

Ipotesi un gene - un enzima

Dai risultati di esperimenti sui funghi dei generi *Neurospora* e *Penicillium*, due genetisti statunitensi, George Wells Beadle e Edward Lawrie Tatum ipotizzarono che i geni contenessero al loro interno le istruzioni in codice per la formazione degli enzimi (proteine dotate di funzione catalitica nelle reazioni chimiche).

Questa teoria, chiamata originariamente "ipotesi un gene - un enzima", fu in seguito ribattezzata "ipotesi un gene - un polipeptide", quando fu dimostrato che i geni contengono, in realtà, le informazioni necessarie a costruire le catene costitutive di tutte le proteine, chiamate polipeptidi. A ciascun gene corrisponde un polipeptide specifico.

Mendel 1866: unità dell'eredità come "fattori" o "determinanti"

Sutton-Boveri 1902-03; Morgan e coll. 1930: i geni sono situati sui cromosomi

Garrod e Bateson 1902: relazione gene-fenotipo

Griffith 1928; Avery, McLeod e Mac Carthy 1944;
Hershey e Chase 1952: il DNA è il materiale ereditario

Beadle e Tatum 1940: relazione gene-proteina

Watson e Crick 1953: il DNA è una doppia elica

Benzer 1960: revisione del concetto di "gene"

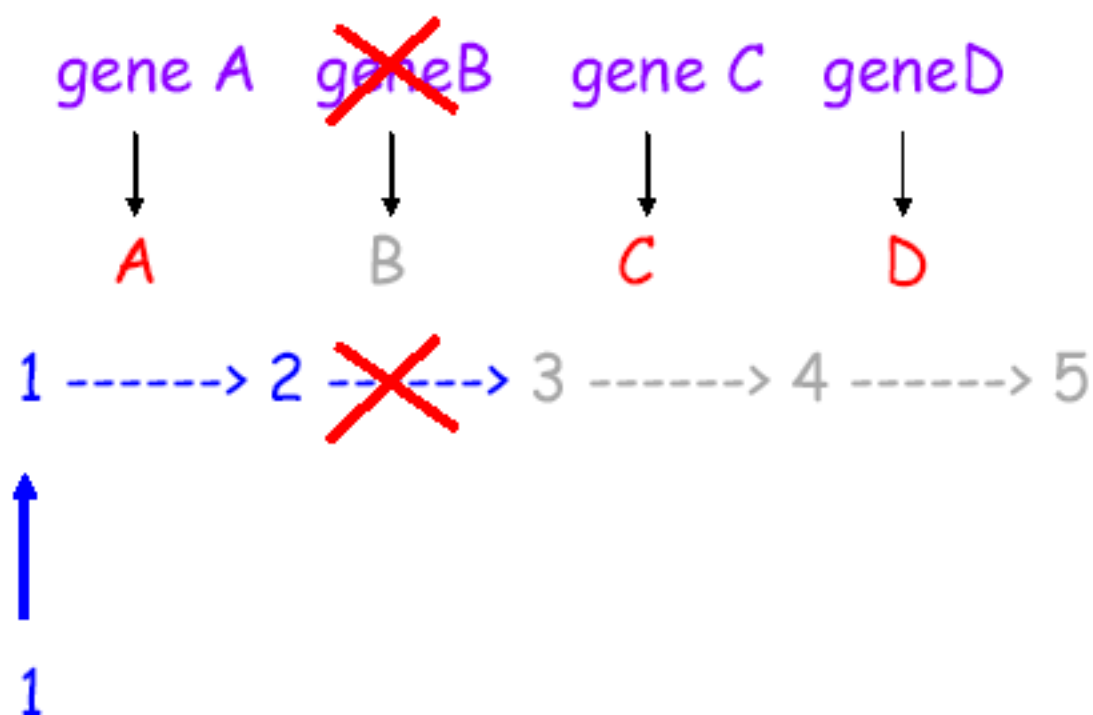
tempo



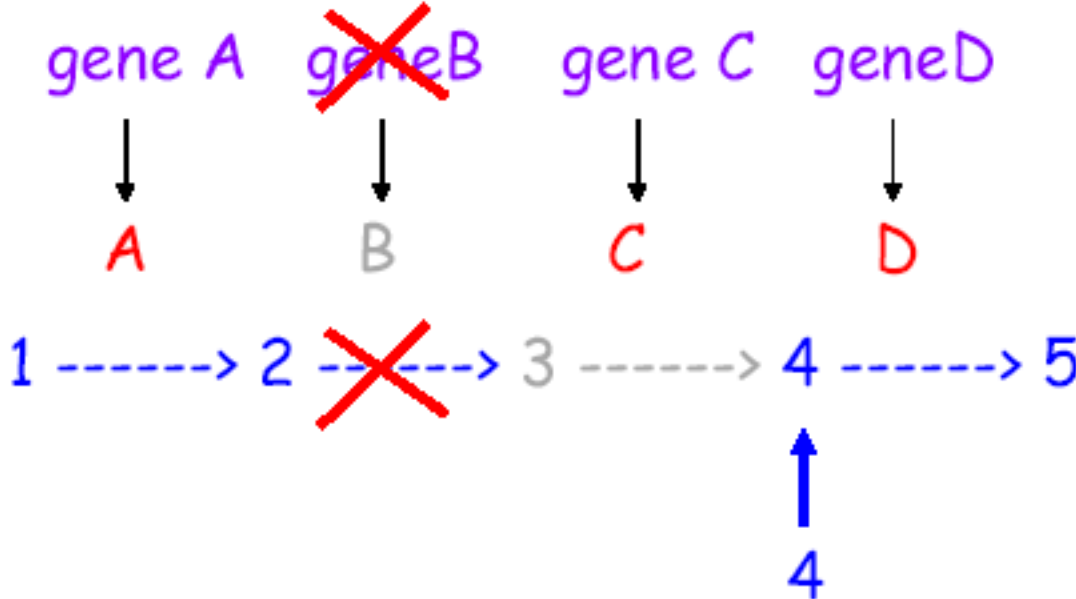
La scoperta della funzione del gene: tappe fondamentali

- Sir Archibald Garrod (1902)
relazione gene-fenotipo
"errori innati del metabolismo"
- George Beadle e Edward Tatum (1940)
studio su *Neurospora crassa*
premio Nobel 1958 per la scoperta che "i geni
funzionano regolando eventi chimici definiti"
ipotizzarono

Se si fornisce al mutante uno dei prodotti intermedi a monte del blocco, questo non avrà alcun effetto:



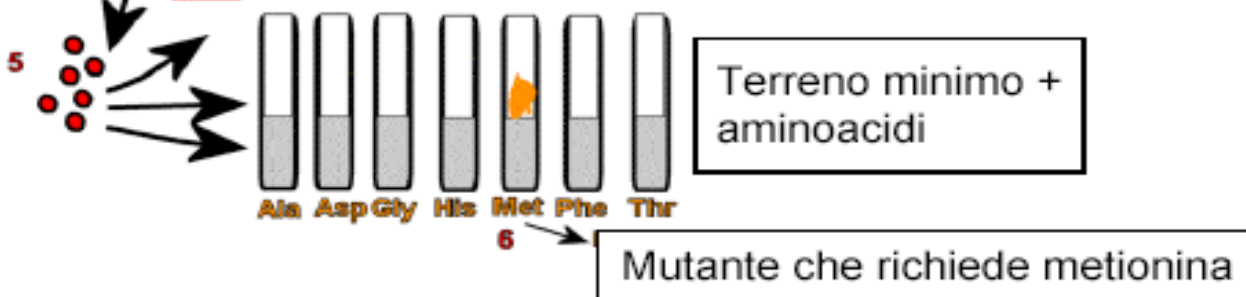
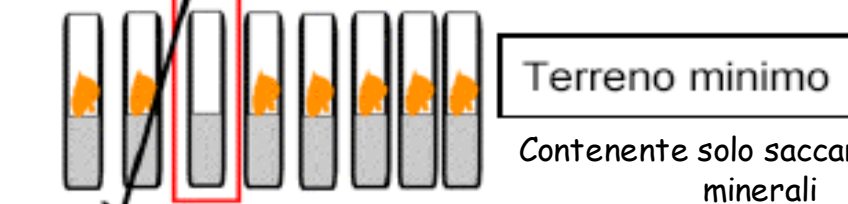
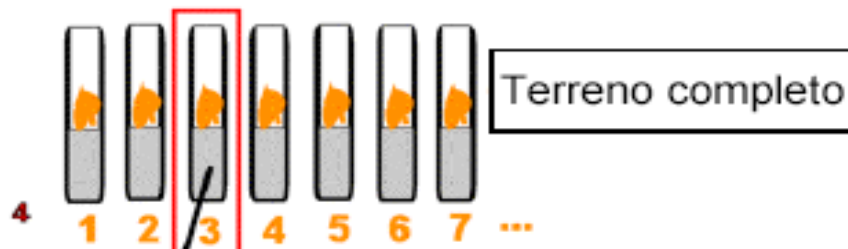
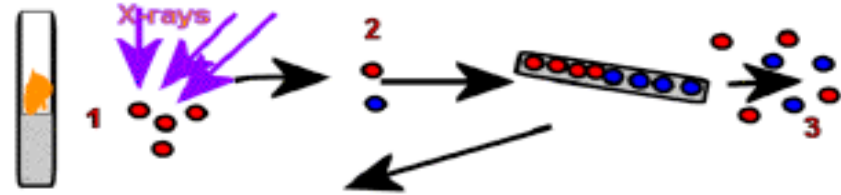
Se si fornisce al mutante uno dei prodotti intermedi a valle del blocco, si potrà avere la sintesi del prodotto finale:



- ▶ Gli ultimi prodotti sintetizzati nella via metabolica potranno sostenere la crescita di più mutanti
- ▶ Mutanti nelle tappe iniziali di una via metabolica potranno essere "salvati" da un numero maggiore di prodotti intermedi rispetto a quelli mutati nelle tappe finali

TEORIA UN GENE - UN ENZIMA (Beadle & Tatum 1940)

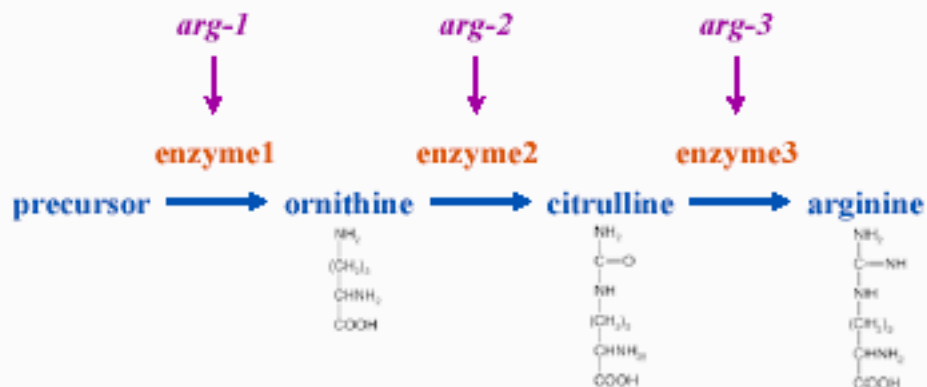
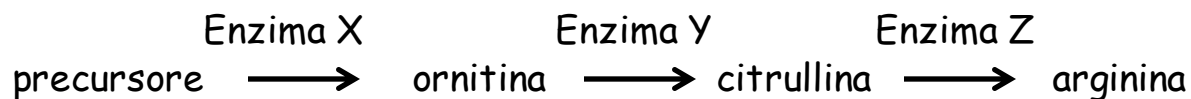
Neurospora: fungo con genoma aploide



ceppo	aggiunta		
	ornitina	citrullina	arginina
arg-1	+	+	+
arg-2	-	+	+
arg-3	-	-	+

Questi mutanti avevano subito mutazioni nei geni che codificano gli enzimi impiegati per sintetizzare quelle sostanze nutritive

... sulla base dei mutanti di *arg* di *Neurospora*, ecco il modello biochimico proposto:



GLI ESPERIMENTI DI BEADLE E TATUM DIMOSTRARONO CHE I GENI ERANO RESPONSABILI DELLA FUNZIONE DEGLI ENZIMI E CHE CIASCUN GENE CONTROLLAVA UNO SPECIFICO ENZIMA.

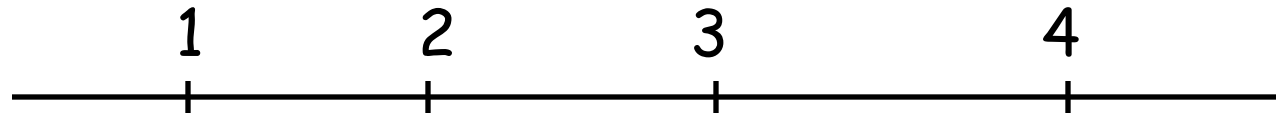
COLINEARITA' GENE - PROTEINA

C. Yanofsky - triptofano sintetasi di *Escherichia coli*

- Identificò 16 mutanti nel gene *trpA*
- Mappò i mutanti mediante la frequenza di ricombinazione
- Determinò la sequenza aminoacidica della proteina TrpA per ciascun mutante
- Dimostrò che la sequenza lineare delle mutazioni sul gene corrispondeva alla sequenza lineare degli aminoacidi sulla proteina

Triptofano sintetasi: catalizza la reazione di indolo-3-glicerol fosfato in triptofano
I geni *trpA* e *trpB* controllano la sintesi dell'enzima

Mappa genetica
delle mutazioni



Polipeptide di tipo selvatico

Tyr Leu Thr Gly

Mutante 1

Cys

Mutante 2

Arg

IL LAVORO DI SEYMOUR BENZER (1953-62): CONTESTO STORICO

- Anni 1950
 - La genetica classica aveva definito i geni
 - Era stata riconosciuta l'importanza delle leggi di Mendel
 - I geni erano visti come le **unità funzionali discrete** dell'informazione
 - Ne erano sconosciuti la natura, le dimensioni, la divisibilità --> **"perle su una collana"**
 - Era stato stabilito che il DNA era il materiale ereditario (Avery, McLeod e McCarthy 1944; Watson e Crick 1953)

Teoria delle Perle

IL GENE ERA VISTO COME:

L'UNITA' **FONDAMENTALE** DELL'EREDITA', NON
DIVISIBILE PER CROSSING OVER
il crossing over avviene tra i geni mai al loro interno

L'UNITA' **FONDAMENTALE** DI CAMBIAMENTO
(= MUTAZIONE) Il gene cambia in toto

L'UNITA' **FONDAMENTALE** DI FUNZIONE
Le parti di un gene non sono funzionali

Benzer rivelò che la teoria delle perle non era corretta!

PERCHE' IL FAGO T4 ?

- Crescita veloce: ciclo vitale 20min
- Numero elevato di individui: permette di selezionare rari eventi di ricombinazione, retromutazione, ecc.

Benzer descrisse la struttura fine della regione genetica rII del fago T4 riuscendo a suddividerla mediante mutazioni e ricombinazione genetica

T4 rI e rII

rII: mutanti r, perché a lisi rapida. Benzer identificò due loci, rI e rII.

I ceppi batterici E.Coli B e K possono ospitare il fago T4.

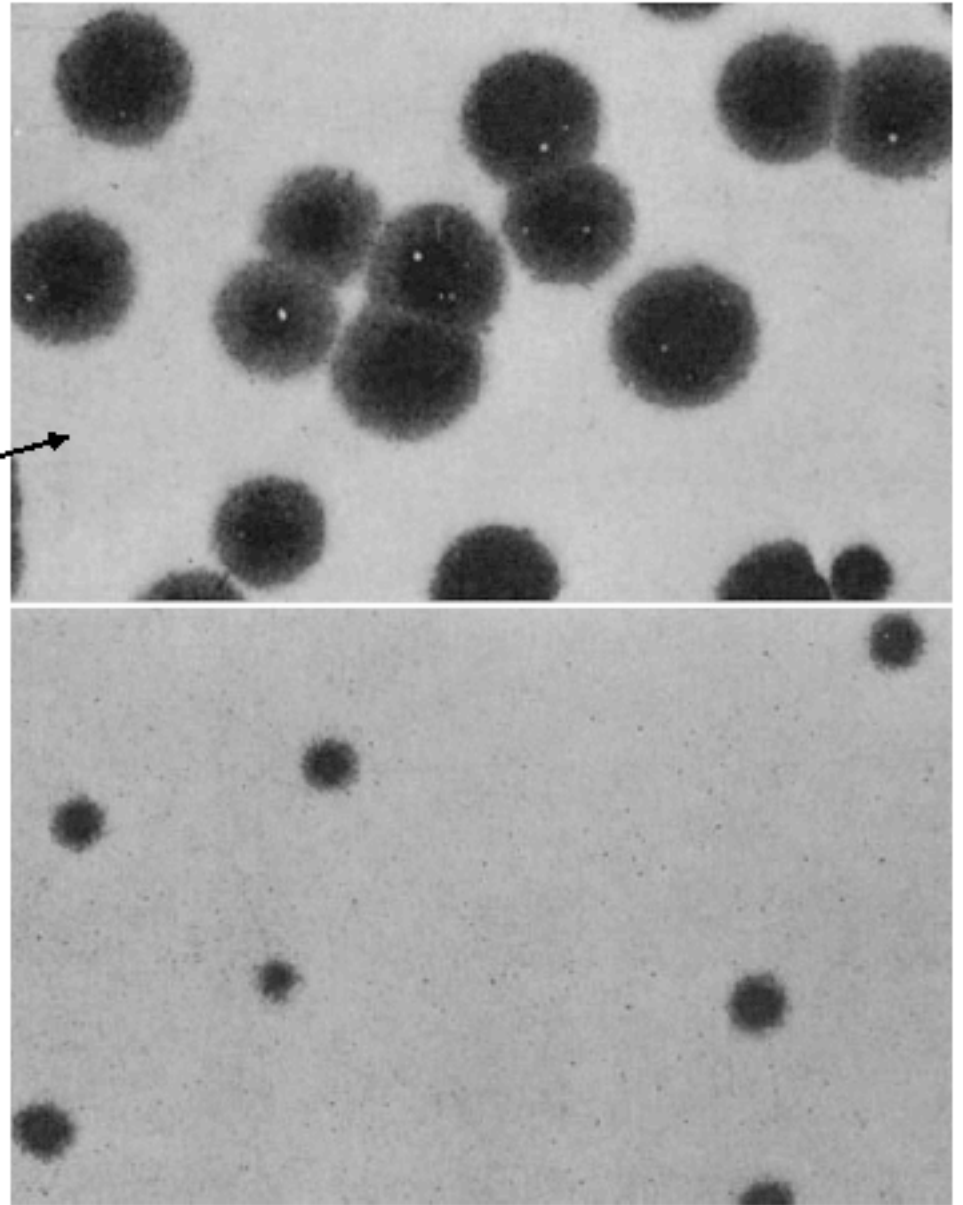
E.Coli B permette la crescita di rI e rII ma i mutanti rII formano placche molto più grosse degli rI.

E.Coli K permette crescita fagi selvatici

Il fago T4 poteva dare tipi diversi di placche di lisi: mutante "r"

rII: placche più grandi su *E. coli* ceppo B

r+



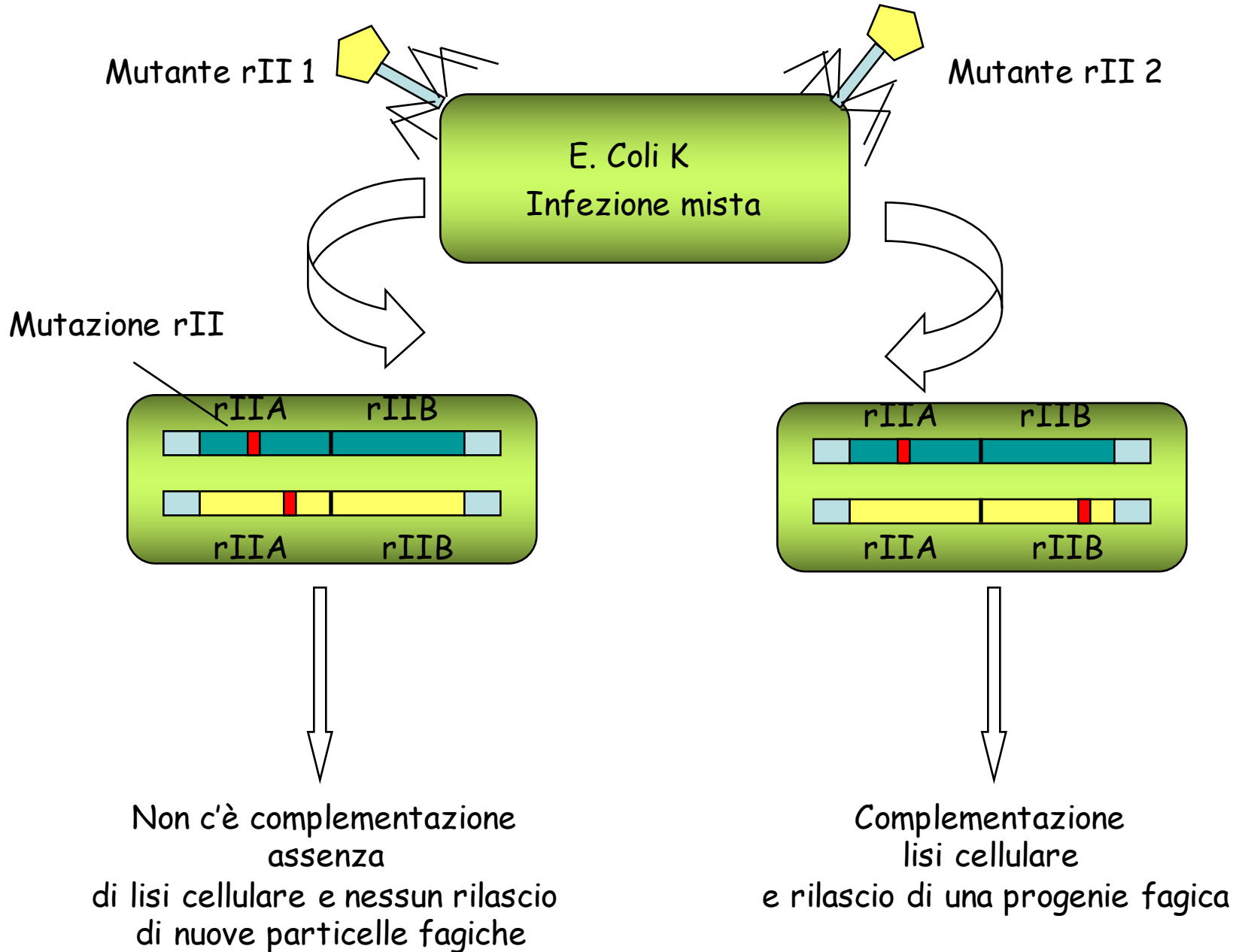
<u>genotipo T4</u>	<u>Ceppo batterico</u>	
	E. coli B	E. coli K
selvatico	piccola	piccola
rII	grande	nessuna

- Il ceppo B permette di differenziare il fago selvatico dal mutante rII in base al tipo di placca di lisi
- Il ceppo K impedisce la crescita del mutante rII

Qual'è l'unità fondamentale di funzione ?

- Co-infezione con due fagi mutanti diversi del ceppo batterico non permissivo
- Se le mutazioni si trovano nella stessa unità funzionale non si ha infezione
- Se le mutazioni si trovano in unità funzionali diverse si ha infezione: complementazione

Test di complementazione



Nel caso dei mutanti rII la complementazione si verifica quando due differenti cromosomi fagici, con mutazioni diverse nel gene rII, sono presenti contemporaneamente nella stessa cellula ospite. La progenie che risulta dopo un evento di complementazione porta solo i genotipi parentali.

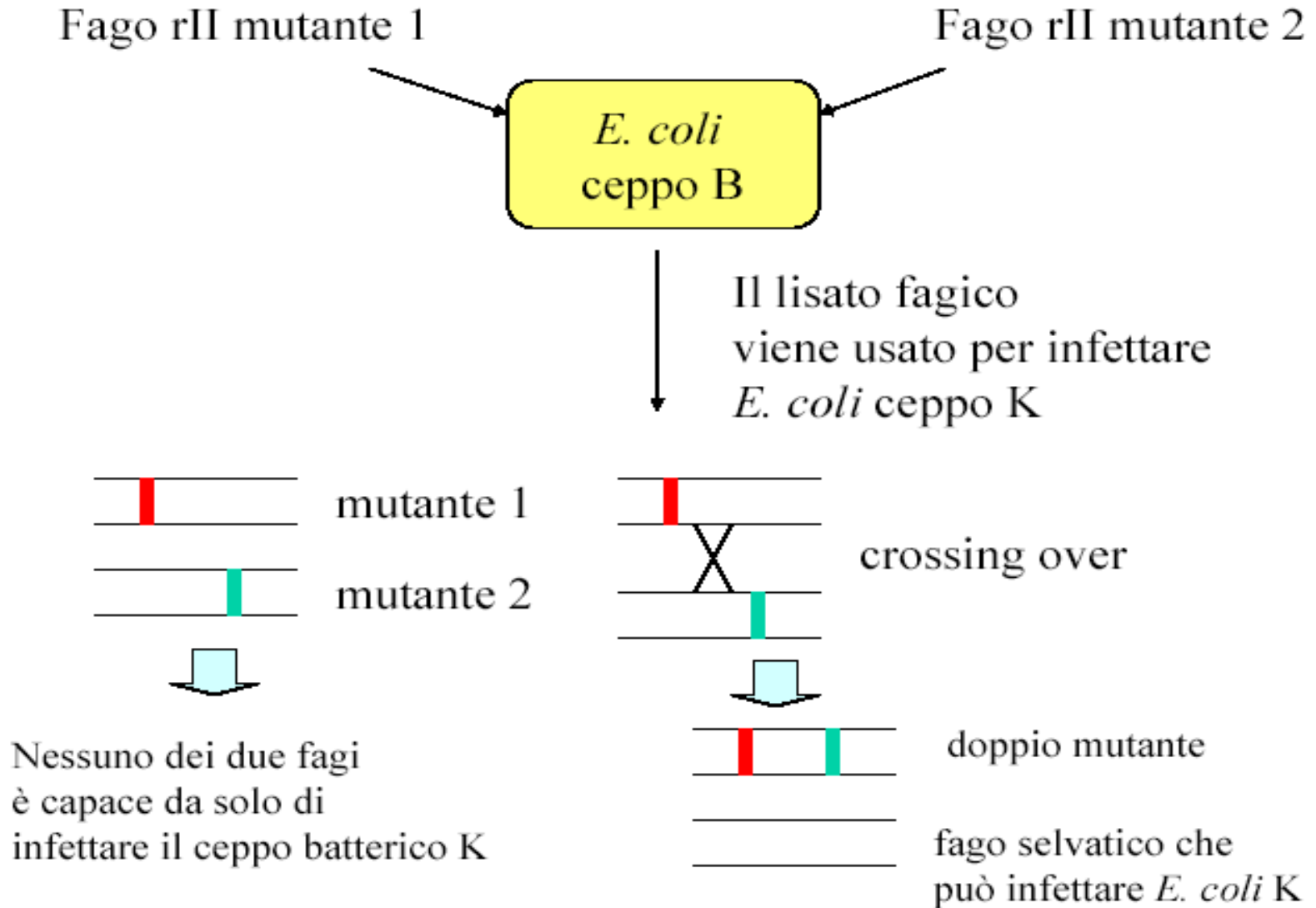
TEST DI COMPLEMENTAZIONE

I mutanti con fenotipo rII permettevano di individuare 2 gruppi di complementazione rIIA e rIIB, dimostrando che il gene rII era suddivisibile in due unità di funzione (cistroni).

IL GENE NON E' PIU' L'UNITA' DI FUNZIONE UNICA
E NON DIVISIBILE

Qual'è l'unità fondamentale di ricombinazione?

- Co-infezione di *E. coli* ceppo B con due fagi mutati nella stessa unità funzionale (cistrone)
- La progenie fagica ottenuta viene usata per infettare il ceppo K (non permissivo): solo i fagi nei quali è avvenuto un evento di ricombinazione all'interno del cistrone (intragenica) potranno formare placche di lisi



La ricombinazione: la formazione di nuove combinazioni di geni per rottura e riunione dei cromosomi
 La complementazione: mescolamento dei prodotti genici

MAPPAGGIO MEDIANTE DELEZIONE

Le mutazioni geniche puntiformi possono essere reversibili cioè possono ridare il fenotipo normale in seguito a una successiva mutazione.

Nel caso di Inserzione o Delezione di una singola base si può avere reversione

Reversione vera: la sequenza di basi nel gene mutato torna ad essere quella wild-type, si ristabilisce fenotipo e genotipo

Reversione per soppressione: la sequenza del gene resta mutata, ma la seconda mutazione, che sopprime l'effetto della prima, ristabilisce il fenotipo normale e avviene in un punto diverso del DNA

MAPPAGGIO MEDIANTE DELEZIONE

REVERSIONE

Mutazione puntiforme:

AATG**C**TTAGCTAAGGC --> AATG**A**TTAGCTAAGGC -->
AATG**C**TTAGCTAAGGC

Delezione:

AATG[CTTAG]CTAAGGC --> AATG[....]CTAAGGC

Mappatura di delezione della regione rII

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Mapa genica con 12 siti mutazione

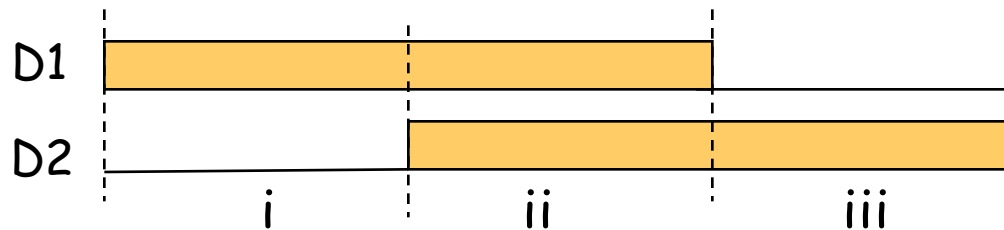
Il mutante D1 non produce ricombinanti rII+ quando viene incrociato per mutanti che portano alterazioni nei siti 1,2,3,4,5,6,7, o 8. Quindi D1 si comporta come se avesse delezione dal sito 1 al sito 8

D1 

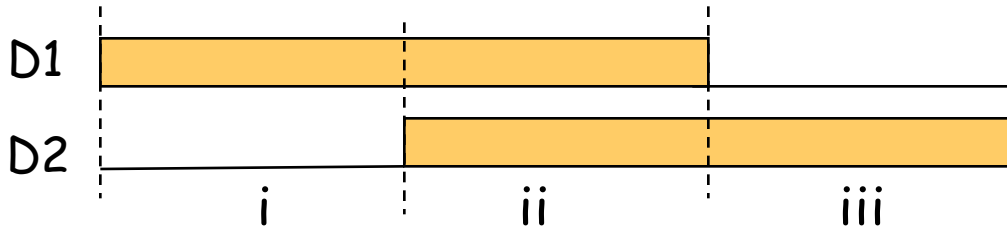
Il mutante D2 non produce ricombinanti rII+ quando viene incrociato per mutanti che portano alterazioni nei siti 5,6,7,8,9,10,11,12. D2 si comporta come se avesse delezione dal sito 5 al sito 12

D2 1 2 3 4 

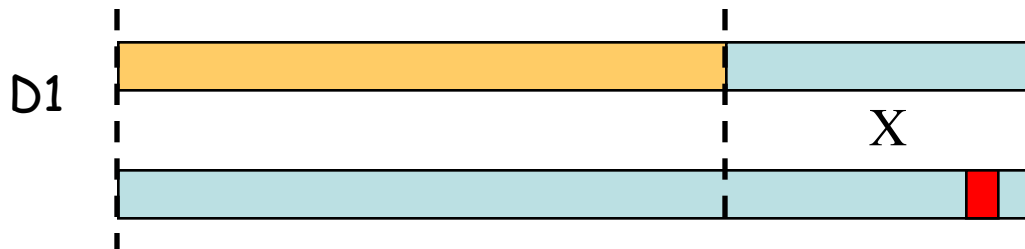
Parzialmente sovrapposte queste delezioni definiscono tre aree del gene: i, ii, iii



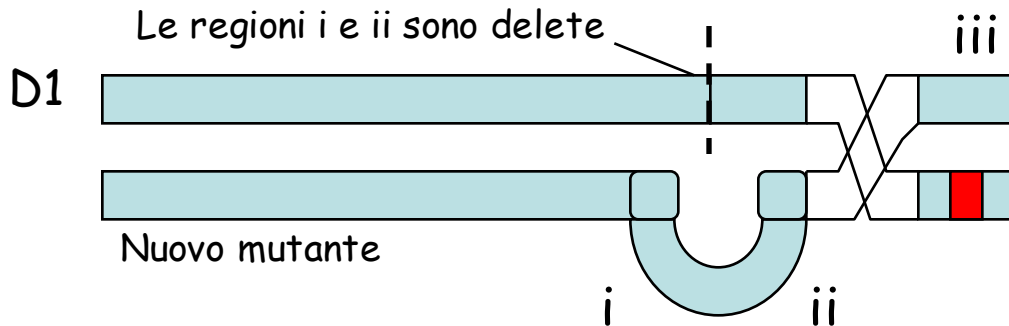
Un nuovo mutante che produce ricombinanti rII+ quando viene incrociato per D1 ma non per D2, deve avere il sito di mutazione nell'area iii. Un mut che da ricombinanti rII+ quando viene incrociato per D2 ma non per D1 deve avere il sito di mutazione nell'area i. Un terzo mut che non produce ricombinanti rII+ né incrociato con D1 né con D2 deve avere il sito di mutaz in ii.



Assumiamo che un mut nell'area iii venga incrociato per D1. L'incrocio può essere rappresentato col seguente schema dove il sito mutante è indicato dalla barra rossa:



appaiamento:



Più alto è il num delle delezioni presenti nel sistema di riferimento, maggiore sarà il num di aree che possono essere identificate e, di conseguenza, tanto più rapida sarà l'identificazione dei siti di nuove mutazioni.

rII 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

D1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

D2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Mutante ? x D1 → ricombinanti rII+

Mutante ? x D2 → no ricombinanti rII+

IL MUTANTE ? SI TROVA ALL'INTERNO DELLA
DELEZIONE PRESENTE NEL MUTANTE D2

Benzer mappava prima le mutazioni entro le delezioni
poi mappava fra di loro le mutazioni entro ciascuna
delezione.

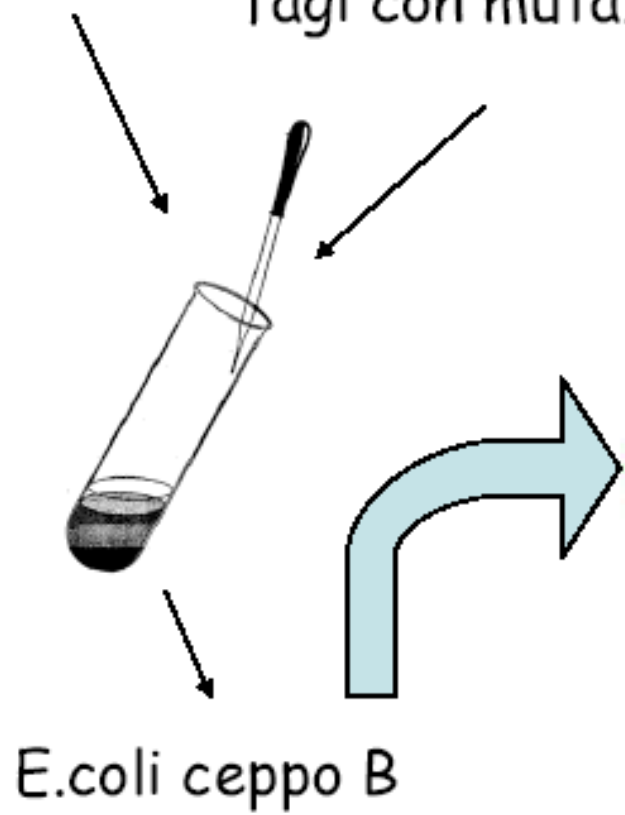
Incroci per mappare le mutazioni rII.

Spot Test

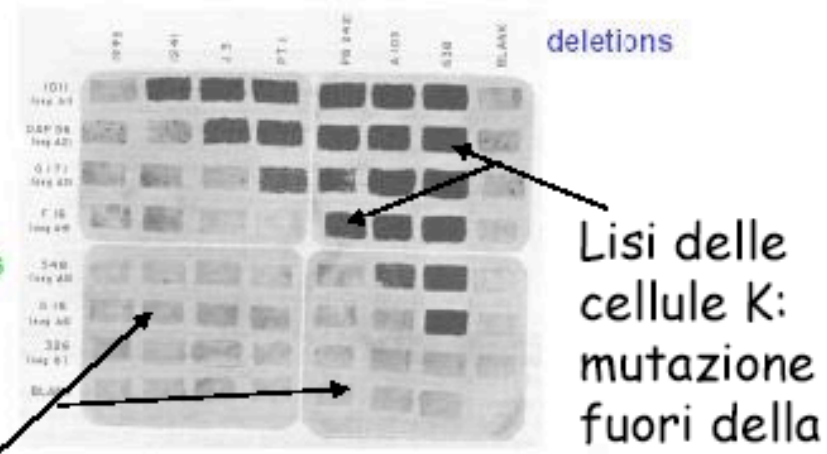
Ogni riga mostra i risultati di un particolare mut saggiato rispetto alle delezioni di riferimento. Ogni mutazione è localizzata in un diverso segmento. Le placche che compaiono negli spazi in bianco sono dovute alla presenza di revertenti in ciascun ceppo mutante.

fagi con delezione

fagi con mutazione da mappare



E. coli ceppo K



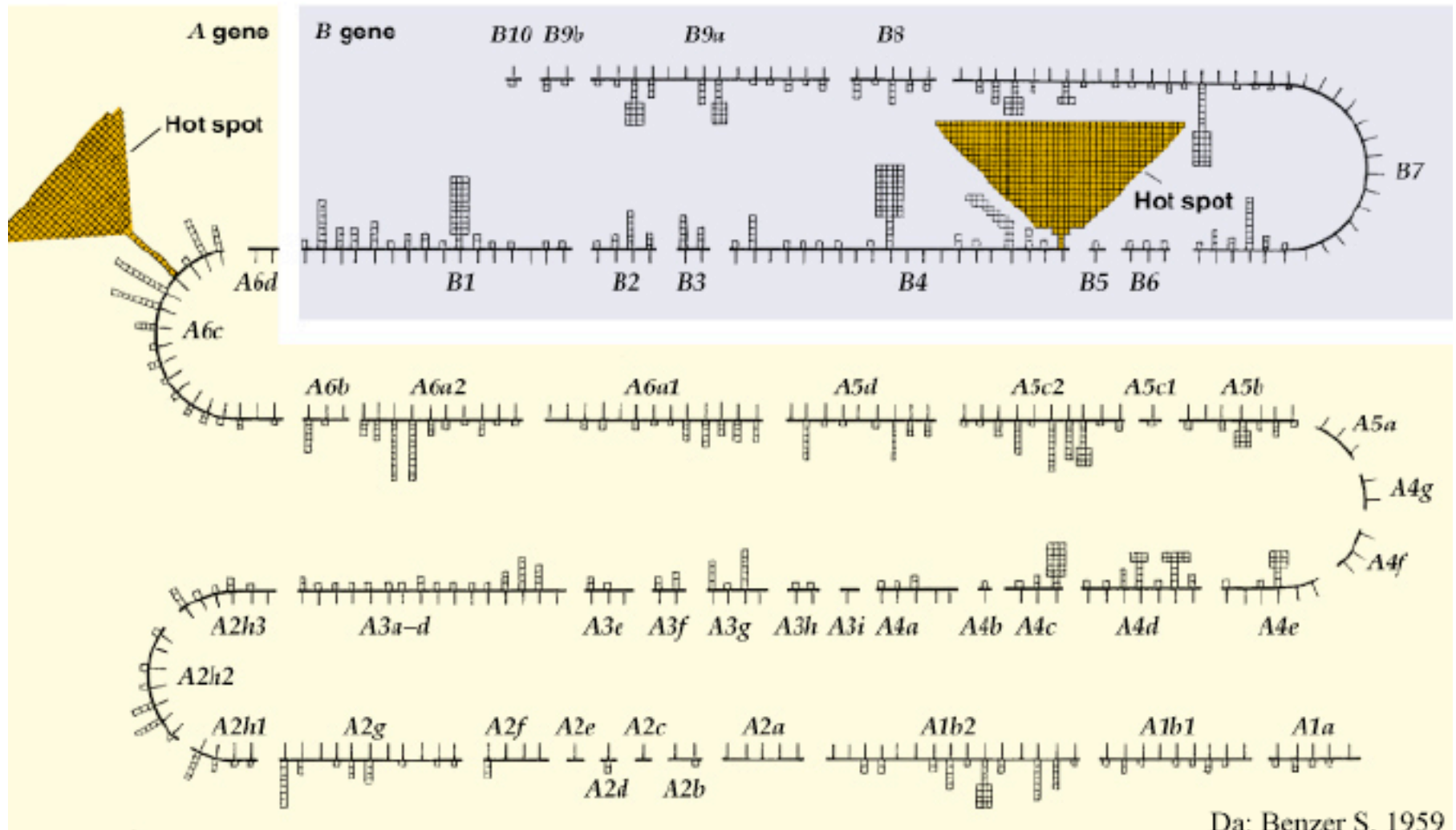
point mutants

Lisi delle cellule K: mutazione fuori della delezione

No lisi delle cellule K: mutazione dentro la delezione

E.Coli B permette la crescita di rI e rII
E.Coli K permette crescita fagi selvatici

LA TOPOGRAFIA DELLA REGIONE rII



Benzer analizzò 1612 mutazioni rII spontanee che mappavano su 251 siti. Ogni cerchietto=mutazione. Hot spots, punti caldi, siti con maggiore tendenza a mutare.

Benzer identificò le unità minime di

- ✓ funzione
- ✓ mutazione
- ✓ ricombinazione

e dimostrò che erano **PIU' PICCOLE DEL GENE**

Il codice genetico

Dopo le scoperte di Beadle e Tatum, e di Watson e Crick, rimaneva ancora da chiarire come il DNA potesse dirigere la costruzione delle proteine, i componenti principali della maggior parte delle strutture della cellula e le molecole fondamentali per lo svolgimento e la regolazione di quasi tutte le reazioni chimiche dell'organismo. La capacità di una proteina di essere parte di una struttura cellulare, o di agire come un enzima che catalizza una particolare reazione chimica, dipende dalla sua forma molecolare e, dunque, dalla sua composizione. Ciascuna proteina è costituita dall'unione di subunità, chiamate amminoacidi, in una o più catene polipeptidiche. Nelle cellule sono presenti venti tipi diversi di amminoacidi. Il numero, il tipo e la sequenza degli amminoacidi nella catena determinano la struttura e la funzione della proteina e sono a loro volta determinati dal gene codificante per quella specifica catena, secondo un codice genetico che traduce l'informazione scritta sul DNA nella sequenza di amminoacidi di ciascuna proteina.

L'esistenza e il ruolo biologico del codice genetico furono dimostrati nel 1966, più di dieci anni dopo la pubblicazione del modello del DNA di Watson e Crick, a opera del biochimico statunitense Marshall Nirenberg.