

# CORSO DI GENETICA

LA NATURA DEL GENE

Roberto Mengentili  
Università di Urbino "Carlo Bo"

# Geni ed errori congeniti del metabolismo cellulare



## INBORN ERRORS OF METABOLISM

The Croonian Lectures delivered before the Royal College of Physicians of London, in June, 1908

By

ARCHIBALD E. GARROD  
F.R.C.P., M.A., 1886.

Fellow of the Royal College of Physicians, Assistant Physician to, and Lecturer on Clinical Pathology at St. Bartholomew's Hospital, Physician to the Hospital for Children, Great Ormond Street.

"In vino veritas, et in aqua dissimulatio."  
Cicero, De officiis, lib. I, c. 12.

LONDON:

HENRY FROWDE, HULLING & STOUGHTON  
OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1, ADELPHI SQUARE, E.C.

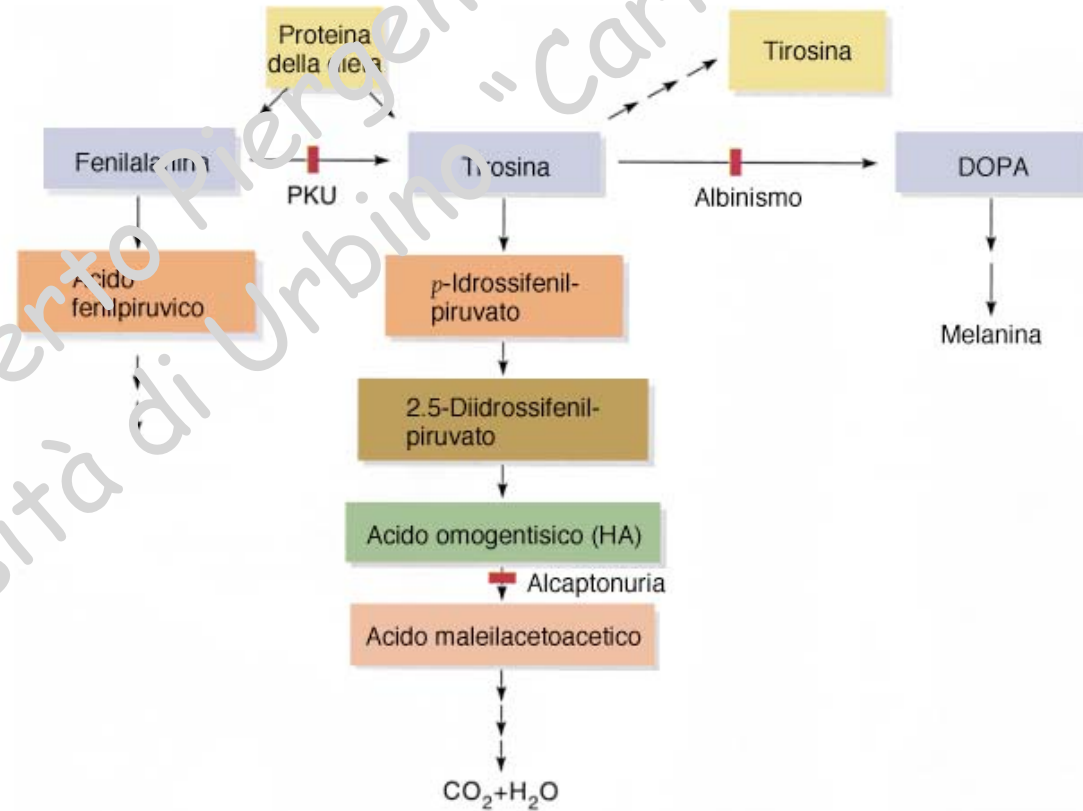
Benzer aveva dimostrato con gli esperimenti sul fago T4 che il cistrone è l'unità di funzione. Tuttavia non era noto né cosa fosse il cistrone, né il suo funzionamento. Nel 1908 il medico A. Garrod aveva osservato che molti difetti congeniti dell'uomo erano dovuti a caratteri recessivi ed erano correlati a difetti metabolici.

Ad esempio, la fenilchetonuria (correlata all'albinismo) è dovuta all'incapacità di trasformare la fenilalanina in tirosina; la fenilalanina si accumula e viene trasformata in un composto tossico, l'acido fenilpiruvico.

# PKU e albinismo

**Figura 4.1**

**Catena metabolica della fenilalanina-tirosina.** Persone affette da alcaptonuria non possono metabolizzare l'acido omogentisico (HA) a maleilacetoacetico e quindi lo accumulano. Persone affette da fenilchetonuria (PKU) non possono trasformare la fenilalanina in tirosina; quindi si accumula l'acido fenilpiruvico. Persone affette da albinismo non possono sintetizzare la melanina dalla tirosina.



# Beadle e Tatum (1941)



George Beadle



Edward Tatum

La reale funzione dei geni fu scoperta da Beadle e Tatum che lavoravano sulla *Neurospora crassa*. Essi irradiarono questo organismo, seminarono le spore su terreno completo e poi le riseminarono su terreno minimo per vedere se crescevano. Dopodiché selezionarono i mutanti per un certo nutriente (**auxotrofi**) e cercarono di capire qual era il difetto. Il loro primo lavoro fu sui mutanti incapaci di crescere senza arginina. I test di complementazione e i dati di mappatura rivelarono che esistevano tre *loci* diversi per il controllo del suo metabolismo, che chiamarono *arg-1*, *arg-2* e *arg-3*.

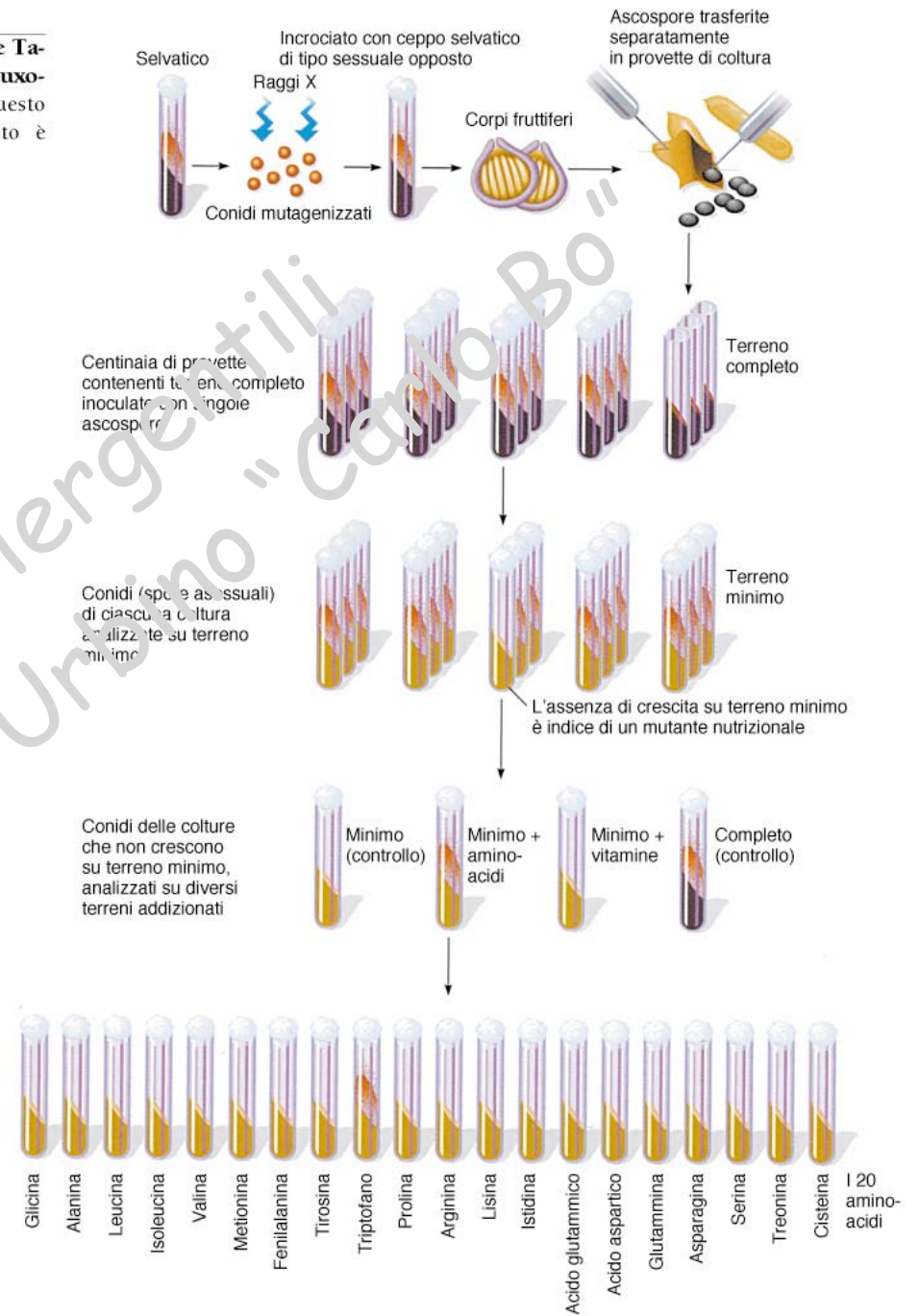


**Figura 4.3**  
**Metodo utilizzato da Beadle e Tatum per isolare mutazioni auxotrofe in *Neurospora*.** In questo caso il ceppo mutante isolato è auxotrofo per triptofano.

# La procedura sperimentale



From *Introduction to Genetic Analysis*, 5e by Griffiths et al. Copyright © 1993 by W. H. Freeman and Company

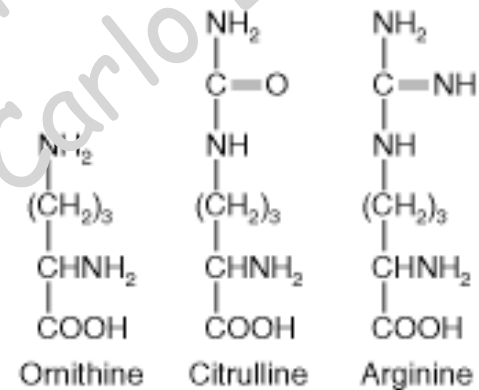


# I risultati ottenuti

Se si somministrano ai tre ceppi delle sostanze chimicamente simili all'arginina, cioè la citrullina e l'ornitina, i tre ceppi reagiscono **differentemente**.

Era noto che nella cellula sostanze simili possono essere convertite una nell'altra dagli **enzimi**, per cui Beadle e Tatum

(che per questo ricevettero il Nobel) ipotizzarono che in realtà i mutanti alterassero ognuno una diversa tappa della **stessa via metabolica!**

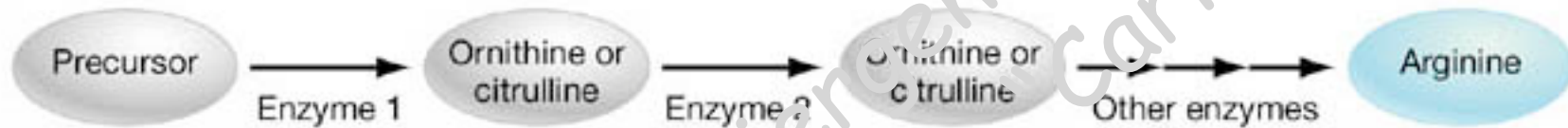


Mutante

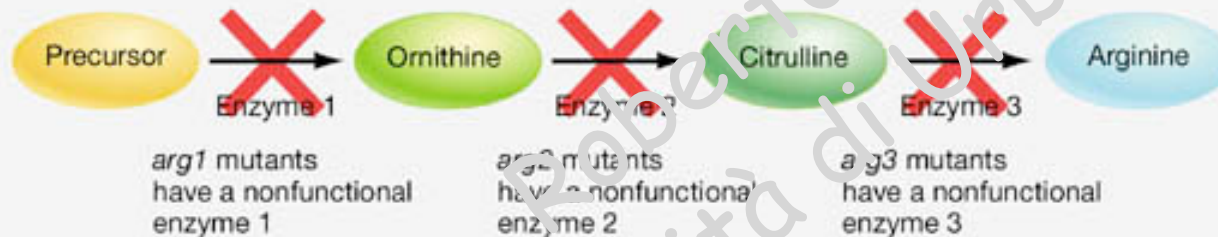
<i>arg1-</i>	+	+	+
<i>arg2-</i>	-	+	+
<i>arg3-</i>	-	-	+

# Un gene, un enzima

(b) Hypothesized pathway for arginine synthesis

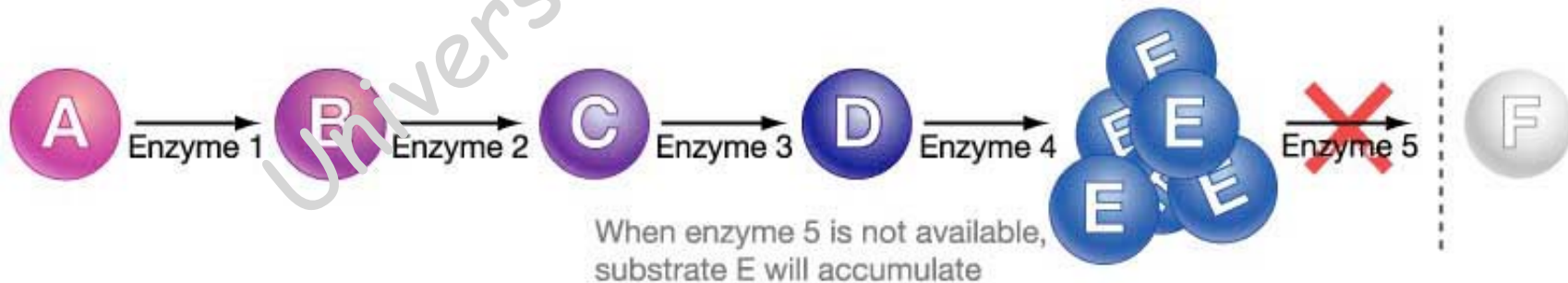


(d) THE ONE GENE-ONE ENZYME HYPOTHESIS



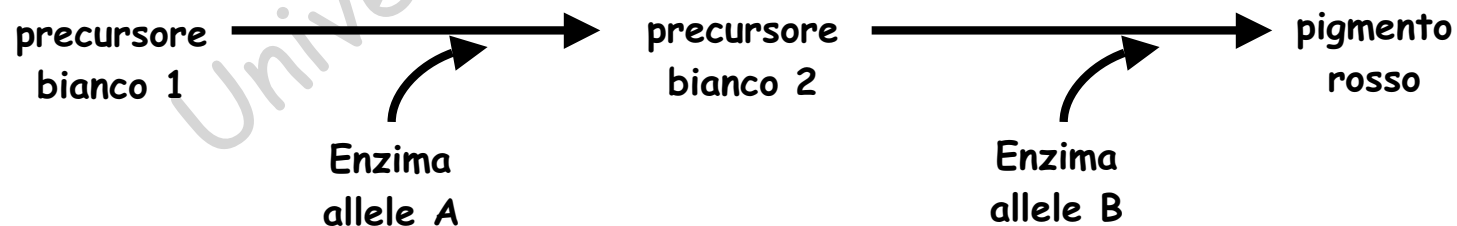
**Hypothesis**

Beadle and Tatum proposed that each gene in an organism is responsible for making a different protein, most of which function as enzymes.



# Interpretazione molecolare dei dati genetici precedenti

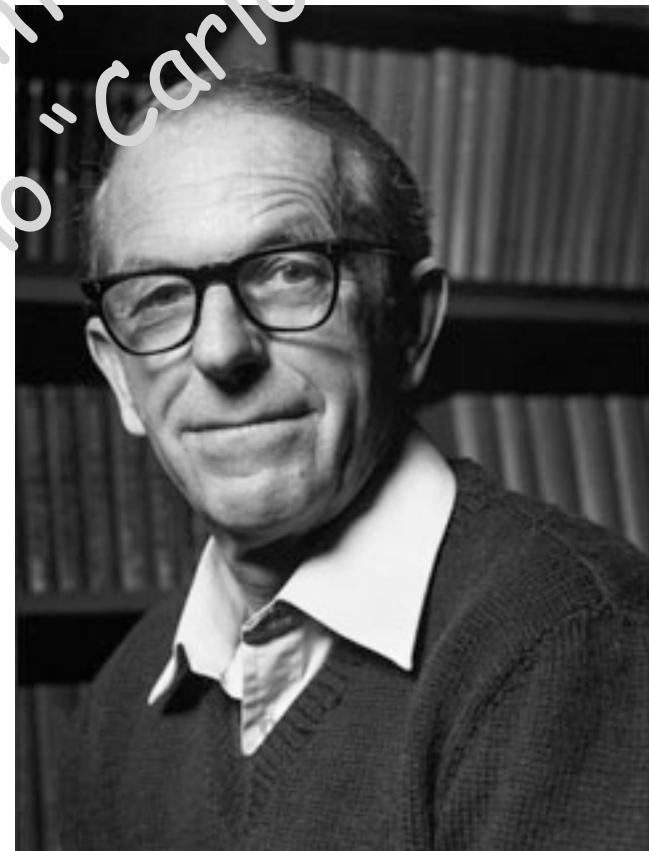
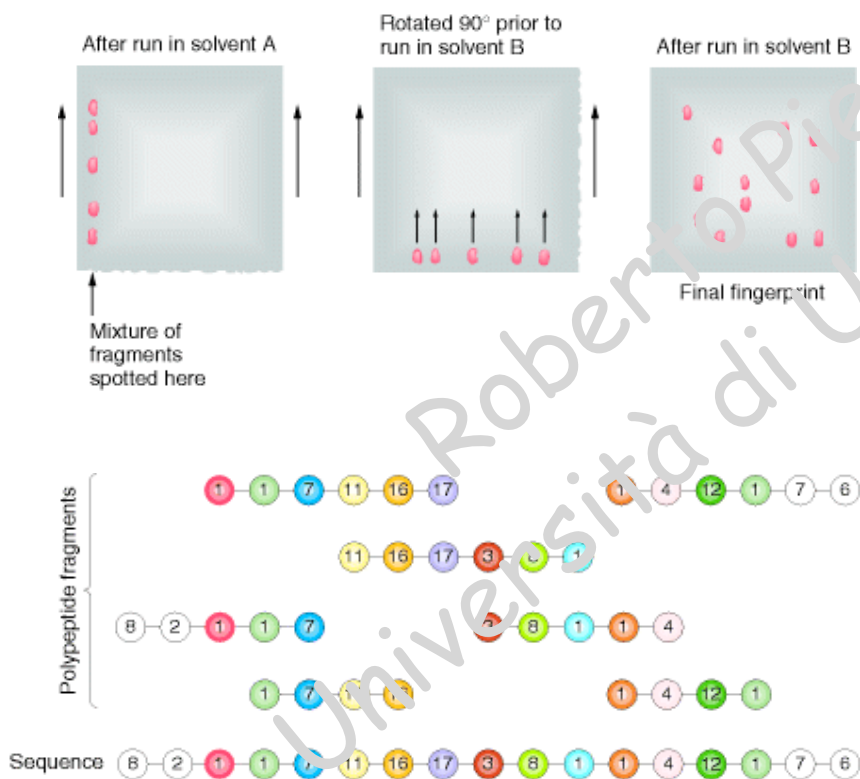
A questo punto diventano chiari molti rapporti mendeliani atipici, come la **complementazione**: due linee a fiore bianco (mutanti), incrociate tra loro, danno fiori rossi (selvatici) in prima generazione, e fiori rossi e bianchi (in seconda generazione) con un rapporto 9:7. Ora è facile interpretare perché: si tratta di una via metabolica con (almeno) due enzimi e tre substrati coinvolti. Si spiega anche la dominanza e la recessività: il dominante ha ancora la funzione enzimatica, il recessivo no.





# Sequenziamento delle proteine

Nel 1953 Frederick Sanger ottiene la prima sequenza polipeptidica completa, l'insulina bovina.

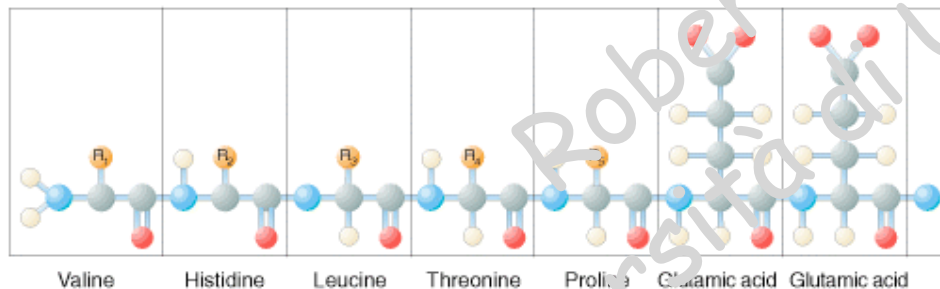


# Un gene, una sequenza polipeptidica

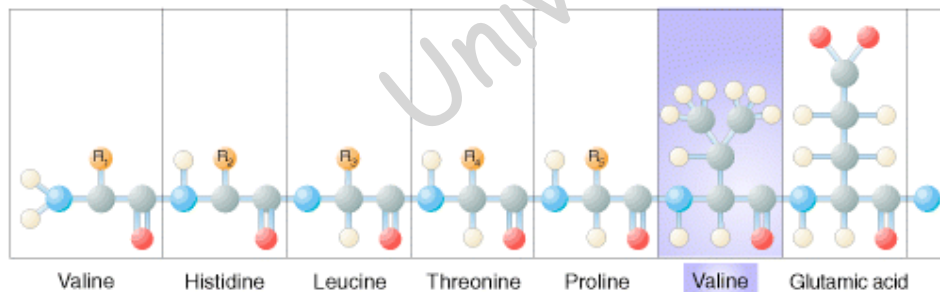


Sanger aveva dimostrato la costanza della sequenza aminoacidica delle proteine, cioè la stessa proteina ha sempre gli stessi aminoacidi, nello stesso ordine. Vernon Ingram studiò l'emoglobina selvatica (HbA) e quella che provoca l'anemia falciforme (HbS), scoprendo che **una singola sostituzione aminoacidica** è la causa della creazione di una proteina mutante responsabile di tutte le patologie umane connesse a questo tipo di anemia.

Normal hemoglobin



Hemoglobin S



# La pleiotropia di HbS

## GLOSSARIO

Bone marrow: midollo osseo

Heart: cuore

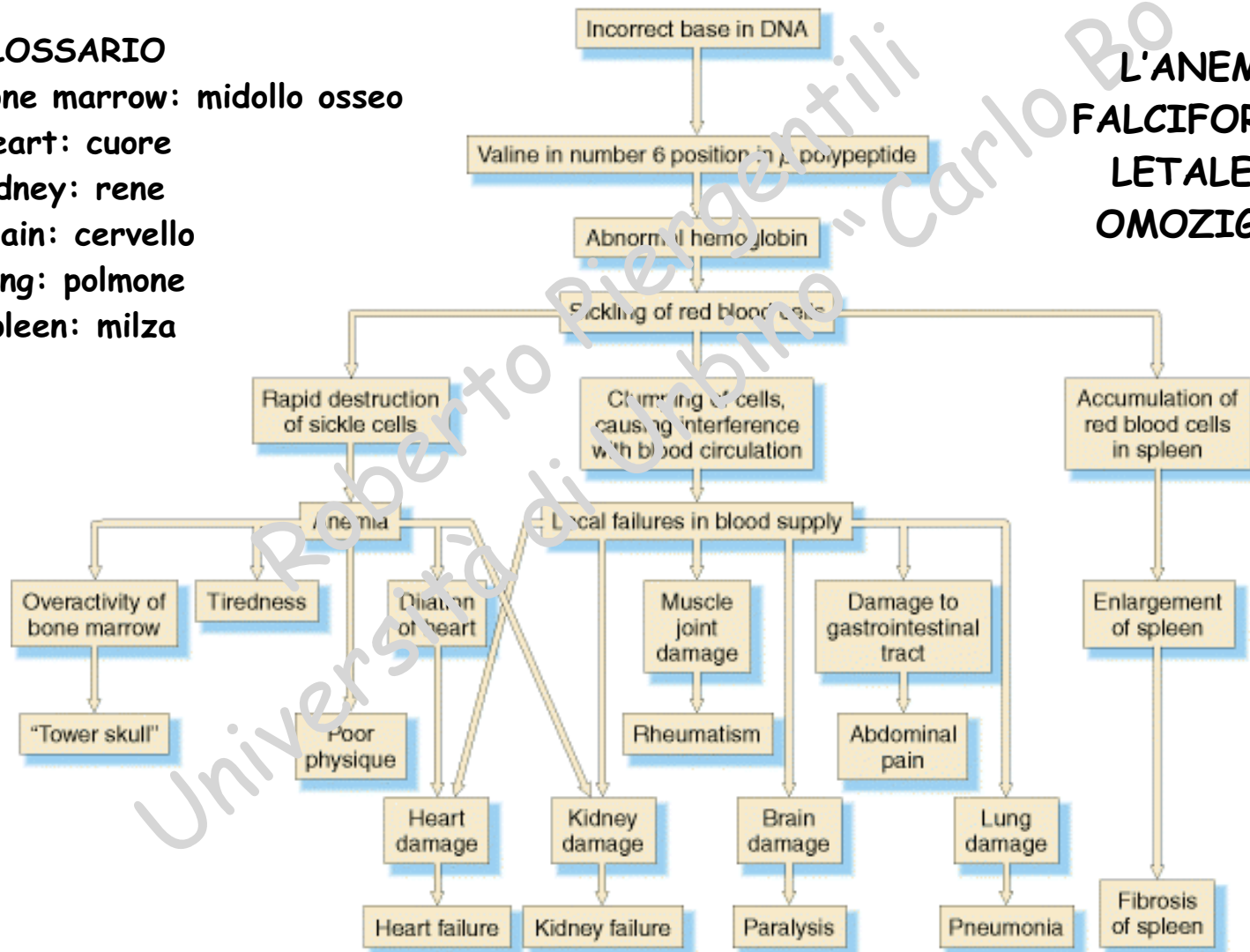
Kidney: rene

Brain: cervello

Lung: polmone

Spleen: milza

L'ANEMIA  
FALCIFORME È  
LETALE IN  
OMOZIGOSI

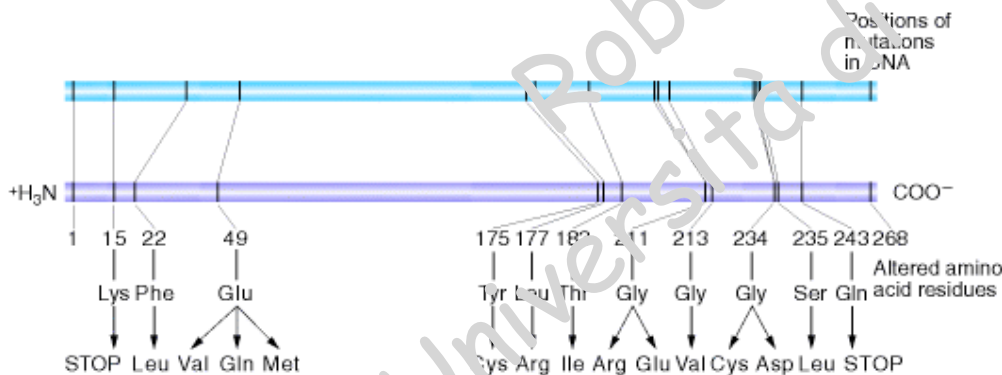


# Colinearità gene - proteina



Nel 1967 Charles Yanofsky aveva isolato tutta una serie di mutazioni a carico del gene A della triptofano sintetasi di *E. coli*. Egli scoprì che ad ogni mutazione corrispondeva un polipeptide difettivo, e che c'era una **correlazione diretta** tra posizione della mutazione nel DNA e posizione dell'aminoacido sbagliato nella proteina. Riuscì anche ad ottenere un ricombinante selvatico tra due mutazioni

dello stesso aminoacido (*Gly47Arg* e *Gly47Glu*), dimostrando che ogni codone (Crick e Brenner) è composto almeno da due reconi (Benzer).



**Quindi l'unità di ricombinazione è più piccola dell'unità di traduzione!**

# Eccezioni

Il concetto un gene → una catena polipeptidica è di importanza capitale per la relazione tra gene e funzione. Tuttavia in alcuni casi ci sono delle ambiguità. Ad esempio in *Neurospora* ci sono due regioni adiacenti nel locus *adenina-3*, dette *ad-3A* e *ad-3B*.

- Tutti i mutanti *ad-3A* complementano con tutti i mutanti *ad-3B*;
- i mutanti *ad-3A* mappano a lato dei mutanti *ad-3B* e viceversa;
- i mutanti *ad-3A* hanno una funzione diversa dai mutanti *ad-3B*;
- nessun mutante *ad-3A* complementa con altri mutanti *ad-3A*;
- **alcuni (non tutti) mutanti *ad-3B* complementano con alcuni altri mutanti *ad-3B*!**

È possibile che *ad-3B* siano in realtà due cistroni?



# I dati e la loro interpretazione

	1	2	3	4
1	-	+	-	-
2	+	-	+	-
3	-	+	-	+
4	-	-	+	-

+ = complementazione; - = non complementazione

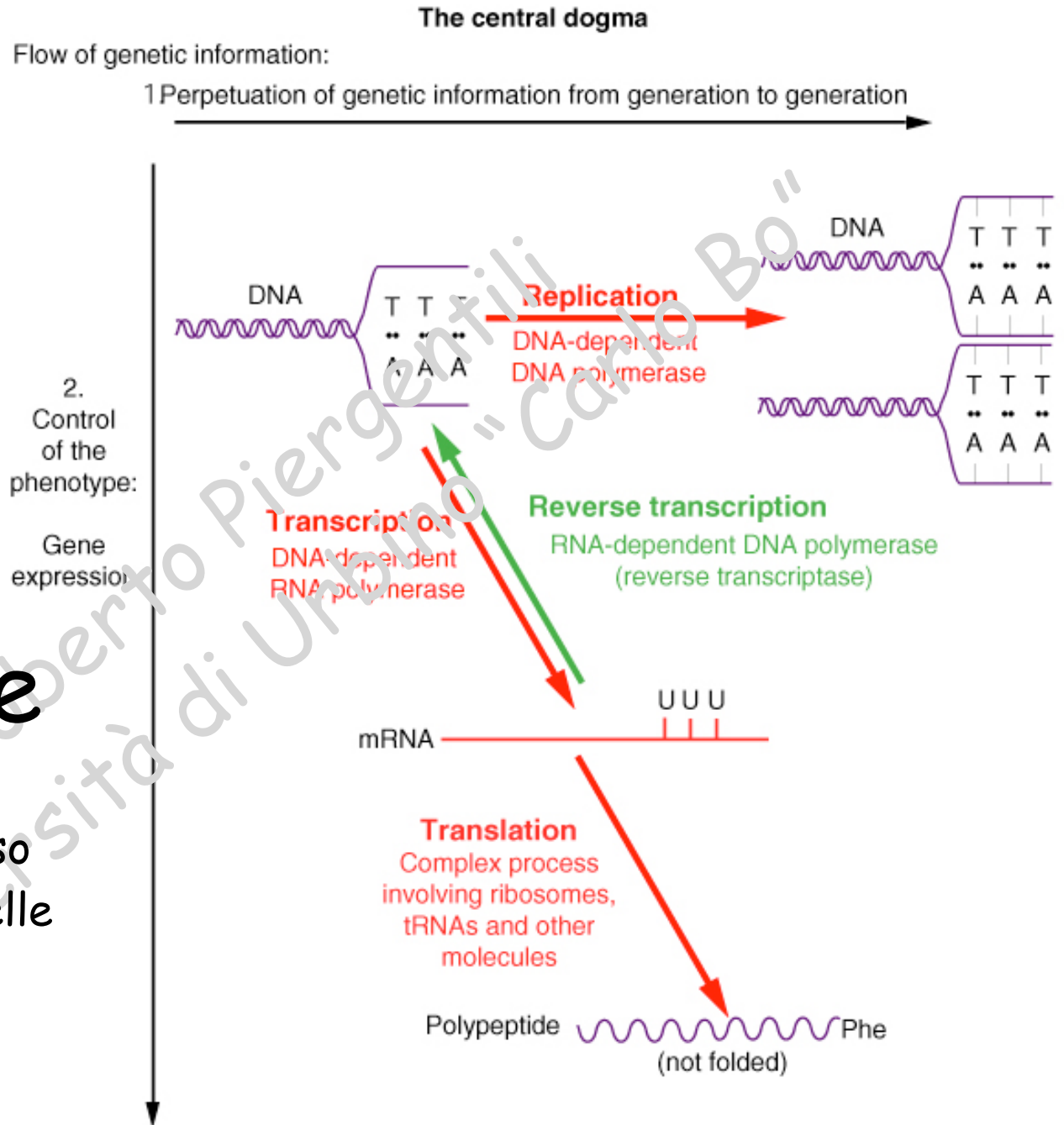
Mappe di complementazione: la non complementazione è nelle zone di sovrapposizione delle barre.

La mappa di complementazione è una mappa "funzionale", non fisica. Tuttavia è da notare che l'ordine di complementazione corrisponde generalmente all'ordine sulla mappa di ricombinazione. Inoltre i dati ci dicono che stiamo vedendo un cistrone solo (confrontare 1 e 3, e poi questi due con 4). La "frequente" reversione ci assicura che non sono delezioni.

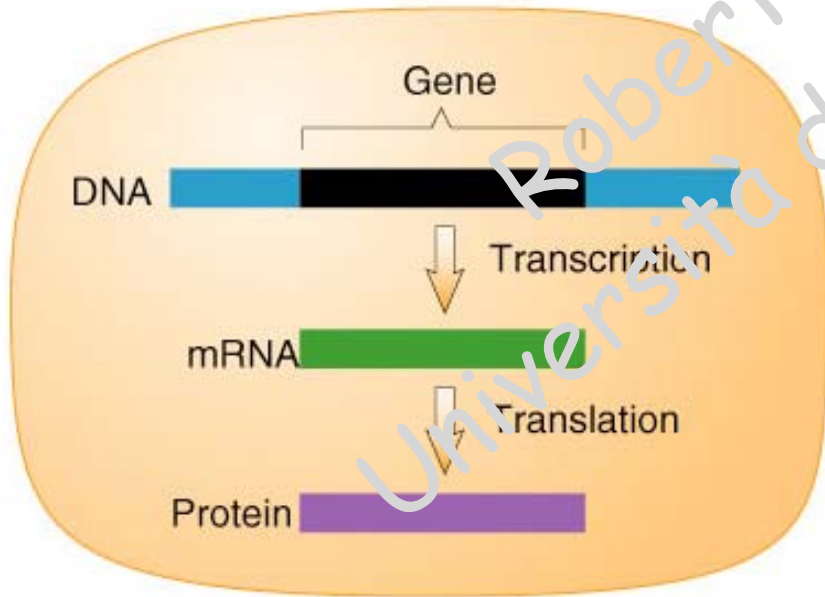
Possibili interpretazioni: (a) proteine a domini separati; (b) strutture quaternarie in grado di compensare le funzioni dei componenti.

# Il dogma centrale della biologia molecolare

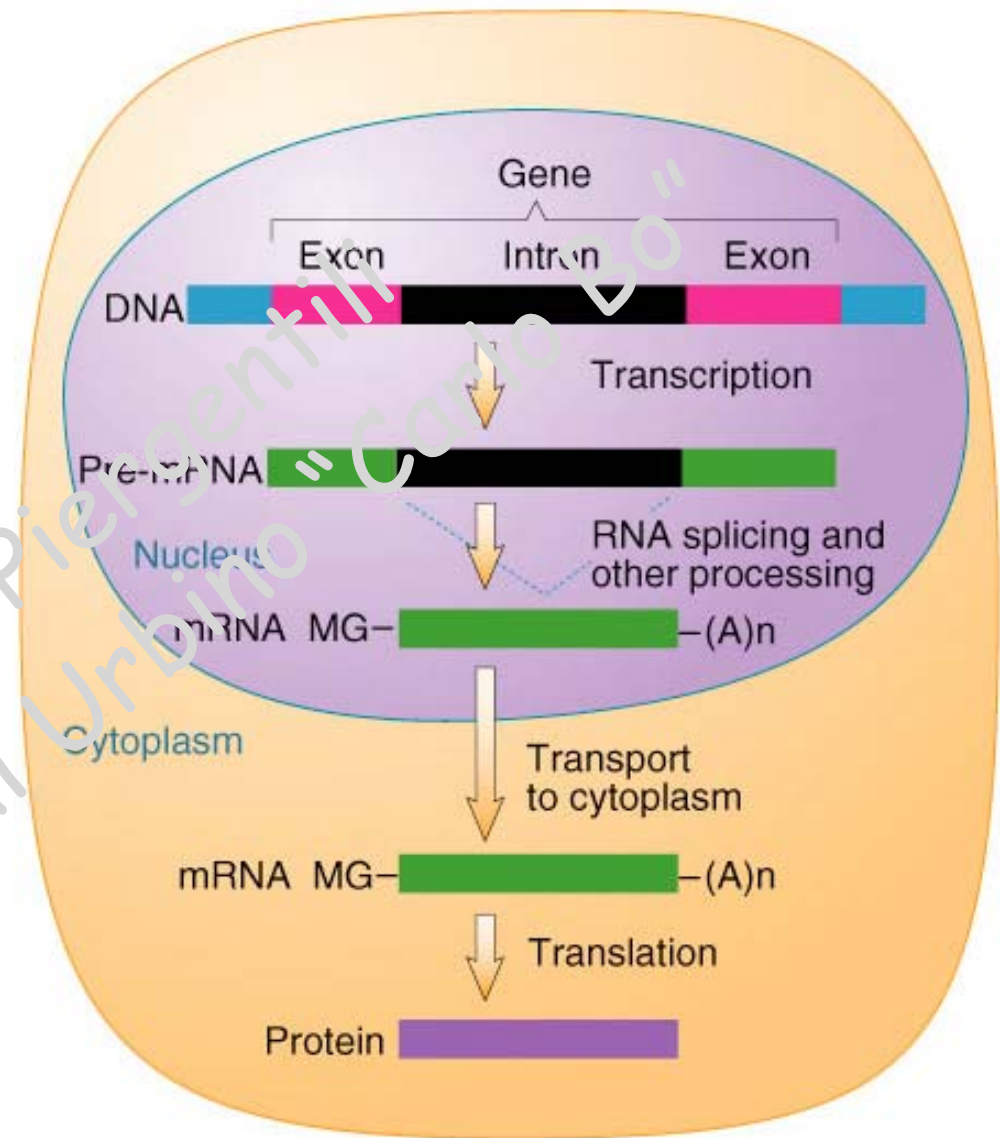
Rappresenta il flusso delle informazioni nelle cellule dei viventi.



# Dal DNA alle proteine: procarioti ed eucarioti



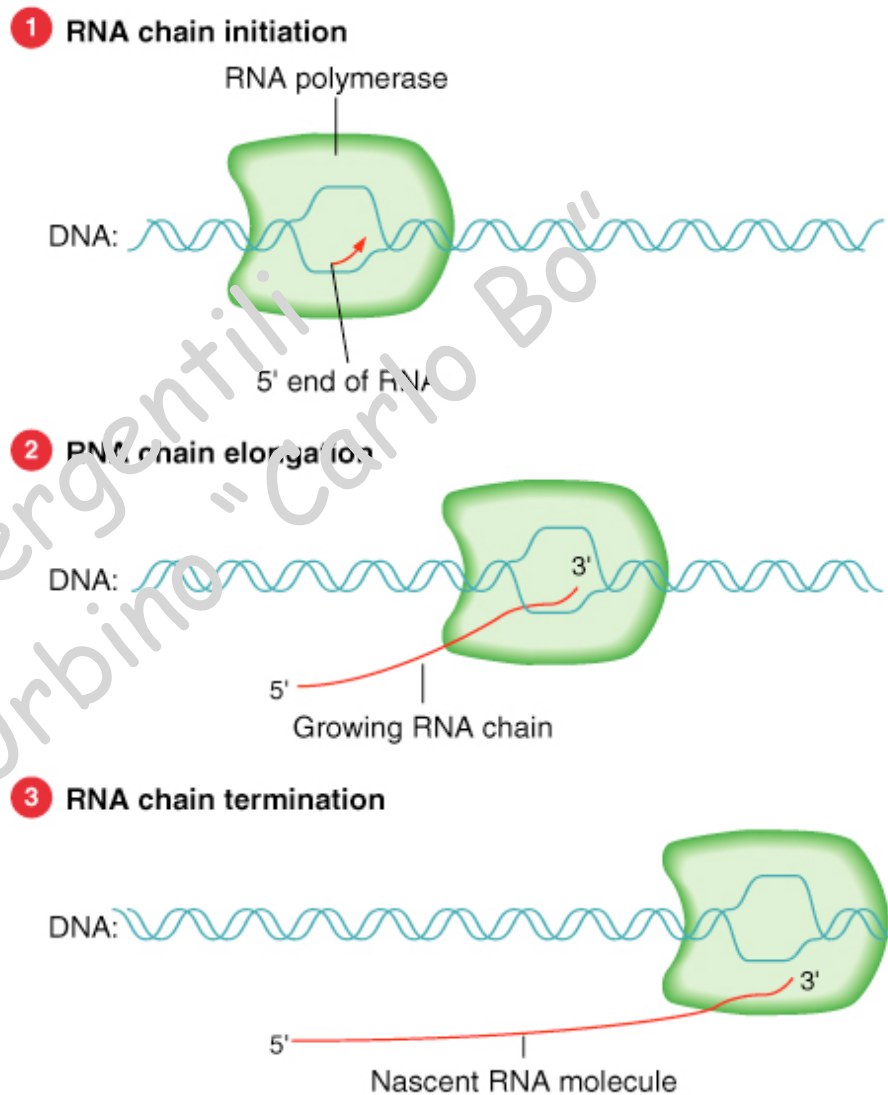
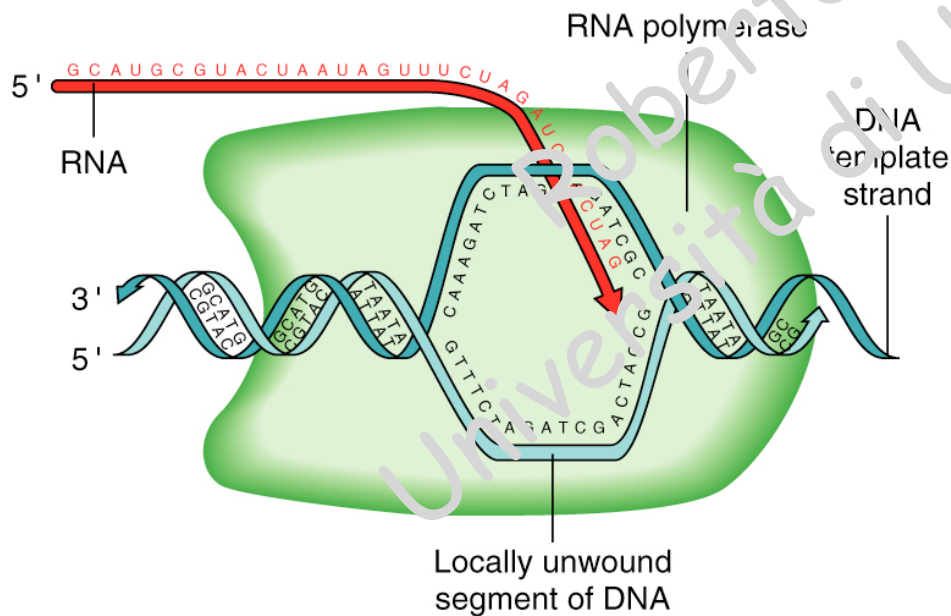
(a) Prokaryotes.



(b) Eukaryotes.

# La RNA polimerasi

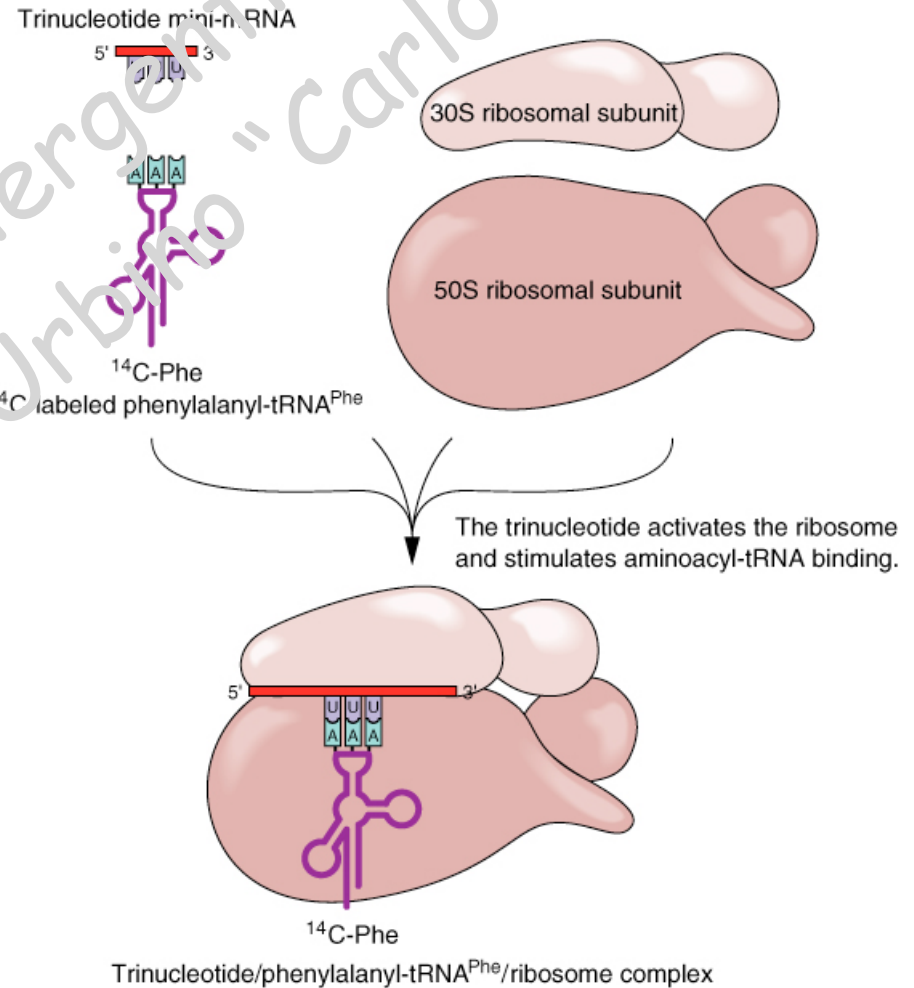
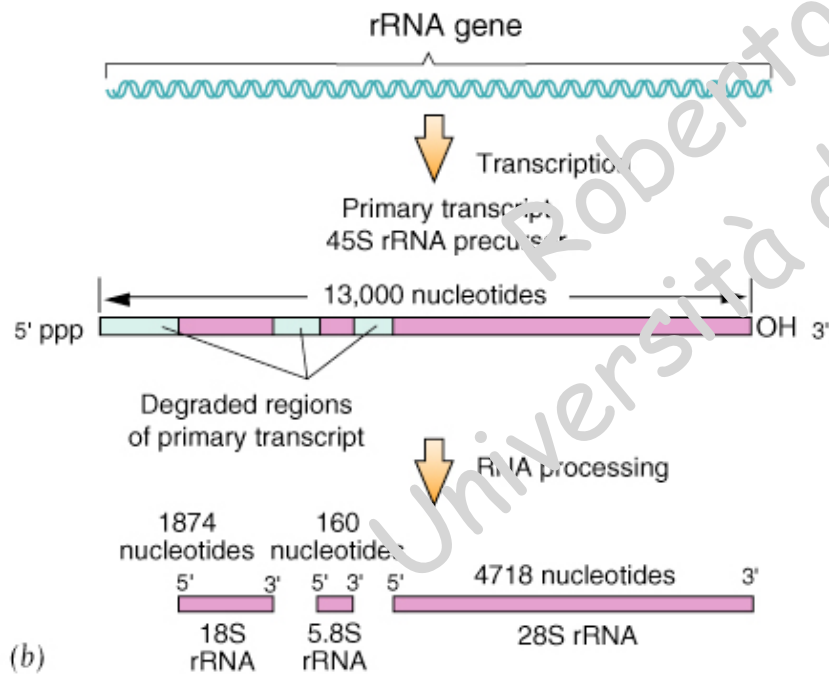
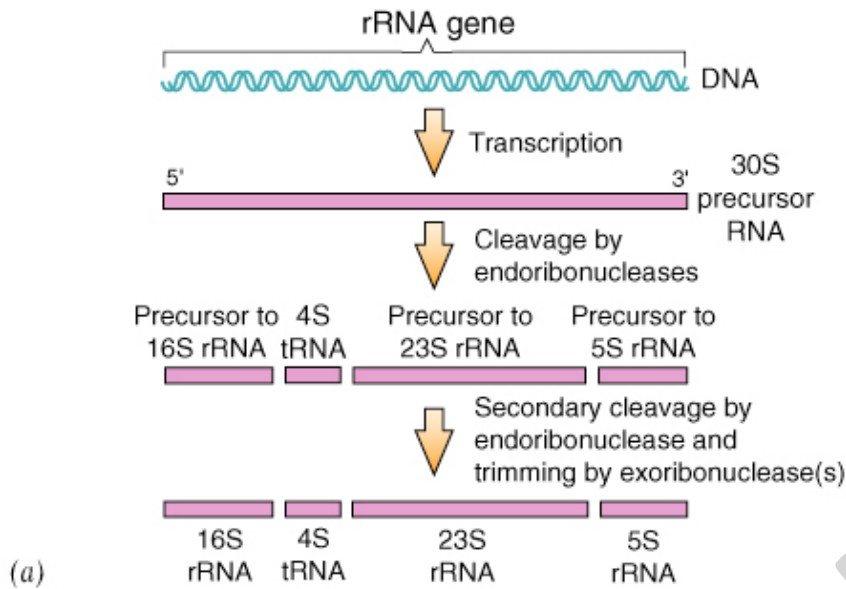
È la responsabile della sintesi dell'RNA messaggero (mRNA)



Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

# Il ribosoma

È composto di proteine ed RNA ribosomale (rRNA) la cui sintesi avviene nel nucleolo.

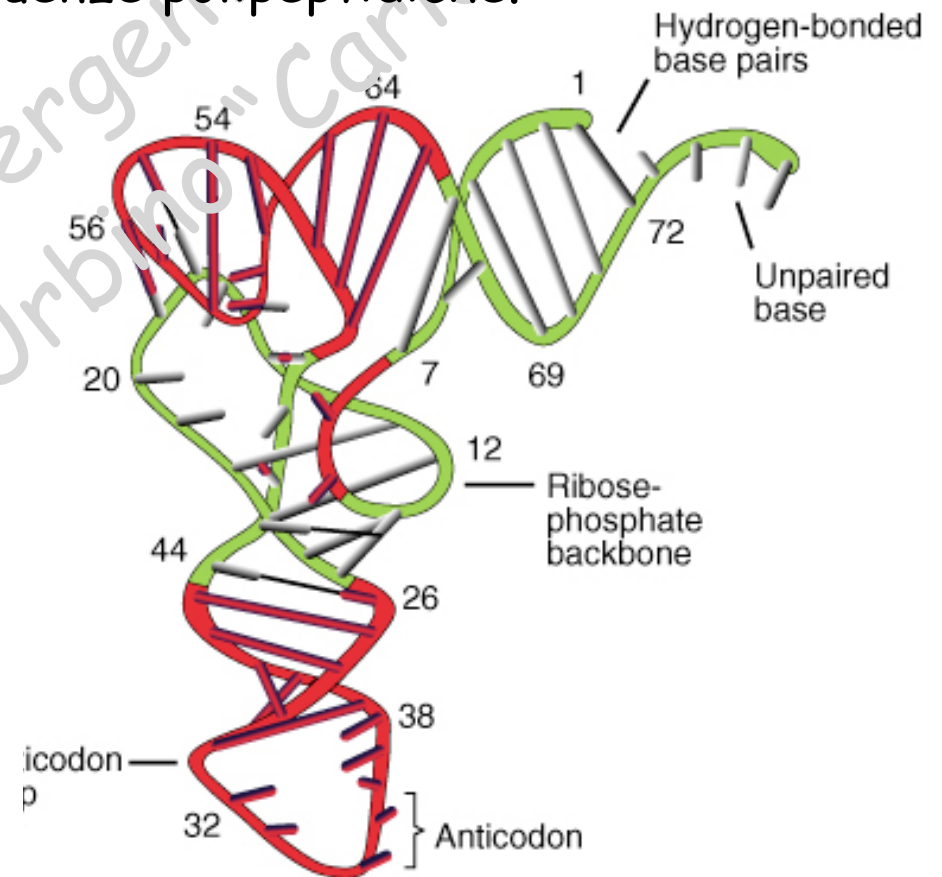
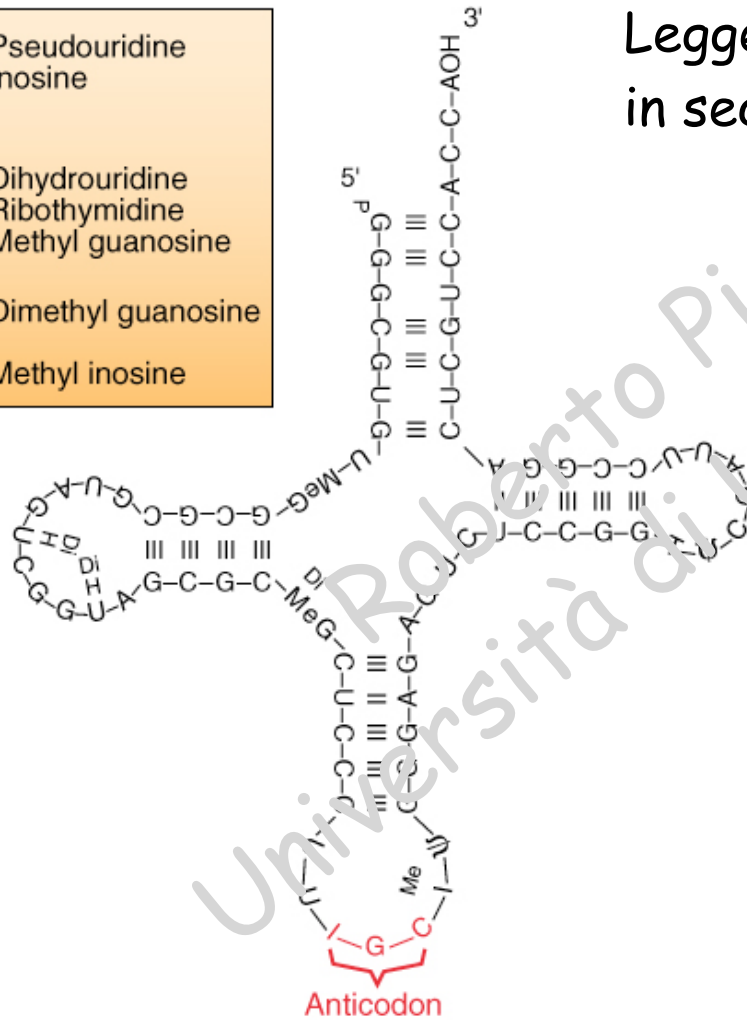




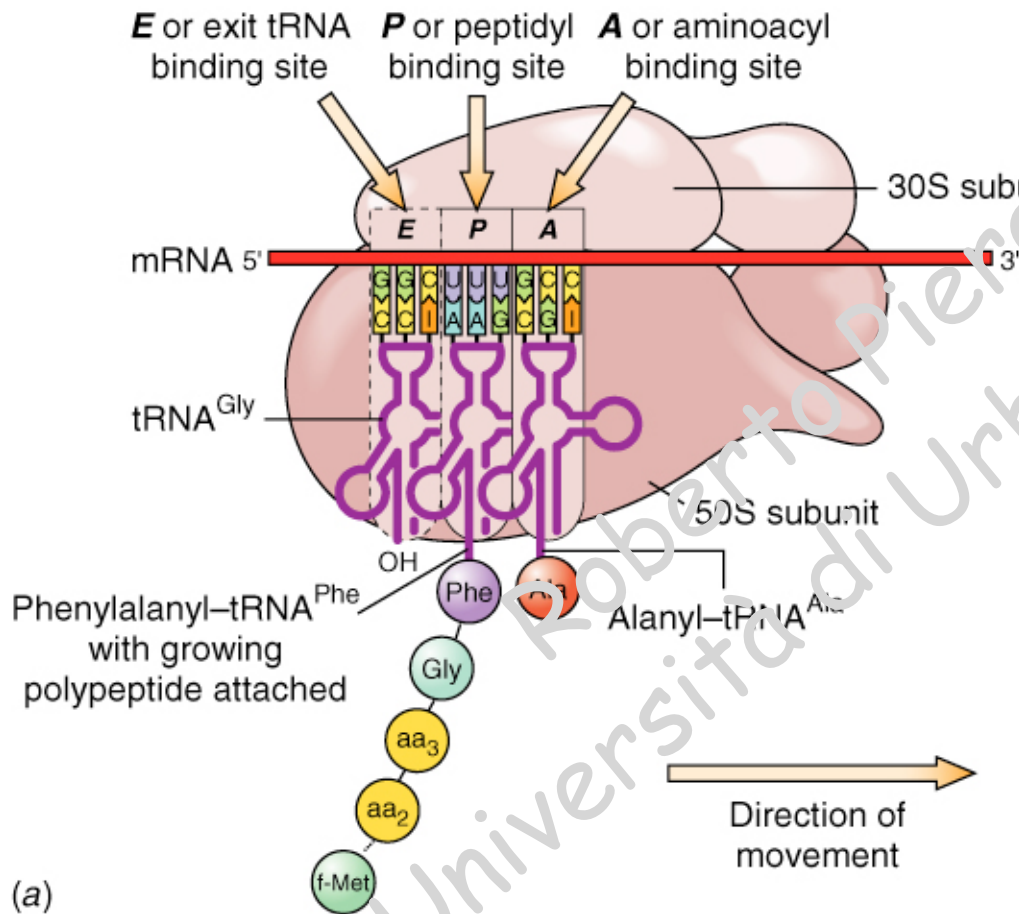
# Il tRNA (o RNA di trasferimento)

Ψ	= Pseudouridine
I	= Inosine
Di	
H	
U	= Dihydrouridine
T	= Ribothymidine
MeG	= Methyl guanosine
Di	
MeG	= Dimethyl guanosine
Me	
I	= Methyl inosine

Legge il codice sul mRNA e lo traduce in sequenze polipeptidiche.

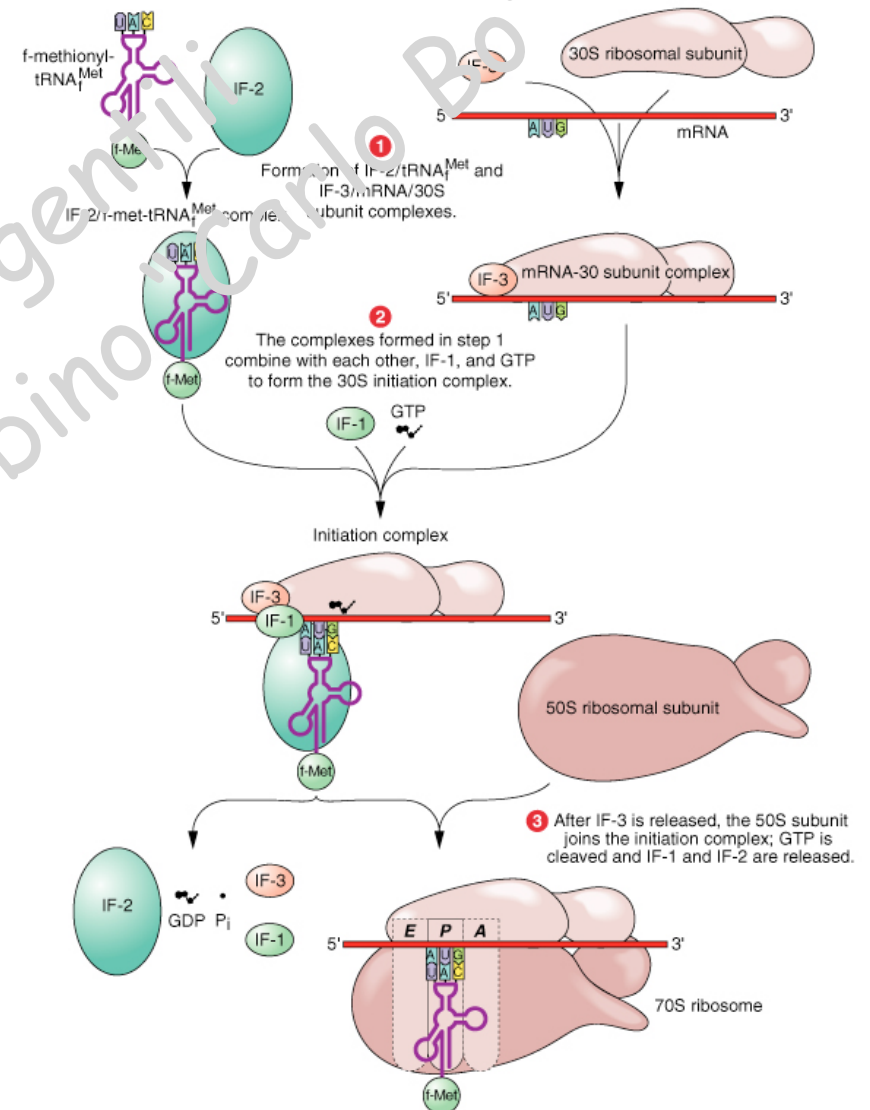


# L'inizio della sintesi proteica

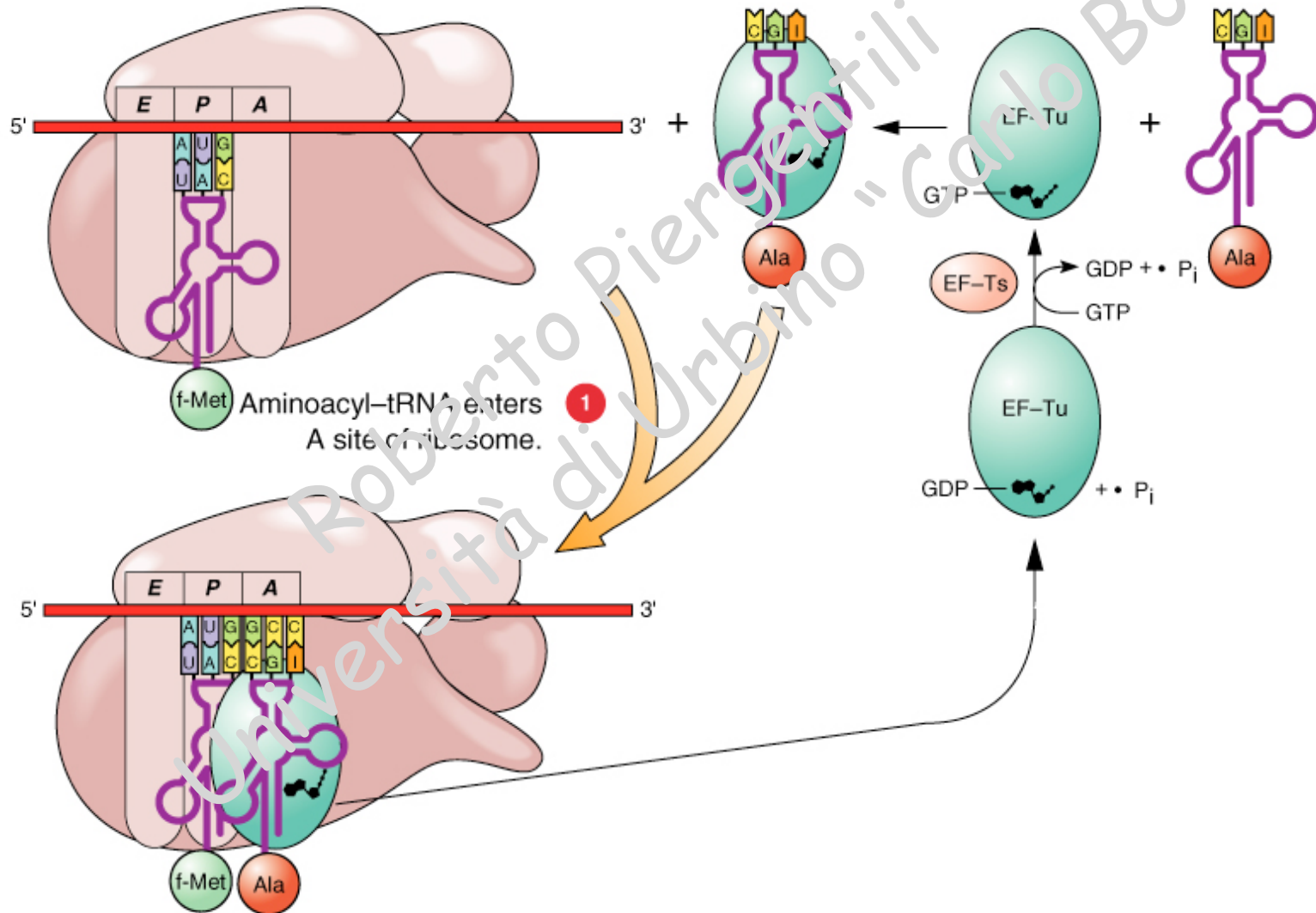


(a)

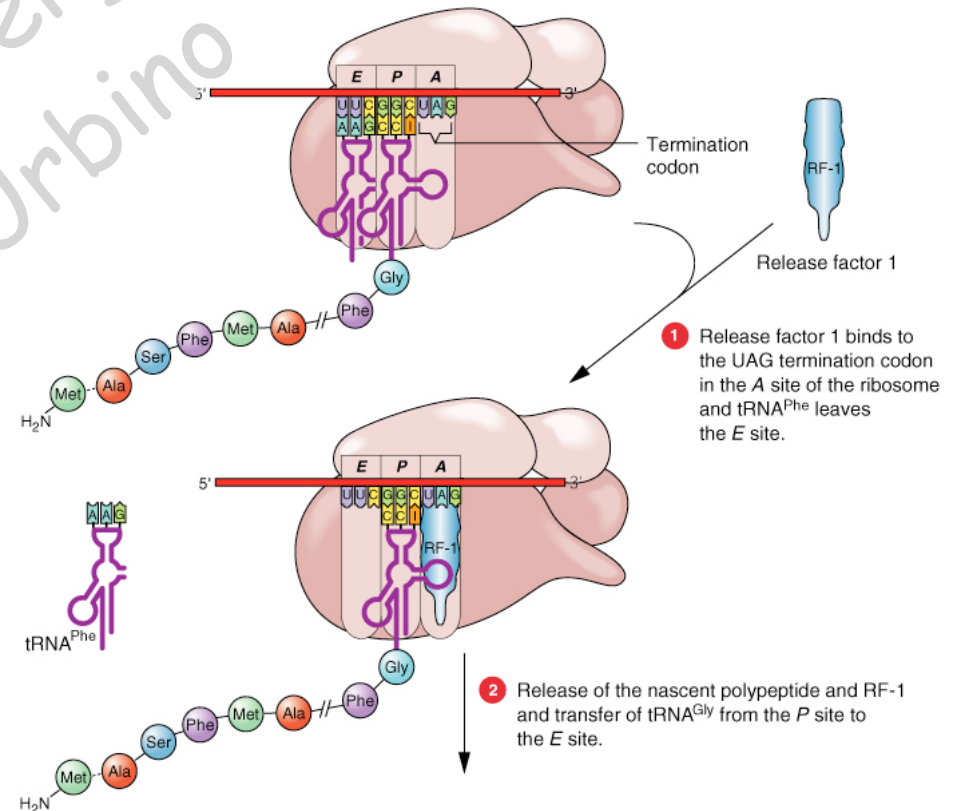
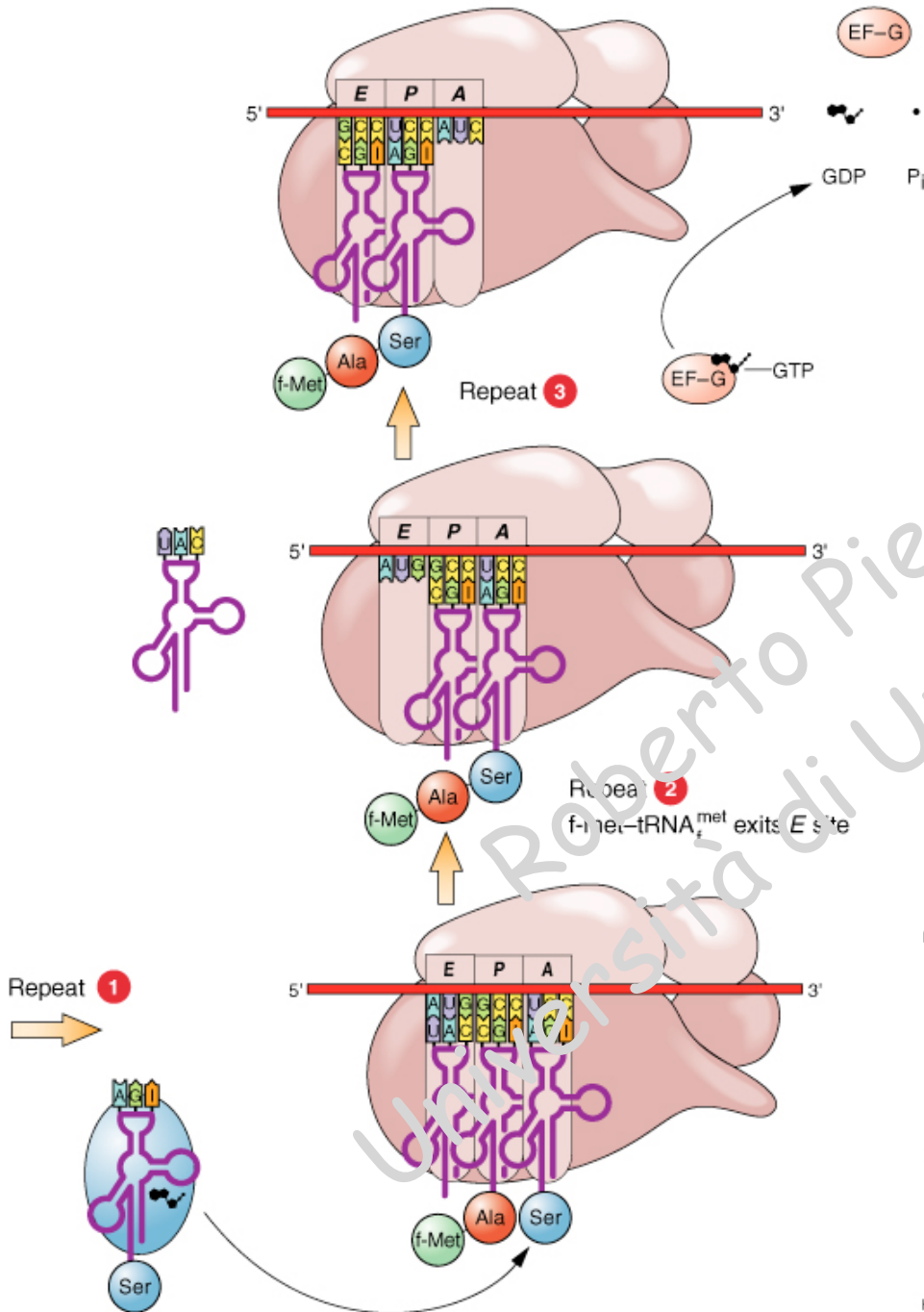
Figure 13.14a Diagram of a model of the 70S ribosome of *E. Coli*. Each ribosome-mRNA complex contains three aminoacyl-tRNA binding sites. The A or aminoacyl-tRNA site is occupied by an alanyl-tRNA<sup>Ala</sup> complex. The P or peptidyl site is occupied by a phenylalanyl-tRNA<sup>Phe</sup> complex, with the growing polypeptide chain covalently linked to the phenylalanine tRNA. The E or exit site is occupied by the tRNA<sup>Gly</sup> prior to its release from the ribosome.



# L'elongazione del polipeptide



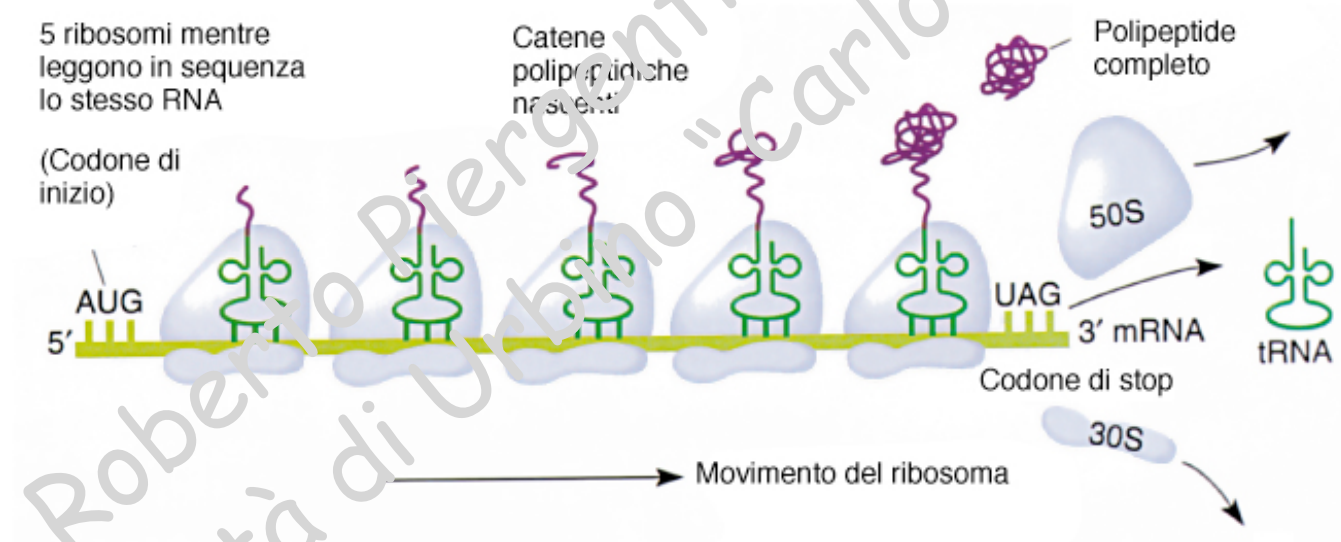
# Elongazione e termine del polipeptide



# Il polisoma

**Figura 6.17**

**Diagramma di un polisoma, diversi ribosomi che traducono in sequenza lo stesso mRNA.**



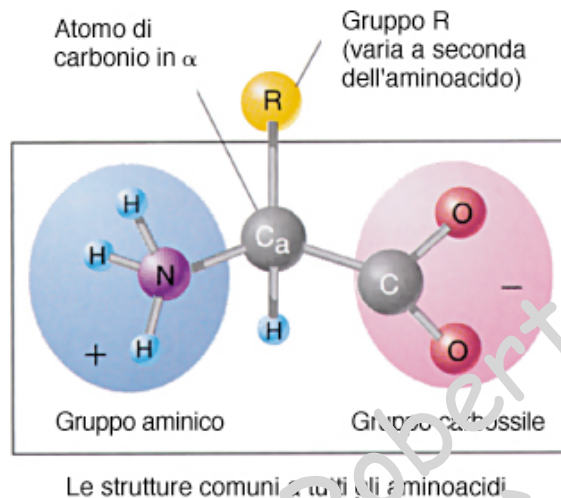
Molti ribosomi traducono contemporaneamente ciascun mRNA, amplificandone gli effetti. Si parla di polisoma o poliribosoma.



# Dettaglio del legame peptidico

Figura 6.1

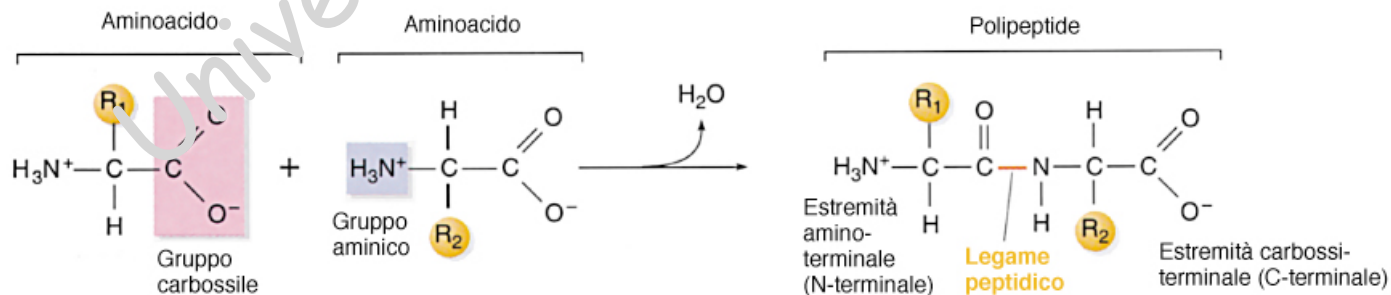
La formula di struttura generale di un aminoacido.



Nel ribosoma viene catalizzata la **condensazione** degli aminoacidi facendo reagire il gruppo amminico del primo con il gruppo carbossilico del secondo. Il primo aminoacido della proteina (la metionina) è all'**N terminale**, l'ultimo al **C terminale**.

Figura 6.3

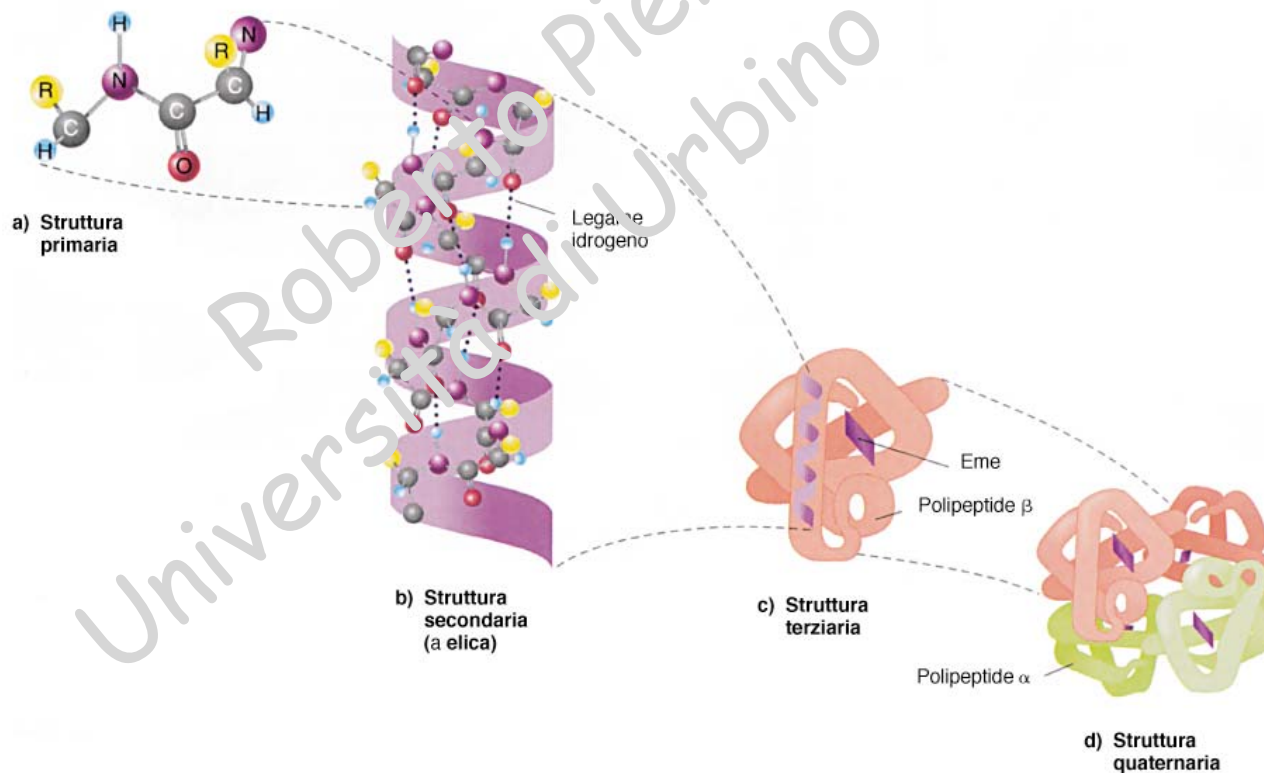
Il meccanismo di formazione del legame peptidico tra il gruppo carbossilico di un aminoacido ed il gruppo amminico di un altro aminoacido.



# Organizzazione 3D delle proteine

**Figura 6.4**

**I quattro livelli di struttura delle proteine.** (a) Primaria, la sequenza degli aminoacidi in una catena polipeptidica. (b) Secondaria, il ripiegamento e l'avvolgimento di un singolo polipeptide in una grande varietà di forme. Viene mostrato un tipo di struttura secondaria, l' $\alpha$ -elica. Entrambe le strutture sono stabilizzate da legami idrogeno. (c) Terziaria, lo specifico ripiegamento tridimensionale della catena polipeptidica. È mostrata la catena polipeptidica  $\beta$  dell'emoglobina, un polipeptide contenente un gruppo eme che trasporta l'ossigeno nel sangue. (d) Quaternaria, l'aggregarsi specifico di più catene polipeptidiche. Viene mostrata l'emoglobina, che è formata da due catene  $\alpha$ , due catene  $\beta$  e quattro gruppi eme.



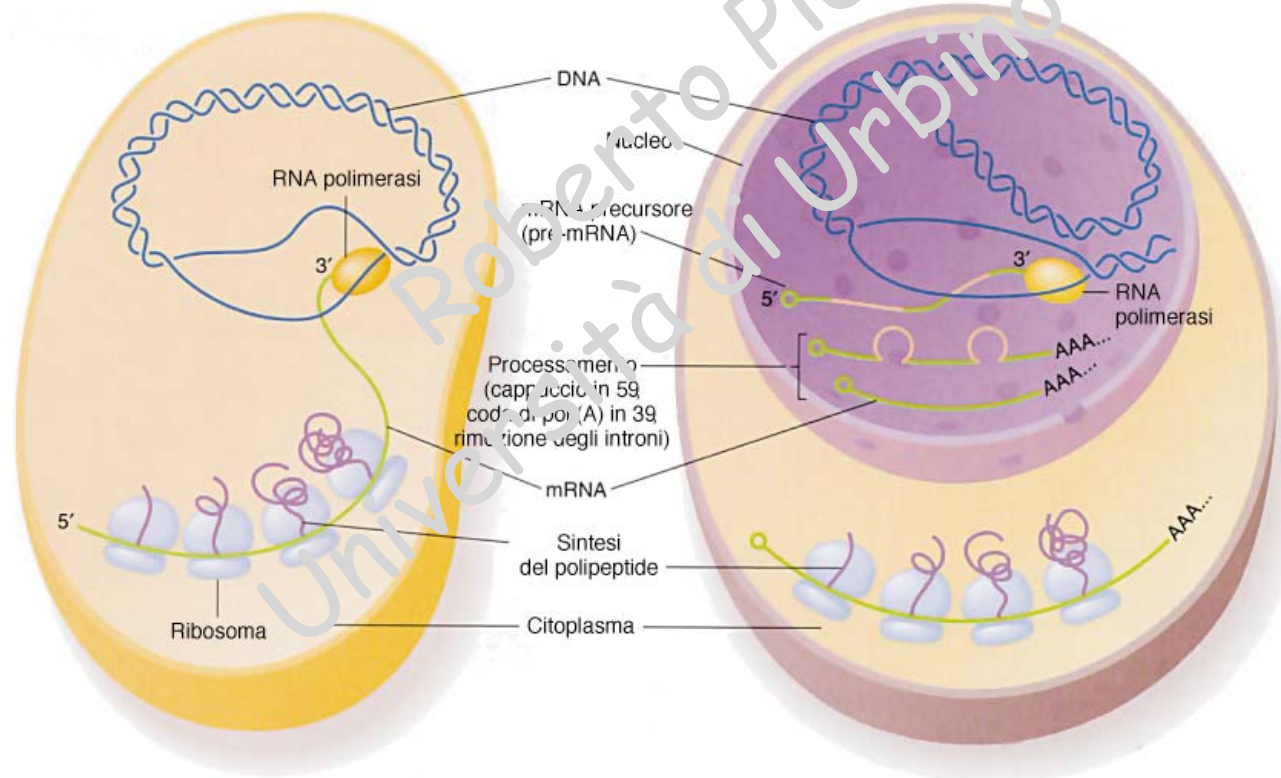
# Differenza tra eucarioti e procarioti

**Figura 5.8**

**Processi per la sintesi di un mRNA funzionale nei procarioti e negli eucarioti.** (a) Nei procarioti l'mRNA sintetizzato dall'RNA polimerasi non deve essere processato prima di essere tradotto dai ribosomi. Inoltre, poiché non c'è nessuna membrana nucleare, la traduzione dell'mRNA può incominciare mentre la trascrizione sta ancora proseguendo. Questo porta all'accoppiamento dei processi di trascrizione e di traduzione. (b) Negli eucarioti il trascritto primario è una molecola di mRNA precursore (pre-mRNA), che è processata nel nucleo, con l'aggiunta di un cappuccio in 5' e di una coda di poli(A) in 3' e la rimozione degli introni. La traduzione può avvenire soltanto dopo che l'mRNA maturo è trasportato nel citoplasma.

a) Procarioti

b) Eucarioti



**Nei procarioti  
non c'è  
separazione  
spaziale e/o  
temporale tra  
trascrizione e  
traduzione!**