accoppiate, la trascrizione dei geni distali potrebbe effettivamente essere regolata dalla velocità con cui vengono tradotti i geni prossimali nello stesso mRNA. Il punto V indica che l'efficienza dell'inizio della traduzione per geni dello stesso operone può variare a causa delle differenze nelle sequenze Shine-Dalgarno e a causa delle differenze nel ripiegamento tridimensionale dei vari siti di legame del ribosoma. Il punto VI è importante perché la quantità di proteine che si accumula in una cellula non è dovuta solo alla velocità con cui viene tradotta, ma anche alla velocità con cui quella proteina viene degradata.

17.4 La mancanza della funzione della proteina Rho è letale per la cellula, per questo la funzione del gene *rho* è essenziale. La mutazione condizionale è l'unico tipo di mutazione che può essere isolata per i geni essenziali.

17.5 a. La caratteristica chiave di un fattore di trascrizione che gli conferisce specificità per uno o più geni specifici è la sequenza amminoacidica del suo dominio di legame al DNA. Questa sequenza di amminoacidi determina la forma complessiva del dominio di legame al DNA e quindi anche la specificità del dominio per la sequenza di basi del DNA. L'affinità di un fattore di trascrizione per una sequenza specifica di basi (di solito nel solco maggiore del DNA) è dovuta alla somma dei contatti stabiliti tra particolari amminoacidi all'interno del dominio di legame al DNA e basi specifiche dell'elemento ad azione *cis*, cui il fattore di trascrizione si lega. Queste interazioni non covalenti tra amminoacidi e basi sono le forze che determinano quanto strettamente un fattore di trascrizione si lega a una specifica se-

quenza di basi nel DNA, ovvero la frequenza con cui il fattore di trascrizione occupa il suo sito di legame.

b. La Figura 17.18 è riprodotta di seguito. Vengono illustrate le varie componenti del sistema di regolazione dell'operone *lac*.

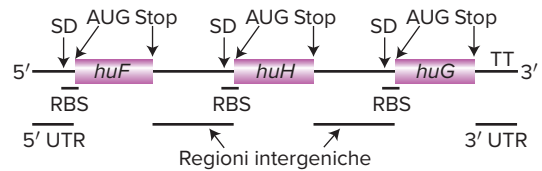


c. L'ansa si forma perché i due dimeri del repressore Lac si legano ciascuno a siti dell'operatore che si trovano a una certa distanza l'uno dall'altro lungo la molecola di DNA, e perché i dimeri si uniscono per formare un tetramero del repressore Lac.

d. Vedi la figura nella parte (b) per gli assi di simmetria (sono le due linee contrassegnate con "d"). La simmetria rotazionale si verifica perché ogni sito dell'operatore ha due sequenze, quasi identiche, in configurazione speculare. Si può osservare che ciascuno degli operatori mostra simmetria rotazionale perché i due monomeri del repressore Lac, all'interno di ciascun dimero, hanno domini di legame al DNA disposti l'uno verso l'altro, coerentemente con la configurazione speculare delle sequenze di DNA quasi identiche nell'operatore.

17.6 Le mutazioni nella regione del promotore possono agire solo in *cis* sui geni strutturali immediatamente adiacenti a questa sequenza regolatrice. Questa mutazione nel promotore non avrà nessun effetto sull'espressione di un secondo operone normale.

17.7



La trascrizione (vedi Figura 8.10) inizia con la prima base all'estremità 5' dell'mRNA mostrato sopra. L'RNA polimerasi trascrive il filamento di DNA stampo fino a raggiungere il segnale di terminazione della trascrizione (TT). Il segnale di terminazione della trascrizione potrebbe essere un'ansa a forcina (un segnale di terminazione intrinseco) vicina, ma non direttamente, all'estremità 3' dell'mRNA, o, in alternativa, potrebbe essere una sequenza vicina all'estremità 3' dell'mRNA che è legata da un fattore proteico come Rho (una sequenza di terminazione estrinseca).

La traduzione (vedi Figura 8.25) inizia quando un ribosoma si lega al sito di legame del ribosoma (RBS) nell'mRNA, che è costituito dalla sequenza Shine-Dalgarno (SD) e, a breve distanza a valle, dal codone di inizio (AUG). I rettangoli in rosa rappresentano le regioni tradotte (registri di lettura aperti od ORF) di ciascun gene. Si noti che la traduzione inizia in tre posizioni separate, una per ciascun gene nell'operone. Nei procarioti l'amminoacido iniziale è fMet. La traduzione termina con un codone non senso (Stop), che porta al rilascio del polipeptide e alla dissociazione delle subunità ribosomali.

Si noti che diverse regioni nell'mRNA non vengono tradotte. Queste includono le sequenze a monte della prima sequenza SD, nota come 5'UTR (regione non tradotta), chiamata anche sequenza leader dell'RNA. Altre regioni non tradotte dell'mRNA includono le sequenze comprese tra ciascuna ORF (le regioni intergeniche) e le sequenze a valle dell'ultima ORF (3'UTR) che contengono il segnale di terminazione della trascrizione TT.

17.8 L'affermazione (b) sarà vera, mentre l'affermazione (a) sarà falsa. Quando un regolatore positivo è inattivato, l'espressione dell'operone sarà molto ridotta.

17.9 a. Quando il gene che codifica per questa proteina che lega il DNA subisce una mutazione con perdita di funzione, il risultato è l'espressione costitutiva dell'operone *emu*. Pertanto, la proteina regolativa di tipo selvatico blocca la trascrizione; in altre parole, è un regolatore negativo dell'espressione dell'operone *emu*. Si può immaginare, per esempio, che la proteina che lega il

DNA possa essere un repressore come il repressore Lac. Si potrebbe allo stesso modo immaginare che il sito di regolazione a cui si lega la proteina di legame del DNA sia simile al sito dell'operatore nell'operone Lac.

b. Il ceppo (I) avrà un'espressione inducibile di *emu1* e costitutiva di *emu2*, mentre il ceppo (II) avrà un'espressione inducibile sia di *emu1* sia di *emu2*. In entrambi i ceppi, la proteina Emu2 può essere prodotta solo dal gene strutturale sul plasmide F', mentre la proteina Emu1 può essere prodotta solo dal gene strutturale sul cromosoma batterico. Entrambi i ceppi dovrebbero avere una quantità sufficiente di proteina Reg2 per reprimere la trascrizione degli operoni *emu* sul plasmide o sul cromosoma, perché gli alleli wild-type del gene *reg2* dovrebbero essere dominanti rispetto agli alleli mutanti con perdita di funzione e perché le proteine di legame come repressore *lac* agiscono in *trans*.

Nel ceppo (I), l'unico gene funzionale *emu1*⁺ (sul cromosoma batterico) è normalmente regolato (cioè è inducibile) perché il sito di legame sul DNA, *reg1* ad azione *cis* (operatore), è intatto e può interagire con il repressore Reg2. Tuttavia, il plasmide F', con l'unico gene funzionale *emu2*⁺, manca di un operatore *reg1* funzionale. Il repressore Reg2 non può regolare l'operone sul plasmide F', quindi l'espressione di *emu1* è costitutiva (l'operone viene trascritto costitutivamente).

Nel ceppo (II), gli operoni *emu* sia sul plasmide F', sia sul cromosoma batterico, hanno operatori *reg1*⁺ funzionali. Il legame a questi operatori della proteina repressore Reg2 rende inducibile l'espressione dei geni strutturali *emu1* ed *emu2*.

c. Il ceppo (I) avrà un'espressione inducibile di *emu1* ed *emu2*, mentre il ceppo (II) avrà un'espressione inducibile di *emu1* e costitutiva di *emu2*. In questo caso, entrambi i ceppi avranno un repressore Reg1 ad azione in *trans* in quantità sufficiente. Il ceppo (II) ha operatori funzionali sia sul plasmide F', sia sul cromosoma batterico, mentre l'unico operatore funzionale nel ceppo (II) è sul cromosoma batterico. Pertanto, l'espressione di *emu1*⁺ dall'operone sul cromosoma batterico sarà normalmente inducibile, mentre l'espressione di *emu2*⁺ dall'operone sul plasmide F' sarà costitutiva perché il repressore Reg1 non può legarsi all'operatore mutante.

17.10 Le cellule non lisogeniche riceventi non possedevano il repressore CI, per cui il fago infettante ha potuto procedere attraverso il ciclo litico.

17.11 Questi revertanti dell'espressione costitutiva dell'operone *lac* potrebbero derivare da cambiamenti di basi nella sequenza del sito operatore che compensa una mutazione di senso nel gene *lacI*. Per esempio, una mutazione nella sequenza dell'operatore potrebbe permettere alla proteina mutante LacI di riconoscere e legare di nuovo l'operatore. Questo scenario sarebbe improbabile se la mutazione del gene *LacI* fosse una mutazione non senso o frameshift.

17.12 Alcuni suggerimenti per capire la logica di questo problema: le colonie saranno blu se viene prodotta la β -galattosidasi (il che significa che è presente e trascritto un gene *lacZ*⁺) e se X-gal è presente e può entrare nella cellula (cioè le cellule sono *lacY*⁺). La trascrizione dell'operone *lac* si verificherà se un induttore (lattosio o IPTG) è presente e può entrare nella cellula (di nuovo, le cellule sono *lacY*⁺), o se le mutazioni nel cromosoma batterico rendono costitutivo l'operone *lac*. Alti livelli di glucosio impediscono il controllo positivo della trascrizione dell'operone *lac* da parte di CRP-cAMP.

a. Con il lattosio come unica fonte di carbonio, i batteri wild-type, *lacI*⁻ od *O*^C formerebbero colonie; l'operone *lac* è indotto dal lattosio nel wild-type ed è trascritto costitutivamente nei mutanti *lacI*⁻ od *O*^C. I batteri *lacZ*⁻ o *lacY*⁻ non formerebbero colonie; in assenza di β -galattosidasi, i mutanti *lacZ*⁻ non possono degradare il lattosio e, senza permeasi, le cellule *lacY*⁻ non permetteranno al lattosio di entrare nella cellula. La proteina "super-repressore", codificata da *lacI*^S, impedirà la trascrizione di qualsiasi operone *lac* con un operatore di tipo selvatico, anche se è presente anche un repressore normale codificato da *lacI*. I batteri *lacI*^S non formerebbero colonie perché il super-repressore impedirebbe la trascrizione dell'operone *lac*.

b. I batteri wild-type, *lacI*⁻ od *O*^C produrranno colonie blu; l'IPTG induce l'operone *lac* nelle cellule wild-type e quindi viene prodotta la β -galattosidasi, i mutanti *lacY*⁻ producono la β -galattosidasi (il prodotto del gene *lacZ*⁺) e l'operone è sempre attivo nei mutanti *lacI*⁻ od *O*^C e così viene prodotta la β -galattosidasi. I batteri *lacZ*⁻ o *lacY*⁻ produrranno colonie bianche; i mutanti *lacZ*⁻ non producono β -galattosidasi e i batteri *lacY*⁻ non consentono all'IPTG di entrare nella cellula. (Si noti che la permeasi non è necessaria per importare nella cellula la fonte di carbonio glicerolo.) Allo stesso modo, i batteri *lacI*^S formeranno colonie bianche perché il loro operone *lac* non può essere trascritto.

c. Senza IPTG, l'unico cambiamento rispetto alla parte (b) è che i batteri di tipo selvatico formeranno colonie bianche. Il motivo è che l'operone *lac* non verrà indotto (non viene prodotta β -galattosidasi) in assenza sia di lattosio sia di IPTG. L'operone è sempre attivo nei mutanti *lacI⁻* od *O^c* (ovvero, la β -galattosidasi è espressa costitutivamente), quindi la presenza o l'assenza di IPTG non fa differenza. La presenza o l'assenza di IPTG non fa differenza per il fatto che i mutanti *lacZ⁻* mancano dell'ORF della β -galattosidasi e l'assenza di IPTG non ha alcun effetto sui batteri *lacY⁻* in quanto non possono consentire l'ingresso di IPTG nella cellula. Il super repressore prodotto nei batteri *lacI^s* occuperà qualsiasi operatore di tipo selvatico, indipendentemente dal fatto che l'induttore sia presente o meno.

d. I batteri wild-type, *lacI⁻* od *O^c* produrranno colonie azzurre. Nelle cellule di tipo selvatico, IPTG induce l'operone *lac* e le cellule producono β -galattosidasi che può utilizzare X-gal come substrato. Tuttavia, la presenza di glucosio implica che non si verificherà alcun controllo positivo dipendente da CRP-cAMP, quindi la trascrizione dell'operone *lac* (e, di conseguenza, la produzione di β -galattosidasi) sarà molto ridotta. I batteri *lacI⁻* od *O^c* trascrivono l'operone costitutivamente, ma senza un controllo positivo, i trascritti *lac* e la proteina β -galattosidasi sono molto ridotti. I batteri *lacZ⁻* o *lacY⁻* produrranno colonie bianche; questo perché i mutanti *lacZ⁻* non producono β -galattosidasi e nei mutanti *lacY⁻* né X-gal né IPTG possono entrare nella cellula senza permeasi. Allo stesso modo, i batteri *lacI^s* genereranno colonie bianche perché il loro operone *lac* non può essere trascritto.

e. Senza IPTG, l'unico cambiamento rispetto alla parte (d) è che i batteri di tipo selvatico formeranno colonie bianche. Il ragionamento è lo stesso della parte (c).

17.13 a. A differenza del lattosio o dell'allolattosio, l'IPTG non è un substrato della β -galattosidasi. Ciò significa che la sua concentrazione può rimanere costante durante un esperimento.

b. Almeno alcune molecole di permeasi sono sempre presenti (anche in assenza dell'induttore) perché una trascrizione basale dell'operone *lac* si verifica ogni volta che l'operatore non è legato dal repressore di Lac. Come tutte le proteine che legano il DNA, il repressore Lac è in equilibrio tra lo stato legato al DNA e quello non legato.

17.14 β -Galattosidasi

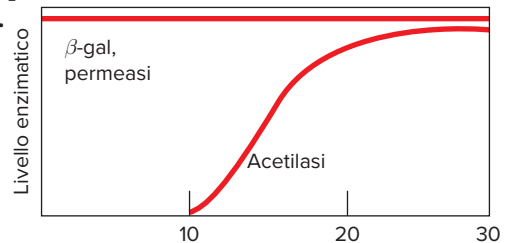
a. costitutivo	Permeasi costitutivo
b. costitutivo	costitutivo inducibile
c. inducibile	inducibile
d. nessuna espressione	costitutivo
e. nessuna espressione	nessuna espressione

17.15 a. In presenza di glucosio, il repressore (LacI) sarà legato all'operatore.

b. In presenza di glucosio + lattosio, non ci saranno proteine legate alla regione regolativa dell'operone *lac*.

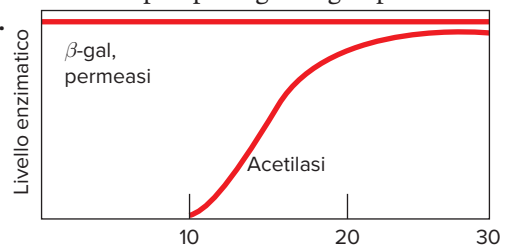
c. In presenza di solo lattosio, il complesso CAP-cAMP sarà legato alla regione del promotore dell'operone *lac*.

17.16 a.



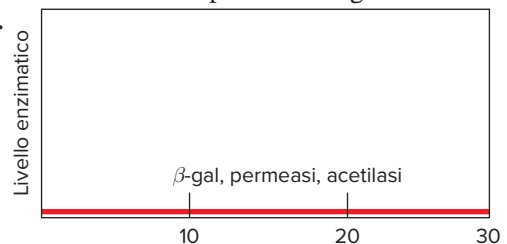
Poiché è presente un gene *I⁺* ed entrambi gli operoni sono *O⁺* *P⁺*, entrambe le copie dell'operone *lac* sono inducibili. Nessuna copia dell'operone *lac* viene trascritta nei primi 10 minuti in assenza di lattosio perché il repressore LacI è legato agli operatori. A partire da 10 minuti, quando viene aggiunto il lattosio come unica fonte di carbonio, tutte e tre le proteine saranno indotte perché è presente almeno un gene strutturale di tipo selvatico per codificare ciascuna proteina e perché il repressore LacI non può più legarsi agli operatori.

b.

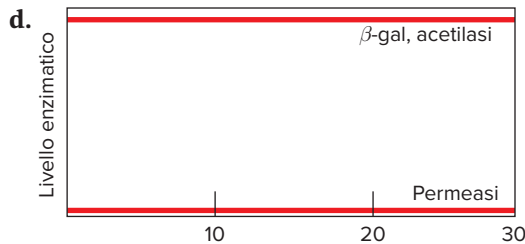


I geni *lacZ⁺* e *lacY⁺* sono costitutivi (sono espressi anche in assenza di lattosio) perché fisicamente connessi alla mutazione *O^c* ad azione in *cis*. D'altra parte, *lacA⁺* è inducibile perché l'unica copia funzionale del gene *lacA* (+) è fisicamente connessa a *O⁺* ed è presente un gene *I⁺*.

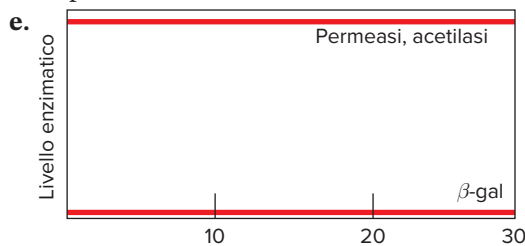
c.



Tutti e tre i geni sono inattivi anche in presenza di lattosio perché una copia funzionale di ciascun gene è collegata a un operatore funzionale (O^+) e l' I^S produce un super-repressore che agisce in *trans*, che impedisce l'induzione di uno degli operoni O^+ . (La proteina super-repressore non può legare l'induttore, quindi si lega sempre ai siti O^+ .)



Entrambe le copie del gene I sono non funzionali (I^-). In assenza di proteina repressore, qualsiasi gene strutturale wild-type a valle di un promotore funzionale (P^+) sarà espresso costitutivamente. Pertanto, $lacZ^+$ e $lacA^+$ sono costitutivi, mentre $lacY^+$ non è espresso perché il promotore dell'operone in cui si trova non è funzionale.



In assenza della proteina repressore, qualsiasi gene strutturale wild-type con un promotore funzionale (P^+) sarà espresso costitutivamente. Pertanto, $lacY^+$ e $lacA^+$ sono costitutivi, mentre $lacZ^+$ non viene espresso perché il promotore dell'operone in cui si trova non è funzionale.

17.17 Il batteriofago lambda (λ) si lega alla proteina LamB nella membrana esterna della cellula batterica ospite per avviare l'infezione fagica. Pertanto, *E. coli* sarà sensibile all'infezione da lambda solo se la proteina LamB è espressa. Le cellule saranno sensibili all'infezione quando vengono coltivate in terreni con maltosio (attivando il *malT* che a sua volta aumenterà l'espressione di LamB) e senza glucosio (quindi in assenza di repressione dei cataboliti per ridurre l'espressione di LamB).

Eventuali mutazioni che influiscano sulla presenza di una proteina funzionale LamB sarebbero resistenti al batteriofago λ . Queste includeranno: (I) mutazioni o delezioni puntiformi *lamB*⁻; (II) mutazioni del promotore che in-

fluenzano la trascrizione dell'operone *malK lamB*.

Il problema definiva la proteina MalT come un regolatore positivo sebbene il meccanismo d'azione non fosse descritto. Presumiamo qui che MalT funzioni legando siti vicino ai promotori dei tre operoni bersaglio in un modo che aiuta l'RNA polimerasi a riconoscere questi promotori. Pertanto, (III) mutazioni con perdita di funzione di *malT* o (IV) mutazioni nel sito del DNA all'interno dell'operone *malK lamB* a cui si lega malT impedirebbero la regolazione positiva del gene *lamB*.

È possibile che tra i geni regolati dal maltosio vi sia un gene che codifica per una proteina che serve a importare il maltosio nella cellula. (V) Una mutazione con perdita di funzione in un gene il cui prodotto è necessario per l'importazione di maltosio bloccherebbe la capacità della cellula di sintetizzare la proteina LamB e renderebbe quindi la cellula resistente al batteriofago λ .

- 17.18** Questo problema può essere affrontato in due modi: (I) partendo dai dati di espressione e valutando quali tipi di mutazioni potrebbero produrre quel particolare fenotipo o (II) iniziando con ogni singolo mutante e abbinandolo a un pattern di espressione. Utilizzando quest'ultimo approccio:
- Il mutante super repressore (a) non mostrerà alcuna espressione di β -galattosidasi in nessuna condizione e quindi è il mutante 3 o 4.
 - La delezione dell'operatore (b) darà livelli costitutivamente elevati di espressione di β -galattosidasi in presenza di glicerolo o lattosio, ma mostrerà una bassa espressione con lattosio + glucosio perché sarà soggetto alla repressione dei cataboliti. Pertanto, la delezione dell'operatore è il mutante 5 o 6.
 - Il tRNA soppressore del codone amber (c) non avrebbe alcun effetto da solo ed è il mutante 7.
 - Il sito di legame CRP-cAMP difettoso (d) provoca gli stessi bassi livelli di espressione di β -galattosidasi sia con lattosio sia con lattosio + glucosio, perché il complesso CRP-cAMP non può legarsi alla regione del promotore per aumentare l'espressione. Pertanto, il mutante 1 o 2 contiene una mutazione nel sito di legame CRP-cAMP.
 - La mutazione non senso nella β -galattosidasi (e) non darà alcuna espressione, quindi è il mutante 3 o 4.
 - La mutazione non senso nel gene repressore (f) porta all'espressione costitutiva della β -galattosidasi, come nei mutanti 5 e 6.

- Con il gene *crp* difettoso (g) il complesso CRP-cAMP non può formarsi, quindi non può legarsi al promotore per aumentarne l'espressione; questo fenotipo si può osservare nei mutanti 1 e 2. Per riassumere, le mutazioni 1 e 2 rappresentano il sito di legame CAP-cAMP mutante e il gene *crp* difettoso; le mutazioni 3 e 4 sono un super-repressore e una mutazione non senso nel gene della β -galattosidasi; le mutazioni 5 e 6 sono una delezione dell'operatore e la mutazione non senso nel gene repressore; la mutazione 7 è un tRNA soppressore del codone non senso amber. La fase successiva dell'analisi prevede la comprensione dei risultati dei genotipi dei doppi mutanti e del merodiploide.
- Una mutazione amber non senso del gene *lacZ* verrebbe soppressa dalla mutazione 7 (tRNA soppressore del codone amber) nella stessa cellula. Pertanto, il mutante 3 contiene la mutazione non senso nel gene della β -galattosidasi (*lacZ*) e il mutante 4 deve contenere una mutazione super-repressore.
- Allo stesso modo, una mutazione non senso nel gene repressore verrebbe soppressa dalla mutazione 7 nella stessa cellula, quindi il mutante 5 è il gene repressore mutante e il mutante 6 è la delezione dell'operatore.
- Il gene *crp* difettoso può essere distinto dal sito di legame CRP-cAMP difettoso dai genotipi merodiploidi mostrati (i genotipi con un plasmide F' oltre al cromosoma batterico). In entrambi i merodiploidi, il cromosoma batterico ha un gene mutante per la β -galattosidasi, ma tutte le altre parti del sistema di espressione dell'operone *lac* sono di tipo selvatico. L'elemento F' ha un sito di legame CRP-cAMP mutante o un gene *crp* difettoso. In quest'ultimo caso, la presenza del gene *crp*⁺ ad azione in *trans* sul cromosoma batterico ripristinerà una regolazione normale dell'operone *lac*. Tuttavia, se la mutazione sull'elemento F' è nel sito di legame CRP-cAMP che agisce in *cis*, il fenotipo del merodiploide sarà ancora mutante. Pertanto, il mutante 1 presenta una mutazione di *crp* e il mutante 2 è il sito di legame alterato.

In sintesi: a = 4; b = 6; c = 7; d = 2; e = 3; f = 5; g = 1.

17.19 a. Se si esegue uno screening solo per i revertanti Lac⁺, molti dei revertanti trovati saranno mutanti solo nell'operone *lac*. Potrebbero essere mutazioni compensative nel sito di legame CRP-cAMP dell'operone *lac* (cioè mutazioni che alterano la sequenza del sito di legame in modo che

possa legarsi ai complessi mutanti CRP-cAMP), o mutazioni nel promotore dell'operone che consentirebbero un forte legame da parte dell'RNA polimerasi anche in assenza del complesso CRP-cAMP.

La richiesta che i mutanti soppressori siano sia Mal⁺ sia Lac⁺ limiterà i possibili revertanti a casi più generali che influenzano il legame o l'attività di CRP-cAMP. Questi potrebbero essere o seconde mutazioni nel gene CRP (tali che un gene *crp* con la mutazione originale e la seconda mutazione ritornerebbe a essere funzionale), o mutazioni nei geni che influenzano la produzione di CRP o cAMP o la funzione del complesso CRP-cAMP.

Si noti che i tipi di soppressori isolati in entrambi gli screening dipendono in gran parte dal tipo di mutazione originale nel gene *crp* con cui si è iniziato. Le risposte fornite presuppongono che il gene *crp* abbia una mutazione di senso, in modo che il prodotto del gene mutante abbia una sequenza amminoacidica alterata che comprometterebbe alcuni aspetti della sua funzione. Se si è iniziato con un mutante non senso o frameshift che non potrebbe produrre una proteina CRP intera, i soppressori trovati (escluse le mutazioni soppressori non senso o frameshift nei geni dei tRNA) dovrebbero aggirare l'intero meccanismo di repressione da catabolita. Pochissimi modi possono essere immaginati per realizzare questo tipo di bypass.

b. Molto probabilmente, la subunità α della RNA polimerasi interagisce direttamente con la proteina CRP. Se la mutazione *crp* originale fosse di senso, il gene potrebbe codificare una proteina CRP a lunghezza intera che potrebbe non più interagire con la subunità α dell'RNA polimerasi. Se il gene che codifica per la subunità α ha una mutazione di senso compensativa, la proteina CRP mutante potrebbe essere in grado di legare la RNA polimerasi mutante.

Molto meno probabile è l'ipotesi che la RNA polimerasi mutante possa riconoscere più efficacemente del normale i promotori degli operoni coinvolti nel metabolizzare gli zuccheri, in modo che il controllo positivo attraverso il complesso CRP-cAMP non sarebbe più necessario per alti livelli di espressione di questi operoni. Innanzitutto, si sa che il riconoscimento del promotore è per lo più mediato dalla subunità α della RNA polimerasi piuttosto che dalla subunità α . In secondo luogo, una mutazione che alteasse il riconoscimento di molti promotori da parte dell'RNA

polimerasi sarebbe probabilmente letale per la cellula.

17.20 Il mutante 6 mostra espressione di *lacZ* quando viene combinato con qualsiasi altra mutazione; questo mutante quindi può avere solamente una mutazione *O^c*. Nei ceppi contenenti la mutazione 5, *lacZ* non viene mai espresso se non quando viene combinato con la mutazione 6 (mutazione *O^c*). La mutazione 5 spegne tutte le altre copie dell'operone in più rispetto alla propria copia, e questo può essere spiegato con una mutazione super-repressore (*I^s*). La mutazione che causa l'inversione dell'operone *lac* (d) non dovrebbe avere effetto sull'espressione né influenzare l'espressione derivante dalle altre copie dell'operone. La mutazione 4 causa espressione inducibile di *lac* tranne quando combinata con la mutazione 5, il super-repressore. L'inversione che non include *lacI*, *p* e *O* non dovrebbe mostrare espressione poiché la regione regolatrice si trova adesso con un orientamento opposto rispetto ai geni. Considerando i pattern di espressione per le mutazioni 2 e 3, la mutazione 3 non mostra espressione tranne quando combinata con la mutazione 4. Per esclusione, la mutazione 2 è una mutazione di senso a perdita di funzione di *lacZ*. Quindi: a. 1; b. 6; c. 2; d. 4; e. 5; f. 3.

17.21 O_2 e O_3 sono ridondanti, cioè hanno la medesima funzione, per cui mutazioni in uno solo dei due producono effetti lievi sui livelli di sintesi, che rendono difficile la loro individuazione.

17.22 a. L'estremità sinistra dell'operatore inizia in una posizione dopo l'estremità della delezione 1 e prima dell'estremità della delezione 5. (L'operatore è intatto nella delezione 1 perché l'operone è ancora inducibile, ma parte dell'operatore è stato rimosso nella delezione 5 perché l'operone è ora espresso in modo costitutivo.) L'estremità destra dell'operatore non può essere determinata da questi dati.

b. Le delezioni possono aver rimosso alcune basi del promotore necessarie per l'inizio della trascrizione.

17.23 I siti di legame del DNA mostrano simmetria rotazionale quando sono legati da omodimeri. Ogni monomero nel dimeri ha lo stesso dominio di legame al DNA che riconosce la stessa sequenza di coppie di basi. I due domini di legame del DNA nell'omodimero sono posizionati come immagini speculari l'uno rispetto all'altro (vedi Figura 17.18), e così devono essere le sequenze di coppie di basi a cui si legano.

Il promotore non è rotazionalmente simmetrico perché l'RNA polimerasi non è un omodimero. È anche istruttivo chiedersi perché il sito del promotore non può essere rotazionalmente simmetrico. La risposta è che, se così fosse, l'RNA polimerasi non "saprebbe" in quale direzione dovrebbe muoversi per trascrivere il gene o l'operone adiacenti.

17.24 a. Per marcare le estremità 5' dei frammenti di DNA genomico con fosfato radioattivo (^{32}P): (I) amplificare con PCR una regione di DNA genomico. È fondamentale per il successo dell'esperimento che tutti i frammenti di DNA radioattivo siano marcati con radioattività solo a quell'unica estremità 5'. Per ottenere ciò, un primer deve includere un sito unico per un enzima di restrizione e altre 6-10 coppie di basi alle estremità se l'enzima non taglia le estremità delle molecole di DNA. (II) Defosforilare le estremità 5' dei frammenti trattando con fosfatasi. (III) Aggiungere ^{32}P alle estremità 5' dei frammenti trattando con l'enzima chinasi in presenza di ATP radioattivo. Si noti che entrambe le estremità 5' dei frammenti saranno radioattive. (IV) A questo punto è necessario tagliare una delle estremità radioattive. Tagliare i frammenti di DNA con l'enzima di restrizione il cui sito è stato incluso in uno dei primer. Separare in base alle dimensioni i due frammenti di DNA mediante elettroforesi su gel: il frammento radioattivo che si desidera utilizzare è quello più grande.

b. Nella Figura 17.15 si può osservare che l'impronta è in realtà una regione della corsia del gel dove non esistono bande. Infatti, i frammenti corrispondenti non vengono prodotti perché una proteina che lega il frammento di DNA nella regione dell'impronta impedisce alla DNasi I di tagliarla. Pertanto, l'impronta è una visualizzazione del sito di legame della proteina.

Se i frammenti di DNA radioattivo fossero marcati con ^{32}P su entrambe le estremità e supponendo che il sito di legame della proteina si trovi in modo asimmetrico nella sequenza del DNA, non si osserverebbe alcuna impronta. Infatti, non verrebbero prodotti frammenti di DNA di determinate dimensioni con una particolare estremità 5' radioattiva, ma verrebbero prodotti frammenti di quelle dimensioni che hanno l'altra estremità 5' radioattiva.

Se i frammenti di DNA fossero marcati con ^{32}P per tutta la loro lunghezza, non si otterrebbero impronte per lo stesso motivo. La proteina che lega il DNA impedirà alla DNasi I di tagliare il

DNA in una posizione particolare. Tuttavia, saranno comunque presenti frammenti di ogni dimensione, perché i frammenti di DNA corrispondenti a entrambi i lati del sito di legame della proteina saranno radioattivi e quindi visibili come bande nel gel.

17.25 L'attenuazione, come nell'operone *trp*, è unica per i procarioti perché dipende dalla traduzione di un mRNA nascente mentre il trascritto si allunga. La trascrizione e la traduzione avvengono simultaneamente nei procarioti, ma non è così negli eucarioti. Negli eucarioti, la trascrizione avviene nel nucleo e i trascritti vengono esportati nel citoplasma, dove vengono tradotti.

17.26 a. Sono necessari almeno tre ribosomi per la traduzione di *trpE* e *trpC* da una molecola di mRNA. Il fatto che ci sia un mRNA a lunghezza intera significa che all'inizio della trascrizione un ribosoma deve aver avviato la traduzione del leader e si è bloccato ai codoni del triptofano nell'attenuatore, determinando la formazione di un anti-terminatore. Un secondo ribosoma deve essersi legato al sito di legame del ribosoma all'inizio del frame di lettura aperto *trpE* e un terzo ribosoma deve legarsi al sito di legame del ribosoma all'inizio del frame di lettura aperto *trpC*.

b. Se i due codoni del triptofano nel leader venissero cancellati, si formerebbe un'ansa a forcina di terminazione causando l'arresto della trascrizione. (Rispetto alla Figura 17.22, il ribosoma tradurrebbe rapidamente il breve frame di lettura aperto nel leader dell'RNA, consentendo la formazione della struttura 3-4 stem-loop che termina la trascrizione.) La trascrizione dei geni *trpE* e *trpC* sarebbe rara, indipendentemente dalla concentrazione di triptofano, perché il livello di mRNA a lunghezza intera dall'operone *trp* sarebbe molto basso.

17.27 In questa sequenza leader di mRNA esiste un registro di lettura aperto, che inizia dal primo nucleotide. La sequenza amminoacidica prevista è:

N Met Thr Arg Val Gln Phe Lys His His His
His His His His Pro Asp C

Da notare le 7 istidine di fila su un totale di 16 aminoacidi. Pertanto, se la cellula è in carenza di istidina, i ribosomi si fermeranno ai codoni His (CAC o CAU) nella sequenza leader perché le molecole tRNA^{His} non saranno cariche di istidina a saturazione. Questa pausa del ribosoma presumibilmente consente alla sequenza leader di ripiegarsi in una configurazione anti-terminatore simile a quella mostrata in Figura 17.22c per l'operone *trp*. Se il leader adotta questa configu-

razione anti-terminatore, l'RNA polimerasi può completare la trascrizione dell'operone, dando la massima produzione dell'mRNA policistronico e la massima espressione delle proteine dei geni strutturali per la sintesi dell'istidina.

17.28 a. La delezione del promotore non permette l'espressione né di *trpE* né di *trpC* perché non può avvenire la trascrizione.

b. Il repressore è mutato; per questo la trascrizione dei geni strutturali è costitutiva. Tuttavia, l'attenuatore è normale e questo comporta una parziale espressione costitutiva dei geni strutturali. Tuttavia, l'attenuatore è normale, per cui, come nella parte (b), in presenza di triptofano c'è un basso livello di espressione di *trpE* e di *trpC*; in assenza di triptofano c'è un alto livello di espressione di *trpE* e di *trpC*.

c. Il repressore non è in grado di legare il triptofano e quindi non si può legare all'operatore; per questo la trascrizione dei geni strutturali è costitutiva. Tuttavia, l'attenuatore è normale, per cui, come nella parte (b), in presenza di triptofano c'è un basso livello di espressione di *trpE* e di *trpC*; in assenza di triptofano c'è un alto livello di espressione di *trpE* e di *trpC*.

d. Il repressore non può legare l'operatore, l'espressione di *trpE* e di *trpC* è costitutiva. L'attenuatore è mutato, quindi l'operone sarà sempre trascritto al massimo livello. *trpE* e *trpC* mostrano una completa espressione costitutiva.

e. Espressione inducibile di *trpC* e parziale espressione costitutiva di *trpE* poiché l'azione in *cis* dell'operatore è mutata ma l'attenuatore è ancora funzionale.

f. Espressione inducibile di *trpC* ma nessuna espressione di *trpE* poiché l'azione in *cis* del promotore è mutata.

g. Espressione completamente costitutiva di *trpE* poiché l'operatore agente in *cis* è mutato e il sito attenuatore agente in *cis* è mutato. L'espressione di *trpC* è parzialmente costitutiva poiché il gene *trpC*⁺ si trova in *cis* rispetto l'operatore mutato e l'attenuatore funzionale.

17.29 Per distinguere l'azione dell'RNA antisense tra interferenza della trascrizione e meccanismi di inibizione della traduzione, è possibile verificare se l'RNA antisense può agire o meno in *trans* per inibire l'espressione del gene che regola; l'azione in *trans* escluderebbe l'interferenza della trascrizione. Supponendo che si abbia un metodo per rilevare il prodotto proteico del gene, un modo semplice per fare questo esperimento sarebbe quello di usare la tecnologia del DNA ricombi-

nante per creare un costrutto plasmidico in cui un promotore batterico forte guida la trascrizione dell'RNA antisenso. Si fanno quindi crescere batteri trasformati con il plasmide in condizioni in cui il prodotto genico in questione è normalmente espresso dal cromosoma batterico. Se l'RNA antisenso funziona interferendo con la trascrizione di senso (in *cis*), l'RNA antisenso del plasmide non dovrebbe avere alcun effetto sui livelli del prodotto genico. Se l'RNA antisenso funziona in *trans* interferendo con la traduzione dell'RNA di senso, i batteri contenenti il plasmide dovrebbero sintetizzare poco o nessun prodotto proteico.

17.30 a. Repressore *lac*: proteina; regolatore negativo; inizio della trascrizione; in *trans*.

b. Operatore *lac*: DNA; regolatore negativo; inizio della trascrizione; in *cis*.

c. CRP: proteina; regolatore positivo; inizio della trascrizione; in *trans*.

d. Sito di legame del CRP: DNA; regolatore positivo; inizio della trascrizione; in *cis*.

e. Repressore *Trp*: proteina; regolatore negativo; inizio della trascrizione; in *trans*.

f. tRNA^{Trp} carico: RNA + piccola molecola (l'amminoacido Trp); regolatore negativo; allungamento della trascrizione; in *trans*.

g. anti-terminatore dell'operone *trp*: RNA; regolatore positivo; allungamento della trascrizione; in *cis*.

h. riboswitch terminatore: RNA; regolatore negativo; allungamento della trascrizione; in *cis*.

i. sRNA che blocca la traduzione: RNA; regolatore negativo; inizio della traduzione; in *trans*.

17.31 a. Alti livelli di guanina libera favoriscono la conformazione a sinistra (terminatore); la conformazione a destra (anti-terminatore) è favorita quando i livelli di guanina libera sono bassi.

b. I riboswitch della guanina regolano in generale i geni coinvolti nel metabolismo delle purine, o in particolare il metabolismo della guanina. Per esempio, un gene che codifica per un enzima necessario per la sintesi della guanina non deve essere trascritto quando nella cellula sono presenti alti livelli di guanina libera, mentre deve essere trascritto quando i livelli di guanina libera sono bassi. Come mostrato nella parte (a), questo è effettivamente ciò che accade: il terminatore si forma quando la guanina è abbondante e l'anti-terminatore si forma quando la guanina è a livelli bassi.

17.32 a. *CsrA*: proteina; regolatore negativo; inizio della traduzione; in *trans*. *CsrB*: RNA; regolatore positivo; inizio della traduzione; in *trans*.

b. È probabile che il sistema *CsrA/CsrB* risponda ai livelli di glucosio. I geni bersaglio per la sintesi del glicogeno (anabolizzanti) potrebbero essere indotti da un alto livello di glucosio se un repressore della trascrizione di *CsrB* non può legare il suo operatore quando il repressore è legato al glucosio. I geni bersaglio per la degradazione del glicogeno (catabolico) potrebbero essere repressi da un alto livello di glucosio se un regolatore positivo della trascrizione di *CsrB* si lega al DNA solo quando non è legato al glucosio.

Si dovrebbe notare che la logica alla base della regolazione dei geni bersaglio è opposta a quella che governa gli operoni *lac* e *trp*. L'operone *lac* è catabolico e indotto dal substrato (allolattosio), mentre l'operone *trp* è anabolico e represso dal prodotto di sintesi (triptofano). È il caso opposto per i geni presi di mira dal sistema *CsrA/CsrB*: un operone anabolico è indotto dal substrato (glucosio), mentre un operone catabolico è represso dal prodotto di sintesi (glucosio). La ragione di questa inversione è il controllo del glucosio piuttosto che del glicogeno. Questo ha senso biologico perché: (I) il glicogeno è una grande molecola che non può essere facilmente importata nelle cellule; (II) la via anabolica genera glicogeno come mezzo per immagazzinare il glucosio in eccesso; (III) la via catabolica scompone il glicogeno quando i livelli di glucosio sono bassi.

17.33 La perdita di funzione della proteina LexA conduce alla nuova espressione di molti geni. Quindi, la proteina LexA wild type regola negativamente l'espressione di questi geni. Studi biochimici hanno dimostrato che la proteina LexA è un repressore che, legandosi all'operatore di questi geni, ne causa lo spegnimento. Molti di questi geni target sono attivati dal danno al DNA; è probabile quindi che codifichino proteine importanti per la cellula nel riparare il danno al DNA. Queste considerazioni suggeriscono che la proteina LexA è importante nel prevenire l'espressione di questi geni riparatori del DNA a meno che non siano necessari.

17.34 Si fondono le sequenze codificanti *lacZ* agli elementi promotori e regolatori di uno dei geni della motilità la cui espressione è stata aumentata durante la crescita cellulare in fonti di carbonio povere. Quindi si introduce questo gene di fusione in un ceppo *lacZ*⁻ di *E. coli*. Questo ceppo batterico produrrà livelli elevati di β -galattosidasi in terreni contenenti fonti scarse di carbonio, ma livelli inferiori di β -galattosidasi in terreni ricchi di fonti di carbonio. Quindi, si mutagenizza que-

sto ceppo e si cercano mutanti in cui l'espressione di *lacZ* non aumenta in condizioni di scarsa crescita. Tali mutanti possono essere saggiati con un substrato di β -galattosidasi come X-gal che cambia colore quando viene scisso. Le cellule mutanti non producono β -galattosidasi e quindi non possono scindere X-gal; queste cellule producono colonie bianche su piastre di Petri contenenti un mezzo povero di carbonio. Le cellule che producono β -galattosidasi scindono l'X-gal e danno origine a colonie blu sulle stesse piastre.

L'esperimento di cui sopra consente di trovare mutanti nei geni coinvolti nella risposta di ricerca di nutrimento. Successivamente è necessario identificare il gene che è stato alterato in ogni ceppo mutante. Un possibile approccio sarebbe mappare i geni; questa procedura sarebbe molto più semplice se si mutagenizzassero le cellule con un trasposone e poi si identificasse il sito di inserimento del trasposone con PCR inversa (vedi Figure 17.28 e 17.29). Un altro approccio sarebbe quello di "recuperare" il fenotipo mutante trasformando le cellule mutanti con una libreria plasmidica contenente frammenti casuali del genoma batterico; si cercherebbero i trasformanti che danno origine a colonie blu su piastre di Petri a bassa fonte di carbonio (vedi Figura 17.27).

17.35 a. Se le piastre X-gal contenessero maltosio, le colonie potrebbero essere blu perché verrebbe indotta la trascrizione del reporter *lacZ*. Le piastre senza maltosio avrebbero colonie bianche. (Nota: queste colonie sono di tipo selvatico, nel senso che tutti i geni che codificano per i regolatori dell'operone indotto dal maltosio sono di tipo selvatico.)

b. In una colonia blu, il reporter viene trascritto in assenza di maltosio. (Presumibilmente, queste colonie sarebbero blu anche in presenza di maltosio.) Le colonie blu potrebbero derivare da una mutazione con guadagno di funzione in un gene che codifica per un regolatore positivo dell'espressione dell'operone *mal* o da una mutazione con perdita di funzione in un gene che codifica per un regolatore negativo di questo operone. Il regolatore wild-type, positivo o negativo che sia, dovrebbe rispondere alla presenza o assenza di maltosio.

Se il gene mutante in questa colonia codifica per un regolatore positivo dell'operone indotto dal maltosio: (I) La proteina wild-type codificata da questo gene verrebbe attivata dal maltosio. Nel caso probabile che la proteina sia un regolatore trascrizionale, la proteina wild-type potrebbe le-

gare il DNA in modo più efficiente in presenza di maltosio. (II) La mutazione risulterebbe in un guadagno di funzione ipermorfo o neomorfo. (III) La mutazione aumenterebbe la quantità della proteina o altererebbe la sequenza di amminoacidi della proteina per farla funzionare in maniera più efficiente o in un modo nuovo. Per esempio, se la proteina di tipo selvatico si lega debolmente al DNA in assenza di maltosio, la mutazione potrebbe comportare la produzione di più proteine; in alternativa, le cellule mutanti potrebbero produrre quantità normali di una proteina mutante che potrebbe legare il DNA in modo efficiente in assenza di maltosio. Il gene reporter sarebbe così espresso (la colonia sarebbe blu) anche se il maltosio non è presente.

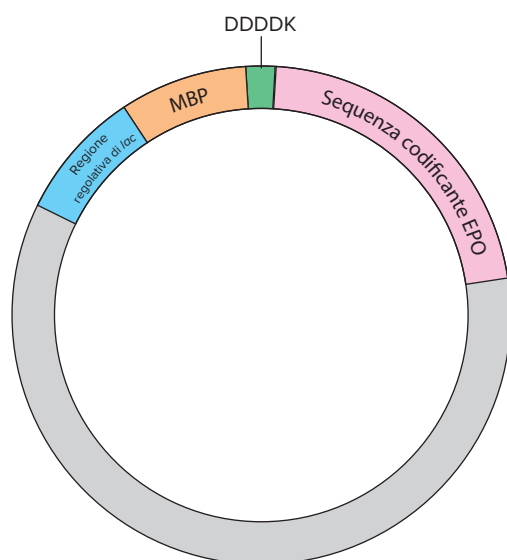
Se il gene mutante in una colonia blu codifica per un repressore dell'operone inducibile dal maltosio: (I) La proteina wild-type codificata da questo funzionerebbe in assenza di maltosio ma non in sua presenza. Nello scenario più probabile, questa proteina sarebbe un repressore trascrizionale come il repressore Lac che potrebbe legare il DNA in assenza, ma non in presenza, di un induttore correlato al maltosio. (II) La mutazione sarebbe a perdita di funzione (o amorfa [nulla] o ipomorfa). (III) Il mutageno non è specificato, quindi la mutazione potrebbe essere una mutazione non senso, una mutazione di senso in un amminoacido chiave per la funzione della proteina, una mutazione frameshift vicino all'inizio dell'ORF o una delezione del gene. Se manca la funzione di regolatore negativo, il gene reporter viene espresso (la colonia è blu) indipendentemente dalla presenza di maltosio.

c. Se la mutazione è a guadagno di funzione, la trasformazione di batteri mutanti con una libreria genomica di tipo selvatico non recupererà da fenotipo mutante (espressione costitutiva, osservata come colonie blu su piastre prive di maltosio) a tipo selvatico (espressione inducibile, osservata come colonie bianche su piastre prive di maltosio). Tuttavia, la trasformazione di un ceppo di tipo selvatico con una libreria genomica composta da DNA genomico mutante causerebbe il fenotipo mutante: una colonia trasformata con un plasmide contenente il gene mutante a guadagno di funzione sarebbe blu in assenza di maltosio.

Se la mutazione fosse a perdita di funzione, si osserverebbero i risultati opposti. La trasformazione di batteri mutanti con una libreria di plasmidi genomici di tipo selvatico comporterebbe

il recupero del fenotipo mutante a tipo selvatico (in colonie trasformate con una copia del gene wild type corrispondente alla mutazione).

- 17.36 a.** Il plasmide illustrato di seguito contiene anche un'origine di replicazione e un gene di resistenza ai farmaci che non sono mostrati. La regione di regolazione dell'operone *lac* deve contenere il promotore dell'operone, l'operatore, il sito di legame CRP-cAMP e il sito di legame del ribosoma. Si noti che la regione di regolazione *lac* deve essere seguita da sequenze che codificano per MBP, DDDDK ed eritropoietina (EPO) in quest'ordine, perché l'N-terminale della proteina di fusione è quello di MBP, mentre il C-terminale della proteina di fusione è quello dell'EPO.



- b.** Il sito di legame del ribosoma si trova nelle sequenze regolatrici *lac* (II).

c. Affinché il plasmide codifichi la proteina di fusione desiderata, MBP, DDDDK e la regione codificante EPO devono essere tutti nello stesso registro di lettura: (I, III, IV).

d. Le sequenze codificanti EPO devono provenire da un cDNA perché i geni batterici non hanno introni né il macchinario enzimatico che può rimuovere gli introni. Pertanto, i batteri non possono far maturare gli RNA eucariotici che contengono introni.

e. Sulla base delle informazioni fornite nel testo, la scelta più logica qui sarebbe quella di utilizzare il lattosio o l'allolattosio come induttori per "attivare" l'espressione del gene di fusione. In realtà, questi composti vengono metabolizzati (scissi dalla β -galattosidasi) così rapidamente che l'induzione sarebbe solo temporanea. I ricercatori possono invece utilizzare un composto chiamato isopropil

β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) come induttore per i geni di fusione sotto il controllo della regione di regolazione dell'operone *lac*. Questo composto imita a livello molecolare l'allolattosio, quindi può legarsi allo stesso modo al repressore Lac, ma non viene scisso dalla β -galattosidasi. L'induttore deve essere aggiunto alla coltura dopo che la popolazione ha raggiunto un'elevata densità perché la proteina di fusione può essere dannosa per le cellule batteriche. Se l'induttore viene aggiunto troppo presto, la coltura potrebbe smettere di crescere in modo da avere troppo poche cellule e quindi troppo poca proteina di fusione.

f. Come suggerisce il nome, la proteina legante il maltosio (MBP) si lega strettamente allo zucchero maltosio. La proteina di fusione potrebbe essere purificata facendo passare un estratto di batteri che esprimono MBP-DDDDK-EPO su una colonna contenente molecole di maltosio accoppiate in modo covalente a una resina insolubile. Quindi si lavano via le proteine che non sono legate strettamente alla colonna, lasciando le proteine di fusione sulla resina.

g. Si può aggiungere l'enzima enterochinasi alla colonna nella parte (f) che ha legato MBP-DDDDK-EPO. Questo enzima scinde i polipeptidi subito dopo DDDDK. Pertanto, dopo la scissione, N-MBP-DDDDK-C rimarrà legato alla colonna attraverso l'associazione di MBP con il maltosio, mentre l'EPO, liberata da MBP e DDDDK, eluirà dalla colonna e potrà essere raccolta.

- 17.37** È probabile che i geni trascritti in risposta ai cambiamenti di osmolarità includano geni trascritti in risposta ad altri stress come lo shock termico, nonché geni che si attivano specificamente in risposta al cambiamento di osmolarità. Si possono confrontare i dati di RNA-Seq di batteri cresciuti in condizioni di alta e bassa osmolarità con batteri cresciuti a temperature normali e in condizioni di shock termico. È probabile che gli RNA presenti specificamente nella coltura sottoposta a shock termico e anche specificamente in condizioni di alta o bassa osmolarità siano geni di risposta allo stress in generale. (Nota: in questo uso, "presenti specificamente" non significa necessariamente che la trascrizione del gene sia assente in una certa condizione, ma piuttosto che la proporzione di read nell'mRNA totale sia significativamente più alta in una condizione o nell'altra. Sarebbe anche interessante esaminare i dati di RNA-Seq per verificare se l'espressione di qualsiasi gene viene ridotta in una condizione rispetto all'altra.)

17.38 a. Ci sono 19 geni rappresentati in Figura 17.30; un gene in azzurro è mostrato chiaramente appena a monte di *modA*, ma è senza nome. La densità genica media è di 1 gene ogni 1000 bp, caratteristica dei genomi batterici. La figura mostra 5 operoni policistronici; tuttavia, se si conta ogni gene isolato come un operone separato, si potrebbe dire che in questa regione esistono 10 operoni [o anche 11, come discusso nella parte (e)].

b. Non sono stati trovati trascritti per il gene *t2110*, ma l'analisi di RNA-Seq è stata eseguita in un'unica condizione ambientale; in condizioni diverse, è possibile che le trascrizioni di *t2110* possano essere rilevate. Nei database, *t2110* è considerato un gene ipotetico perché ha una ORF sufficientemente lunga, ma gli scienziati non hanno dimostrato che il polipeptide codificato da questo ORF sia mai prodotto nelle cellule.

La direzione della trascrizione corrisponde presumibilmente al filamento di DNA contenente l'ORF. Questa assegnazione potrebbe essere verificata se si potessero rilevare trascritti di *t2110* in una condizione diversa all'interno di una genoteca di cDNA direzionale costruita con un metodo come quello illustrato in Figura 17.29.

c. L'interruzione prematura della trascrizione dovuta alla regolazione da parte di un attenuatore o di un riboswitch (o forse a causa dell'esistenza di un sito di terminazione della trascrizione debole) potrebbe essere rilevata per un numero inferiore di read di sequenza alla fine di un operone rispetto a quelle all'inizio. L'operone *hutUH* può essere regolato in questo modo. Si noti in Figura 17.30 che l'RNA-Seq rileva significativamente più letture per *hutU* che per *hutH*.

d. La trascrizione antisense verrebbe rilevata quando, in una regione del genoma, si trovassero read di una sequenza in entrambe le direzioni. (Si vedrebbero alcune read rappresentate in verde e alcune letture in viola in una particolare posizione della sequenza del DNA.) Nella figura non si osservano esempi di questo tipo.

e. La figura mostra più read della sequenza *galM* rispetto alle letture dei geni *galETK*. Questo è inaspettato perché *galM* è il più lontano dal promotore; al massimo ci si aspetterebbe che l'RNA polimerasi terminasse la trascrizione prima di raggiungere *galM*. Questa scoperta suggerisce che *galM* potrebbe essere un singolo gene controllato dal proprio promotore piuttosto che parte dello stesso operone di *galETK*.

f. No. Ciò che viene riportato dall'RNA-Seq è il numero relativo di trascritti corrispondenti a ge-

ni diversi. La regolazione della traduzione non può comparire nei dati.

17.39 Almeno tre criteri permettono di stabilire che un piccolo RNA è un sRNA regolativo: (I) Le sequenze di sRNA non devono contenere alcuna ORF. (II) In molti casi, si può escludere che gli sRNA siano frammenti di un mRNA più grande perché nello stesso esperimento di RNA-Seq non si trovano trascritti vicini con lo stesso orientamento. (III) Si dovrebbe trovare una sequenza complementare, con orientamento inverso, alla sequenza di sRNA, nel filamento di senso di uno o più mRNA, in particolare al 5'-UTR.

17.40 a. Quando i livelli di uno specifico tRNA non carico sono elevati, ha senso trascrivere di più la tRNA sintetasi corrispondente; il tRNA non carico legato al leader della T-box provoca la formazione dell'antiterminatore. Ma quando la maggior parte di quel tRNA è carico, non è richiesta alcuna trascrizione aggiuntiva di tRNA sintetasi; il tRNA carico legato al leader della T-box determina la formazione di un terminatore.

b. La parte del T-box leader che lega l'anticodone tRNA^{Tyr} (5'GUA) ha la sequenza 5'UAC, che è uno dei due codoni Tyr. La modificazione di quella sequenza 5'UAC in uno dei due codoni Phe (5'UUU o 5'UUC) potrebbe far rispondere il leader a tRNA^{Phe} anziché a tRNA^{Tyr}.

c. La modificazione del 5'UAC in 5'CUA (un codone della leucina) potrebbe rendere l'espressione del gene *tyrS* sensibile ai livelli di tRNA^{Leu} non carico. Il tRNA^{Tyr} scarico contatta il leader della T-box con due sequenze: il suo anticodone e la sua estremità 3'. Solo l'anticodone è specifico per tRNA^{Tyr}, quindi presumibilmente questa sequenza fornisce la specificità della T-box.

d. Un ceppo batterico con una mutazione nel gene che codifica per tRNA^{Tyr} in modo tale che l'anticodone tRNA^{Tyr} riconosca il codone 5'CUA consentirebbe al leader del T-box mutante di rispondere nuovamente ai livelli di tRNA^{Tyr}. (Si noti che un tale ceppo batterico sarebbe poco vitale perché molte proteine avrebbero Tyr dove si dovrebbe trovare Leu. Si noti inoltre che affinché un tale ceppo batterico sopravviva, deve avere più di un gene per tRNA^{Tyr} in modo tale che Tyr possa ancora essere inserito nelle proteine dove dovrebbe.)

e. Quando i livelli di tirosina sono bassi, la β -galattosidasi è alta; i livelli di tRNA^{Tyr} scarico sarebbero elevati, favorendo la formazione dell'anti-terminatore. Livelli elevati di tirosina determinano una scarsa produzione di β -galattosidasi; la

maggior parte del tRNA^{Tyr} è carica e quindi normalmente si forma il terminatore. [Se le cellule sono colate su piastre Petri con X-gal ma nessun induttore, in teoria si potrebbe vedere la differenza tra i colori delle colonie blu e bianco. Nessun induttore potrebbe essere presente, altrimenti il normale gene endogeno *lacZ* produrrebbe β -galattosidasi ad alti livelli e non si potrebbe osservare l'azione del gene reporter.]

f. Ipotesi I: il tRNA^{Tyr} si lega alla T-box, come mostrato nella figura del Problema 40. In questo scenario, il tRNA^{Tyr} mutante che può legare la T-box ma non può essere caricato con tirosina fa sì che la T-box sia sempre nella conformazione anti-terminatore; i livelli di tirosina non avrebbero alcun effetto. Cioè, il reporter β -galattosidasi sarebbe espresso ad alti livelli indipendentemente dalla quantità di tirosina.

Ipotesi II: la tirosina lega direttamente la T-box invece di tRNA^{Tyr}. In questo caso, il mutante tRNA^{Tyr} non avrebbe alcun effetto sulla risposta della T-box alla tirosina. Cioè, il reporter β -galattosidasi sarebbe espresso a bassi livelli se la tirosina è alta e ad alti livelli se è bassa.

Quando questo esperimento è stato eseguito in laboratorio, i risultati hanno confermato l'ipotesi I ma non l'ipotesi II, indicando che i livelli di tirosina influenzano la T-box indirettamente tramite tRNA^{Tyr}.

g. Gli algoritmi informatici che identificano i regolatori T-box devono cercare, a monte degli operoni, sequenze di basi complementari inverse che potrebbero formare strutture di RNA a forcina e quindi una sequenza 5'UGGU all'interno di tale forcina.

17.41 Utilizzando l'analisi di RNA-Seq, il trascrittoma di *V. fischeri* che cresce ad alta densità e produce luce potrebbe essere confrontato con quello di *V. fischeri* non bioluminescente che cresce a bassa densità. L'operone *luxICDABE* sarebbe identificato come un trascritto presente a livelli molto più elevati nei batteri bioluminescenti rispetto a quelli che non producono luce. Tuttavia, *luxR* non verrebbe identificato in quanto è trascritto agli stessi livelli in *V. fischeri* in condizioni sia di bassa sia di alta densità.

17.42 La chiave per risolvere questo problema è ricordare che le mutazioni a perdita di funzione nello stesso gene non complementano (–), mentre le mutazioni in geni diversi complementano (+). Inoltre, le mutazioni che inattivano un intero operone non complementeranno le mutazioni in singoli geni all'interno di quell'operone.

a. La matrice di complementazione è mostrata nel diagramma seguente. Lungo la diagonale, le mutazioni non possono complementare.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	–								
3	+	+							
4	+	+	+						
5	+	+	+	+					
6	+	+	+	+	–				
7	+	+	+	+	–	–			
8	–	–	–	–	+	+	+		
9	–	–	–	–	+	+	+	–	

b. È possibile utilizzare questa matrice di complementazione per ordinare i 9 mutanti di bioluminescenza in quattro gruppi di complementazione: gruppo I = 1, 2, 8, 9; gruppo II = 3, 8, 9; gruppo III = 4, 8, 9; gruppo IV = 5, 6, 7.

c. Questi gruppi di complementazione corrispondono ciascuno a un gene diverso. Tuttavia, questi risultati di complementazione sono insoliti rispetto a quelli visti nel Capitolo 7, in quanto i mutanti 8 e 9 sono membri di tre distinti gruppi di complementazione. Il motivo è che le mutazioni nei ceppi 8 e 9 impediscono l'espressione dell'intero operone *luxICDABE*, che comprende sei diversi geni. Al contrario, i mutanti che definiscono i tre gruppi di complementazione singoli influenzano ciascuno solo uno dei geni nell'operone: i mutanti 1 e 2 sono *luxA*[–], il mutante 3 è *luxB*[–] e il mutante 4 è *luxI*[–]. Si noti che i mutanti 8 e 9 non sono inclusi nel gruppo di complementazione IV (mutanti 5, 6, 7) perché i mutanti del gruppo IV sono *luxR*[–] e il gene *luxR* non fa parte dell'operone *luxICDABE*.

17.43 a. Il gene *luxR* viene trascritto a livelli bassi, non abbastanza alti da produrre la quantità di trascrizione *lacZ* richiesta per le colonie blu.

b. L'operone *luxICDABE* viene trascritto a bassi livelli senza auto-induttore.

c. La trascrizione di *luxR* non è controllata dall'auto-induttore; La Figura 17.34 non indica alcun modo in cui ciò potrebbe verificarsi.

d. *LuxR* legato all'auto-induttore attiva la trascrizione dell'operone *luxICDABE*. Il gene *luxI* codifica per una proteina che fa produrre più auto-

induttore. L'operone doveva essere trascritto e tradotto al fine di produrre abbastanza auto-induttore per produrre abbastanza mRNA *lacZ* affinché le colonie diventassero blu.

e. La trascrizione di *luxR* è costitutiva ma a un livello basso.

17.44 Molecole che mimano il ligando per il recettore del quorum sensing reprimerebbero l'espressione della tossina di *V. cholerae* e potrebbero essere potenzialmente utilizzate come farmaci per prevenire i sintomi del colera.

17.45 a. Una piccola molecola che lega *LuxR* può prevenire la bioluminescenza in uno dei due modi descritti di seguito. In primo luogo, una piccola molecola potrebbe impedire a *LuxR* di legare il DNA e di attivare la trascrizione dell'operone. In secondo luogo, una piccola molecola potrebbe impedire all'auto-induttore di legare *LuxR*. In questo secondo caso, per prevenire la bioluminescenza la piccola molecola NON deve causare lo stesso cambiamento allosterico in *LuxR* che opera l'auto-induttore.

b. Per un agente patogeno che esprime tossine in risposta al legame di un auto-induttore a una proteina come *LuxR*, una piccola molecola inibitore della proteina simile a *LuxR* potrebbe prevenire la patogenesi. Questa piccola molecola non ucciderebbe le cellule (quindi non sarebbe un antibiotico), ma potrebbe comunque essere un farmaco efficace per prevenire la malattia.

Va notato che una piccola molecola che si lega a *LuxR* di *V. fischeri* non si lega necessariamente a un auto-induttore di una specie patogena. Tuttavia, trovare una tale molecola per *LuxR* fornirebbe la prova che questo tipo di schema potrebbe produrre un farmaco utile se applicato ad altri auto-induttori. In effetti, la bioluminescenza faciliterebbe tale ricerca. Cioè, gli scienziati potrebbero progettare operoni di bioluminescenza la cui trascrizione è controllata dalle proteine simili a *LuxR* che regolano l'espressione della tossina nei patogeni e utilizzare il test di bioluminescenza per scoprire piccole molecole inibitori delle proteine simili a *LuxR*.