

cloramfenicolo e dalla streptomina. Gli antibiotici sono tossici per i microorganismi ma non per l'uomo perché tutti questi processi metabolici sono diversi nei batteri e nell'uomo.

- 14.55. (1) Il codice è degenerato; la maggioranza degli amminoacidi può essere specificata da due o più codoni. (2) Gli introni sono rimossi enzimaticamente dal trascritto primario di mRNA prima che questo venga tradotto. (3) Alcuni segmenti di una proteina possono venire rimossi enzimaticamente per trasformarla nella forma biologicamente attiva, la cui struttura primaria è quella che viene determinata. (4) La regione del promotore e altri siti di controllo del gene, che sono essenziali per il suo funzionamento nella cellula, non sono tradotti nella struttura della proteina.

CAPITOLO 15

La genetica dei batteri e dei virus

I BATTERI

1. Caratteristiche dei procarioti.

Ci sono due tipi fundamentalmente diversi di organismi cellulari nel mondo biologico. I protozoi (animali unicellulari), i funghi (piante non fotosintetiche), le piante e gli animali presentano cellule *eucariotiche* (ben nucleate). I batteri e le alghe azzurre (cianofite: "cianobatteri") sono tipi cellulari più primitivi descritti come *procarioti* ("prima del nucleo", cioè anucleati). Ci sono differenze più profonde tra una cellula batterica e la più semplice delle cellule eucariotiche che tra un protozoo e una cellula umana (Tabella 15.1).

2. Categorie trofiche (nutrizionali) di batteri.

La maggioranza dei batteri ottiene energia assorbendo e degradando le sostanze nutritive organiche di tessuti vivi o morti di altri organismi o delle loro secrezioni o rifiuti. Pochi tipi di batteri fotosintetici contengono la batterioclorofilla e possono utilizzare l'energia della luce per produrre le proprie molecole organiche a partire da sostanze inorganiche. I batteri chemiosintetici possono utilizzare l'energia liberata da reazioni di ossido-riduzione di sostanze chimiche inorganiche (per esempio convertendo il nitrato in nitrito, il solfuro in solfato, o il ferro ferroso in ferro ferrico), per produrre le proprie molecole organiche a partire da sostanze inorganiche o organiche. Le alghe azzurre contengono lo stesso tipo di clorofilla trovato nelle piante eucariotiche e fotosintetizzano allo stesso modo, liberando l'ossigeno come sottoprodotto (non viene sviluppato ossigeno dalla fotosintesi batterica).

Gli organismi che possono vivere di sostanze inorganiche, o attraverso la fotosintesi o la chemiosintesi, sono detti *autotrofi*. Tutti gli altri organismi che richiedono sostanze nutritive organiche sono detti *eterotrofi*. La maggioranza dei batteri richiede un qualche composto organico (come lo zucchero) come fonte di carbonio e di energia. I ceppi di tipo selvatico (*prototrofici*) sono capaci di crescere con una dieta molto semplice. Un *terreno minimo* per molti batteri eterotrofi include l'acqua, pochi sali inorganici semplici e un composto organico come fonte di carbonio e di energia chimica. Ceppi mutanti di batteri che necessitano di essere riforniti del terreno minimo per la crescita sono detti *auxotrofi*.

Il tempo di generazione del colibacillo *Escherichia coli* mentre cresce su un terreno minimo è di circa 60 minuti a 37 °C. Se il mezzo è rifornito di tutti gli amminoacidi e nucleotidi fabbricati di solito dal batterio (*terreno completo*), il tempo di generazione si riduce a 20 minuti. Quando le condizioni nutrizionali sono buone, ciascuna cellula batterica contiene tipicamente tra i due e i quattro cromosomi geneticamente identici. Quando invece sono povere, la duplicazione cromosomica resta indietro alla divisione cellulare e perciò le cellule vitali contengono solo un cromosoma.

3. Variazioni fenotipiche.

I batteri sono scarsamente visibili anche ai microscopi ottici più potenti; hanno all'incirca la dimensione dei mitocondri delle cellule eucariotiche. Le loro morfologie grossolane individuali sono classificate come sferiche (cocchi), a bastoncino (bacilli) o a elica (spirilli). Le strutture interne dei batteri possono essere rivelate soltanto dalla microscopia elettronica. Tutti i batteri hanno una membrana cellulare e la maggior parte dei batteri possiede una parete cellulare esterna di lipidi, proteine e polisaccaridi. La parete cellulare delle piante eucariotiche e delle alghe procariotiche azzurre contiene cellulosa, che invece non si trova nelle pareti cellulari

Tabella 15.1. Alcune differenze che distinguono gli eucarioti e i procarioti

Eucarioti	Procarioti
(1) Nucleo, mitocondri, cloroplasti, lisosomi, ecc.	(1) Assenza di organelli delimitati da membrane
(2) Reticolo endoplasmico elaborato (non associato con la duplicazione del DNA)	(2) Poche membrane interne (per esempio, mesosomi associati con la duplicazione del DNA)
(3) Cinque tipi di istoni legati intimamente al DNA	(3) Poche proteine (perlopiù enzimi) scarsamente legate al DNA; nessun istone
(4) Anche la cellula più piccola è 5-10 volte più grande di <i>Escherichia coli</i>	(4) Circa la dimensione dei mitocondri eucariotici
(5) Actina e miosina	(5) Actina o proteine actino-simili assenti
(6) Microtubuli (per esempio, le fibre del fuso soggette a degradazione da parte della colchicina)	(6) Nessun microtubulo
(7) Mitosi e meiosi usata per la riproduzione sessuata e asessuata	(7) Cromosomi nucleoproteici assenti; divisione amitotica (scissione binaria)
(8) Di solito più di una molecola di DNA lineare (cromosoma) per genoma	(8) Una singola molecola di DNA circolare ("cromosoma"), sufficiente per la vita; nessun centromero o cinetocoro
(9) Ribosomi 80S (subunità 40S e 60S)	(9) Ribosomi 70S (subunità 30S e 50S)
(10) Soltanto mRNA monocistronici	(10) Comunemente mRNA policistronici
(11) Tre forme principali di RNA polimerasi (rispettivamente per rRNA, mRNA e tRNA)	(11) Un tipo solo di RNA polimerasi
(12) Uno o più nucleoli (associati in tandem alle copie DNA di geni che codificano per rRNA)	(12) Nessun corrispettivo del nucleolo
(13) Sono comuni i geni ripetitivi (talvolta in migliaia di copie)	(13) Ciascun gene presente una volta sola
(14) Sono comuni introni ed esoni	(14) Nessuna sequenza d'intervento
(15) Duplicazione del DNA iniziata in molti siti su un cromosoma (frammenti di Okazaki)	(15) Unico sito d'inizio per la duplicazione del DNA
(16) La metionina non formilata inizia tutti i polipeptidi	(16) La metionina formilata inizia tutti i polipeptidi
(17) La maggioranza degli mRNA contiene lunghe sequenze poli-A al 3' (funzione sconosciuta); non codificate dal DNA nucleare; aggiunte dalla poli-A polimerasi	(17) Sono rare le sequenze poli-A agli estremi 3' degli mRNA
(18) Una diversa proteina è legata a ciascuna estremità degli mRNA (funzione sconosciuta); virtualmente non esistono mRNA nudi nella cellula	(18) Nessuna proteina legata alle estremità
(19) "cappello" ("cap") = 7'-metilguanosa-5' ppp5' purin nucleoside (di solito A) all'estremo 5' degli mRNA; da non confondersi con CAP (proteina attivatrice dei cataboliti)	(19) Nessun "cappello" ("cap")
(20) La scatola di Hogness (TATA box) è il promotore della RNA polimerasi II, analoga alla scatola di Pribnow nei procarioti	(20) La scatola di Pribnow (TATAATG) si trova vicino al punto d'inizio dell'RNA nelle regioni del promotore

batteriche. Il DNA dei batteri non è complessato con le proteine istoniche e non è quindi paragonabile a un cromosoma eucariotico. Ciononostante, il DNA circolare "nudo" di un batterio è chiamato "cromosoma". Nei procarioti non ci sono organelli delimitati da membrane (come il nucleo o i mitocondri). Regioni localizzate del DNA batterico vengono tuttavia considerate come "regioni nucleari"; l'area esterna al nucleo batterico viene chiamata "citoplasma".

Contrariamente alla morfologia delle singole cellule batteriche, quella delle colonie batteriche che crescono su una piastra di agar nutriente possono essere facilmente osservate ad occhio nudo (macroscopicamente). Le colonie batteriche possono presentare variazioni di dimensione, forma, abitudini di crescita, struttura, colore, ecc. Colonie o colture in terreno liquido geneticamente diversi possono rispondere in modo diverso a sostanze nutritive, coloranti, farmaci, anticorpi o patogeni virali nel mezzo di coltura.

4. La riproduzione.

I procarioti si riproducono vegetativamente, attraverso un processo asessuale chiamato "scissione binaria". Tutti i discendenti derivati asessualmente da un solo batterio costituiscono un *clone* di cellule geneticamente identiche. Sono stati proposti almeno due modelli per la duplicazione del cromosoma circolare batterico. Nel modello del "circolo rotante", si produce una molecola di DNA lineare per duplicazione di una ad anello allo scopo di trasferire il materiale genetico da una cellula donatrice a una ricevente durante l'accoppiamento batterico (coniugazione). Una rottura sito-specifica avviene su un filamento dell'anello di DNA, creando un'estremità libera 3'OH e un'altra 5'P. L'enzima DNA-polimerasi aggiunge nucleotidi all'estremità 3' attraverso l'appaiamento di basi con l'altro filamento di DNA, creando una "coda" a singolo filamento che finisce in 5'P. Un filamento complementare viene quindi sintetizzato usando la "coda" come stampo. Il circolo può ruotare molte volte, creando dei *concatemeri* contenenti sequenze genomiche ripetitive. Una nucleasi taglia il concatemero in segmenti corrispondenti alla dimensione di un genoma, che contengono delle "estremità adesive" (regioni complementari a singolo filamento, "sticky ends"). I genomi lineari si circolarizzano appaiando le basi delle estremità adesive. La DNA ligasi attacca i punti di rottura, producendo un circolo di DNA a doppio filamento.

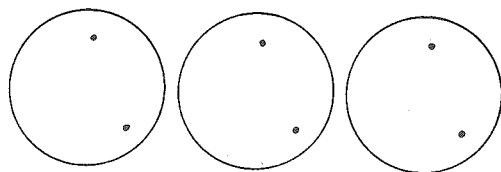
In un secondo modello i circoli di DNA batterico, mitocondriale e virale si possono duplicare senza formare concatemeri lineari. La duplicazione inizia ad una specifica posizione, e le due forche replicative si muovono in direzioni opposte intorno al circolo. Deve esistere qualche espediente per permettere la rotazione libera di uno dei filamenti; si tratta di un "perno molecolare". Si sa che l'enzima *DNA girasi* può intaccare e riattaccare il DNA e può precedere la forca replicativa come enzima del perno. A metà strada lungo il circolo, le due repliche posseggono una struttura intermedia che assomiglia a una θ (theta greca). Questo meccanismo di duplicazione alla fine crea supereliche di DNA circolare a doppio filamento perché le intaccature a singolo filamento che permettono lo svolgimento dell'elica sono ben presto riattaccate. La crescita della catena procede fino a che non viene ostacolata stericamente dalle supereliche. A questo punto uno speciale enzima ("*swivelase*") produce un'intaccatura che rilassa la molecola e ripara anche il taglio, di modo che la duplicazione può riprendere di nuovo.

Il cromosoma batterico è attaccato ad una invaginazione della membrana, chiamata *mesosoma*, a livello delle due forche replicative a Y quasi adiacenti. Durante la duplicazione del cromosoma, la cellula si allunga per la crescita della zona tra i due punti di attacco, provocando un allontanamento delle due repliche cromosomiche. Un setto di nuovo materiale della parete cellulare viene quindi sintetizzato in questa regione di allungamento, producendo due cellule figlie. Anche prima che il setto sia stato completato, ciascuna replica del cromosoma può acquisire una seconda forca ad Y sul mesosoma vicino al punto di attacco originale, e un secondo ciclo di duplicazione cromosomica può già essere incominciato. Questo processo asessuale si ripete più e più volte per produrre milioni di cellule che costituiscono un clone o una colonia visibile ad occhio nudo su una piastra di agar nutritivo.

5. Le mutazioni batteriche

I batteri sono molto utili per lo studio delle mutazioni genetiche a causa dei loro tempi di generazione molto corti e della facilità con cui si possono produrre popolazioni cellulari molto grandi (da 10^6 a 10^9 cellule) in una provetta o in una piastra di agar. Per esempio, 10^9 batteri possono crescere in terreno liquido (brodo di coltura) e quindi essere distribuiti in modo uniforme su una piastra di agar in modo che una massa solida di cellule ne ricopra la superficie. Se in questa coltura è presente una cellula mutante su un milione, essa può essere reperita ricorrendo a terreni selettivi. Per esempio se, in un ceppo sensibile, si è verificata una mutazione per la resistenza alla streptomina, si possono inoculare i batteri su una piastra di agar che contenga streptomina. Tutte le cellule senza mutazione saranno sensibili a questo antibiotico e non potranno crescere; solo il mutante resistente formerà una colonia. La mutazione spontanea per la resistenza alla streptomina si produrrà indipendentemente dalla presenza o assenza di streptomina nell'ambiente. Alcuni tipi di mutazioni spontanee sono *preadattative*, cioè sarebbero utili all'organismo in un ambiente diverso. Ciò si può dimostrare con una tecnica di inoculazione su piastra mediante duplicazione. Un pezzo di velluto sterile viene compresso su una colonia batterica in agar senza streptomina (piastra madre) e quindi trasferito su un numero qualunque di piastre di agar contenenti streptomina (duplicati). Il peo del velluto preleva dalla piastra madre rappresentanti di ciascun clone e li inocula in ogni piastra che funge da duplicato. La posizione dei cloni che crescono su ogni piastra duplicato è sempre la stessa, indicando così che la mutazione per la resistenza alla streptomina è avvenuta nella piastra madre prima di ogni contatto con la streptomina, cioè è preadattata alla sopravvivenza in un ambiente diverso, in particolare in presenza di streptomina.

Esempio 15.1.

Piastra madre
senza streptominaPiastra duplicati
contenenti streptomina

6. La ricombinazione genetica

(a) La trasformazione

Quando gli pneumococchi sono circondati da capsule polisaccaridiche sono *virulenti* (cioè capaci di produrre malattia) e formano colonie con un bordo liscio su terreno solido. Gli pneumococchi senza capsula sono invece *avirulenti* e formano colonie di forma irregolare. Quando un ceppo di forma irregolare viene esposto a un estratto purificato di DNA di una colonia dal bordo liscio, alcune cellule di colonie dalla forma irregolare *si trasformano* in cellule che danno colonie a bordo liscio. E' questa una prova del fatto che il DNA è materiale genetico. La trasformazione può avvenire in alcune specie con frequenze fino al 25%, ma più frequentemente avviene a frequenze molto basse. Colture senescenti di alcuni batteri incorrono spontaneamente nella rottura cellulare (autolisi), che riversa il DNA nell'ambiente assieme ad altre cellule, e quindi offre l'opportunità che avvenga una trasformazione. Una cellula deve essere in uno stato fisiologicamente recettivo, chiamato *competenza*, il che si presenta solo durante una frazione del ciclo di crescita. In questa fase, il DNA è legato transitoriamente con la superficie cellulare. Ogni cellula ha un numero di siti recettori ai quali il DNA può attaccarsi. Essi possono saturarsi di DNA non trasformante (e cioè DNA di un organismo non affine), impedendo così la comparsa di trasformanti. Solo frammenti relativamente grandi di DNA possono penetrare nella cellula competente, ma, una volta dentro, il DNA si lega in modo permanente. Una spiegazione del processo d'integrazione è che il DNA penetra solo nei due siti corrispondenti ai due siti di duplicazione localizzati

sul lato interno della membrana cellulare. Visto che il DNA trasformante ruota oltre la forcella di duplicazione stazionaria, la sintesi del DNA dell'ospite viene interrotta in corrispondenza della regione omologa e il DNA trasformante si integra nel cromosoma dell'ospite. Normalmente se ne integra solo un piccolo segmento. Il DNA trasformante non si trova mai libero nel citoplasma ed è capace di produrre un effetto fenotipico solo dopo l'integrazione. La frequenza di trasformazione aumenta con la concentrazione del DNA fino al livello di saturazione. Se due marcatori sono strettamente associati sullo stesso segmento trasformante di DNA, essi possono entrambi raggiungere un'espressione fenotipica. Tali eventi di *doppia trasformazione* sono rari e la loro frequenza è una funzione del grado di associazione.

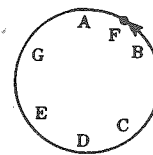
(b) La coniugazione

Il materiale genetico di batteri e virus è organizzato in un'unica struttura circolare, piuttosto che in parecchie strutture lineari come negli organismi superiori. La *coniugazione* è il trasferimento a senso unico di DNA da una cellula donatrice (maschio) a una cellula ricevente (femmina). Nel ceppo K-12 di *Escherichia coli*, il maschio possiede molti duplicati del fattore sessuale F ed è rappresentato dal simbolo F^+ , quando il fattore sessuale è nella fase extracromosomica. Le femmine non hanno tale fattore e sono rappresentate dal simbolo F^- . Quando cellule F^+ si coniugano con cellule F^- , uno o più fattori sessuali sono trasmessi attraverso il ponte citoplasmico (tramite un'appendice tubulare sulle cellule maschili detta *pilo*) e infettano i riceventi F^- , convertendoli in cellule F^+ (maschi). Nessun altro materiale genetico viene trasferito nelle coniugazioni $F^+ \times F^-$.

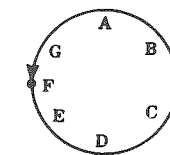
Alcune cellule F^+ in coltura possono integrare una particella del sesso nel loro "cromosoma": esse sono chiamate Hfr (con elevata frequenza di ricombinazione) e hanno la potenzialità di operare un trasferimento genetico. Nelle cellule Hfr neoformate le particelle F extracromosomiche ben presto si disintegrano e scompaiono. Quando una particella F si installa in un cromosoma, rompe l'anello in quel punto. Durante la coniugazione è l'estremità del cromosoma distale rispetto al fattore F ad essere trasferita per prima. Il fattore F all'estremità terminale del cromosoma Hfr viene invece raramente trasferito, dal momento che il ponte citoplasmico viene mantenuto solo per un breve periodo di tempo. La sua rottura blocca il trasferimento del materiale genetico dal donatore al ricevente. Così, a meno che l'intero cromosoma non venga trasferito (con la particella F all'estremità terminale), l'ex coniugante (cellula ricevente dopo che la coniugazione è stata completata) di $Hfr \times F^-$ è sempre F^- . Ciascun ceppo Hfr trasferisce i suoi marcatori in un ordine particolare.

Per alcune generazioni dopo la coniugazione, l'ex coniugante sarà un diploide parziale (*merozigote*) per quella porzione del cromosoma che ha ricevuto da Hfr. A meno che il pezzo in più (*esogenote* o *merogenote*) si integri nel cromosoma dell'ospite, esso va normalmente perduto e il merozigote diventa di nuovo aploide.

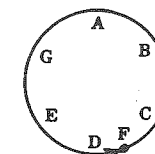
Esempio 15.2.



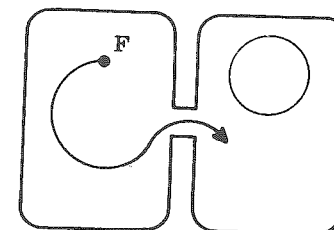
Questo ceppo Hfr trasferisce i suoi marcatori nell'ordine BCDEGAF.



Questo ceppo Hfr trasferisce i suoi marcatori nell'ordine GABCDEF.



Questo ceppo Hfr trasferisce i suoi marcatori nell'ordine DEGABCF.

Hfr
(donatore) F^-
(ricevente)

(c) La trasduzione

Per capire la trasduzione, ci si deve dapprima familiarizzare con il ciclo vitale del batteriofago. Il più noto tra i sistemi di trasduzione è il fago lambda (λ) in *Escherichia coli* e il fago P22 in *Salmonella typhimurium*. Il ciclo litico dei fagi virulenti T-pari (2, 4, 6) che infettano *Escherichia coli* è rappresentato nella fig. 15-1.

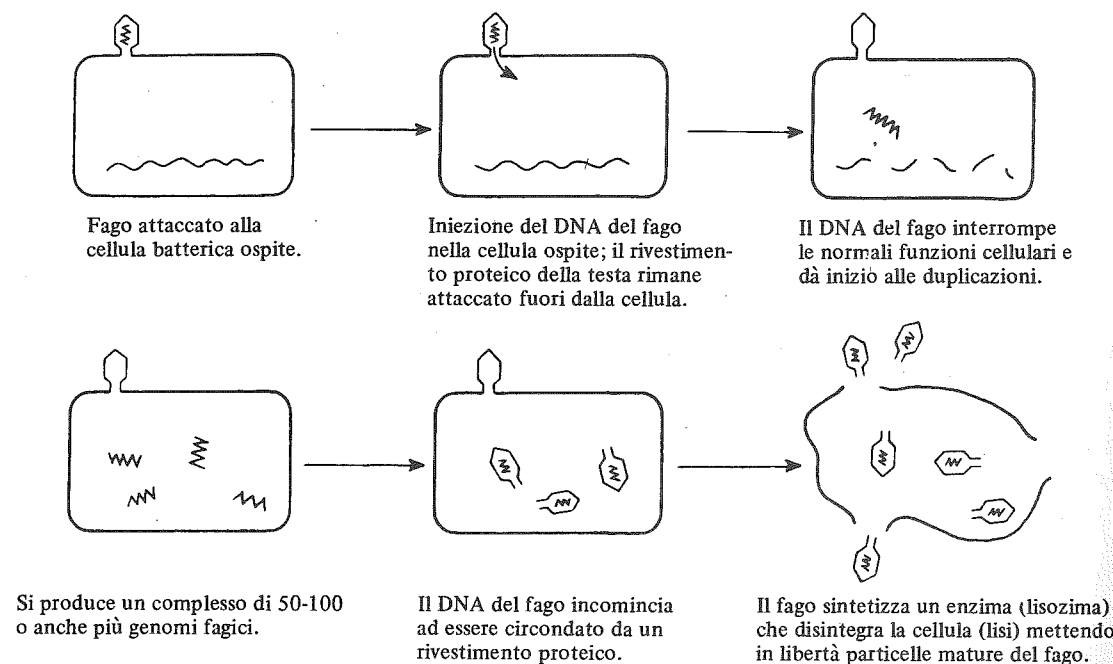


Fig. 15-1. Ciclo vitale di fagi T-pari.

Quando un virus infetta una cellula, ha due possibilità che si escludono l'una con l'altra: (1) può agire come un fago *virulento* ed entrare nel ciclo vegetativo (litico) o (2) può agire come un fago non virulento (temperato), integrandosi nel cromosoma ospite come un *profago* e duplicandosi in sintonia con il cromosoma batterico. Una cellula che ospita un profago si dice *lisogena*, perchè il DNA di questo profago può, in condizioni appropriate, essere liberato o *indotto* dal cromosoma batterico (*deintegrazione*) e ritornare alla fase litica. I batteri lisogeni non si possono normalmente distinguere dalle cellule batteriche normali, se non per il fatto che le loro cellule sono immuni nei riguardi di infezioni da parte di altri fagi della stessa specie. Alcuni batteri lisogeni possono essere indotti a liberare il loro profago dal cromosoma che lo ospita per trattamento con luce ultravioletta (induzione UV) o mediante coniugazione (induzione zigotica).

Quando un profago si deintegra dal cromosoma batterico, può prendere con sé un piccolo segmento adiacente di DNA dell'ospite, che perde così, in questo processo, una parte del suo genoma. La particella fagica può così mediare il trasferimento di un gene batterico o di una porzione di gene batterico da una cellula a un'altra, in un processo chiamato *trasduzione*. Tutti i fagi trasducenti mancano di una porzione del loro stesso genoma. Ne esistono di due tipi soprattutto: (1) trasduttori generalizzati e (2) trasduttori ristretti.

I *trasduttori generalizzati* non hanno un sito specifico di attacco al cromosoma: possono attaccarsi in qualunque punto e così hanno eguale probabilità di trasdurre qualunque gene. Se l'esogenote di un fago trasduttore generalizzato viene incorporato nel genoma del ricevente, si produce un clone di cellule aploidi ricombinanti. Questo processo viene definito *trasduzione completa*. Se invece l'esogenote non viene integrato, ma viene mantenuto co-

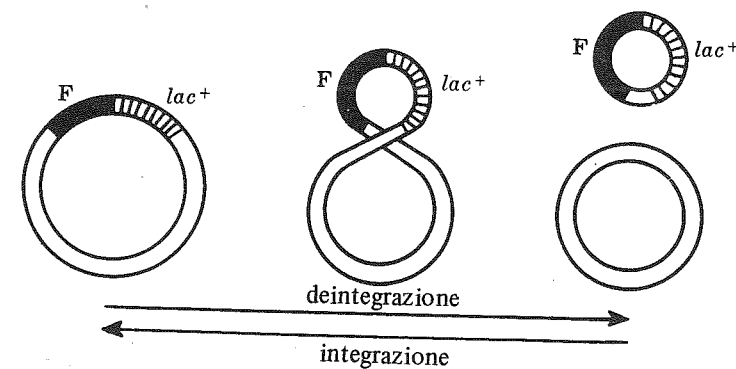
me particella non duplicantesi, esisterà come merozigote solo in una cellula di un clone (*trasduzione abortiva*).

La *trasduzione ristretta* avviene solo in cellule che possiedono un profago integrato nel cromosoma, in un locus specifico chiamato "sito del profago". Solo il locus immediatamente adiacente al sito del profago può essere trasdotto. Il miglior esempio di questa trasduzione ristretta è data dal fago λ (lambda) nel ceppo K12 di *Escherichia coli*. Il sito del profago per λ in *Escherichia coli* è adiacente al gene per la fermentazione del galattosio (gal^+). Quando un ceppo gal^+ lisogeno per λ è indotto a lisarsi dalle radiazioni ultraviolette, alcune particelle λ saranno portatrici del gene gal^+ . Un fago λ trasduttore che abbia "mercanteggiato" una parte del proprio genoma per il marcatore gal^+ è chiamato λdg (cioè λ difettivo per il galattosio) e quindi non può da solo né lisare né lisogenizzare una cellula ospite. Se un ceppo batterico lisogeno gal^- (contenente un normale profago λ) è messo in presenza di una soluzione contenente λdg , i pochi trasduttori gal^+ che ne risultano diventano eterogenoti instabili gal^+/gal^- ("lisogenizzazione doppia"). L'esogenote in trasduzione ristretta non è integrato nel cromosoma ospite, ma può duplicarsi con l'ospite per formare un clone di eterogenoti. Quando questi sono indotti a lisarsi (dall'attività del normale fago "coadiutore") quasi ogni particella λ porta i geni gal , dando come risultato un'elevata frequenza di trasduzione (Hft). La lisogenizzazione e la trasduzione sono proprietà di una singola particella di fago, che si escludono l'una con l'altra.

(d) I plasmidi

I plasmidi sono piccole molecole di DNA circolare extracromosomiche ("citoplasmatiche"), che si duplicano autonomamente. Alcuni plasmidi, detti *episomi*, possono integrarsi nel cromosoma dell'ospite e duplicarsi con esso. Di solito contengono informazioni genetica "non essenziale", come i geni per la "sessualità" o per la resistenza agli antibiotici. Un *vettore*, usato in ingegneria genetica (capitolo 16) per introdurre nuovi geni in una cellula batterica, può essere un batteriofago come λ o un plasmide come il fattore sessuale F di *Escherichia coli*. Se il solo materiale genetico esistente in una particella F è il gene per il sesso, l'episoma avrà probabilmente una scarsa omologia con il cromosoma batterico e quindi avrà poca probabilità d'integrarsi nel cromosoma dell'ospite (convertendo quest'ultimo in una cellula Hfr). Quando una particella F in una cellula Hfr si deintegra, può portare con sé una porzione del cromosoma ospite adiacente. Si dice che una simile particella F possiede una *memoria cromosomica* e ci si aspetterebbe che, in seguito all'infezione, si integri nel cromosoma F^- con una frequenza relativamente elevata. Occasionalmente il "pezzo di memoria" di una particella F è abbastanza lungo da permettere al fattore del sesso di duplicarsi autonomamente come particella infettiva; inoltre, se è portatore di un cistrone completo, può anche essere capace di produrre un effetto fenotipico. Questo processo è chiamato *seduzione* e, per complementazione o integrandosi nel cromosoma dell'ospite, può produrre effetti fenotipici nei merozigoti.

Esempio 15.3.



Se il locus del lattosio è adiacente al locus F, per deintegrazione (rottura e riunione) può formarsi una particella $F-lac^+$.

7. La mappa del cromosoma batterico

(a) La coniugazione interrotta.

Quando colture Hfr e F^- vengono mescolate, la coniugazione può venire arrestata in qualunque momento lo si voglia sottoponendo il miscuglio alle forze di scissione di un Frullatore Waring che artificialmente rompe i ponti di coniugazione. Il campione viene immediatamente diluito e inoculato su terreni selettivi, poi incubato e quindi conteggiato per stabilire il numero di ricombinanti. Oltre al marcatore prescelto, il ceppo Hfr deve anche portare un marcatore distale auxotrofo o marcatore di sensibilità, che impedisce la crescita delle cellule Hfr sul terreno selettivo e quindi consente solo alle cellule ricombinanti di comparire. Questa tecnica viene chiamata *controselezione*. A causa della polarità secondo la quale viene trasferito il cromosoma Hfr, il tempo in cui i vari marcatori genetici compaiono nel ricevente indica la loro organizzazione lineare nel cromosoma donatore. A una data temperatura, il trasferimento della prima metà del cromosoma Hfr procede con una velocità relativamente uniforme; pertanto il tempo di entrata dei diversi marcatori in una cellula ricevente (F^-) è una funzione della distanza fisica fra loro. A causa degli errori introdotti con le manipolazioni sperimentali, questo metodo è più adatto per quei marcatori che sono distanziati di più di due minuti.

Esempio 15.4. Un ceppo Hfr portatore dei marcatori prototrofi a^+ , b^+ , c^+ viene mescolato con un ceppo F^- , portatore degli alleli auxotrofi a , b , c . La coniugazione è stata interrotta con intervalli di 5 minuti e i batteri inoculati su terreni che hanno rivelato la presenza di ricombinanti.

Tempo (in minuti)	Ricombinanti
5	ab^+c
10	ab^+c^+
15	$a^+b^+c^+$

L'ordine dei geni nel ceppo donatore Hfr è $b^+ - c^+ - a^+$; b è a meno di 5 unità di tempo dall'origine; c è a meno di 10 unità di tempo da b ; a è a meno di 10 unità di tempo da c .

(b) La coniugazione ininterrotta.

Quando alla coniugazione viene consentito di procedere senza interruzioni artificiali, il tempo di rottura del ponte citoplasmico diventa chiaramente un fattore casuale fra le coppie che si appaiano. Quanto più un marcatore si trova vicino all'origine (estremità di testa del cromosoma donatore) tanto maggiori sono le sue possibilità di comparire come ricombinante in una cellula ricevente. Le cellule donatrici e riceventi vengono mescolate per circa un'ora nel brodo di coltura e quindi inoculate in terreni selettivi che consentono la crescita solo di ricombinanti F^- per uno specifico marcatore. La controselezione contro Hfr deve anche far parte di un disegno sperimentale. Il marcatore controselettivo dovrebbe essere collocato quanto più distante possibile dal marcatore prescelto di modo che i ricombinanti non selezionati non vadano perduti con la sua inclusione. Le frequenze con le quali marcatori non prescelti compaiono in ricombinanti selezionati sono inversamente proporzionali alle loro distanze dal marcatore prescelto, a condizione che siano distanti da esso. Naturalmente, ogni marcatore non prescelto fra il marcatore selezionato e l'origine del cromosoma sarà sempre trasferito in testa a simile marcatore. I marcatori prosimali, lontani più di tre unità di tempo, presentano circa il 50% di ricombinazione, indicando così che il numero medio degli scambi fra loro è superiore a uno. Proprio nel punto in cui la costruzione di una mappa grossolana mediante coniugazione, cioè per marcatori lontani meno di due unità di tempo, diventa inefficace, la mappa di ricombinazione diventa invece assai efficiente, permettendo così la stima di distanze fra geni strettamente associati o fra siti mutanti all'interno dello stesso gene. Le distanze fra geni possono venire espresse in tre tipi di unità: (1) unità di tempo, (2) unità di ricombinazione, (3) unità chimiche.

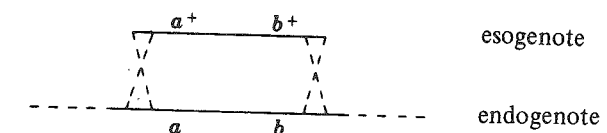
Esempio 15.5. Se, in *Escherichia coli*, un minuto di coniugazione è equivalente a 20 unità di ricombinazione e l'intero cromosoma viene trasferito in 100 minuti, allora la lunghezza totale della mappa è di 2000 unità di ricombinazione. Se, nel cromosoma, esistono 10^7 paia di nucleotidi, allora un'unità di ricombinazione rappresenta $10^7/2000 = 5000$ paia di nucleotidi.

(c) La mappa di ricombinazione.

Praticamente tutte le opportunità di ricombinazione nei batteri implicano solo un parziale trasferimento di materiale genetico (*meromissi*) e non quello dell'intero cromosoma. Uno o più geni hanno la possibilità d'integrarsi nel cromosoma dell'ospite per coniugazione, secondo la lunghezza del pezzo di donatore ricevuto. Normalmente gli esogenoti devono integrarsi per potersi duplicare e distribuire a tutte le cellule di un clone. Durante la trasformazione o la trasduzione solo un piccolo segmento di DNA viene normalmente integrato. Così, se una cellula viene trasformata per due marcatori genetici dallo stesso frammento trasformante di DNA (doppia trasformazione), i due loci devono essere strettamente associati. Parimenti, se una cellula è simultaneamente trasdotta per due geni dal DNA di un unico fago trasducente (*cotrasduzione*), i due marcatori devono essere strettamente associati. Il grado di associazione fra diversi geni funzionali (intercistronica) o fra mutazioni all'interno dello stesso gene funzionale (intracistronica) può allora essere calcolato in base ai risultati degli incroci specifici.

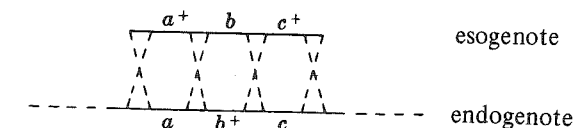
Nei sistemi merozigoti in cui il contributo genetico del genitore donatore è incompleto, è necessario un numero pari di crossing over per integrare l'esogenote nel cromosoma dell'ospite (*endogenote*).

Esempio 15.6.



I ricombinanti prototrofi devono integrare l'esogenote da qualche punto a sinistra del locus a fino a qualche punto a destra del locus b . Sono necessari due crossing over (o un numero comunque pari) perché si abbia quest'integrazione.

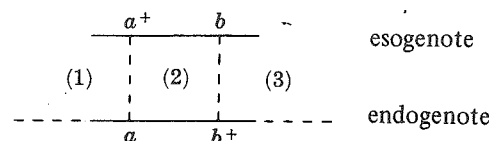
Esempio 15.7.



In questo esempio un ricombinante prototrofo richiede un crossing over quadruplice (o un numero comunque pari) per l'integrazione di tutti i geni di tipo selvatico.

Il numero totale di discendenti è ignoto nei sistemi merozigoti, per cui non si può esprimere su questa base la frequenza di ricombinazione. Le frequenze di ricombinazione devono dunque essere messe in rapporto a qualche standard che sia comune a tutti gli incroci. Per esempio, il numero di ricombinanti prototrofi prodotti dall'incrocio di due ceppi mutanti può essere confrontato con il numero emergente dall'incrocio di tipi selvatici con tipi mutanti. Tuttavia, molte fonti di errore sono inevitabili quando si comparino i risultati di incroci diversi. Questo problema può essere aggirato confrontando il numero di ricombinanti prototrofi con qualche altra classe di ricombinanti che provengono dallo stesso incrocio.

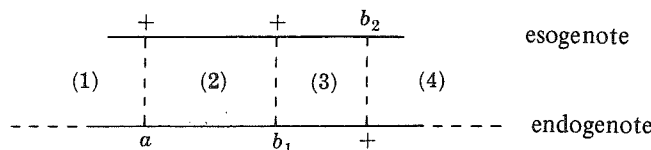
Esempio 15.8. Test dei rapporti per diversi geni funzionali. Si supponga di avere due ceppi mutanti, a e b , in cui il ceppo donatore (a^+b) può crescere su un terreno minimo rifornito di sostanza B, mentre il ceppo ricevente (ab^+) non può farlo.



Il crossing over nelle regioni (1) e (2) produce ricombinanti prototrofi (a^+b^+) in grado di crescere su terreni non riforniti di sostanze supplementari. Se il terreno viene rifornito di sostanza B, allora i ricombinanti a^+b che derivano da crossing over verificatisi nelle regioni (1) e (3) possono crescere in aggiunta ai prototrofi.

$$\text{Rapporto di ricombinazione standardizzato} = \frac{\text{numero di prototrofi}}{\text{numero di ricombinanti}}$$

Esempio 15.9. Test del rapporto intracistronico. Si considerino due mutazioni intracistroniche, b_1 e b_2 , che non permettono la crescita su un terreno privo della sostanza B. Il ceppo ricevente contiene una mutazione in un altro gene funzionalmente diverso (a), sia associato sia non associato a b , che non permette la crescita se non vengono fornite le sostanze A e B.



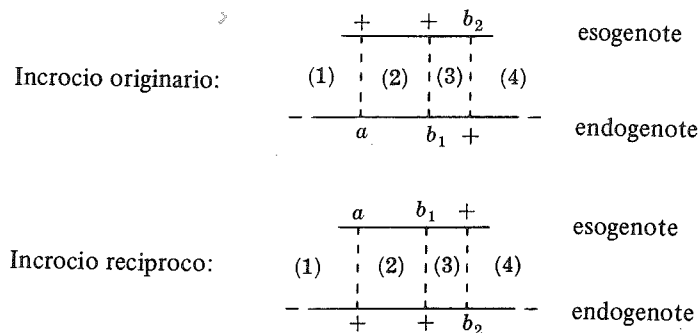
Su un terreno privo delle sostanze supplementari, compaiono solo i prototrofi formati da crossing over verificatisi nelle regioni (1) e (3). Su un terreno rifornito solo della sostanza B, possono sopravvivere quei ricombinanti che coinvolgono la regione (1) e una qualsiasi delle altre tre regioni.

$$\text{Rapporto di ricombinazione standardizzato} = \frac{\text{numero di colonie su terreno non rifornito di B}}{\text{numero di colonie su terreno rifornito di B}}$$

(d) La definizione dell'ordine genetico.

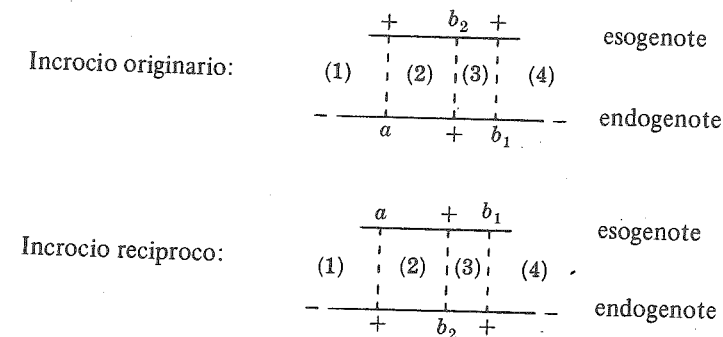
La costruzione di mappe di piccole regioni, nei microrganismi, ha rivelato che i crossing over multipli avvengono spesso con una frequenza molto superiore a quella casuale, un fenomeno chiamato "interferenza negativa localizzata". Il solo metodo non ambiguo per determinare l'ordine di siti molto strettamente associati è quello che ricorre a incroci reciproci che coinvolgono tre fattori. Si supponga di sapere che la localizzazione del gene a è alla sinistra del gene b mentre l'ordine di due mutanti all'interno del cistrone b è ignoto. Gli incroci reciproci porteranno a risultati diversi, secondo l'ordine dei siti mutanti.

Esempio 15.10. Si supponga che l'ordine dei siti sia $a-b_1-b_2$.



Nell'incrocio originario, i prototrofi (+++) possono essere prodotti da crossing over che si verificano nelle regioni (1) e (3). Nell'incrocio reciproco, essi compaiono in seguito a crossing over verificatisi nelle regioni (3) e (4). Il numero dei prototrofi dovrebbe essere all'incirca lo stesso nei due incroci.

Esempio 15.11. Si supponga che l'ordine dei siti sia $a-b_2-b_1$.



Nell'incrocio originario, la produzione di prototrofi richiede quattro crossing over, uno in ciascuna delle regioni (1), (2), (3) e (4). Nell'incrocio reciproco sono necessari, invece, solo due crossing over (nelle regioni (2) e (3)) per produrre prototrofi. Quindi ci si aspettano molti più ricombinanti prototrofi dall'incrocio reciproco che dall'incrocio originario.

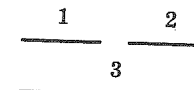
(e) La costruzione di mappe di complementazione.

Una particella F che trasporta un gene batterico diverso dal fattore del sesso produce un merozigote F^+ , relativamente stabile. Questi diploidi parziali possono essere usati per test di complementazione su mutanti che riguardano lo stesso carattere.

Esempio 15.12. Un ceppo Hfr di *Escherichia coli* è incapace di fermentare il lattosio (z_1^-) e può trasferire il gene z_1^- per seduzione a un ricevente mutante (z_2^-), formando l'eterozigote $z_2^-(F^-z_1^-)$. Se z_1 e z_2 appartengono allo stesso cistrone (alleli funzionali), allora la complementazione non avviene e vengono prodotti soltanto dei fenotipi mutanti. Se z_1 e z_2 sono mutanti in cistroni diversi, allora la complementazione potrebbe produrre tipi selvatici in grado di fermentare il lattosio.

La complementazione intracistronica può essere possibile qualche volta quando il prodotto enzimatico si compone di due o più catene polipeptidiche identiche. Le prove sperimentali hanno dimostrato che un miscuglio *in vitro* di enzimi inattivi provenienti da qualche mutante in complementazione può "ibridarsi", così da produrre un enzima che abbia fino al 25% dell'attività normale. Si ammette che i mutanti che non si complementano con altri mutanti (con alcuni soltanto) si sovrappongono nella loro funzione. Una mappa di complementazione può essere costruita partendo dai risultati sperimentali che si ricavano saggiando tutte le possibili coppie di mutanti per la loro azione complementare nei merozigoti batterici o negli eterocarionti fungini. Una mappa di complementazione non può essere paragonata in alcun modo a una mappa di crossing over, dal momento che il gene viene definito secondo criteri diversi. Essa non dice niente della struttura o della localizzazione delle mutazioni interessate. Le mappe di complementazione sono dedotte dai merozigoti o dagli eterocarionti; le mappe di crossing over da esperimenti di ricombinazione.

Esempio 15.13. Tre mutanti si dispongono per complementazione su una mappa in questo modo:

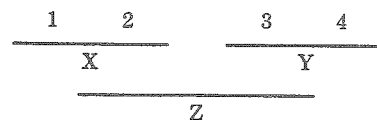


Ciò indica che i mutanti 1 e 2 sono complementari e non si sovrappongono nelle loro funzioni. Pertanto 1 e 2 sono mutazioni non alleliche. Il mutante 3 non si complementa né con 1 né con 2 e quindi deve sovrapporsi (in una certa misura) tanto con 1 quanto con 2. Da ciò risulta che 3 è funzionalmente allelico tanto con 1 quanto con 2.

(f) La costruzione di mappe mediante mutanti di delezione.

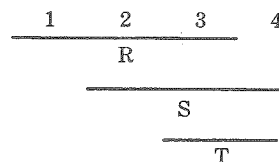
Una delezione di un gene funzionale in qualche segmento non può ricombinarsi con mutazioni puntiformi in quella stessa regione anche se, invece, mutazioni in due punti in siti diversi all'interno di questa stessa regione possono ricombinarsi e produrre il tipo selvatico. Un'altra proprietà caratteristica dei mutanti di delezione è la loro stabilità, essendo essi incapaci di mutare di nuovo nel tipo selvatico. L'uso di delezioni che si sovrappongono può ridurre considerevolmente il lavoro nell'analisi della struttura fine di un gene.

Esempio 15.14. Nel determinare i limiti di una delezione, si supponga che una serie di mutanti singoli (1, 2, 3, 4) sia già stata disposta su una mappa come appare qui sotto:



Esempio 15.15. Una delezione che non si ricombina con i mutanti puntiformi 1 e 2 mentre produce il tipo selvatico con 3 e 4 si estende sulla regione X. Una delezione che non dà ricombinanti con 3 e 4 ha i limiti indicati da Y. Un mutante di delezione che produce il tipo selvatico solo con i mutanti puntiformi 1 o 4 ha i limiti indicati da Z.

Nell'assegnare le mutazioni puntiformi alle regioni di delezione



date le delezioni R, S e T mostrate qui sopra, la mutazione che si ricombina per dare il tipo selvatico con le delezioni S e T, ma non con R, è 1. Il numero 3 è il solo dei quattro mutanti che non si ricombina con una delle tre delezioni.

I VIRUS

1. Caratteristiche dei virus.

I virus non sono cellule, ma parassiti intracellulari obbligati. Tutti i virus infettivi (virioni), con l'eccezione dei viroidi*, consistono di una componente genetica (DNA o RNA, mai entrambi) complessata (spesso avvolta) da proteine dette collettivamente *capside*. Il capsido di solito consiste di subunità identiche ripetute dette *capsomeri*. La combinazione dell'acido nucleico virale con le proteine di rivestimento è chiamata *nucleocapside*. Le componenti virali (acido nucleico e proteine) si assemblano spontaneamente, senza l'aiuto di appositi enzimi, a formare i virioni completi all'interno della cellula ospite. I virus che infettano i batteri sono detti *batteriofagi* o più semplicemente *fagi*. Il nucleocapside rappresenta lo stadio infettivo di tutti i fagi. La maggioranza dei fagi abbandonano la cellula ospite provocandone la *lisi*. Alcuni virus animali e vegetali non rompono o lisano le cellule ospiti, ma vengono "secreti" da esse attraverso un processo di "gemmazione". Il nucleocapside acquista, pertanto, uno strato esterno costituito da un lembo della membrana cellulare dell'ospite (contenente proteine e lipidi) chiamato *peplo*. Le proteine prodotte secondo le istruzioni virali possono venire esposte sullo strato più esterno al peplo e vengono chiamate *peplomeri*. Esse servono come siti di attacco specifici per infettare altre cellule ospiti. La serie dei fagi T si attaccano alle cellule batteriche per mezzo della coda o delle fibre della coda e iniettano l'acido nucleico all'interno della cellula. Il capsido e le proteine della coda rimangono fuori, come sacchetti vuoti. Altri tipi di virus

* I viroidi sono piccoli segmenti infettivi (circa 255 nucleotidi) di RNA a singolo filamento nudo. Come si duplicano è un mistero. Furono scoperti per la prima volta come la causa della malattia del tubero lungo nelle patate e pomodori.

sembrano entrare nelle cellule attraverso un processo inverso alla gemmazione (una forma di endocitosi o di fagocitosi). Una volta dentro la cellula, i pepli (se presenti) e il capsido devono essere rimossi prima che l'acido nucleico virale si duplichi ("crescita vegetativa" o "ciclo litico") o lisogenizzi la cellula (si integri cioè nel cromosoma dell'ospite). Il numero di fagi in una coltura può essere valutato iniettandone un'appropriata diluizione su una piastra contenente le cellule ospiti. Ciascuna particella fagica litica formerà una *placca* (buco) in questa piastra.

La maggior parte dei virioni variano come dimensioni da circa 10 nanometri (nm) (per esempio i batteriofagi F2, R17 e MS2) a 300 nm (i poxvirus animali) e passano attraverso filtri (da 0,2 a 0,45 micrometri (μm)) che non lasciano passare i batteri (con l'eccezione dei *Chlamydia*, *Rickettsia* e *Mycoplasma*). Il limite di risoluzione del microscopio ottico è di circa 200 nm, e perciò la maggior parte dei virus non sono visibili senza l'aiuto del microscopio elettronico.

I virus differiscono dagli organismi cellulari per le seguenti caratteristiche:

- (1) Hanno un solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA), mentre le cellule li hanno entrambi.
- (2) Non sono capaci di sintetizzare le proteine (non contengono cioè ribosomi), di utilizzare fonti proprie di energia chimica (non hanno metabolismo), o di generare ATP (non hanno un sistema di citocromi).
- (3) Non hanno membrane esterne lipoproteiche, o organelli dotati di membrana, oltre ai pepli derivati dall'ospite.
- (4) Non sono colpiti da concentrazioni di antibiotici che non sono tossiche per le cellule.
- (5) Sono sensibili a certe proteine prodotte dalle cellule dei più evoluti vertebrati, chiamate *interferoni*, che interferiscono con la duplicazione virale, ma non con l'attacco o l'entrata del virus nella cellula ospite.
- (6) Non hanno sistemi di movimento oltre alla diffusione.
- (7) Non "crescono" nel senso classico di crescita di massa; e cioè, una volta formato, il virione non aumenta più la sua dimensione.

I fenotipi virali che sono utili per una classificazione includono il tipo di acido nucleico (RNA o DNA), la forma di acido nucleico (a singolo o a doppio filamento), il peso molecolare, la composizione molecolare in basi (contenuto di G + C), la simmetria (cubica, elicoidale o complessa), il rivestimento o meno, la dimensione (determinata attraverso filtrazione, microscopia elettronica e ultracentrifugazione), la presenza o assenza dell'enzima trascrittasi inversa (DNA polimerasi RNA dipendente) in certi virus a RNA, la composizione antigenica (attività sierologica), le caratteristiche di agglutinazione e lo spettro degli ospiti (specie) infettate.

2. La struttura genetica e la duplicazione dei virus.

Mentre il materiale genetico di tutti gli organismi cellulari è il DNA lineare a doppio filamento, i virus possono avere DNA o RNA, nelle forme vuoi a singolo vuoi a doppio filamento. Ciascuna di queste forme richiede una diversa modalità di duplicazione. Ci sono sei schemi principali di duplicazione e trascrizione conosciuti nei virus animali, i cui dettagli si possono trovare in qualunque manuale di virologia completo. I virus a RNA non hanno bisogno di sintetizzare DNA per duplicarsi, ma i virus a DNA devono fabbricare RNA per produrre nuovi virioni. I virus a RNA oncogeni (capaci di indurre tumori), a singolo filamento, devono fabbricare una copia di DNA (cDNA) e questa si deve integrare nel cromosoma dell'ospite come provirus prima di essere capace di *trasformare* una cellula normale in una cancerosa. Per fabbricare DNA da RNA è necessario uno speciale enzima chiamato DNA polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa). Le cellule non infettate non contengono questo enzima; esso deve essere prodotto per traduzione delle istruzioni contenute nell'RNA virale (che si comporta quindi come un mRNA). Questi virus oncogeni, nella forma di virioni infettivi, contengono la trascrittasi-inversa e la propria DNA-polimerasi RNA-dipendente (sintetizzata nell'ospite infettato per ultimo). Appartengono ad un gruppo di virus chiamati "retrovirus" (Retroviridae), perché sembrano invertire il normale flusso cellulare di informazione genetica dal DNA

all'RNA. La trascrittasi inversa può essere utilizzata *in vitro* per sintetizzare un gene cellulare dal suo trascritto (mRNA) purificato.

Nell'infezione dei batteriofagi (liberazione dei virioni) ci sono cinque passaggi principali (fig. 15-1).

- (1) L'adsorbimento del fago sui recettori della cellula ospite per mezzo di specifiche proteine virali.
- (2) La penetrazione nella cellula ospite dell'acido nucleico virale (di solito per iniezione).
- (3) La duplicazione del "genoma" virale e la sintesi delle proteine virali.
- (4) Il montaggio spontaneo dei nuovi nucleocapsidi.
- (5) La liberazione dei virioni maturi dalla cellula ospite.

Essenzialmente gli stessi passaggi sono seguiti dai virus animali, con l'aggiunta di un passaggio in cui il virione viene liberato del nucleocapside dopo che è penetrato nella cellula. La sintesi dell'mRNA cellulare cessa subito dopo l'infezione fagica; le nucleasi fagiche distruggono il DNA dell'ospite. Alcuni fagi (per esempio il T4) possiedono l'enzima idrossimetilasi che modifica le citosine fagiche in idrossimetilcitosine. Le basi così modificate sono resistenti alla degradazione compiuta dalle nucleasi sia dell'ospite sia del fago. Alcuni fagi possiedono o fabbricano dei repressori (proteine) che disattivano le funzioni del DNA ospite. Altri fabbricano o possiedono specifiche polimerasi degli acidi nucleici che duplicano o trascrivono soltanto i genomi virali. Alcuni virus contengono l'informazione per sintetizzare tRNA nuovi che traducono preferenzialmente soltanto le proteine virali.

Esempio 15. 16.

Il virus del sarcoma di Rous (RSV), che causa tumori nei tessuti osseo e connettivo dei polli, consiste di due molecole di RNA a singolo filamento identiche. Da quattro a otto molecole di tRNA sono legate a ciascuno dei due genomi virali 35S e "incollano" le due catene in un complesso 70S. Come tutte le DNA-polimerasi, la trascrittasi inversa non può iniziare le catene DNA, ma può soltanto aggiungere desossiribonucleotidi alle catene DNA nascenti o a corti RNA "d'innescio" ("primers") che iniziano la sintesi di DNA. I "primers" per la sintesi del DNA dei genomi del RSV sembrano essere alcune delle molecole tRNA legate al complesso 70S. Il genoma doppio del RSV è una caratteristica piuttosto unica, che non si trova in molti altri virus.

3. La mappa del genoma virale.

Durante la duplicazione del DNA del fago, un insieme di forse 100 o più genomi fagici può essere presente all'interno della cellula ospite. Esiste quindi un'opportunità per ciascuna molecola di DNA di andare incontro a svariati eventi di ricombinazione, chiamati "tornate di accoppiamenti". Questo aspetto del ciclo vitale del fago rende l'interpretazione dei dati di ricombinazione considerevolmente più difficile che non nella maggior parte degli organismi superiori. Una certa compensazione si può avere per qualcuna di queste difficoltà ricorrendo a un appropriato programma sperimentale e accettando quelle ipotesi che sono concordanti. In tal modo, l'analisi del genoma fagico si è avvicinata al livello di risoluzione nucleotidico.

Forse l'analisi più definitiva che sia mai stata realizzata della struttura fine di un gene è quella di Benzer che ha studiato la regione r_{II} del fago T4. Quando il T4 di tipo selvatico (r^+) infetta l'ospite *Escherichia coli*, produce placche relativamente piccole con bordi increspati. Nella regione r sono state scoperte molte mutazioni che producono tutte una lisi più rapida del loro ospite che non il tipo selvatico, il quale produce placche più grandi con bordi relativamente più lisci. Questi mutanti r possono essere classificati in tre gruppi fenotipici, secondo la loro capacità di produrre lisi su tre ceppi di *Escherichia coli*.

I siti di r_I , r_{II} e r_{III} sono localizzati su una mappa in punti completamente diversi e non contigui. La regione r_{II} è lunga circa 8 unità di ricombinazione, rappresentando così all'incirca l'1% del cromosoma del fago. Per mezzo di test di complementazione, si dimostra che la regione r_{II} consiste di due cistroni adiacenti e contigui, A e B.

Ceppo del fago	Ceppo di <i>Escherichia coli</i>		
	B	S	K
r^+ (selvatico)	tipo selvatico	tipo selvatico	tipo selvatico
r_{II}	grandi placche	grandi placche	grandi placche
r_{II}	grandi placche	tipo selvatico	nessuna placca
r_{III}	grandi placche	tipo selvatico	tipo selvatico

Quando due diversi ceppi r_{II} (contenenti mutazioni in cistroni diversi) vengono aggiunti al ceppo K12 in numero abbastanza grande da assicurare che ciascuna cellula sia infettata da almeno un rappresentante di ciascun mutante, tutte le cellule subiranno rapidamente una lisi, liberando un numero normale di fagi figli (la maggior parte dei quali sono difettivi come i ceppi parentali). Se i due ceppi di fagi contengono mutazioni nello stesso cistrono r_{II} , solo i rari ricombinanti di tipo selvatico saranno in grado di causare la lisi e il numero di cellule intaccate sarà allora molto piccolo. Quindi i risultati della complementazione si distinguono facilmente da quelli della ricombinazione.

Sono state usate delle delezioni che si sovrappongono per delimitare un numero di siti mutanti in un piccolo segmento di un cistrono. Benzer non ha cercato di ordinare i siti mutanti all'interno di ciascuno di questi piccoli segmenti, ma li ha però sottoposti a test di ricombinazione per constatare la loro identità o non identità. Ciò è stato realizzato infettando doppiamente il ceppo B nel brodo di coltura con una coppia di mutanti r_{II} (r_{IIa} e r_{IIb}) e consentendo loro di lisare la coltura. Il numero totale di fagi figli è calcolato inoculando diluizioni di questo prodotto di lisi in colonie di *coli* B e conteggiando le placche che ne risultano. I ricombinanti di tipo selvatico sono contati inoculando il prodotto di lisi in una coltura di *coli* K. Per ogni placca di tipo selvatico ($r_{IIa}^+ r_{IIb}^+$) conteggiata, si ammette che si sia formato anche un ricombinante reciproco mutante doppio ($r_{IIa} r_{IIb}$) non riconoscibile.

$$\text{Percentuale di ricombinazione} = \frac{200 (\text{numero di placche su K})}{\text{numero di placche su B}}$$

La più piccola frequenza di ricombinazione riproducibile osservata fra due siti nella regione r_{II} è circa dello 0,02%, il che corrisponde a circa 1/400 di un gene la cui lunghezza totale è solo di 8 unità di ricombinazione!

4. Il batteriofago lambda (λ).

Per trasformare una cellula normale in una cellula cancerosa, un virus oncogeno si deve integrare nel cromosoma dell'ospite in un modo analogo alla lisogenizzazione di una cellula batterica da parte di un fago temperato. Oggi si conoscono i meccanismi di controllo della lisogenizzazione da parte del fago λ , molto meglio che per qualsiasi altro virus. Relativamente poco si sa circa l'analogo processo di virogenia nelle cellule animali. Si spera che alcune informazioni ottenute dallo studio di fagi come lambda possano essere usate per comprendere i meccanismi attraverso i quali i virus oncogeni trasformano una cellula normale in cancerosa o come un uovo fecondato si differenzia nei vari tipi cellulari di un organismo multicellulare.

La figura 15-2 è una mappa genetica del genoma di lambda e ad essa faremo riferimento durante la discussione che segue. Una proteina repressore prodotta dal gene *cI* impedisce il ciclo litico e permette di stabilizzare o di mantenere la lisogenizzazione. Inoltre, il repressore rende la cellula immune da ulteriori infezioni da fagi lambda esogeni. Due operatori sono sensibili al repressore, o_R (operatore di destra) e o_L (operatore di sinistra). Quando blocca o_L , o il repressore impedisce l'espressione del gene *N*; quando blocca o_R , impedisce l'espressione dei geni *O* e *P*. I prodotti proteici dei geni *N*, *O* e *P* sono necessari per l'espressione della maggior parte degli altri geni strutturali di lambda. Ciascun operatore ha il proprio sito del promotore,

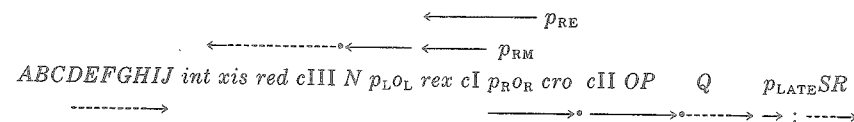


Fig. 15-2. La mappa del genoma di lambda. Le frecce piene indicano la direzione delle regioni genetiche cotrascritte, soggette all'azione di terminazione del fattore rho. Le frecce tratteggiate indicano l'estensione della cotrascrizione quando sono presenti fattori di antiterminazione che annullano l'attività del fattore rho; il prodotto del gene *N* annulla la terminazione in (*) e il prodotto del gene *Q* in (:). (Da Gunther S. Stent e Richard Calendar, *Molecular Genetics: An Introductory Narrative*, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1978).

p_L e *p_R*. Ciascun operatore consiste di tre sequenze nucleotidiche di 16 basi, correlate da simmetria binaria. Così, tre molecole di repressore possono legarsi a ciascun locus operatore.

Il repressore di lambda controlla la propria sintesi; quando è a bassa concentrazione, induce la propria sintesi, mentre ad alte concentrazioni la reprime. Il gene *cI* che produce il repressore è trascritto da destra verso sinistra, iniziando dal sito del promotore indicato *p_{RM}* (promotore del repressore, di mantenimento). Fra i tre siti per il legame del repressore nella regione *p_{ROR}*, quello più a sinistra si sovrappone con *p_{RM}*, di modo che quando il repressore vi si lega, il gene *cI* viene disinnescato. Il repressore si lega più prontamente al sito più a destra nella regione *p_{ROR}* e ha un'affinità minore per il sito più a sinistra. Così, quando il rifornimento di repressore è scarso, soltanto il sito più a destra si complessa con il repressore, stimolando in realtà la trascrizione del repressore (analogamente al controllo positivo esercitato dal complesso CAP-cAMP se legato al sito di legame del CAP nella regione *lacP*). Se il repressore è presente in eccesso, il sito di legame più a sinistra sarà coperto dal repressore e la sintesi del repressore sarà inibita attraverso un controllo negativo. La concentrazione del repressore può pertanto essere mantenuta in una misura relativamente ristretta.

Per stabilire lo stato lisogenico è necessaria una concentrazione di repressore molto più alta che per mantenerlo. Si può raggiungere una frequenza di sintesi del repressore da 50 a 100 volte più elevata quando la trascrizione viene iniziata dal sito indicato *p_{RE}* (promotore del repressore, instaurazione), che si trova parecchie centinaia di paia di basi nucleotidiche (nbp) a destra del promotore *p_{RM}*. I prodotti dei geni *cII* e *cIII* esercitano un controllo positivo essenziale per iniziare la sintesi dell'mRNA di *cI* nel sito *p_{RE}*, ma non essenziale per iniziarla nel sito *p_{RM}*. Le molecole di mRNA iniziate nel sito *p_{RE}*, più lunghe, possiedono una efficiente sequenza di legame al ribosoma per tradurre il gene *cI*. Le molecole di mRNA iniziate nel sito *p_{RM}*, più corte, probabilmente non contengono tutte le nbp del legame al ribosoma e sono perciò tradotte in modo molto inefficiente nelle proteine del repressore. Quando la trascrizione inizia nel sito *p_{RE}*, l'RNA polimerasi non è limitata nel suo movimento attraverso il locus *o_R* nel gene *cI*, anche se tutte e tre le sequenze di *o_R* sono legate al repressore. Questo controllo positivo della sintesi del repressore avviene sia a livello trascrizionale (per mezzo dei prodotti *cII* e *cIII* che stimolano l'inizio dell'mRNA nel sito *p_{RE}*) sia a livello traduzionale (per mezzo dell'alta efficienza del legame tra il ribosoma e l'mRNA prodotto a partire dal sito *p_{RE}*).

Una risposta litica produttiva può essere evocata quando una cellula non lisogenica è infettata da uno o più fagi lambda. Il primo gene sintetizzato dall'operone di destra è *cro* (controllo del repressore e di altre cose); il suo prodotto è un repressore del repressore dell'immunità litica (il prodotto del gene *cI*). Si pensa che il prodotto del gene *cro* inizi la trascrizione del gene *cI* nel sito promotore *p_{RM}*. Se il repressore dell'immunità è presente nella cellula, disinnescherà l'operone di destra e non sarà prodotto nessun "repressore del repressore"; questa è la condizione normale nello stato di profago. Tuttavia, se il repressore non è presente nella cellula, il repressore prodotto da *cro* impedisce la sintesi del repressore dell'immunità, favorendo così la risposta litica.

Tra i geni *N* e *cIII*, *cro* e *cII* e *P* e *Q* esistono dei siti attenuatori (discussi nel capitolo 14 a proposito dell'operone del triprofano in *Escherichia coli*). Il prodotto del gene *N* è un fattore

di antiterminazione che impedisce al fattore rho di legarsi ai segnali di terminazione. Così, la presenza del prodotto del gene *N* consente la trascrizione dei geni distali, altrimenti soggetti a terminazione nelle regioni dell'attenuatore. Tuttavia, il fattore di terminazione del gene *N* non consente la trascrizione dei "geni tardivi" da *S* a *J* in una singola molecola di mRNA poligenico, a iniziare dal promotore indicato *p_{LATE}*. La maggioranza dei prodotti di questi geni sono componenti strutturali proteiche del fago infettivo lambda (e cioè le proteine della testa e della coda). Il fattore di antiterminazione prodotto dal gene *Q* è richiesto per l'espressione dei geni che sono sotto il controllo del promotore *p_{LATE}*.

Il genoma lineare di lambda nel fago infettivo si circolarizza prima della duplicazione, di modo che i geni *R* e *A* diventano adiacenti. Questo si realizza per mezzo dei "prodotti enzimatici precoci" dei geni *int*, *xis*, *red* e *rex*, che riguardano la ricombinazione genetica e l'integrazione o la deintegrazione del genoma fagico. I geni *O* e *P* sembrano determinare i componenti dei complessi enzimatici che duplicano il genoma di lambda.

Quando una cellula non lisogenica viene infettata dal fago lambda, o viene lisata o diventa lisogenica. Quale dei due stati, che si escludono a vicenda, viene raggiunto può dipendere dalla competizione tra la sintesi del repressore dell'immunità e la sintesi di una o più proteine precoci dello sviluppo vegetativo del fago, come il prodotto del gene *cro*. Alternativamente, la decisione di seguire la risposta litica o quella lisogenica può essere determinata in primo luogo dal livello che il prodotto del gene *cIII* ha raggiunto prima che la trascrizione ulteriore del gene *cIII* sia stata repressa dal repressore dell'immunità nel locus *p_{LOL}*.

PROBLEMI CON LA SOLUZIONE

I BATTERI

- 15.1. La genetica batterica, come disciplina, è iniziata nel 1943, quando S.E. Luria e M. Delbrück pubblicarono un articolo dal titolo "Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance". Prima di allora non si sapeva se l'eredità dei batteri cambiasse in modo adattativo e specifico in conseguenza dell'esposizione ad ambienti specifici, o se mutanti specifici esistessero nella popolazione già prima che una pressione ambientale agisse come agente selettivo così da aumentare il numero di mutanti adattativi. La prima idea era lamarckiana, la seconda neodarwiniana. Luria e Delbrück trovarono che c'era una grande variazione tra un esperimento e l'altro nel numero di *E. coli* che erano resistenti alla lisi mediata del fago T1. Per determinare quale delle due ipotesi fosse corretta, essi escogitarono la seguente "prova di fluttuazione". Venti "colture individuali" di 0,2 ml e una "coltura di massa" di 10 ml di terreno nutriente erano incubate con circa 10³ cellule di *E. coli* per millimetro. Le colture erano incubate fino a contenere circa 10⁸ cellule/ml. Gli 0,2 ml di ciascuna coltura individuale erano sparsi interamente su una piastra di agar nutriente, seminata pesantemente di fagi T1. Dieci campioni di 0,2 ml della coltura di massa venivano trattati in modo simile. Dopo un'incubazione di una notte intera, veniva contato il numero di cellule batteriche T1-resistenti (Ton⁺). I risultati sono presentati nella tabella seguente. Che cosa si può dedurre da questa "prova di fluttuazione"?

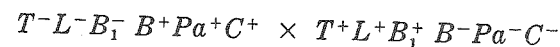
Colture individuali		Campioni della coltura di massa	
Numero della coltura	Numero delle colonie resistenti	Numero del campione	Numero delle colonie resistenti
1	1	1	14
2	0	2	15
3	3	3	13
4	0	4	21
5	0	5	15
6	5	6	14
7	0	7	26
8	5	8	16
9	0	9	20
10	6	10	13
11	107		
12	0		
13	0		
14	0		
15	1		
16	0		
17	0		
18	64		
19	0		
20	35		

Soluzione:

Le varianze di ciascun esperimento possono essere calcolate dalla formula del quadrato (11.2); le colture individuali hanno una varianza di 714,5, mentre la varianza dei campioni dalla coltura di massa è 16,4. In una distribuzione di Poisson, la media e la varianza sono essenzialmente identiche; quindi, il rapporto varianza/media dovrebbe essere uguale all'unità (1,0). Il rapporto varianza/media per i campioni della coltura di massa è $16,4/16,7 = 0,98$ o quasi 1,0, come atteso per una distribuzione casuale di eventi rari. I campioni della coltura di massa servono collettivamente come controllo per le colture individuali. Lo stesso rapporto per le colture individuali, tuttavia, è $714,5/11,3 = 63,23$, indicando che in ciascuna coltura ci sono fluttuazioni estremamente ampie intorno alla media del numero di cellule Ton^r. Se la resistenza ai fagi T1 avviene con una data probabilità soltanto dopo il contatto con i fagi, allora ciascuna coltura, sia degli esperimenti individuali sia di quelli di massa, dovrebbe contenere approssimativamente lo stesso numero medio di cellule resistenti. D'altra parte, se i mutanti Ton^r insorgono prima del contatto con i fagi, ci si attende una grande variazione intorno alla media tra una coltura e l'altra, perché alcune incorreranno in una mutazione molto presto e altre tardi (o per nulla) durante il periodo di incubazione. Questo esperimento si dimostra in favore dell'ipotesi della mutazione e contro l'ipotesi della resistenza indotta.

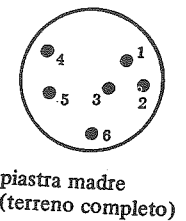
Alcune mutazioni, come la resistenza fagica, sono *preadattive* nella misura in cui il loro vantaggio selettivo diventa manifesto soltanto quando i fagi sono presenti nell'ambiente come agente selettivo; in questo caso i batteri T1-sensibili (Ton^s) sono uccisi dai fagi T1, consentendo soltanto alle poche cellule Ton^r di sopravvivere e moltiplicarsi. La resistenza ai fagi dipende dall'alterazione della struttura dei recettori batterici ai quali si attaccano normalmente i fagi T1. L'immunità alla superinfezione da parte di un fago specifico si basa sulla produzione di un repressore della duplicazione del fago da parte di una cellula lisogenica.

- 15.2. Due ceppi auxotrofi tripli di *Escherichia coli* vengono mescolati in un terreno liquido e inoculati su un terreno completo che serve quindi da piastra madre per ottenere duplicati su 6 tipi di terreni diversi. Dalla posizione dei cloni sulle piastre e dagli ingredienti presenti nel terreno colturale si determini il genotipo di ciascuno dei 6 cloni. L'ordine dei geni è il seguente.

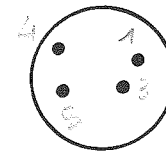


I rifornimenti nutritivi sono abbreviati come segue:

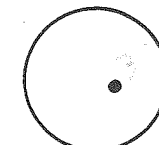
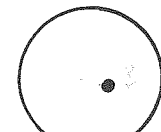
T = treonina B = biotina
L = leucina Pa = fenilalanina
B₁ = tiamina C = cistina



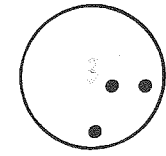
Duplicati: ciascuna piastra contiene il terreno colturale minimo più le sostanze aggiunte indicate sotto ciascuna piastra.



T, L

L, B₁

B, Pa



Pa, C

T, B₁

B, C

Soluzione:

- # 1 cresce quando viene rifornito di T e L o di T e B₁, ma non quando viene rifornito di L e B₁. Quindi questo è auxotrofo per T soltanto ($T^-L^+B_1^+B^+Pa^+C^+$).
- # 2 compare solo sulla piastra rifornita di Pa e di C. E' questo un clone auxotrofo doppio di genotipo $T^+L^+B_1^+B^+Pa^-C^-$.
- # 3 compare su tutte le piastre duplicati e, quindi, deve essere prototrofo ($T^+L^+B_1^+B^+Pa^+C^+$).
- # 4 cresce solo quando è rifornito di T e L; deve essere un doppio auxotrofo con genotipo $T^-L^-B_1^-B^+Pa^+C^+$.
- # 5 e # 1 compaiono sempre insieme sulle piastre duplicati e quindi hanno lo stesso genotipo
- # 6 può crescere in presenza di Pa e C o di B e C. Il fattore comune è C per il quale questo ceppo è singolarmente auxotrofo ($T^+L^+B_1^+B^+Pa^-C^-$).

- 15.3. In condizioni ottimali, alcuni batteri possono dividersi ogni 20 minuti. Si supponga che ogni cellula abbia una massa di 2×10^{-9} mg. La massa della Terra è di circa $5,97 \times 10^{27}$ g. Si determini il tempo (in ore) richiesto alla progenie di una singola cellula che si divide senza limitazioni, al ritmo di cui sopra, per raggiungere il peso della Terra.

Soluzione:

Al tempo zero si ha 1 cellula; 20 minuti più tardi 2 cellule; al 40° minuto ci sono 4 cellule; al 60° minuto ve ne sono 8 e così via. Il numero di cellule per ogni ora, t , è naturalmente 2^{3t} . Il numero delle cellule equivalente al peso della Terra è

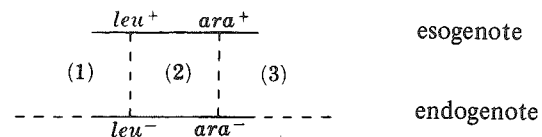
$$(5,97 \times 10^{27}) / (2 \times 10^{-12}) = 2,98 \times 10^{39} = 2^{3t}$$

$$\text{da cui } 3t \log 2 = \log 2,98 + \log 10^{39}, \quad t = \frac{\log 2,98 + 39}{3 \log 2} = \frac{39,475}{3(0,301)} = 43,7 \text{ ore.}$$

- 15.4. Un ceppo di *Escherichia coli* incapace di fermentare il carboidrato arabinosio (ara^-) e di sintetizzare gli amminoacidi leucina (leu^-) e treonina (thr^-) è trasdotto da un ceppo di tipo selvatico ($ara^+leu^+thr^+$). I ricombinanti per la leucina si trovano inoculandoli in un terreno colturale minimo a cui è stata aggiunta treonina. Le colonie che si formano nelle

piastre in cui è avvenuta la trasduzione sono state duplicate o distese mediante striscio su piastre contenenti arabinosio. Su 270 colonie cresciute sulle piastre a cui è stata aggiunta treonina, 148 potevano anche fermentare l'arabinosio. Si calcoli il totale di ricombinazione fra *leu* e *ara*.

Soluzione:



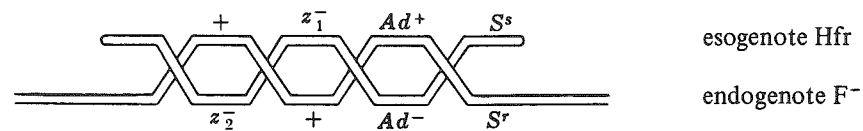
Perché un trasducente sia *leu+ara+*, deve avvenire un crossing over nelle regioni (1) e (3); perchè si formi *leu+ara-*, deve avvenire un crossing over nelle regioni (1) e (2).

$$\text{Rapporto di ricombinazione standardizzato} = \frac{\text{n. di } leu^+ara^-}{\text{n. di } leu^+ara^+} = \frac{(270 - 148)}{270} = 0,45 \text{ o } 45\%$$

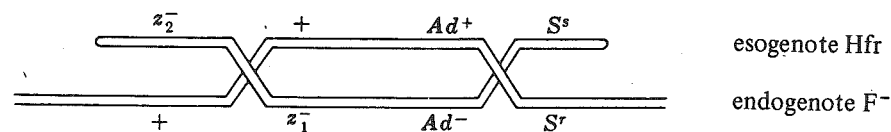
15.5. Sono stati isolati diversi mutanti z^- , tutti privi della capacità di sintetizzare la β -galattosidasi. Viene realizzato un incrocio $Hfr(z_1^- Ad^+ S^s) \times F^-(z_2^- Ad^- S^r)$ in cui Ad^- significa fabbisogno di adenina, S^s e S^r rispettivamente sensibilità e resistenza alla streptomicina. Dopo circa un'ora, il miscuglio viene diluito e inoculato in terreno colturale minimo contenente la streptomicina. Molti cloni Ad^+ sono risultati in grado di fermentare il lattosio, indicando così un'attività β -galattosidasi. Solo alcuni cloni Ad^+ , risultanti dall'incrocio reciproco $Hfr(z_2^- Ad^+ S^s) \times F^-(z_1^- Ad^- S^r)$, hanno dimostrato di poter fermentare il lattosio. Qual è l'ordine dei marcatori relativo al locus Ad ?

Soluzione:

Supponiamo che l'ordine sia z_2-z_1-Ad . Nel primo incrocio, sono necessari quattro crossing over per produrre un prototrofo resistente alla streptomicina, in grado di fermentare il lattosio ($z_2^+ z_1^+ Ad^+ S^r$).

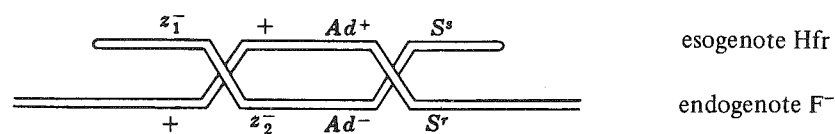


L'incrocio reciproco richiede solo due crossing over per produrre un prototrofo in grado di fermentare lattosio.

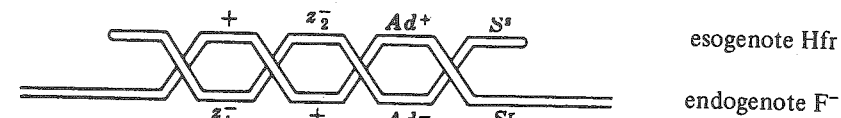


Ci si aspetta che i crossing over doppi siano molto più frequenti dei crossing over quadrupli. Lo schema sopra riportato non si adatta ai dati perché il primo incrocio è stato più frequente dell'incrocio reciproco. La supposizione formulata deve dunque essere sbagliata.

Si supponga ora che l'ordine sia z_1-z_2-Ad . Il primo incrocio richiede un crossing over doppio.



L'incrocio reciproco richiede quattro eventi di crossing over



Ci si aspetta che l'incrocio reciproco sia molto meno frequente in quest'ipotesi ed è in accordo con le osservazioni.

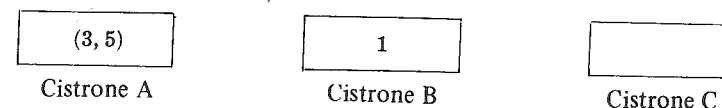
15.6. Sei mutazioni risultano appartenere a tre cistroni. Dai risultati delle prove di complementazione, si determinino quali mutanti stanno nello stesso cistrone.

1	2	3	4	5	6	
0	+	+				1
	0		+	+		2
		0	+	0		3
			0		+	4
				0	+	5
					0	6

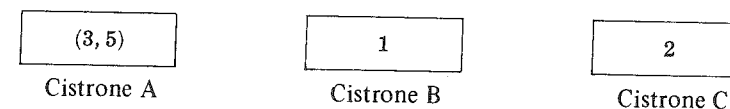
+ = complementazione
0 = non complementazione
casella vuota = non sottoposto a prova

Soluzione:

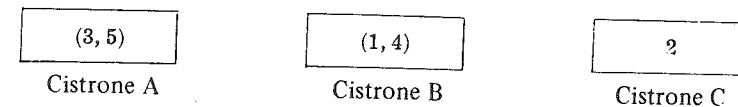
Naturalmente le mutazioni 3 e 5 stanno nello stesso cistrone, dal momento che non si complementano l'una con l'altra. Le mutazioni 1 e 3 sono su cistroni diversi, dal momento che si complementano l'una con l'altra. Esse verranno assegnate arbitrariamente ai cistroni A e B.



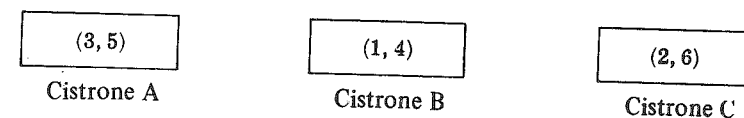
1 e 2 sono in cistroni diversi, ma non si sa se 2 sia in A o in C. Tuttavia, poiché 5 e 2 si complementano, 2 non può essere nel cistrone A o in quello B e deve essere per forza in C.



3 e 4 si complementano; così 4 deve essere o in B o in C. Ma 2 e 4 sono anche complementari; così 4 non può essere in C e deve essere in B.



6 non può essere in A dal momento che si complementa con 5. Così 6 è tanto in B quanto in C. Poiché 6 e 4 si complementano, stanno in cistroni diversi. Se 6 non può essere in A o in B, deve essere in C. I mutanti sono raggruppati nei cistroni come viene indicato qui sotto.



I VIRUS

15.7. Nel tentativo di determinare l'entità della ricombinazione fra due mutazioni nella regione rII del fago T4, si nota come il ceppo B di *Escherichia coli* venga doppiamente infettato dai due tipi di mutanti. Si prepara una diluizione 1 : 10⁹ del lisato e la si inocula nel ceppo B, mentre una diluizione 1 : 10⁷ viene inoculata nel ceppo K. Su K si notano due placche, su B venti. Si calcoli l'entità della ricombinazione.

Soluzione:

Per poter confrontare il numero delle placche su B e quello su K, si devono correggere i dati per il fattore di diluizione. Se 20 placche sono prodotte da una diluizione di 10⁹, ci si aspetta che la diluizione minore (10⁷) produca 100 volte questo numero di placche.

$$\text{Percentuale di ricombinazione} = \frac{200 \text{ (n. di placche su K)}}{\text{n. di placche su B}} = \frac{200(2)}{20(100)} = 0,2\%$$

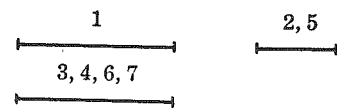
15.8. Sette mutanti per delezione nel cistrone A della regione rII del fago T4 sono stati saggiati in tutte le combinazioni a coppie per i ricombinanti di tipo selvatico. Nella tabella dei risultati, a lato, + = ricombinazione, 0 = non ricombinazione. Si costruisca una mappa topologica per queste delezioni.

	1	2	3	4	5	6	7
1	0	+	0	0	+	0	0
2		0	0	0	+	+	0
3			0	0	+	+	0
4				0	+	0	0
5					0	0	0
6						0	0
7							0

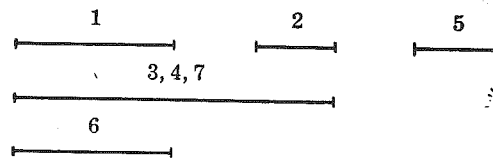
Soluzione:

Se due delezioni si sovrappongono in una qualsiasi misura, non si può formare che un ricombinante di tipo selvatico.

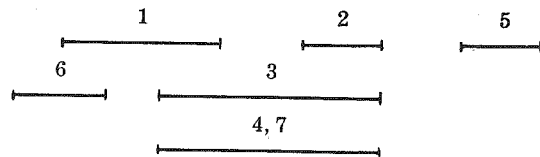
(1) La delezione #1 si sovrappone a 3, 4, 6 e 7 ma non a 2 o 5.



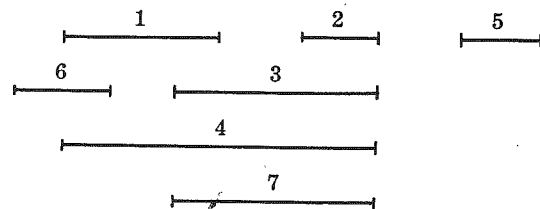
(2) La delezione #2 si sovrappone a 3, 4 e 7 ma non a 1, 5 o 6.



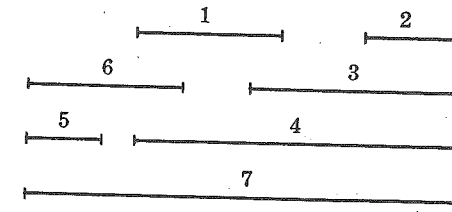
(3) La delezione #3 si sovrappone a 1, 2, 4 e 7 ma non a 5 o 6.



(4) La delezione #4 si sovrappone a 1, 2, 3, 6 e 7, ma non a 5.



(5) La delezione #5 si sovrappone a 6 e 7, ma non a 1, 2, 3 o 4. Per soddisfare queste condizioni si farà scivolare 5 alla sinistra di 1 e si estenderà 7 in parte della regione 5, dimodochè le sovrapposizioni del punto (4) non cambino. Ora, il segmento 5 può sovrapporsi a 6 e a 7 senza sovrapporsi a 1, 2, 3 o 4.



(6) La delezione #6 si sovrappone a 1, 4, 5 e 7 ma non a 2 o 3. Non si richiede alcun cambiamento.

(7) La delezione #7 si sovrappone a tutte le altre regioni, come è stato temporaneamente rappresentato nel punto (5). Ciò completa la mappa topologica. Sebbene le sovrapposizioni soddisfino le condizioni espresse nella tabella, non si hanno informazioni sull'effettiva lunghezza delle singole delezioni.

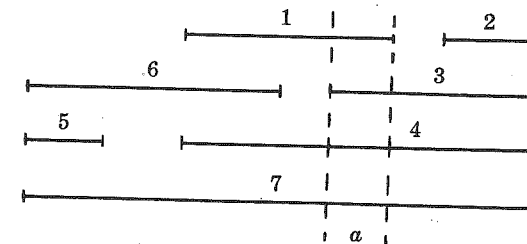
15.9. Cinque mutazioni puntiformi (da a ad e) sono state saggiate per i ricombinanti di tipo selvatico con ciascuno dei sette mutanti per delezione di cui si è parlato nel problema appena esposto. Si determini l'ordine delle mutazioni puntiformi e si modifichi corrispondentemente la mappa topologica.

	1	2	3	4	5	6	7
a	0	+	0	0	+	+	0
b	+	+	+	0	+	0	0
c	+	+	+	+	0	0	0
d	0	+	+	0	+	0	0
e	+	0	0	0	+	+	0

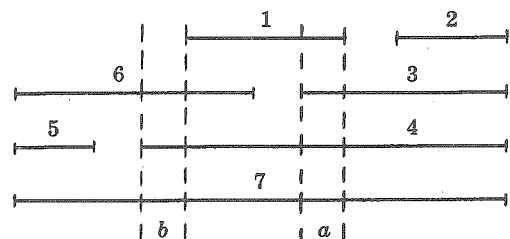
Soluzione:

Una mutazione per delezione non può ricombinarsi per dare il tipo selvatico con un mutante puntiforme che sia all'interno dei suoi confini. La mappa topologica è stata già sviluppata nel problema 15.8.

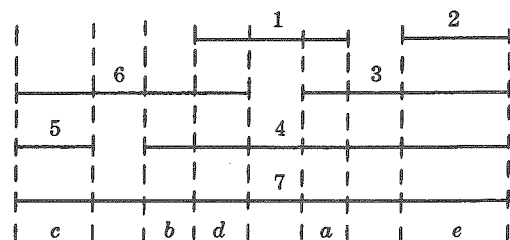
(1) Il mutante a non si ricombina con 1, 3, 4 e 7 e quindi deve essere in una regione comune a tutte queste delezioni.



(2) Il mutante b non si ricombina con 4, 6 e 7 e così si trova in una regione comune a queste tre delezioni. Considerando la mappa topologica come si presenta nel punto (1), un mutante puntiforme non si potrebbe trovare nelle regioni 4, 6 e 7 senza essere anche nella regione 1. Quindi quest'informazione permette di modificare la mappa topologica accorciando la delezione 1, ma in modo che si sovrapponga ancora alla delezione 6. Questo dà una regione in cui b può esistere.



(3) Il mutante *c* si trova in una regione comune alle delezioni 5, 6 e 7; il mutante *d* in una regione comune alle delezioni 1, 4, 6 e 7 e il mutante *e* in una regione comune alle delezioni 2, 3, 4 e 7.



Così l'ordine di queste mutazioni puntiformi è *c-b-d-a-e* e la mappa topologica è modificata come appare al punto 2.

15.10. Si proponga un sistema per stabilire la localizzazione di un profago lambda rispetto ad altri geni batterici.

Soluzione:

Si incroci una cellula donatrice Hfr (lisogenica per lambda) con una ricevente F^- non lisogenica. Una volta che il genoma di lambda è stato trasferito nella cellula ricevente F^- attraverso la coniugazione, essa morirà probabilmente per lisi (un fenomeno conosciuto come *induzione zigotica*). Usando la tecnica d'interruzione dell'accoppiamento (trattamento con frullatore), dovrebbe essere possibile determinare il punto in cui le frequenze dei ricombinanti vicini all'origine diminuiscono col tempo. A questo punto, tutto il genoma di lambda è stato donato e può essere messo in relazione con la posizione di altri geni batterici sulla base della mappa temporale.

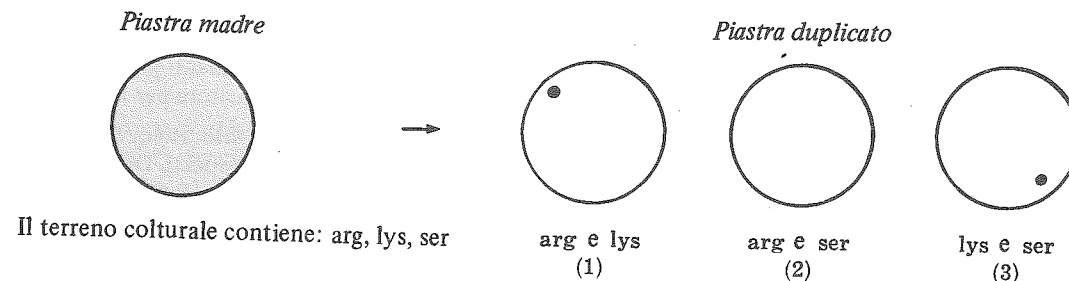
Dal momento che le cellule riceventi non contengono alcun repressore (ed è improbabile che durante la coniugazione del repressore non legato venga trasferito), il profago esogeno ha una buona probabilità di entrare nel ciclo litico, poiché livelli relativamente elevati di repressore sono richiesti per stabilire lo stato lisogenico nella cellula ricevente F^- . Una cellula lisogenica di solito contiene del repressore non legato ("citoplasmatico") sufficiente per inibire la superinfezione da parte di uno o più fagi lambda, ma una cellula non lisogenica non è immune all'infezione di fagi lambda esogeni o di profagi lambda. Nel secondo caso, quindi, l'induzione zigotica di profagi lambda esogeni ha una buona probabilità di succedere. Quando lambda entra in una cellula non lisogenica, si ha competizione tra la produzione del repressore dell'immunità e il "repressore del repressore dell'immunità". Il risultato di questa competizione determina se la cellula diventa lisogenica o litica.

Un sistema alternativo per localizzare il profago lambda è rappresentato dalla coniugazione tra un ceppo Hfr non lisogenico e un ceppo F^- lisogenico per lambda e dallo studio della perdita di immunità alla superinfezione di lambda attraverso ricombinazione. Tuttavia, questo procedimento sarebbe molto più laborioso di quello precedente.

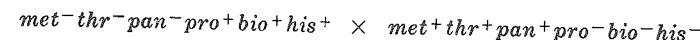
PROBLEMI SUPPLEMENTARI

I BATTERI

15.11. Circa 10^8 cellule di *Escherichia coli* appartenenti a un ceppo mutante vengono inoculate su un terreno colturale completo che forma una colonia batterica. Si preparino dei duplicati che contengano un terreno colturale minimo a cui siano stati aggiunti gli amminoacidi arginina, lisina e serina. (a) Dai risultati determini il genotipo del ceppo mutante; (b) si spieghino le colonie che appaiono nelle piastre duplicati.



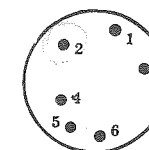
15.12. Due ceppi batterici auxotrofi vengono coniugati nel brodo di coltura, diluiti e poi inoculati in agar completo (piastra madre). Le piastre duplicati che contengono vari elementi in più si ricavano dalla piastra madre. Dalla posizione di ogni clone e dal tipo di terreno sul quale viene trovato, si determini il genotipo.



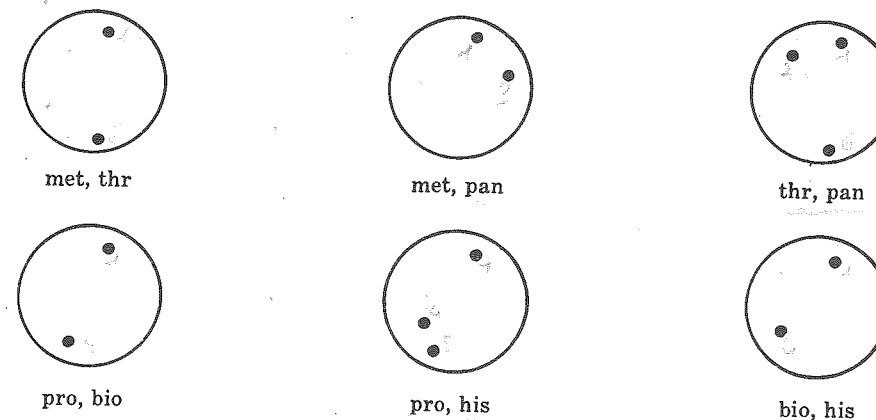
Simboli

- met = metionina
- thr = treonina
- pan = acido pantotenico
- pro = prolina
- bio = biotina
- his = istidina

Piastra madre



Piastre duplicati: ciascuna piastra contiene terreni colturali minimi più le sostanze aggiunte indicate qui sotto.



15.13. Un ceppo batterico incapace di sintetizzare la metionina (met^-) viene trasdotto da un ceppo incapace di sintetizzare l'isoleucina ($ileu^-$). La coltura su brodo viene diluita e quindi inoculata su un terreno minimo che contenga in più l'isoleucina. Una quantità equivalente di coltura in brodo, diluita, viene inoculata in un terreno minimo. Diciotto cloni sono comparsi sulle piastre contenenti terreni minimi e 360

su quelle contenenti in più l'isoleucina. Si calcoli il rapporto di ricombinazione standardizzato.

- 15.14. Si calcoli il rapporto di ricombinazione standardizzato fra due mutanti del locus per l'arginina, usando la seguente informazione. Un ceppo batterico che è doppiamente auxotrofo per la timina e per l'arginina ($thy^- arg_{E1}^-$) viene trasformato usando un'elevata concentrazione di DNA di un singolo ceppo auxotrofo ($thy^+ arg_{E2}^-$). Diluzioni identiche sono inoculate in terreni colturali minimi e in altri pure minimi ma a cui sia stata aggiunta arginina. Per ogni colonia che compare sulle piastre con solo terreno minimo vi sono circa 120 colonie sulle piastre a cui sia stata aggiunta arginina.
- 15.15. Sono noti due mutanti nel locus per il triptofano try_A^- e try_B^- , che stanno alla destra di un locus per la cisteina (cys). Un ceppo batterico con genotipo $cys^+ try_A^-$ viene trasdotto dal fago da un ceppo che è $cys^- try_B^-$. Si realizza anche un incrocio reciproco laddove il ceppo $cys^- try_B^-$ viene trasdotto dal fago da un ceppo che è $cys^+ try_A^-$. In entrambi i casi il numero di ricombinanti prototrofi è equivalente. Si determini l'ordine dei mutanti per il triptofano, in relazione al marcatore per la cisteina.
- 15.16. Si realizza un incrocio fra il ceppo (S^r) F^- resistente alla streptomicina, e marcato con i caratteri $Gal^- T^- Az^r Lac^- T1^r Mal^- Xyl^- L^-$, e il ceppo prototrofo Hfr che ha caratteri opposti. Dopo 60 min di contatto, i campioni vengono trasferiti su piastre con terreni colturali minimi e contenenti in più streptomicina. Il miscuglio originale ha il seguente rapporto di 2×10^7 Hfr: $4 \times 10^8 F^-$. Le frequenze (percentuali) dei caratteri Hfr ritrovate nei ricombinanti $T^+ L^+ S^r$ sono le seguenti: 72% $T1^s$, 0% Mal^+ , 27% Gal^+ , 91% Az^s , 0% Xyl^+ , 48% Lac^+ . (a) Quante cellule F^- esistono nel miscuglio originario per ciascuna cellula Hfr? (b) Qual è l'agente controselectivo che impedisce agli individui Hfr di mascherare il riconoscimento dei ricombinanti? (c) In quale ordine vengono probabilmente trasmessi questi geni dalle cellule Hfr?

- 15.17. Sono noti quattro ceppi Hfr di *Escherichia coli* che, durante la coniugazione, trasferiscono il proprio materiale genetico in sequenze diverse. Dato il tempo di entrata dei marcatori nel ricevente F^- , si costruisca una mappa genetica che li includa tutti e si marchino le distanze fra coppie di geni adiacenti.

Ceppo 1.	Marcatori:	<i>arg - thy - met - thr</i>
	Tempo in minuti:	15 21 32 48
Ceppo 2.	Marcatori:	<i>mal - met - thi - thr - try</i>
	Tempo in minuti:	10 17 22 33 57
Ceppo 3.	Marcatori:	<i>phe - his - bio - azi - thr - thi</i>
	Tempo in minuti:	6 11 33 48 49 60
Ceppo 4.	Marcatori:	<i>his - phe - arg - mal</i>
	Tempo in minuti:	18 23 35 45

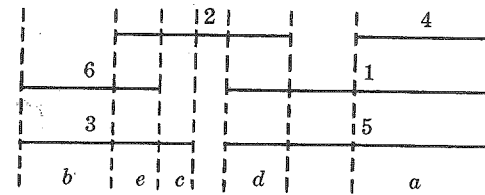
- 15.18. I trasduttori abortivi sono merozigoti relativamente stabili che possono essere usati per prove di complementazione. Sei mutanti sono stati saggiati in tutte le combinazioni in coppia e si sono ottenuti i risultati indicati nella tabella (+ = complementazione, 0 = non complementazione). Si costruisca una mappa di complementazione che concordi con i dati.

	1	2	3	4	5	6	
1	0	+	0	+	+	+	1
2		0	0	+	+	+	2
3			0	+	+	+	3
4				0	0	+	4
5					0	0	5
6						0	6

- 15.19. Sono noti sei mutanti puntiformi che risiedono in tre cistroni. Si completi la seguente tabella in cui + = complementazione e 0 = non complementazione.

	1	2	3	4	5	6
1	0	+	+	+	+	+
2		0	+	+	0	+
3			0	0	+	0
4				0	+	0
5					0	+
6						0

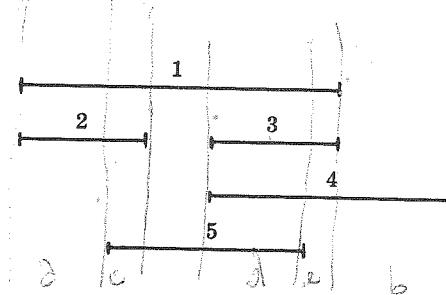
- 15.20. Data la mappa topologica di 6 mutanti per delezione riportata qui sotto, si prevedano i risultati degli esperimenti di ricombinazione che interessano i 5 mutanti puntiformi (da a a e) e ciascuna delle 6 delezioni (da 1 a 6). Si completi la tabella dei risultati allegata, usando + per la ricombinazione e 0 per la non ricombinazione



Delezioni

	1	2	3	4	5	6
a	0	+	+	0	0	+
b	+	+	0	+	+	0
c	+	0	0	+	+	+
d	0	0	+	+	0	+
e	+	0	0	+	+	0

- 15.21. Sono state saggate per i ricombinanti di tipo selvatico 5 mutazioni puntiformi (da a a e) con ciascuna delle cinque delezioni mostrate nella mappa topologica qui di seguito. I risultati sono elencati nella tabella pure di seguito (+ = ricombinazione, 0 = non ricombinazione). Si determini l'ordine di tali mutazioni.



Delezioni

	1	2	3	4	5
a	0	0	+	+	+
b	+	+	+	0	+
c	0	0	+	+	0
d	0	+	0	0	0
e	0	+	0	0	+

- 15.22. Diverse prove suggeriscono che il cromosoma circolare di *Escherichia coli* ha soltanto una o due forcelle replicative a Y. La lunghezza di un intero nucleo non duplicato è di 1300 μm (circa 500 volte più lungo di una cellula di *E. coli*). Per un giro completo della doppia elica di DNA ci sono 10 paia di basi, equivalenti a 34 Å o $3,4 \times 10^{-3} \mu m$. (a) Quante paia di basi nucleotidiche ci sono nel genoma di *E. coli*? (b) Se il genoma di *E. coli* viene duplicato in 40 minuti a 37 °C attraverso due forche replicative, quante rotazioni per minuto (rpm) la doppia elica parentale deve fare per consentire la separazione dei filamenti complementari durante la duplicazione?
- 15.23. Un evento iniziale essenziale, anche se non l'unico perché una cellula si trasforma in cancerosa è un danneggiamento del DNA (mutazione). Agenti che danneggiano il DNA (mutageni) sono quindi carcinogeni soltanto potenziali. La maggioranza dei carcinogeni chimici non sono biologicamente attivi nella forma originale; devono essere dapprima metabolizzati in metaboliti carcinogenici. Bruce Ames ha ideato una prova per esaminare le caratteristiche carcinogeniche potenziali di sostanze chimiche. La prova di Ames è attualmente la prova standard per valutare quantitativamente la potenzialità

mutagenica di un reagente chimico. Questa prova si serve di un ceppo auxotrofo di *Salmonella typhimurium* che non può produrre l'amminoacido istidina (*his*⁻). Per aumentare la sensibilità del ceppo di prova, (1) esso porta una mutazione che rende l'involucro della cellula più permeabile alla penetrazione delle sostanze chimiche di prova, (2) è stata eliminata la sua capacità di riparazione di modo che la maggior parte delle lesioni primarie non viene curata, e (3) per mezzo di un plasmide viene introdotto un elemento genetico che rende la duplicazione del DNA più incline agli errori. Un estratto di fegato di ratto viene aggiunto a una piastra di coltura contenente un terreno minimo, ricoperta di uno strato sottile di questi batteri. Un disco di carta da filtro viene impregnato della sostanza chimica da saggiare e collocato al centro della piastra. Dopo due giorni di incubazione viene contato il numero di colonie. (a) Che tipo di eventi vengono valutati contando le colonie? (b) Perché nell'esperimento è stato aggiunto estratto di fegato di mammifero? (c) Si faccia uno schema della distribuzione attesa delle colonie su una piastra contenente un carcinogeno noto. Si spieghi perché si sviluppa questa distribuzione. (d) Supponiamo che la sostanza in prova (per esempio la nitrosoguanidina) sia mescolata con i batteri prima che vengano inoculati sulla piastra in due dosi (una alta e una bassa), insieme con un controllo. Si faccia uno schema della distribuzione attesa delle colonie in queste tre piastre.

- 15.24. Quando il DNA batterico viene danneggiato da un agente mutageno, la lesione viene di solito riparata attraverso i meccanismi di riparazione per taglio. Tuttavia, l'efficienza di questo processo è inferiore al 100%, alcune lesioni pertanto non vengono riparate. Se queste lesioni ritardano la duplicazione del DNA, entra in azione un sistema di "riparo SOS", incline all'errore, che provoca l'attivazione e la produzione di una proteina multifunzionale chiamata proteina RecA (per "ricombinazione"). Essa interferisce con la divisione cellulare risultando in un allungamento delle cellule in filamenti. Inoltre, la proteina RecA taglia il repressore di lambda, che deve rimanere intatto affinché il virus rimanga latente come profago. Il ceppo B di *Escherichia coli* è lisogenico per lambda, mentre il ceppo A non lo è. Questa informazione condusse Moreau, Bailone e Devoret a ideare una "prova di induzione del profago" o "prova d'induzione" per carcinogeni potenziali. Il ceppo B di *E. coli*, lisogenico, è reso difettivo per il sistema di riparo per taglio e viene geneticamente modificato per rendere l'involucro cellulare permeabile a un ampio spettro di sostanze chimiche da provare. Questo particolare ceppo viene mescolato con il ceppo indicatore A e con estratto di fegato di ratto; la miscela viene quindi inoculata su una piastra e il terreno ricoperto con uno strato sottile di batteri indicatori dispersi con pochi batteri lisogenici. La sostanza chimica da provare è applicata ad un disco di carta da filtro e collocata al centro della piastra per una "prova delle macchie". (a) Come viene saggiato il danneggiamento del DNA dopo l'incubazione? (b) Perché è richiesto il ceppo A come indicatore? (c) Che vantaggio presenta la prova d'induzione sulla prova di Ames? (d) Si spieghi il vantaggio selettivo dell'induzione lisogenica. (e) L'ingegneria genetica ha unito il gene per la galattocidasi al cromosoma batterico, creando così un organismo utile per saggiare i mutageni attraverso una prova di attività enzimatica. Dove è stato inserito questo gene nel cromosoma e come lavora il sistema?

I VIRUS

- 15.25. Sei mutanti per delezione nel cistrone A della regione rII del fago T4 sono stati saggiati per i ricombinanti di tipo selvatico. Nella tabella qui di seguito + = ricombinazione, 0 = non ricombinazione. Si costruisca una mappa topologica per queste delezioni.

	1	2	3	4	5	6
1	0	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	+
3			0	+	0	0
4				0	+	+
5					0	+
6						0

- 15.26. Cinque mutanti per delezione nel cistrone B della regione rII del fago T4 sono stati saggiati per i ricombinanti di tipo selvatico in tutte le combinazioni a coppie. Nella seguente tabella in cui sono raccolti i risultati, + = ricombinazione, 0 = non ricombinazione. Si costruisca una mappa topologica per queste delezioni.

	1	2	3	4	5
1	0	+	+	0	0
2		0	+	0	+
3			0	+	0
4				0	0
5					0

- 15.27. Il DNA del batteriofago T4 contiene circa 200 000 coppie di nucleotidi. La regione rII del genoma T4 occupa all'incirca l'1% della sua lunghezza genetica totale. Benzer ha trovato circa 300 siti separabili per ricombinazione all'interno della regione rII. Si determini il numero medio di nucleotidi per ciascun ricone.
- 15.28. Il peso molecolare del DNA nel fago T4 è calcolato essere 160×10^6 . Il peso molecolare medio di ciascun nucleotide è circa 400. Si calcola che la mappa genetica totale di T4 sia lunga circa 2500 unità di ricombinazione. Con quale frequenza ci si aspetta che si formino i ricombinanti r⁺ quando vengono incrociati due mutanti r diversi (con mutazioni in nucleotidi adiacenti)?

- 15.29. Nella regione rII del fago T4 è stato trovato un certo numero di mutazioni. Dai dati di ricombinazione, mostrati nella tabella a lato, si determini se ciascun mutante è un'alterazione puntiforme o una delezione (+ = ricombinazione, 0 = non ricombinazione). Due dei quattro mutanti subiscono una mutazione all'indietro; non si è mai osservato, invece, che gli altri due mutanti mutassero all'indietro. Si disegni una mappa topologica per rappresentare la propria interpretazione.

	1	2	3	4
1	0	0	0	+
2		0	+	0
3			0	+
4				0

- 15.30. Il ceppo B di *Escherichia coli* viene doppiamente infettato con due mutanti rII del fago T4. Una soluzione diluita a 6×10^7 del lisato viene inoculata in una coltura di *E. coli* B; una a 2×10^5 in *E. coli* K. Nel ceppo K, sono comparse 12 placche; nel ceppo B 16. Si calcoli l'entità della ricombinazione tra questi due mutanti.
- 15.31. Si proponga un meccanismo semplice con cui la luce ultravioletta potrebbe indurre un profago lambda in uno stato litico.
- 15.32. Di solito si osserva una risposta non litica in cellule di *E. coli* lisogeniche per lambda, quando sono coniugate con donatori Hfr non lisogenici o in incroci tra Hfr (λ) \times F⁻ (λ). Il profago donato non viene quasi mai ereditato dai ricombinanti. La lisi è molto anomala in incroci di Hfr (λ) \times F⁻. Si spieghino queste osservazioni.
- 15.33. I fagi temperati come lambda producono placche torbide; i fagi virulenti producono sempre placche chiare. (a) Si offra una spiegazione per le placche torbide. (b) Alcuni mutanti lambda producono placche chiare. Quale locus genetico è con buona probabilità mutato in questi casi?
- 15.34. Che cosa ci si aspetta che avvenga in una cellula di *E. coli* in cui: (a) il livello del prodotto del gene cIII di lambda è sufficientemente elevato da permettere l'inizio della trascrizione del gene cI nel promotore p_{RE}? (b) il livello del prodotto del gene cIII non è sufficiente a permettere l'inizio della trascrizione nel promotore p_{RE}?

RISPOSTE AI PROBLEMI SUPPLEMENTARI

15.11. (a) $arg^- lys^- ser^-$ (auxotrofo triplo); (b) la piastra (1) contiene una mutazione in ser^+ , la piastra (3) una mutazione in arg^+ .

15.12.

Clone	Genotipo del clone					
	<i>met</i>	<i>thr</i>	<i>pan</i>	<i>pro</i>	<i>bio</i>	<i>his</i>
1	+	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+
3	-	+	-	+	+	+
4	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	+
6	+	-	+	+	+	+

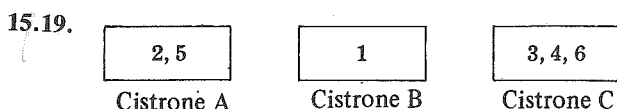
15.13. Il 20% di ricombinazione

15.14. Lo 0,83% di ricombinazione

15.15. $cys - try_B - try_A$

15.16. (a) 20; (b) la streptomicina; gli individui Hfr sono sensibili ad essa (S^s); (c) origine - (T^+L^+) - Az^s - $T1^s$ - Lac^+ - Gal^+ - S^s - (Mal^+Xyl^+). Nota: l'ordine dei marcatori all'interno delle parentesi non può essere determinato in base ai dati.

15.17. $arg - thy - mal - met - thi - trn - azi - bio - try - his - phe - arg$
 6 4 7 5 11 1 15 8 14 5 7 12



	1	2	3	4	5	6
1	0	+	+	+	+	+
2		0	+	+	0	+
3			0	0	+	0
4				0	+	0
5					0	+
6						0

Nota: il nome del cistrone è arbitrario

15.20.

Mutazioni puntiformi	Delezioni					
	1	2	3	4	5	6
a	0	+	+	0	0	+
b	+	+	0	+	+	0
c	+	0	0	+	+	+
d	0	0	+	+	0	+
e	+	0	0	+	+	0

15.21. a - c - d - e - b

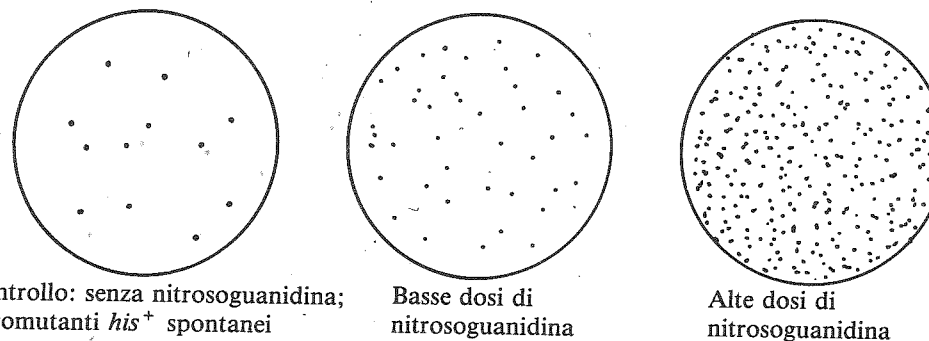
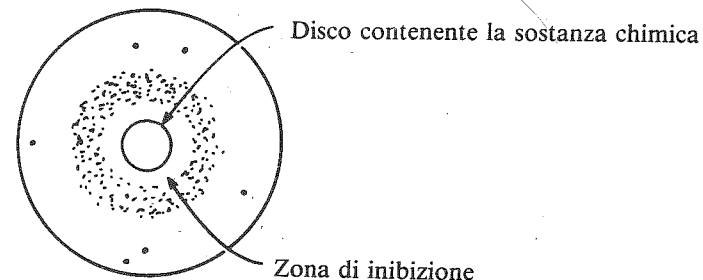
15.22. (a) $\frac{1300 \mu m \times 10 \text{ bp/per giro}}{3,4 \times 10^{-3} \mu m/\text{per giro}} = 3,9 \times 10^6$ o 3900 paia di kilobasi (kb)

(b) Velocità di crescita della catena = $\frac{3900 \text{ kb}}{2(2400 \text{ sec})} = 0,8 \text{ kb/sec}$

$\frac{800 \text{ bp/sec}}{10 \text{ bp/rot}} \times 60 \text{ sec/min} = 80 \text{ rot} \times 60 \text{ min}^{-1} = 4800 \text{ rot/min}$

o veloce quanto una centrifuga da laboratorio.

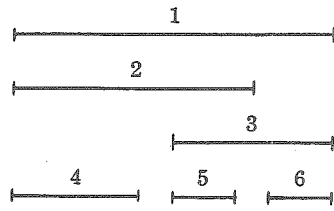
15.23. (a) Le retromutazioni da his^- a his^+ . (b) Fornisce le funzioni metaboliche dei mammiferi che sono di solito richieste per convertire una sostanza chimica nei suoi metaboliti carcinogenici. (c) Dopo due giorni, la maggioranza dei batteri his^- sono morti per mancanza di istidina. Ci si attende che le frequenze di retromutazioni siano proporzionali alla concentrazione della sostanza chimica che forma un gradiente di concentrazione decrescente in direzione radiale intorno al disco di carta. Vicino al disco c'è una zona in cui nessuna cellula può crescere a causa dei livelli tossici della sostanza chimica. Al di là di questa zona ci possono essere così tanti retromutanti his^+ che le cellule formano una colonia quasi continua. Alla periferia ci sono pochi cloni più grandi (perché sono isolati) che rappresentano i mutanti spontanei his^+ che non sono stati esposti alla sostanza chimica.



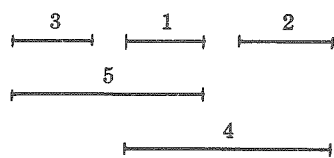
15.24. (a) Il danneggiamento del DNA attiva la proteina RecA che taglia il repressore di lambda e dà il via alla duplicazione del genoma virale. La cellula scoppia e libera i virus che infettano e lisano il ceppo indicatore A, provocando la comparsa di placche (buchi) nelle colonie batteriche che circondano il disco di carta. (b) Se una cellula del ceppo B viene indotta alla lisi, i virus non si possono moltiplicare in altre cellule dello stesso ceppo perché il repressore attivo di lambda è presente in queste cellule in quanto prodotto dei profagi. È quindi richiesto un ceppo non lisogenico A per indicare quanti virus sono stati indotti dal trattamento chimico. (c) La prova d'induzione può saggiare un carcinogeno potenziale alle dosi che ucciderebbero i batteri di prova in una prova di Ames (dando una reazione negativa falsa). La prova di Ames evidenzia soltanto le rare retromutazioni di his^- in his^+ , laddove un danneggiamento del DNA in un punto qualsiasi può iniziare l'induzione lisogenica (un effetto di massa, indipendente dalla sopravvivenza delle cellule in presenza di sostanze tossiche). (d) Se il DNA della cellula ospite non si può duplicare, è probabile che la cellula muoia. In queste condizioni, sarebbe vantaggioso per un profago entrare nel ciclo litico e infettare quindi una cellula

“più sana”. (e) Il gene per la galattochinasi è stato inserito vicino e sotto il controllo del repressore di lambda. Quando un mutageno danneggia il DNA, la proteina RecA viene attivata e taglia il repressore; questo apre l’operone all’RNA polimerasi e consente la sintesi dell’enzima galattochinasi, la cui attività può essere quantificata per via spettrofotometrica, fornendone il substrato.

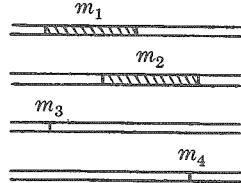
15.25.



15.26.



15.27. Circa 7 nucleotidi per ricone

15.28. Ci si aspetta che lo 0,00625% di tutta la progenie sia costituito da ricombinanti r^+ 15.29. m_1 e m_2 sono delezioni, m_3 e m_4 sono mutazioni puntiformi

15.30. Lo 0,5% di ricombinazione

15.31. La luce UV distrugge il repressore dell’immunità.

15.32. Il repressore è già presente nel citoplasma della cellula ricevente $F^- (\lambda)$. Esso si lega agli operatori o_R e o_L e impedisce la riproduzione vegetativa del profago nel segmento di cromosoma donato vuoi da $F^- (\lambda)$ vuoi da Hfr (λ). Gli enzimi precoci non sono quindi prodotti e la ricombinazione (che conduce all’eredità dei geni lambda donati) non può avvenire.

Le cellule non lisogeniche F^- non contengono il repressore. In una cellula lisogenizzata ci sono così poche molecole di repressore che probabilmente il repressore libero non si legherà al segmento del donatore appena sintetizzato che si trasferisce attraverso il pilo nel ricevente F^- . Quando il profago di Hfr (λ) entra nella cellula F^- , avviene una competizione tra la produzione del repressore di lambda e una proteina precoce dello sviluppo vegetativo fagico (come il prodotto del gene *cro*). Il risultato di questa competizione non è prevedibile; in questi incroci, quindi, la lisi è anomala.

15.33. (a) Le placche torbide sono dovute alla crescita secondaria dei batteri lisogenizzati di un ceppo indicatore sensibile a lambda. (b) È probabile che le mutazioni del locus *cI* producano un repressore difettivo. Questi mutanti non possono pertanto lisogenizzare il ceppo indicatore.

15.34. (a) Il controllo negativo esercitato dal prodotto del gene *cro* sul promotore p_{RM} impedisce la sintesi del repressore dell’immunità. Si possono raggiungere concentrazioni sufficientemente alte del repressore per poter stabilire la lisogenizzazione. (b) La sintesi del repressore continua a dipendere dalla trascrizione del gene *cI* iniziata nel promotore p_{RM} e quindi è soggetta alla repressione da parte del prodotto del gene *cro*. Questa condizione favorisce la risposta litica.

CAPITOLO 16

Genetica molecolare

LA STORIA

Prima della scoperta della struttura chimica del materiale genetico, il “gene” era un’unità ereditaria, astratta e indivisibile (paragonabile al vecchio concetto di atomo indivisibile). Con il termine di *genetica classica* o *formale* ci si riferisce a questo periodo storico. La parola “formale” si riferisce all’aspetto esteriore di qualcosa che è distinto dalla sua sostanza. La genetica classica ha avuto un successo enorme nel delucidare molti principi biologici di base, pur senza capire la natura del gene. L’era della *genetica molecolare* è iniziata con la scoperta della struttura del DNA, allorché si è determinato che l’unità fondamentale dell’eredità è il nucleotide del DNA e si è scoperto che il “gene” consiste di un insieme di nucleotidi.

La storia della maggioranza delle discipline scientifiche è generalmente caratterizzata da periodi di stagnazione relativamente lunghi intervallati da esplosioni di rapidi progressi. Queste “ventate” di ricerca hanno perlopiù inizio con lo sviluppo di nuove tecnologie. Questo è certamente vero per la biochimica e per la biologia molecolare. A questo proposito, almeno tre principali aree tecnologiche hanno avuto importanza: (1) la strumentazione e le tecniche, (2) i traccianti radioattivi e (3) l’enzimologia degli acidi nucleici.

1. La strumentazione e le tecniche.

L’ultracentrifuga analitica fu sviluppata negli anni venti da Theodor Svedberg. Il grado di sedimentazione di una sostanza durante l’ultracentrifugazione è funzione in primo luogo della sua dimensione e in secondo luogo della sua forma. Un’espressione di questi parametri è l’unità di sedimentazione (S, in onore di Svedberg). Questo strumento è stato poi modificato per la separazione di organelli quali i nuclei, i ribosomi, i mitocondri e i cloroplasti. Può essere usato per determinare il numero minimo di tipi di macromolecole in un campione biologico e per calcolare i pesi molecolari delle macromolecole.

Il microscopio elettronico fu inventato negli anni trenta, rendendo finalmente possibile la visualizzazione non soltanto di strutture subcellulari ma anche di virus e macromolecole. Per mezzo del microscopio elettronico si è dimostrato che le mappe genetiche circolari dei microorganismi hanno una corrispondente struttura fisica circolare. Si sono inoltre visualizzati i ribosomi multipli attaccati ad una molecola di mRNA (polisomi).

L’elettroforesi è una tecnica che separa le molecole secondo la loro carica netta in un campo elettrico, di solito su un mezzo di supporto solido o semisolido, come la carta o l’agar. Linus Pauling usò questa tecnica per differenziare l’emoglobina delle cellule falciformi da quella normale e determinò (attraverso un’analisi di sequenza delle proteine) che la loro differente mobilità elettroforetica era dovuta alla differenza di un singolo amminoacido nelle catene beta. Walter Gilbert e Allan Maxam svilupparono una tecnica elettroforetica per determinare rapidamente la sequenza nucleotidica di frammenti di DNA lunghi fino a 100 paia di basi. L’elettroforesi è stata largamente impiegata per differenziare *isozimi*, cioè proteine con identiche proprietà enzimatiche ma diversa struttura primaria.

I dati ottenuti per diffrazione dei raggi X da parte di sostanze cristalline sono stati analizzati con computer e hanno permesso di delucidare la configurazione tri-dimensionale degli acidi nucleici (DNA, tRNA) e delle proteine (mioglobine, capsomeri virali, enzimi).

Durante la metà degli anni 40 e all’inizio degli anni 50 di questo secolo, sono stati perfezionati diversi tipi di cromatografie, che permettono di separare le molecole per differenze di