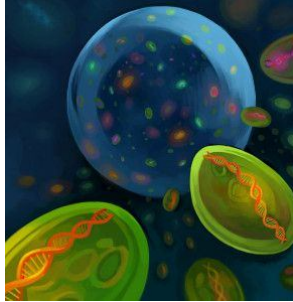


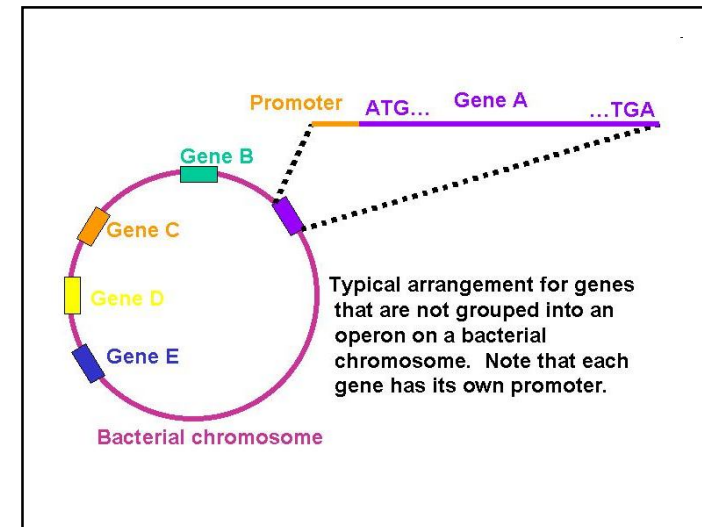
A.A. 2015-16

Dipartimento di Scienze della Vita
CdS Biologia Molecolare e Cellulare (LM-6)



**Genetica dei Procaroti
2 & 3**

Prof. *Laura Marri*
ricevimento: previo appuntamento telefonico o e-mail

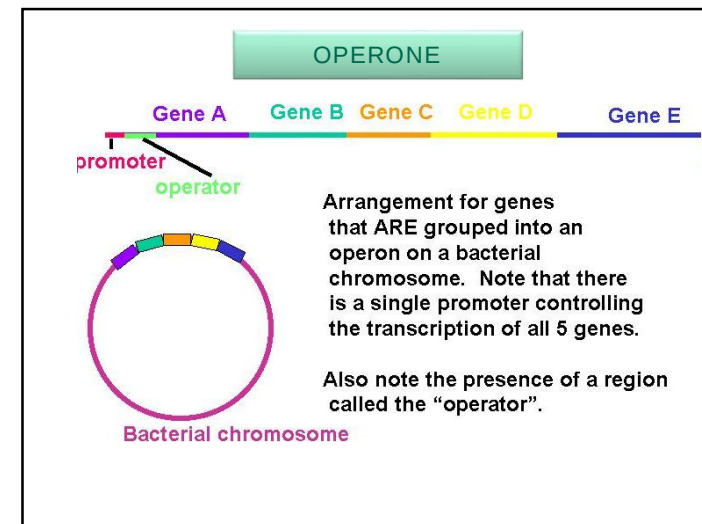


OPERONE

unità che coordina e regola la trascrizione nei batteri

Un operone comprende:

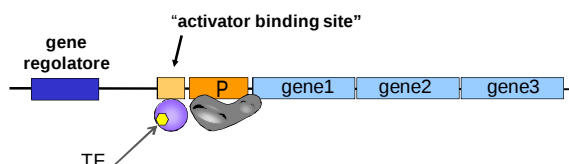
un set di geni strettamente correlati che sono regolati da un singolo operatore e trascritti insieme



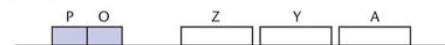
REGULONS

Regulons, as groups of transcriptionally co-regulated operons, are the basic units of cellular response systems in bacterial

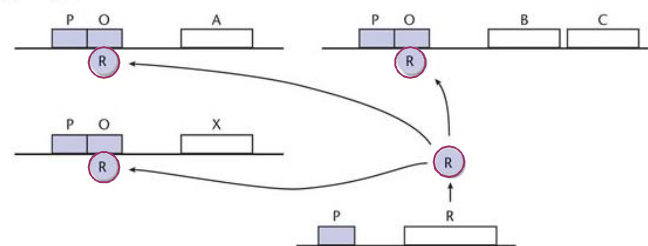
A bacterial regulon is a group of operons/genes that are transcriptionally co-regulated by the same regulatory machinery, consisting of *trans* regulators (transcription factors or simply TFs) and *cis* regulatory binding elements in the promoters of the operons they regulate.



(a) An operon



(b) A regulon



REGULONS

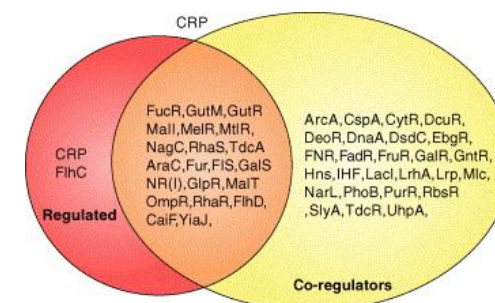
Since the term regulon was first proposed in 1964, 173 regulons have been fully or partially identified in *E. coli* K12 and numerous more in other bacteria e.g. *B. subtilis*.

Regulons can be categorized into two classes:

- LOCAL: consisting of only a few component operons
- GLOBAL: having a relatively large number of operons

REGULATED GENES AND CO-REGULATORS OF CRP

CRP: cAMP receptor protein
CAP: catabolite gene activator protein



Current Opinion in Microbiology

The intersection contains those TFs that are directly regulated by CRP and which work as co-regulators with CRP.

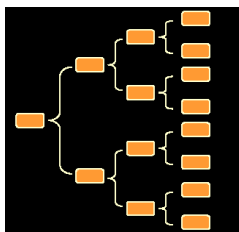
Crescita batterica = riproduzione cellulare

Crescita di organismi pluricellulari vs. organismi unicellulari:

- multicellulare: aumento delle dimensioni di un organismo
- unicellulare: aumento del numero di individui di una popolazione

Fissione binaria:

- ▶ riproduzione asessuata
- ▶ una cellula si divide in due identiche



Ciclo cellulare batterico

- **REPLICAZIONE DEL CROMOSOMA**
- **ALLUNGAMENTO**
- **DIVISIONE CELLULARE**

Per poter studiare le variazioni biochimiche, morfologiche e fisiologiche che avvengono tra 2 divisioni cellulari si cerca di

SINCRONIZZARE la coltura in modo che **TUTTE LE CELLULE** in una coltura siano allo **STESSO PUNTO** del **CICLO CELLULARE**.

1. Metodi che agiscono sul metabolismo cellulare portando le cellule tutte allo stesso punto del ciclo
2. Metodi fisici che permettono di separare nella popolazione le cellule allo stesso punto

1. Metodi che agiscono sul metabolismo cellulare portando le cellule tutte allo stesso punto del ciclo

TEMPERATURA

un abbassamento della temperatura da 37°C a 25°C per 15 min induce divisione sincrona in pneumococco e in altri microrganismi .

Si sfrutta la termodipendenza di qualche passaggio della divisione cellulare che avviene solo a T più elevata.

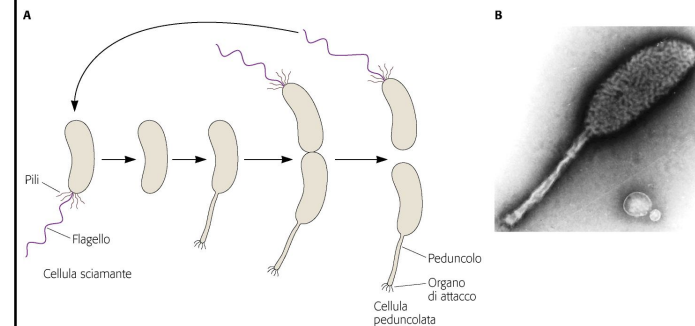
DIGIUNO

i microrganismi vengono posti in un terreno in cui mancano metaboliti essenziali (aminoacidi, vitamine basi azotate): in questo modo le cellule raggiungono una condizione di blocco della crescita e non appena trasferite in un terreno nutritivo completo presentano divisione sincrona

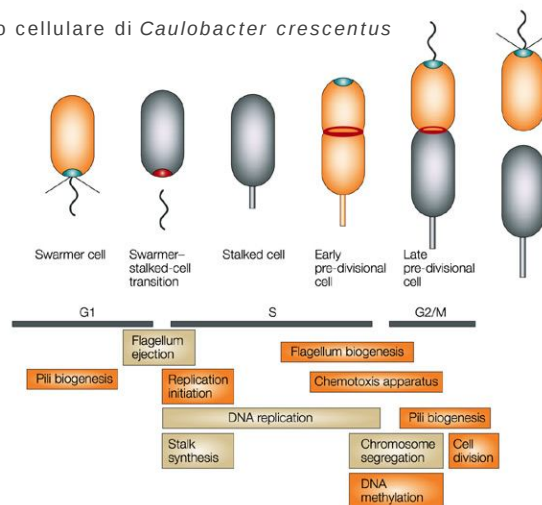
DILUIZIONE

le cellule vengono fatte crescere fino alla fase stazionaria (5×10^9 cellule/ml) poi diluite in terreno fresco

Crescita sincrona e metodi di sincronizzazione

Germinazione di *Bacillus subtilis*Ciclo cellulare di *Caulobacter crescentus**baby machine method* Helmstetter & Cumming, 1963Ciclo cellulare di *Caulobacter crescentus*

In *Caulobacter*, chromosome replication never occurs more than once per division. This is because division in this organism always gives rise to two different types of cells.

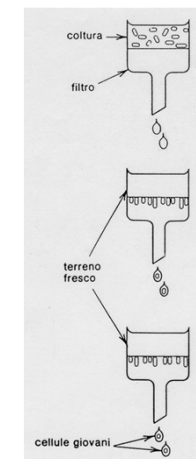
Ciclo cellulare di *Caulobacter crescentus*

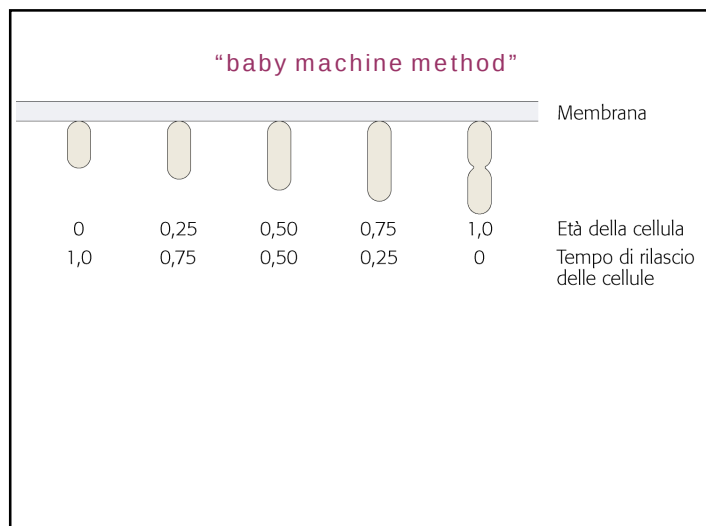
Crescita sincrona e metodi di sincronizzazione

baby machine method

Helmstetter & Cumming, 1963

metodo fisico che permette di separare dalla popolazione la frazione di cellule che sono nello stesso punto del ciclo cellulare.





Molecular Microbiology (2005) 57(2), 380–391
doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04693.x

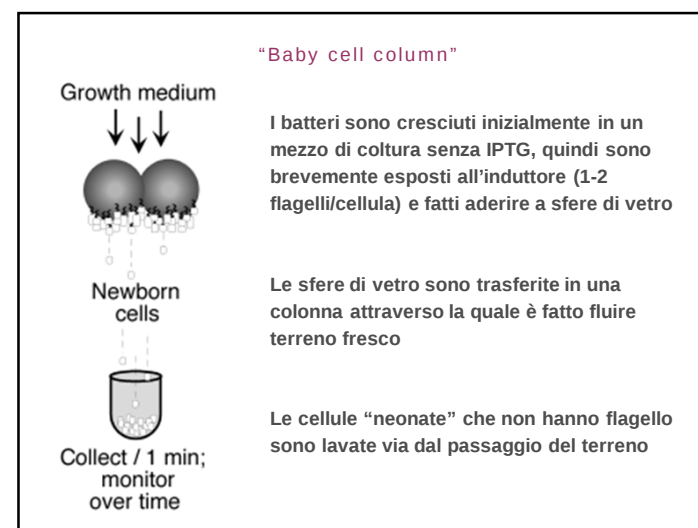
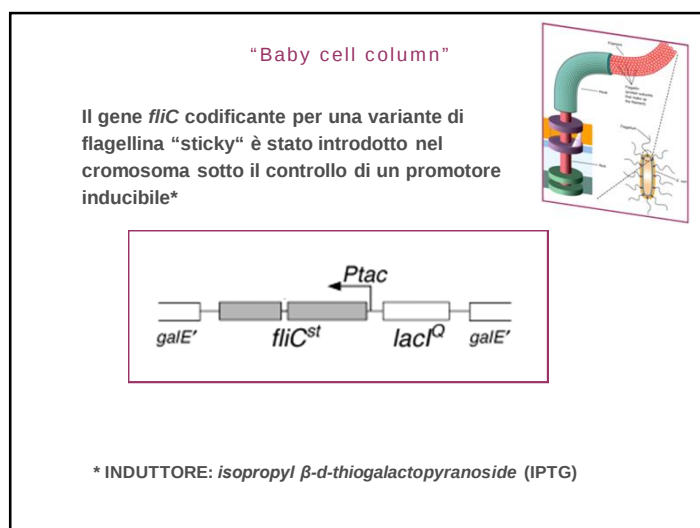
The *Escherichia coli* baby cell column: a novel cell synchronization method provides new insight into the bacterial cell cycle

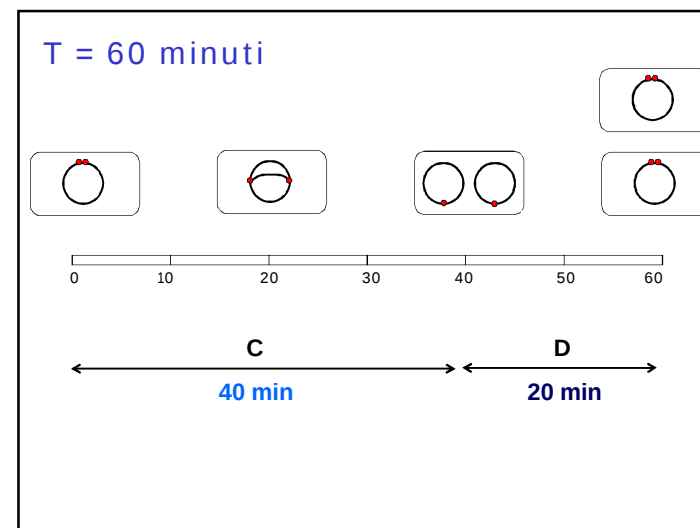
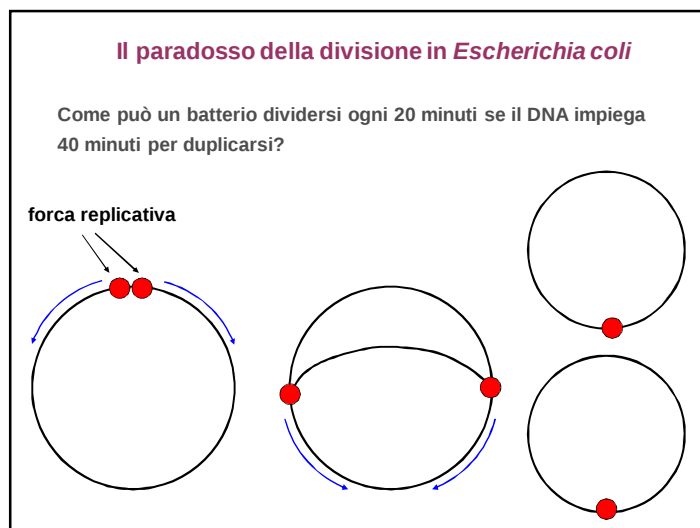
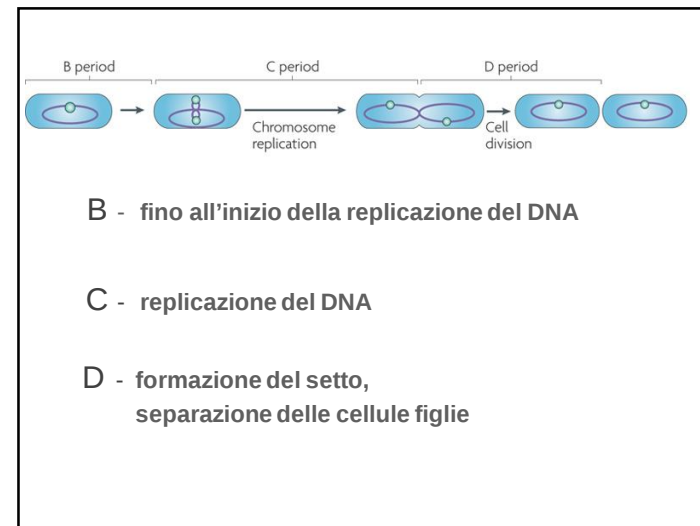
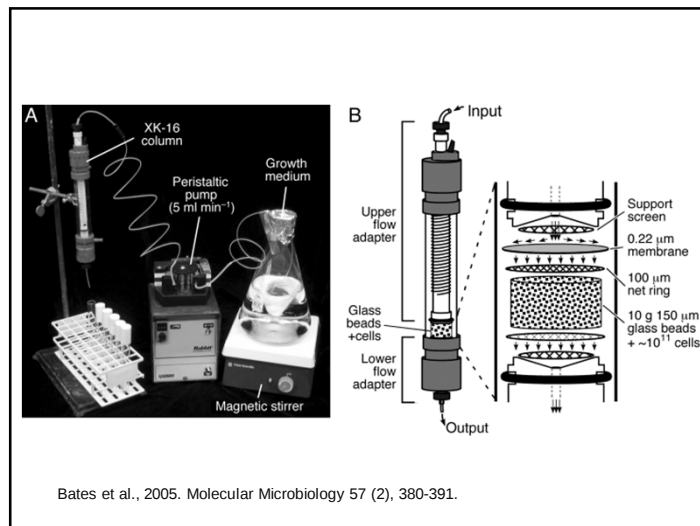
David Bates,^{1*} Jessica Epstein,¹ Erik Bove,² Karen Fahrner,¹ Howard Berg¹ and Nancy Kleckner¹

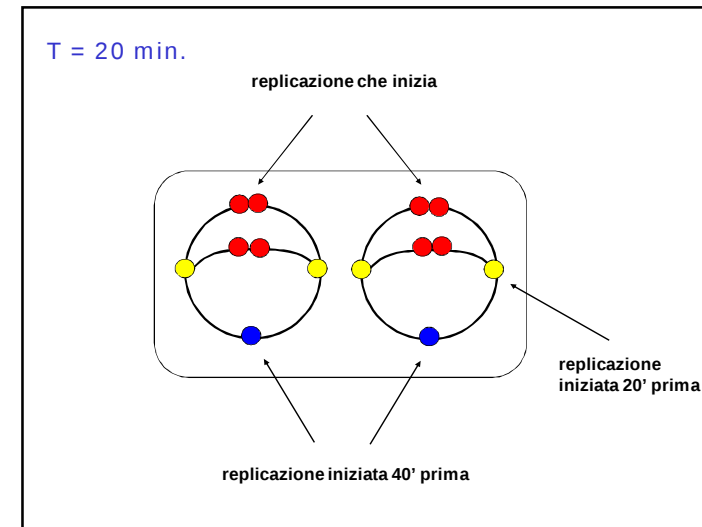
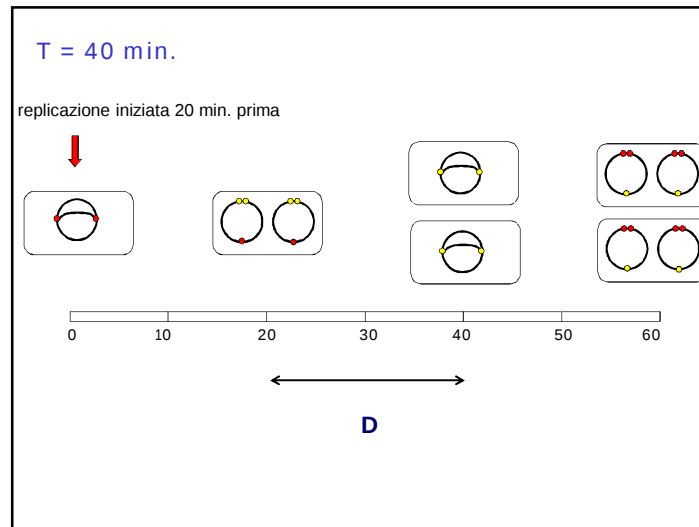
¹Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA.
²Department of Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Montebello, 0310 Oslo, Norway

Summary

We describe a new method for synchronizing bacterial cells. Cells that have transiently expressed an inducible mutant ‘sticky’ flagellin are adhered to a volume of glass beads suspended in a chromatography column through which growth medium is pumped. Following repression of flagellin synthesis, newborn cells are eluted from the column in large quantities exceeding that of current baby machine techniques by approximately 10-fold. Eluted cultures of ‘baby cells’ are highly synchronous as determined by analysis of DNA replication, cell division and other events, over time after elution from the column.







Replicazione del DNA in *E. coli*

Un nuovo ciclo di replicazione inizia prima che si completi il ciclo precedente

Apertura di forche multiple di replicazione

Le cellule in fase di divisione ereditano una copia completa del genoma più una parte parzialmente replicata

La replicazione del DNA offre un modello di regolazione

- ♦ inizia sempre all'origine
- ♦ i geni prossimi all'origine sono duplicati per primi
- ♦ aumenta il numero di copie

per questi geni quindi aumenta anche il numero dei loro prodotti

si tratta di geni associati con la sintesi della parete e della membrana cellulare, es. OMP

La replicazione del cromosoma è seguita dalla segregazione:
i cromosomi duplicati vengono disposti ai lati opposti della
cellula in divisione

I batteri quali *E. coli* riescono a portare a termine questo
processo in modo efficiente nonostante l'assenza di un
apparato mitotico

In questo processo è sicuramente implicato è l'operone
mukFEB

Mutanti *muk* producono cellule anucleate con una frequenza di
circa 100 superiore a quella del *wild type*

mukaku ("anucleato")

B - fino all'inizio della replicazione del DNA

C - replicazione del DNA

D - formazione del setto,
separazione delle cellule figlie

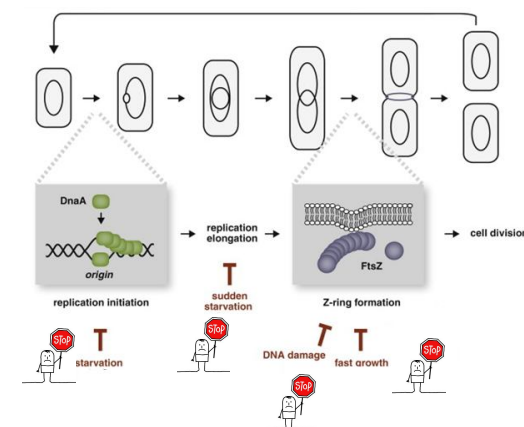
La formazione del setto richiede una regolazione:

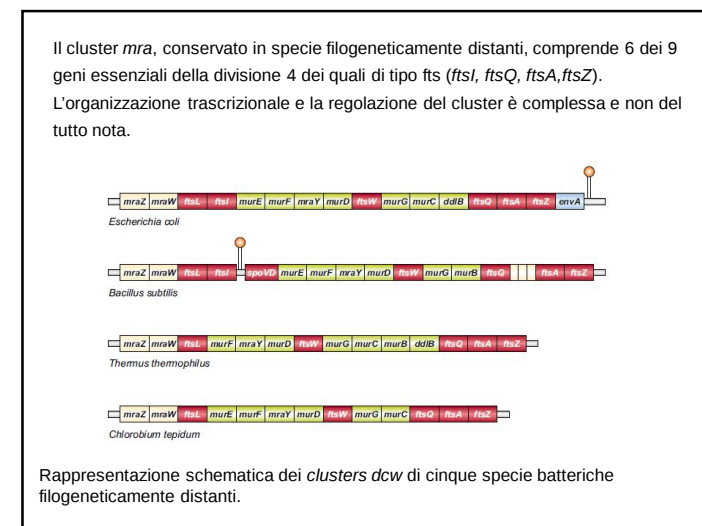
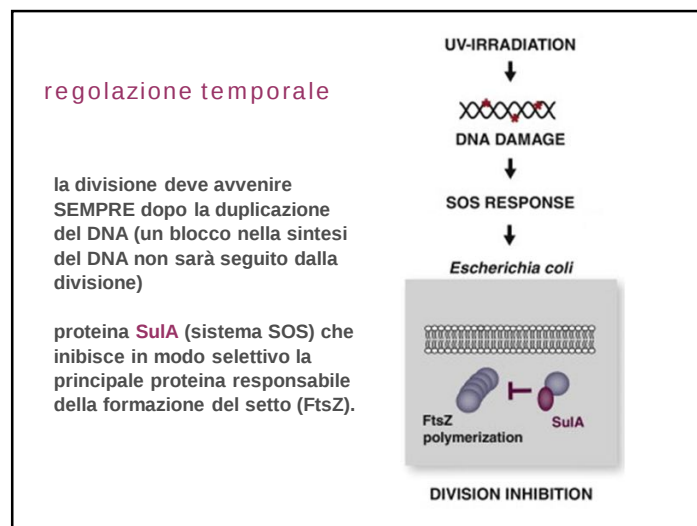
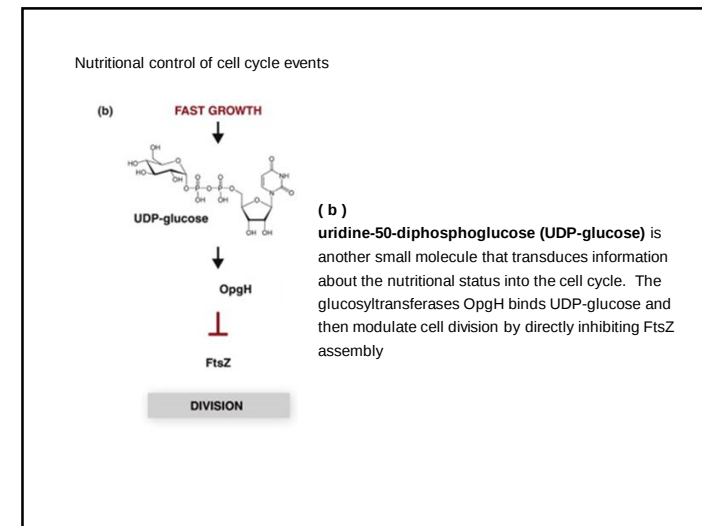
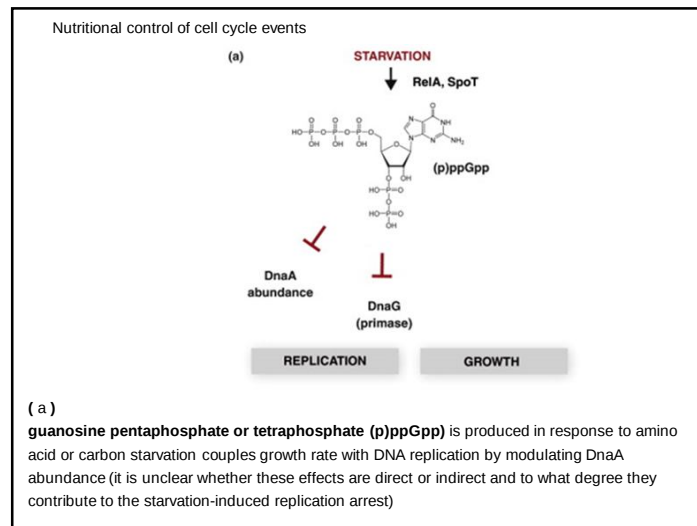
TEMPORALE

SPAZIALE

regolazione temporale

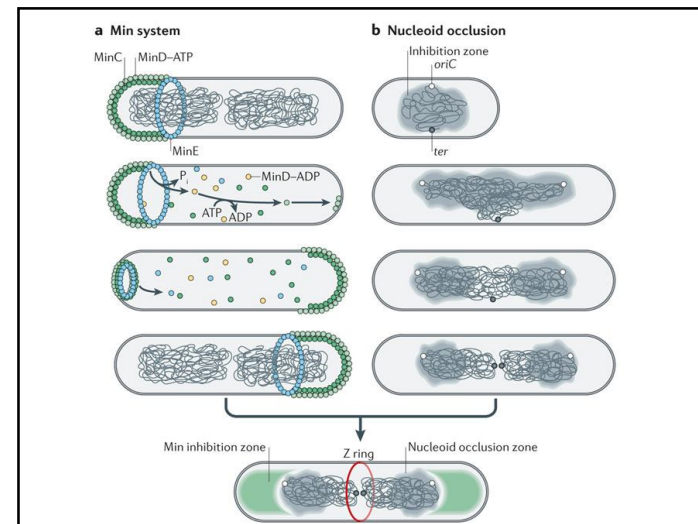
Controllo nutrizionale



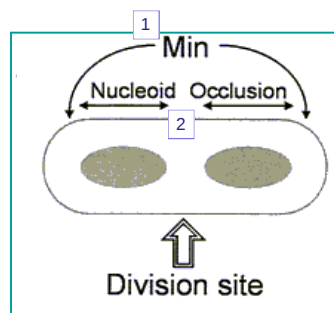


Rod-shaped bacteria have two main systems to accurately direct localization of the division plane to mid-cell:

- the Min system prevents aberrant division at the cell poles
- nucleoid occlusion prevents division from occurring over the nucleoids



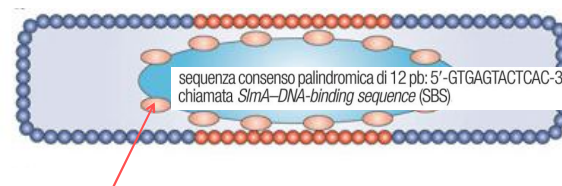
sistema Min



1

Vedere articolo allegato: L. Rothfield, A. Taghbalout and YL shih (2005) "Spatial control of bacterial division-site placement ", Nature Reviews Microbiology, 3, 959-968.

Selezione del punto di divisione



NO: nucleoid occlusion proteins

two proteins that have a role in the NO phenomenon have been identified: Noc in *Bacillus subtilis* and SlmA in *Escherichia coli*.

Occlusione del nucleotide

Il nucleotide esercita un effetto negativo sul posizionamento del setto: in una regione occupata dal nucleotide non si formerà mai il setto



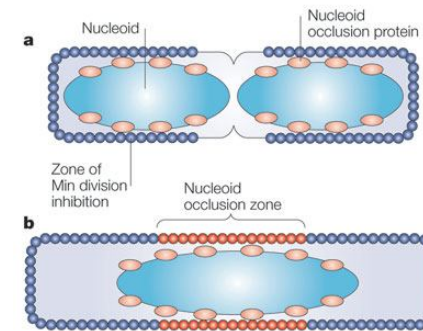
Il volume cellulare è occupato dal nucleotide. Non ci sono siti liberi per la formazione del setto



In seguito alla segregazione del DNA, la regione mediana rimane libera dal nucleotide. Il setto può formarsi

Selezione del punto di divisione

the nucleoid occlusion (NO) proteins are associated with the nucleoid



Formazione del setto e divisione in *Escherichia coli*

Una fase precoce della divisione nei batteri è la formazione dello *Z ring* a livello del sito di divisione.



Lo studio della divisione cellulare di *E. coli* si è avvalso dell'analisi di mutanti termosensibili in questo processo, capaci cioè di dividersi normalmente a 30 °C (temperatura permissiva) ma non a 40-42 °C (temperatura non permissiva).

(detti *fts* per *filamentous thermosensitive*)

Mutante termosensibile per una proteina del divisoma (FtsQ).

Ceppo *fts*
ad alta T (42° C) →

A T non permissiva le cellule crescono normalmente in dimensioni ma non potendo dividersi formano cellule lunghe e filamentose con più copie del cromosoma (non visibile nella figura) che poi muoiono.

fts = Eilaments

Ceppo *fts*
a bassa T (30° C) →

A T permissiva le cellule si dividono correttamente.

Un fenotipo analogo è osservabile in mutanti termosensibili per altri geni della divisione.



FtsZ

Filamenting temperature-sensitive mutant Z

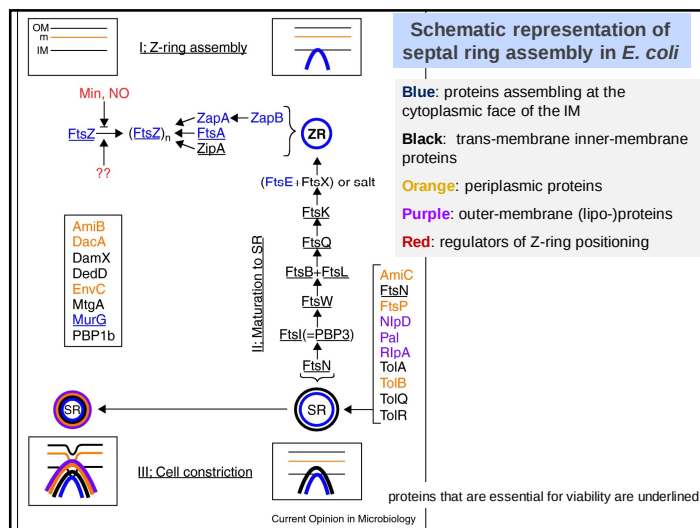
FtsZ è virtualmente presente in tutti i batteri, nella maggioranza degli Archaea e nei cloroplasti e mitocondri degli eucarioti.

Tra le proteine batteriche coinvolte nella divisione è quella più conservata

La formazione dello *Z ring* è dovuta alla capacità della proteina FtsZ di polimerizzare

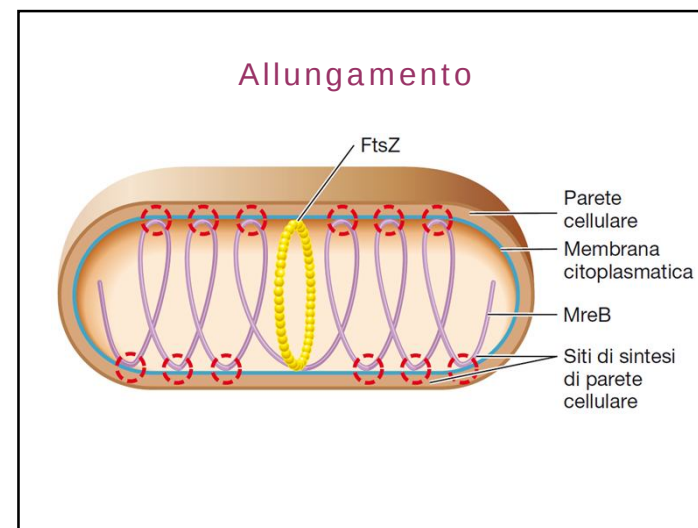
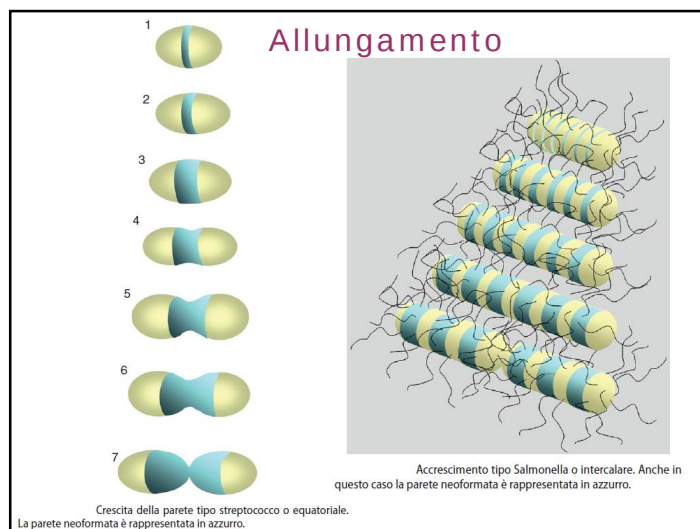
queste proteine possono legare ed idrolizzare nucleosidi trifosfati (GTP) che forniscono l'energia necessaria al rimodellamento della forma cellulare, possibilmente contrastando le forze dovute al turgore e alla architettura parietale presente.

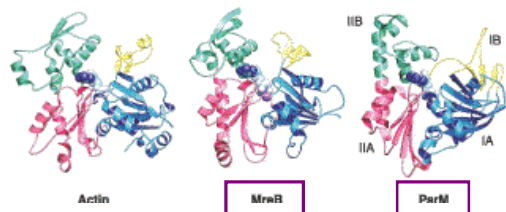
FASI DELL'ASSEMBLAGGIO DELL'APPARATO DI CITOCHINESI.



FtsZ

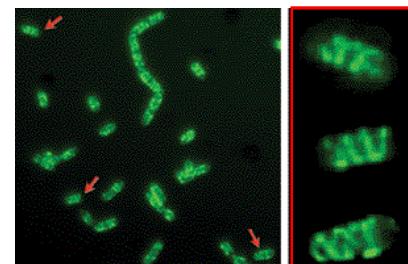
- ✦ è la proteina principale del setto e quella che interviene per prima
- ✦ proteina citoplasmatica di 40.000 D, circa 20.000 copie per cellula
- ✦ è una GTPasi con attività polimerizzante che richiede GTP
- ✦ La polimerizzazione è inibita da **SulA** (controllo della replicazione) e da **MinC** (controllo spaziale della localizzazione del setto)
- ✦ Tra le proteine Fts è quella più conservata tra i procarioti: è assente solo nelle clamidie. E' presente in alcuni mitocondri e cloroplasti





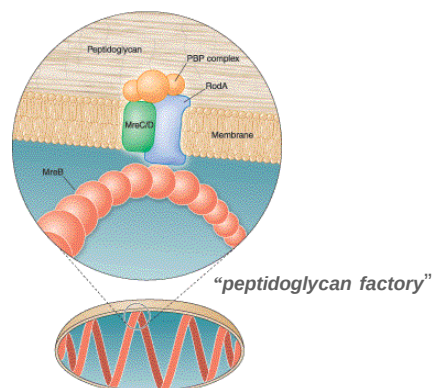
Thermotoga maritima

these proteins carry out nucleotide binding and hydrolysis, and that they can polymerize into linear protofilaments, similar to eukaryotic actins.

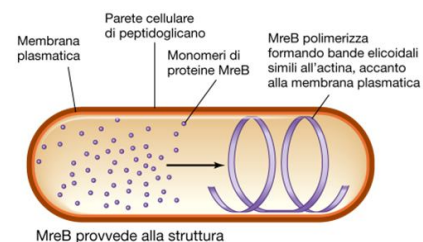


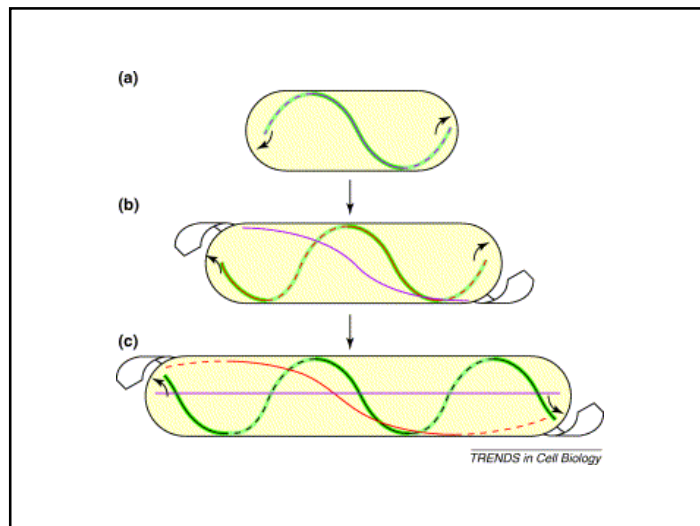
Helical cytoskeletal "cables" visualized by fluorescence microscopy of live cells of *B. subtilis* expressing a GFP fusion to the MreB homologue, Mbl. Three cells from the field (arrowed) are shown enlarged to the right.

How Do MreB Proteins Determine Cell Shape?



MreB forma filamenti elicoidali sulla faccia interna della membrana plasmatica contribuendo a dar forma alla cellula.

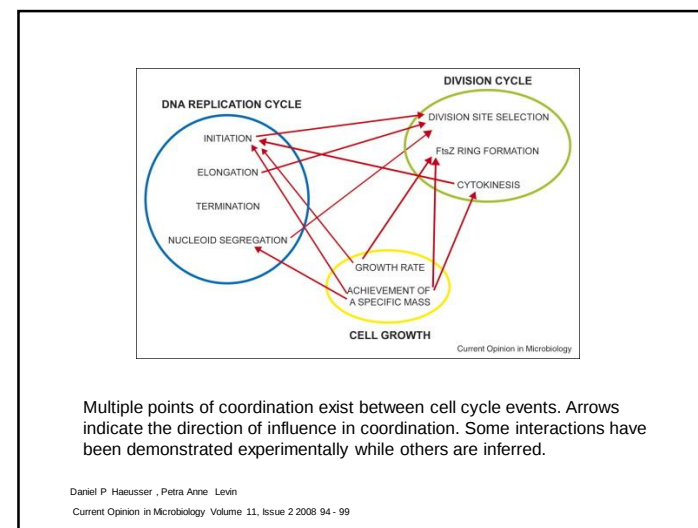
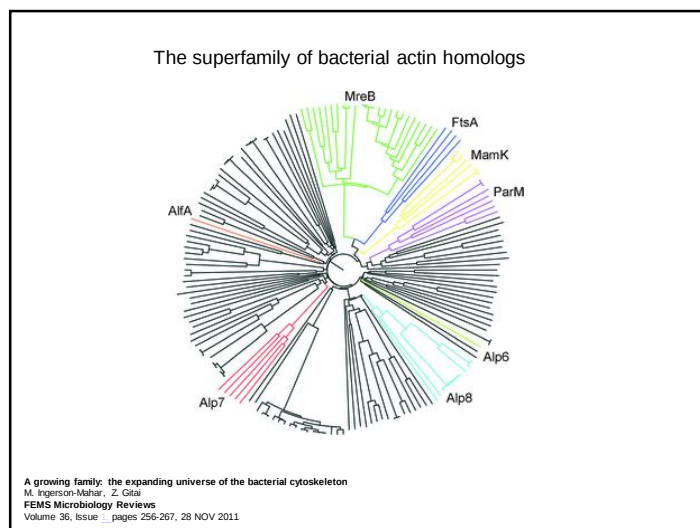




a | Cells such as *Staphylococcus aureus* contain the **tubulin-like** division protein **FtsZ**, which is present in virtually all eubacteria, most cells containing FtsZ as the sole cytoskeletal element are spherical.

b | When **actin-like MreB** homologues are present, cells can take on a rod-shaped morphology like that seen in *Escherichia coli*.

MreB and its homologues often appear as intracellular helical structures (orange) when viewed with fluorescence microscopy.



SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which Is Accompanied by Mutagenesis

Radman, M. (1974) in: Molecular and environmental aspects of mutagenesis, pp. 128 – 142, Prakash, L., Sherman, F., Miller, C., Lawrence, C. and Tabor, H. W. (Eds.), Charles C. Thomas Publisher, Springfield.



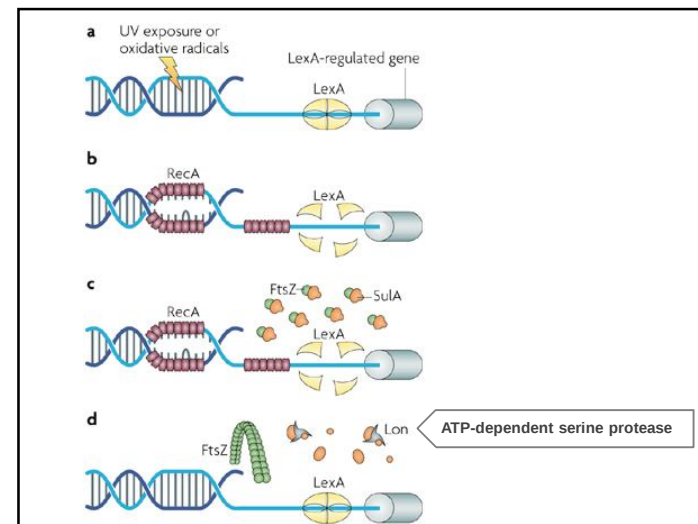
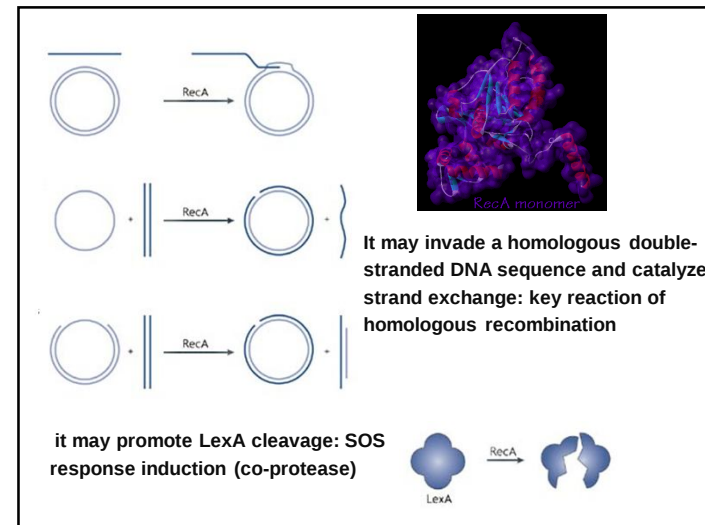
la risposta SOS causa l'inibizione della divisione cellulare

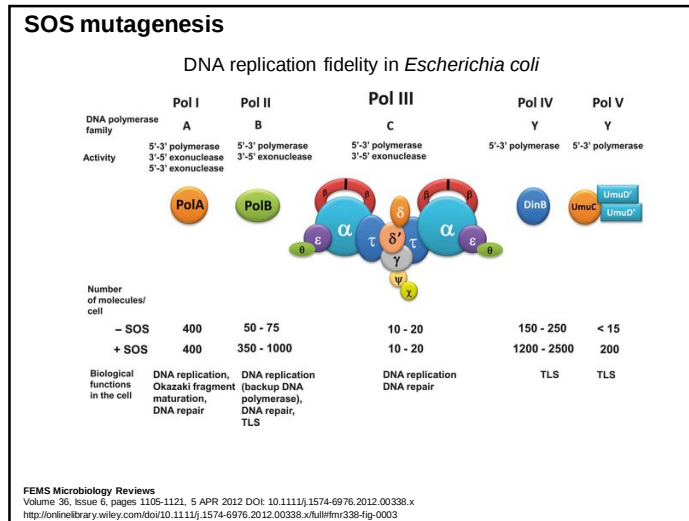
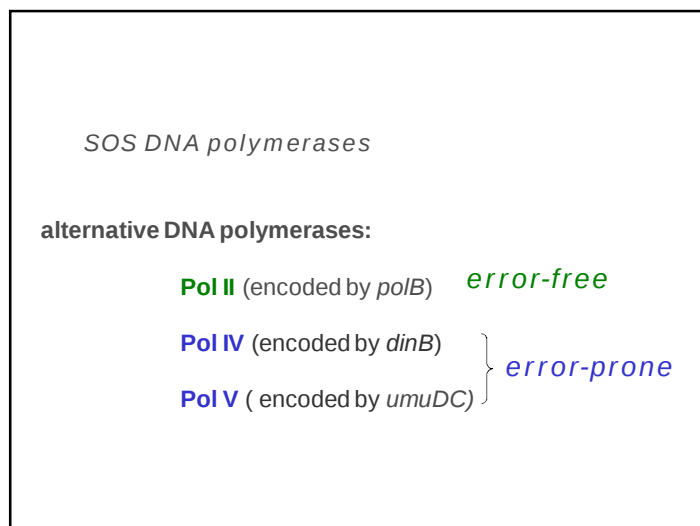
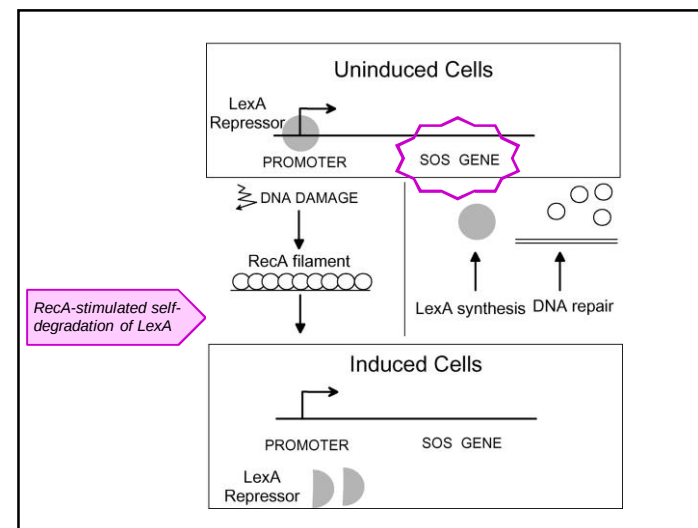
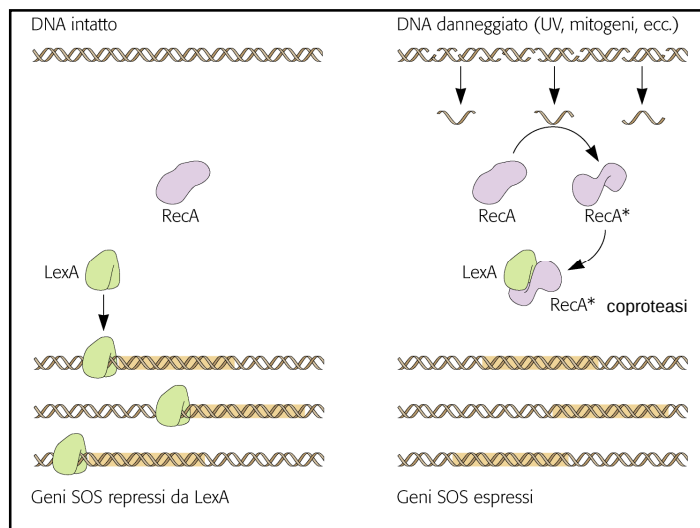
La risposta SOS causa l'inibizione della divisione cellulare

SfiA (SulA) interagisce con FtsZ

in condizioni normali l'espressione di *sulA* è inibita dalla proteina LexA

Il processo è reversibile: SulA è una proteina instabile



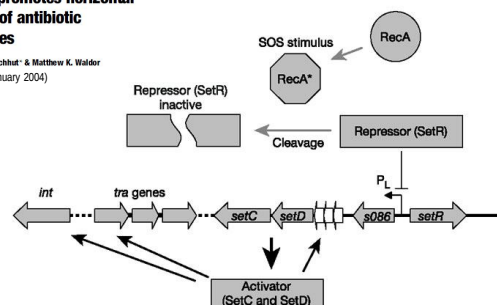


ICE derived from *Vibrio cholerae*

resistance to chloramphenicol, sulphamethoxazole, trimethoprim and streptomycin

SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes

John W. Bader*, Blanca Hochhut* & Matthew K. Waldor
Nature 427, 72-74 (1 January 2004)



ICEs: Integrating conjugative elements are a diverse group of mobile elements that are transferred by means of cell-cell contact and integrate into the chromosome of the new host

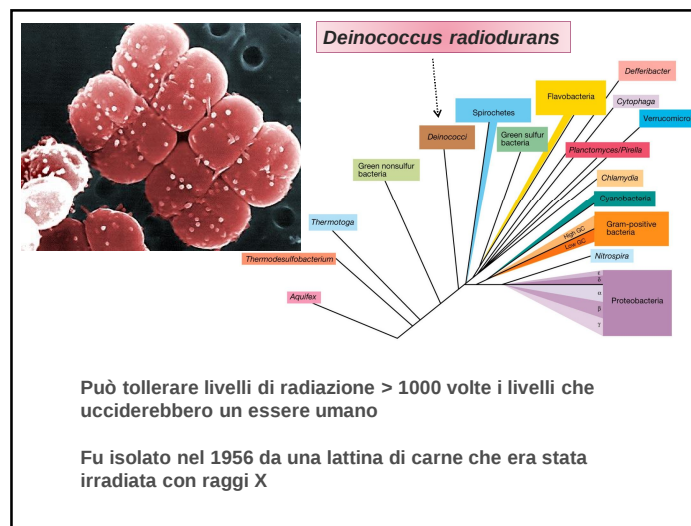
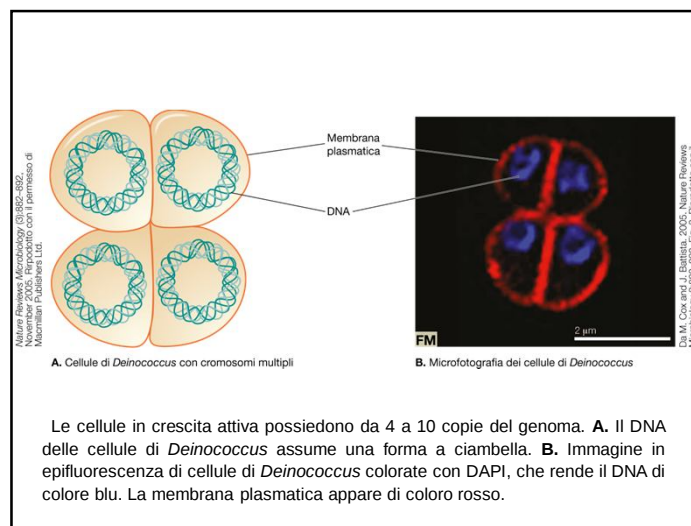


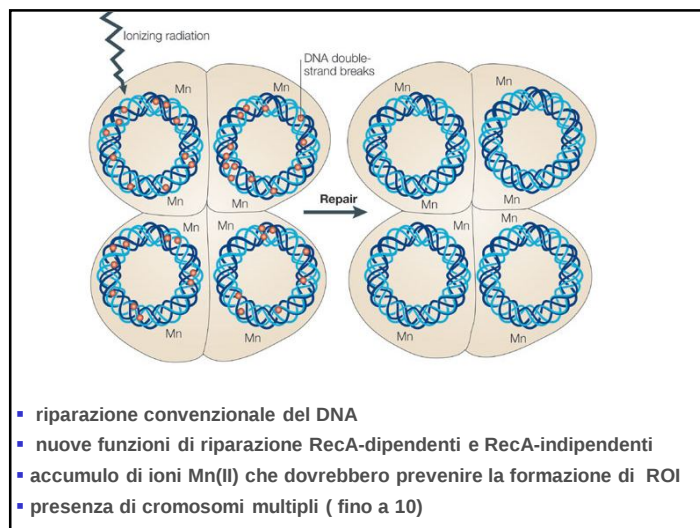
Tabella 8.2 Dimensioni, numero e struttura dei cromosomi e dei plasmidi di alcune specie microbiche.

ORGANISMO	CROMOSOMI			PLASMIDI		
	DIMENSIONE (Mbp)	NUMERO	STRUTTURA	DIMENSIONE (Kbp)	NUMERO	STRUTTURA
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2,1 + 3,0	2	Lineare + circolare	450 + 200	2	Circolare
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	1	Circolare			
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5,7	1	Circolare	> 50 ognuno	6	
<i>Borrelia</i>	0,91	1	Lineare	5-200	Multiplici	Circolare + lineare
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	8,7	1	Circolare			
<i>Brucella melitensis</i>	2,1 + 1,2	2	Circolare			
<i>Brucella suis</i> biovars 1, 2, 4	1,0 + 2,0	2	Circolare			
<i>Brucella suis</i> biovar 3	3,1	1	Circolare			
<i>Buchnera</i> sp. ceppo APS	0,640	1	Circolare	< 7,8 ognuno	2	Circolare
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2,6 + 0,4	2	Circolare	177 + 45	2	
<i>Escherichia coli</i> K-12	4,6	1	Circolare			
<i>Leptospira interrogans</i>	4,7 + 0,35	2	Circolare			
<i>Paracoccus denitrificans</i>	2,0 + 1,1 + 0,64	3	Circolare			
<i>Rhizobacterium meliloti</i>	2,4 + 1,7	2	Circolare	1400	1	Circolare

D. radiodurans harbours 4 genetic elements designated as:

- chromosome I
- chromosome II
- a megaplasmid
- a small plasmid





CONAN THE BACTERIUM

The world's toughest organism thrives in blistering deserts and radioactive dumps. Now workers are giving it a taste for chemical waste

BY PATRICK HUYGHE

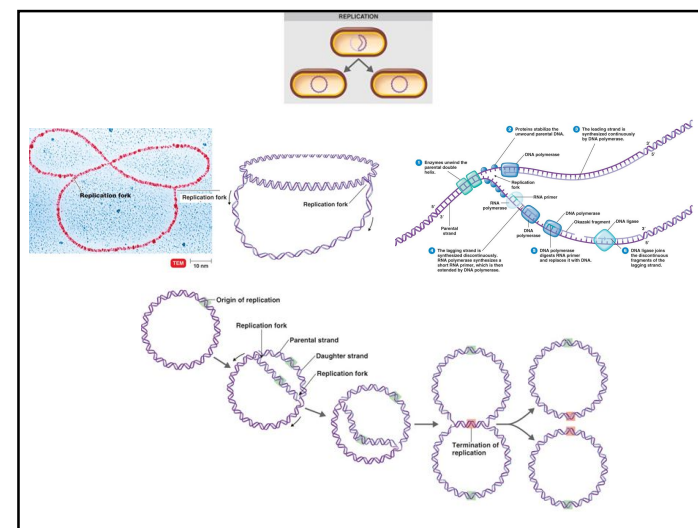
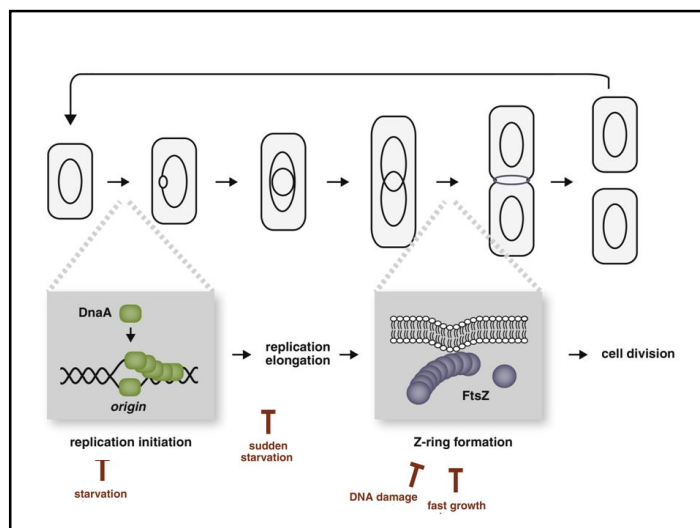
THE SCIENCES • July/August 1998

Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology

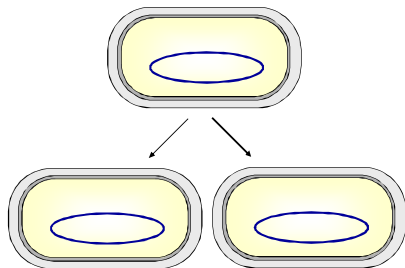
Michael J Daly

Current Opinion in Biotechnology 2000, 11:280-285

Seventy million cubic meters of ground and three trillion liters of groundwater have been contaminated by leaking radioactive waste generated in the United States during the Cold War. A cleanup technology is being developed based on the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*, which is being engineered to express bioremediating functions.

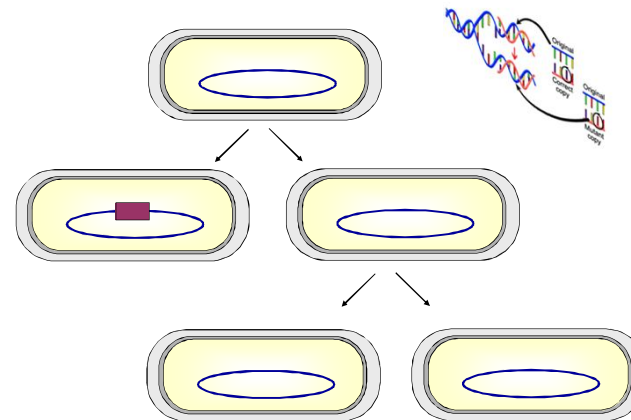


Variabilità genetica nei batteri



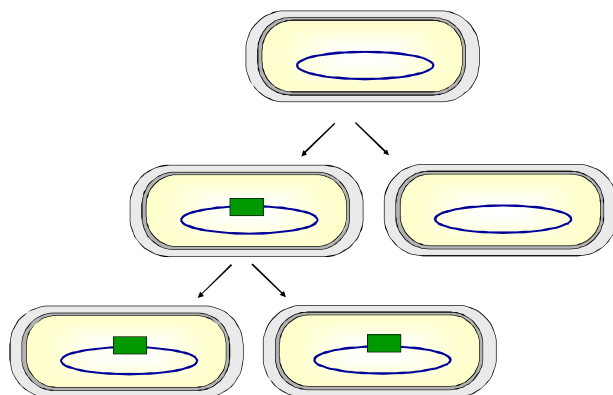
le due cellule figlie sono geneticamente identiche tra loro e alla cellula madre

Variabilità genetica nei batteri



Nella maggioranza dei casi le mutazioni sono deleterie.....

Variabilità genetica nei batteri



.....ma in qualche caso possono conferire un vantaggio!

Frequenza di mutazione

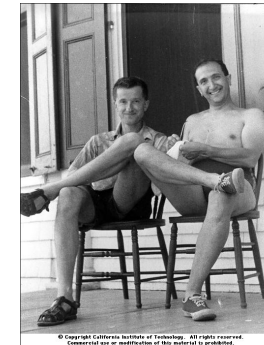


DINNER AT THE MICROBES

La frequenza con cui avvengono i diversi tipi di mutazioni è estremamente variabile.

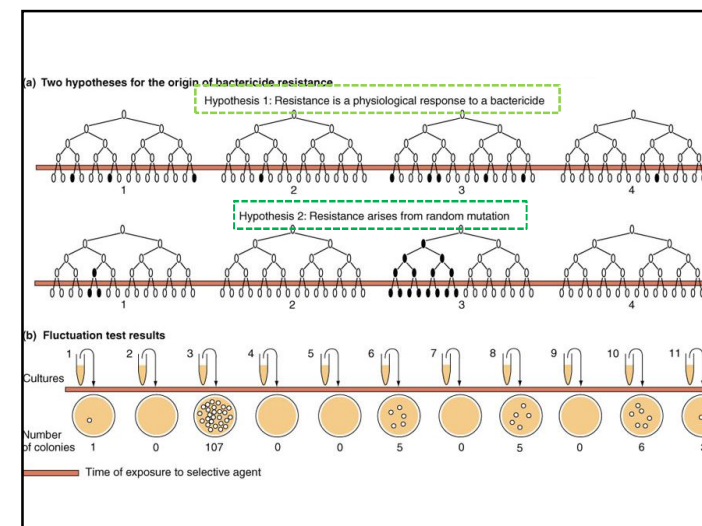
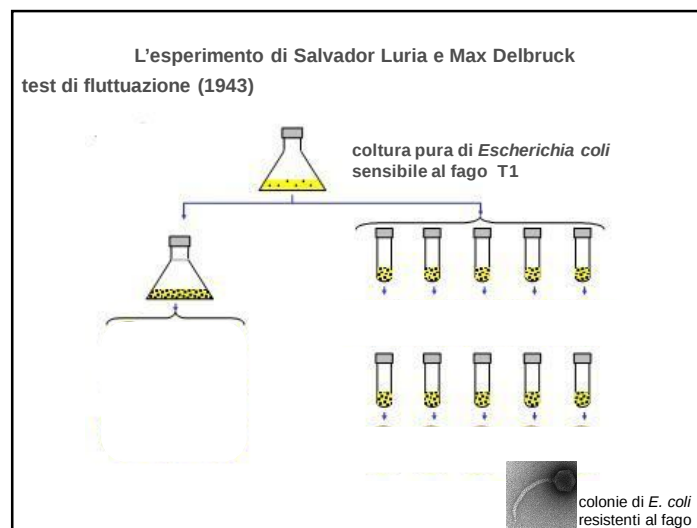
Genome Organism	Size (bp)	Target	Mutation Rate per Replication	
			per bp	per Genome
Bacteriophage M13	6.41×10^3	<i>lacZα</i>	7.2×10^{-7}	0.0046
Bacteriophage λ	4.85×10^4	<i>cI</i>	7.7×10^{-8}	0.0038
Bacteriophage T2 and T4	1.60×10^5	<i>rII</i>	2.4×10^{-8}	0.0040
<i>E. coli</i>	4.639×10^6	<i>lacI</i>	4.1×10^{-10}	0.0019
		<i>lacI</i>	6.9×10^{-10}	0.0033
		<i>hisGDCBHAF</i>	5.1×10^{-10}	0.0024
		Average of all values	5.4×10^{-10}	0.0025
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (pH 3.5, 75°C)	2.243×10^6	<i>pyrE</i>	7.8×10^{-10}	0.0018

Come si originano le mutazioni?



Nobel Prize, 1969

Max Delbrück (1906 -1981) & Salvador Luria (1912 - 1991)
Cold Spring Harbor Laboratory, Long Island NY, Summer 1953



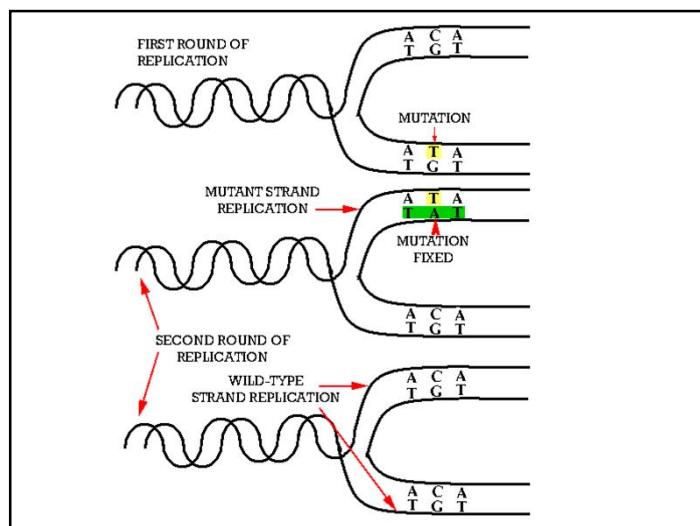
Conclusione:

- Batteri sensibili al fago diventano resistenti prima di entrare in contatto con il virus.
- Il numero di mutanti dipende dal momento in cui si verifica ciascun evento di mutazione (e dal numero di eventi) in ciascuna coltura.
- L'esposizione al virus non induce l'insorgenza della mutazione.
- L'esposizione al virus seleziona mutanti preesistenti

Basi molecolari delle mutazioni

Mutazioni puntiformi

Il cambiamento del fenotipo dipende dal punto esatto in cui la mutazione è situata nel gene e da quale prodotto è normalmente codificato dal gene.



Mutazioni per sostituzione di base

TRANSIZIONI: purina $\rightarrow$ purina $G \rightleftharpoons A$
 pirimidina $\rightarrow$ pirimidina $C \rightleftharpoons T$

TRASVERSIONI: purina $\rightleftharpoons$ pirimidina
 $G \rightleftharpoons T$ $G \rightleftharpoons C$
 $A \rightleftharpoons T$ $A \rightleftharpoons C$

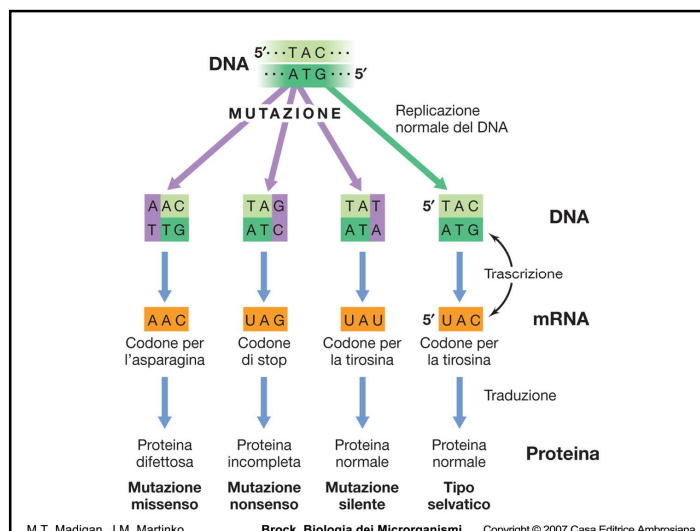
Basi molecolari delle mutazioni

Mutazioni puntiformi

possono risultare per sostituzione di una base nel DNA o per inserzione e delezione di una base (microinserzioni e microdelezioni).

The Expression of Mutations

- **Base substitution** (point mutation)
 - Change in one base
 - Result in change in amino acid
- **Missense mutation**
- **Nonsense mutation**
 - Results in a nonsense codon



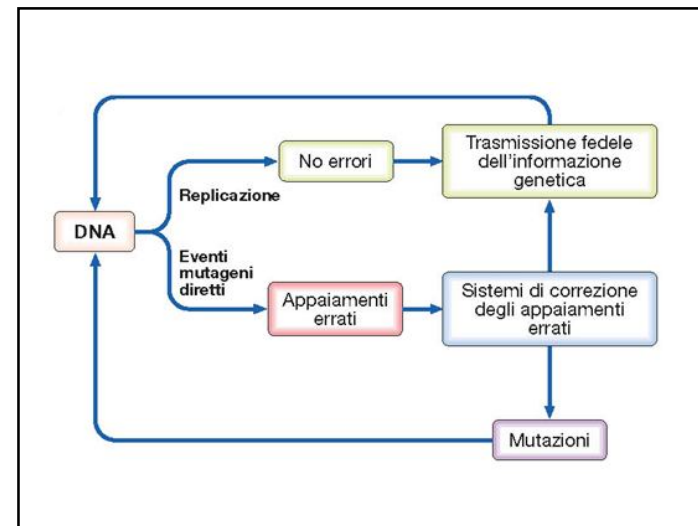
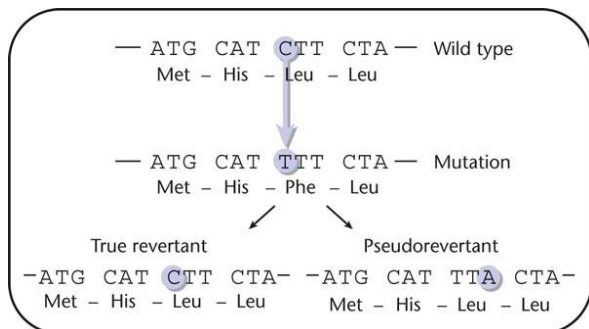
Basi molecolari delle mutazioni

Mutazioni che coinvolgono molte paia di basi

Le inserzioni si verificano per aggiunta di nuove basi al DNA e inattivano il gene in cui accadono. Molte mutazioni da inserzione sono dovute a sequenze di DNA specifiche, lunghe 700-1400 bp, dette sequenze di inserzione. Le mutazioni da inserzione possono regredire per reversione.

Le delezioni possono coinvolgere la perdita di centinaia o migliaia di paia di basi; non regrediscono per reversione se non per ricombinazione

Reversione



Le mutazioni possono essere:

Spontanee

(frequenza molto bassa)

Indotte da mutageni

Mutageni chimici

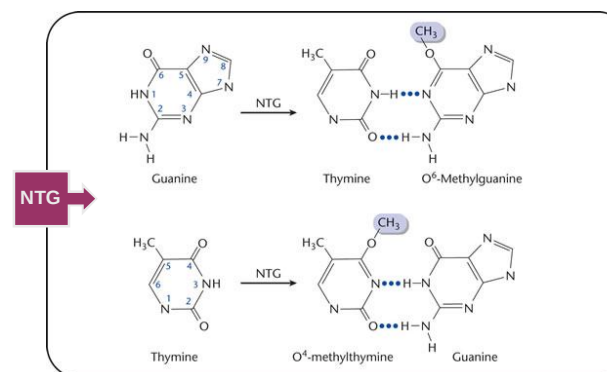
- analoghi delle basi
- agenti alchilanti
- agenti intercalanti

Mutageni fisici

Radiazioni non ionizzanti: UV
Radiazioni ionizzanti:
raggi gamma
raggi X
raggi cosmici

Agenti alchilanti

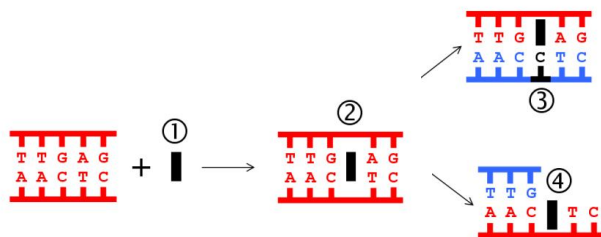
Nitrosoguanidina, Acido nitroso, Idrossilamina sono responsabili di reazioni di metilazione, deaminazione, ecc.



Agenti intercalanti

Acridine (arancio di acridina, bromuro di etidio): sono molecole planari che si inseriscono tra due basi del DNA, separandole

Questa conformazione anormale può portare a microinserzioni e microdelezioni durante la replicazione

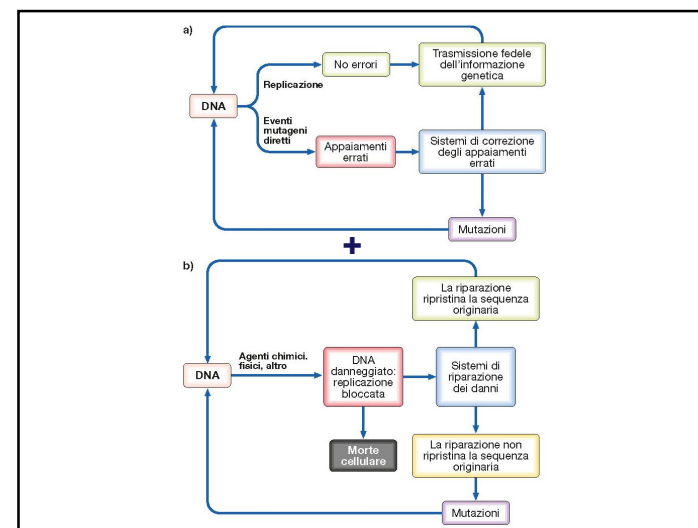
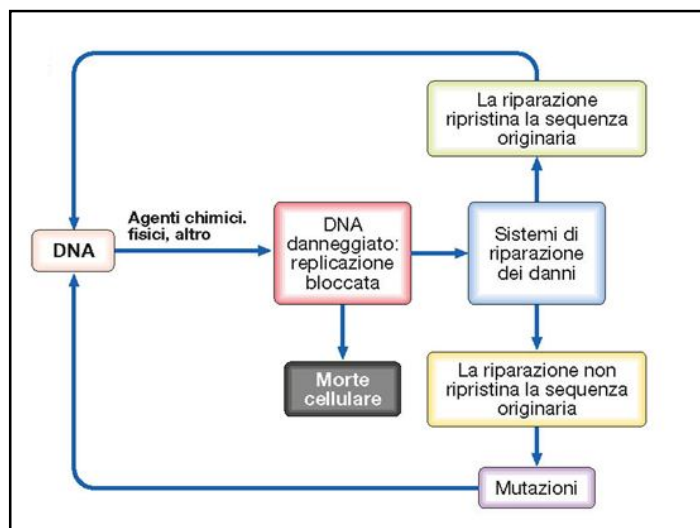


Radiazioni ionizzanti

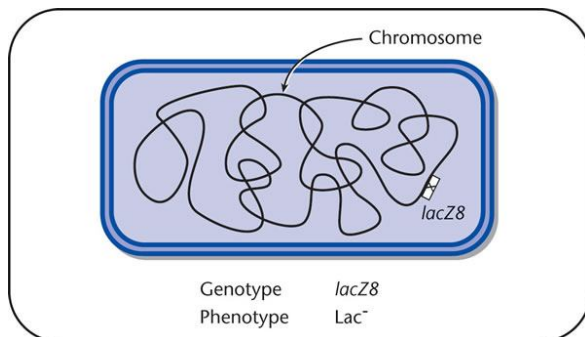
Sono radiazioni a lunghezza d'onda corta (raggi X, gamma, raggi cosmici). Più potenti dei raggi UV e altamente penetranti.

Causano la ionizzazione dell'acqua e di altre sostanze con la produzione di radicali liberi come lo ione ossidrilico (OH⁻)

La loro azione mutagenica è indiretta in quanto il danno è prodotto dai radicali liberi.



Nomenclatura genetica batterica



Nomenclatura genetica batterica

wild-type strain phenotypically **Arg⁺**

mutant incapable of synthesizing arginine: phenotype will be **Arg⁻** and genotype ***arg***.

arginine biosynthesis, for example, requires more than one gene.

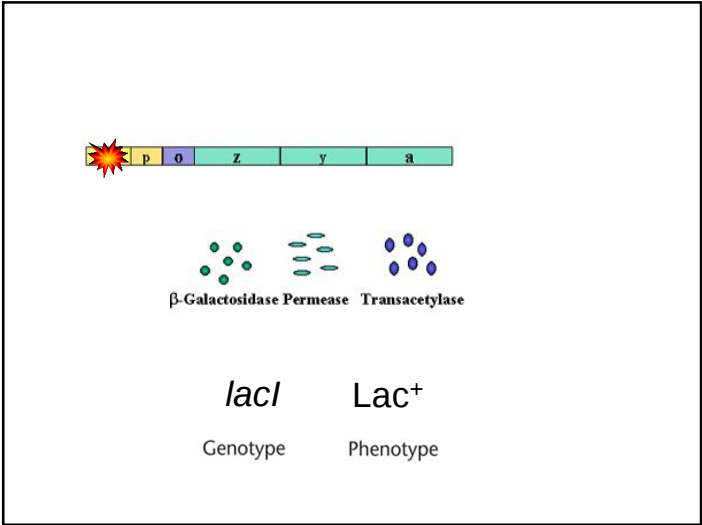
In such cases, a fourth letter is added to the gene symbol, each identifying a different gene: *argA*, *argB*, *argC*, etc.



lacZ Lac^-
Genotype Phenotype



lacY Lac^-
Genotype Phenotype



Tipi di mutanti batterici

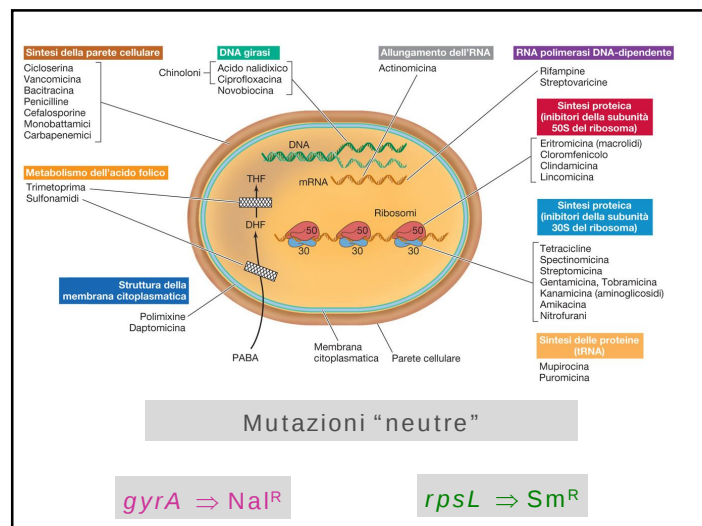
MORFOLOGIA
delle colonie (forma , colore)

CAPACITÀ/INCAPACITÀ DI CRESCERE
delle cellule
In particolari condizioni ambientali
(temperatura, luce, terreno)

ALTRE PROPRIETÀ
motilità
patogenicità,

TIPO DI MUTANTE	FENOTIPO DEL CEPPLO SELVATICO	FENOTIPO DEL CEPPLO MUTANTE	POSSIBILI CAUSE DEL FENOTIPO MUTANTE
Mutanti morfologici	Morfologia delle colonie: grandi	Piccole	Aumento del tempo di generazione
	lisce	Rugose	Perdita della capacità di produrre la capsula polisaccaridica
	rugose	Lisce	Produzione/riassorbimento di esopolisaccaridi
	pigmentate	Incolori	Perdita della capacità di produrre pigmento
Morfologia della cellula	bastoncelli	Filamenti	Defetti nella divisione cellulare
	cellule singole	Cellule aggregate	Defetti nella divisione cellulare
	presenza di spore	Assenza di spore	Defetti nel processo di sporulazione
	cellule motili	Cellule immobili	Defetti nella biogenesi del flagello

TIPO DI MUTANTE	FENOTIPO DEL CEPPLO SELVATICO	FENOTIPO DEL CEPPLO MUTANTE	POSSIBILI CAUSE DEL FENOTIPO MUTANTE	
Mutanti resistenti:	a batteriofagi	Il batterio non forma colonie in presenza del fago; il fago si adsorbe al batterio e forma placche di lisi	Il mutante cresce in presenza del fago; il fago non si adsorbe al batterio e non forma placche di lisi	Incapacità di produrre il recettore su cui il virus si adsorbe
	ad antibiotici	Il batterio non cresce o muore in presenza dell'antibiotico	Il mutante cresce in presenza dell'antibiotico	Modificazione della molecola bersaglio cellulare dell'antibiotico; alterazione della permeabilità cellulare a una o più classi di molecole; attivazione di sistemi di detossificazione
	ad agenti tossici	Il batterio non cresce o muore in presenza dell'agente tossico	Il mutante cresce in presenza dell'agente tossico	Alterazione della permeabilità cellulare a una o più classi di molecole; attivazione di sistemi di detossificazione; modificazione della molecola bersaglio dell'agente tossico



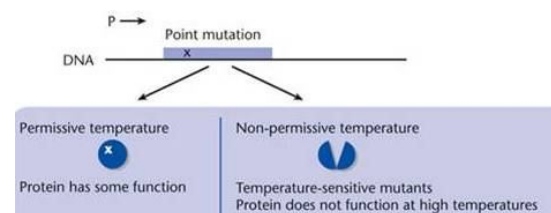
Altri tipi di mutazioni

Mutanti condizionali: esprimono la mutazione solamente sotto particolari condizioni ambientali

TIPO DI MUTANTE	FENOTIPO DEL CEPPO SELVATICO	FENOTIPO DEL CEPPO MUTANTE	POSSIBILI CAUSE DEL FENOTIPO MUTANTE	
Mutanti catabolici	Utilizzazione di zuccheri o altre fonti di carbonio ed energia	Il batterio cresce in un terreno in cui un dato composto costituisce l'unica fonte di carbonio ed energia	Il mutante non cresce nel terreno in cui quel dato composto costituisce l'unica fonte di carbonio ed energia	Perdita della capacità di catabolizzare quel particolare composto a causa di - inattivazione di uno o più enzimi della via catabolica - inattivazione del sistema di trasporto (assunzione) di quella sostanza
Mutanti auxotrofi	Richiesta di fattori di crescita	Il batterio (prototrofo) cresce in un terreno "minimo" (es.: terreno minerale con una sola fonte di carbonio ed energia)	Il mutante non cresce nel terreno "minimo" ma richiede uno o più fattori addizionali (aminoacidi, basi, vitamine)	Perdita della capacità di sintetizzare il fattore di crescita a causa di inattivazione di uno o più enzimi della via biosintetica
Mutanti letali condizionali	Termosensibili	Il batterio cresce a temperature comprese tra 20 e 45 °C	Il batterio può crescere alle temperature più basse (20-32 °C) ma non a quelle più elevate (42 °C)	Una proteina preposta a una funzione essenziale risulta inattiva o instabile ad alta temperatura; la causa può essere una sostituzione di un aminoacido rilevante per il mantenimento della struttura terziaria o quaternaria della proteina.

In seguito a mutazioni puntiformi rare:

Mutanti letali condizionali



Per *Escherichia coli*:
temperatura permissiva: 25-30°C