14
DEFINIZIONE DEL CONCETTO DI GENE
Struttura
fine del gene

Cos'è un gene?

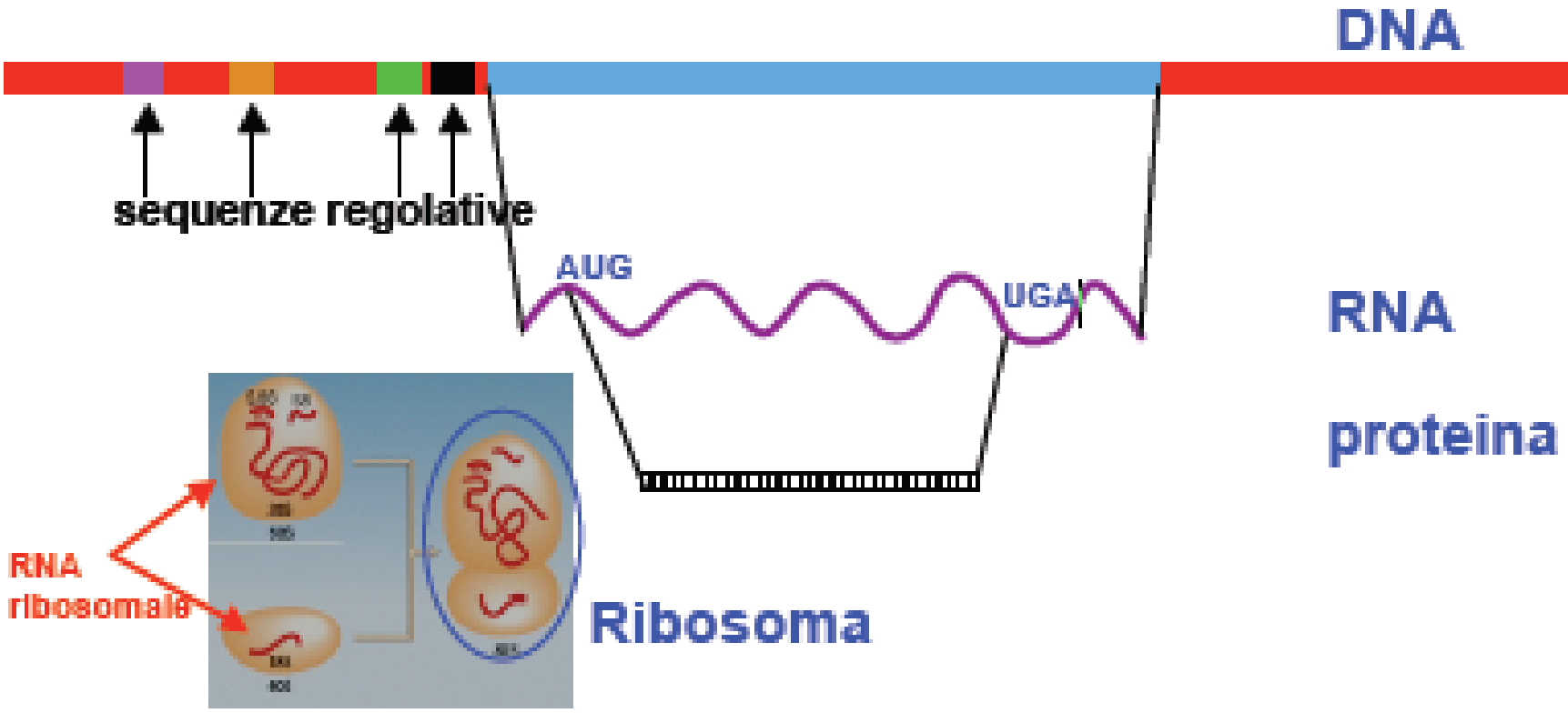
- Sta alla genetica come l'atomo sta alla chimica.

- E' l'unità ereditaria che specifica una certa caratteristica fenotipica di un individuo:
  - consiste in segmento di DNA dove è contenuta l'informazione per quella caratteristica.
  - In termini operativi: **sequenza di nucleotidi che specifica la sequenza di a.a. della proteina** che ne costituisce il prodotto.

- E' l'unità dell'informazione che specifica un polipeptide.

Cos'è un gene?

L'unità di informazione genetica che controlla la sintesi di un polipeptide o di una molecola di RNA



I geni sono le unità funzionali di base e le più piccole unità genetiche strutturali?

➢ Fino al 1940, il gene era considerato come unità di base dell'informazione genetica definita da vari criteri.

❑ Definizione funzionale

- **Il gene viene definito in base alle caratteristiche del prodotto finale**
  - *Un gene - un carattere*
  - *Un gene - un enzima*
  - *Un gene - un polipeptide*
  - *Un gene - un trascritto*

❑ Definizione strutturale

Il gene viene definito come una struttura fisica specifica

- ***Sequenza nucleotidica con particolari caratteristiche***

❑ Definizione genetica

Il gene viene definito funzionalmente in base all'effetto di specifiche coppie di mutazioni sul fenotipo mutante

- *Unità di complementazione*

Un gene = un polipeptide

- Definizione scarsamente operativa:

in un organismo complesso non è possibile correlare ogni segmento di DNA con uno specifico polipeptide tra i tanti prodotti.

Meglio utilizzare un approccio genetico piuttosto che biochimico

- **Test di complementazione**

introdotto da Ed Lewis e rielaborato da S. Benzer per definire sperimentalmente il concetto di gene nel fago T4

Test di complementazione
o test cis-trans o test di allelismo

- Per verificare se due mutazioni sono a carico dello stesso gene (e quindi sono alleliche) o se sono a carico di geni diversi si usa
  - **il test di complementazione o test *cis-trans* o test di allelismo**

- Il test di complementazione (o test in *trans*) consente di dare una **definizione operativa del gene**

Complementazione

- dall'incrocio tra due individui con fenotipo recessivo (omozigoti recessivi) si ottiene una progenie con il fenotipo dominante

- **Il test di complementazione consente di stabilire se mutazioni che producono lo stesso fenotipo siano localizzate nello stesso gene o in geni differenti**

- **Se due mutazioni recessive appartengono allo stesso gene**
  il fenotipo dell'individuo della F1 che le porta entrambe è recessivo

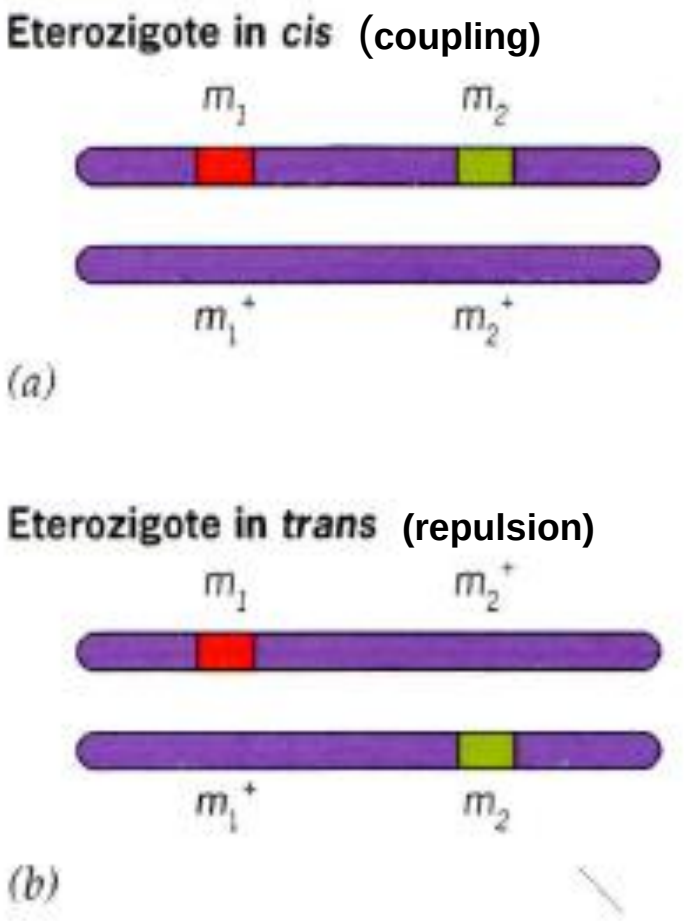
- Se due mutazioni recessive **appartengono a geni diversi**
  il fenotipo dell'individuo della F1 che le porta entrambe è dominante

Complementazione: concetto di gene

	mutante A	*mutante B*
i) stessa mutazione	m_1 / m_1	m_1 / m_1
ii) mutazioni diverse dello stesso gene = *alleliche*	m_1 / m_1	m_2 / m_2
iii) mutazioni di geni diversi = *non alleliche*	m_1 / m_1 ; $m_2^+ m_2^+$	m_1^+ / m_1^+ ; m_2 / m_2

1. **TEST DI ETEROZIGOSI**
1. **TEST DI COMPLEMENTAZIONE**
3. **TEST DI RICOMBINAZIONE**

1. Complementazione: definizione operativa del gene

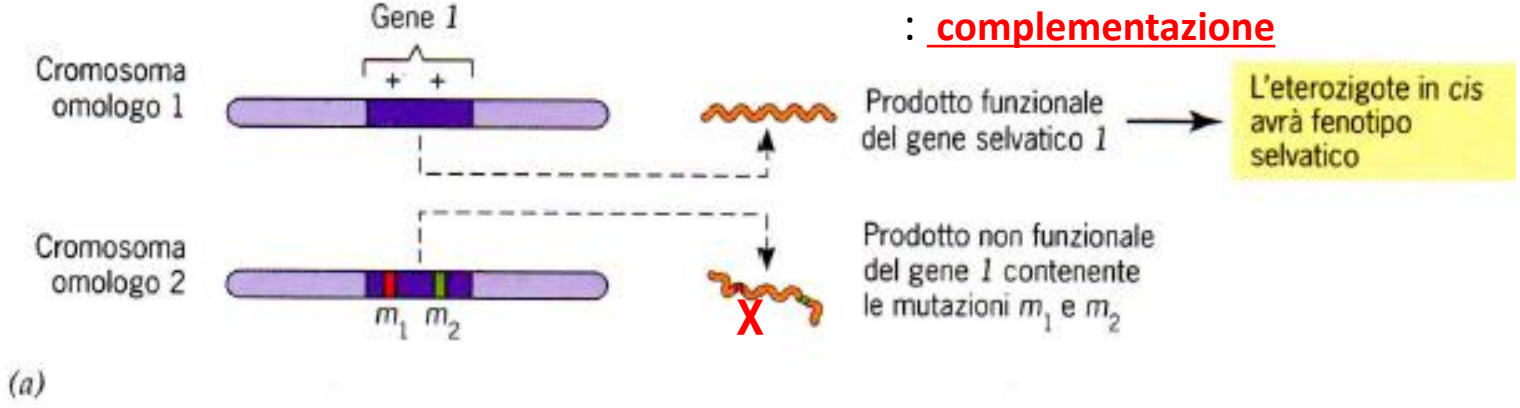


Disposizione dei marcatori genetici negli eterozigoti in *cis* ed in *trans*

Test di Complementazione: serve per definire il gene operativamente

a) test in *cis*.

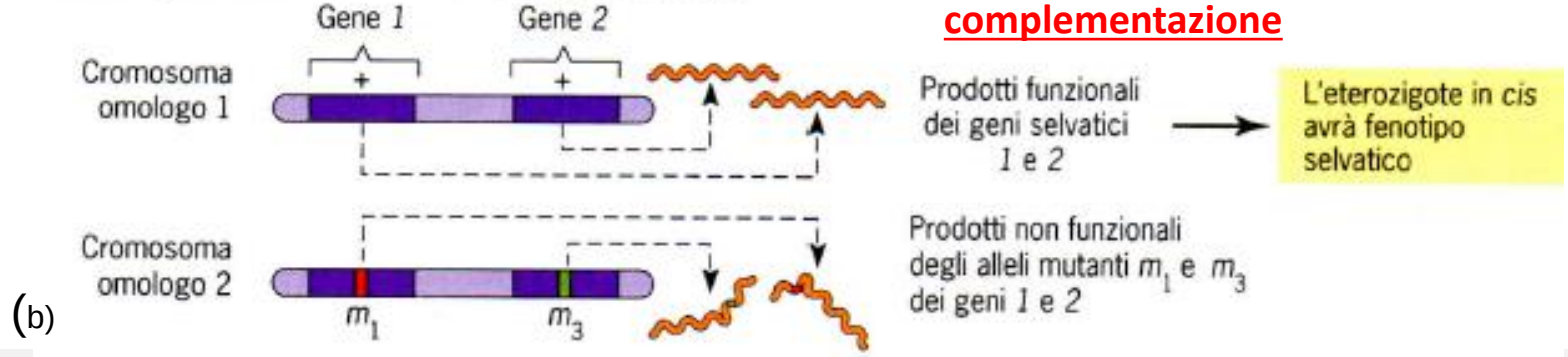
Eterozigote in *cis*: mutazioni in un solo gene



: complementazione

L'eterozigote in *cis* avrà fenotipo selvatico

Eterozigote in *cis*: mutazioni in due geni differenti



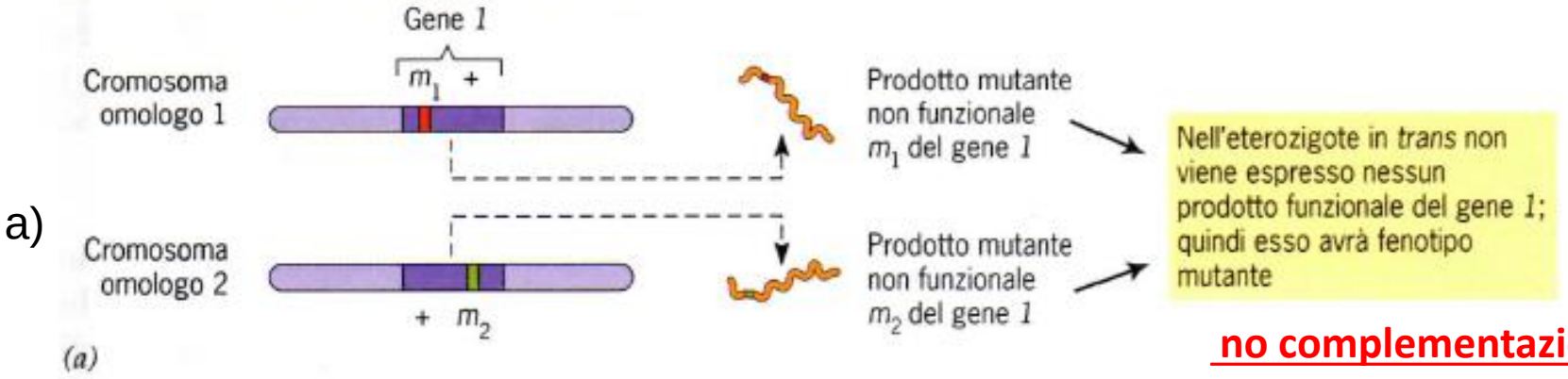
complementazione

L'eterozigote in *cis* avrà fenotipo selvatico

- **L'eterozigote in *cis* deve presentare fenotipo selvatico,**
  - **sia che le mutazioni si trovino nello stesso gene (a)**
  - **sia che si trovino in geni differenti (b)**

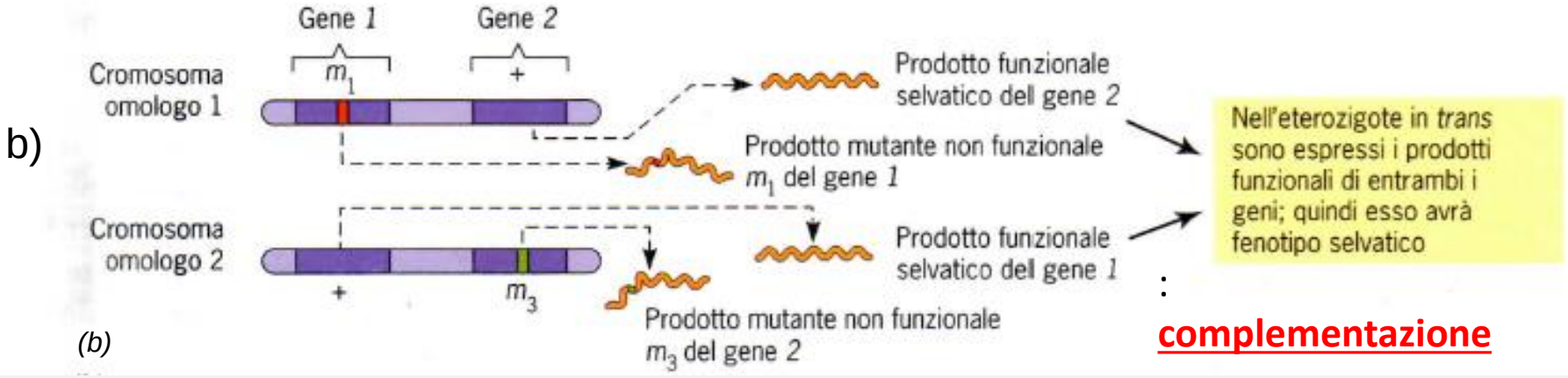
b. Test in *trans*.

Eterozigote in *trans*: mutazioni in un solo gene



no complementazione

Eterozigote in *trans*: mutazioni in due geni differenti



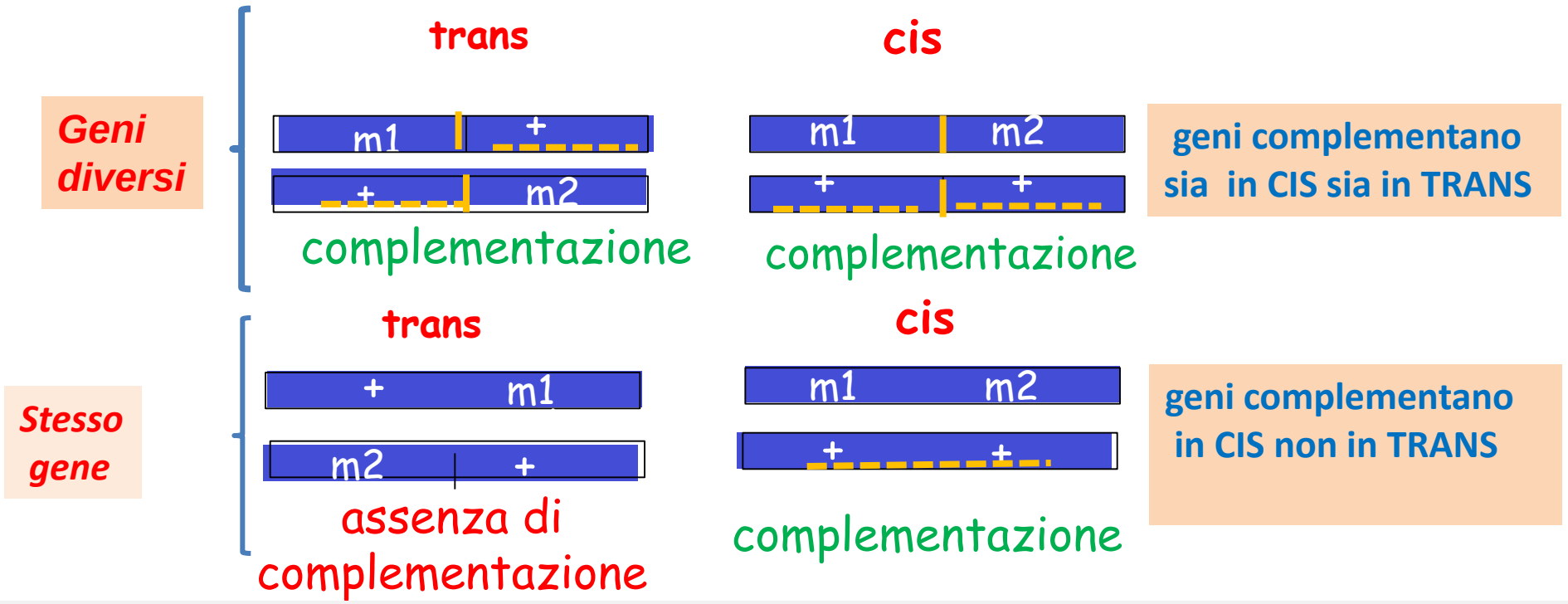
complementazione

➢ **L'eterozigote in *trans* deve** avere

- **fenotipo mutante** se le due mutazioni **sono localizzate nello stesso gene** (a)
- **fenotipo selvatico se si trovano in geni differenti** (b).

Test di Complementazione

- Il **cistrone** prende il nome dal test di complementazione che si chiama **test cis-trans (**introdotto da Seymour Benzer)



- Per **cistrone** (unità funzionale) si intendono le **sezioni di mappa dove sono localizzati** tutti gli alleli **che complementano** tra di loro in **fase cis e non in fase trans**: **tutti gli alleli funzionali di un gene.**
- E' quindi il **segmento di DNA che specifica un polipeptide e che in termini operativi abbiamo chiamato gene**

Cistrone: unità di funzione

- Oggi, la maggior parte dei genetisti considera i termini *gene* e *cistrone* come sinonimi

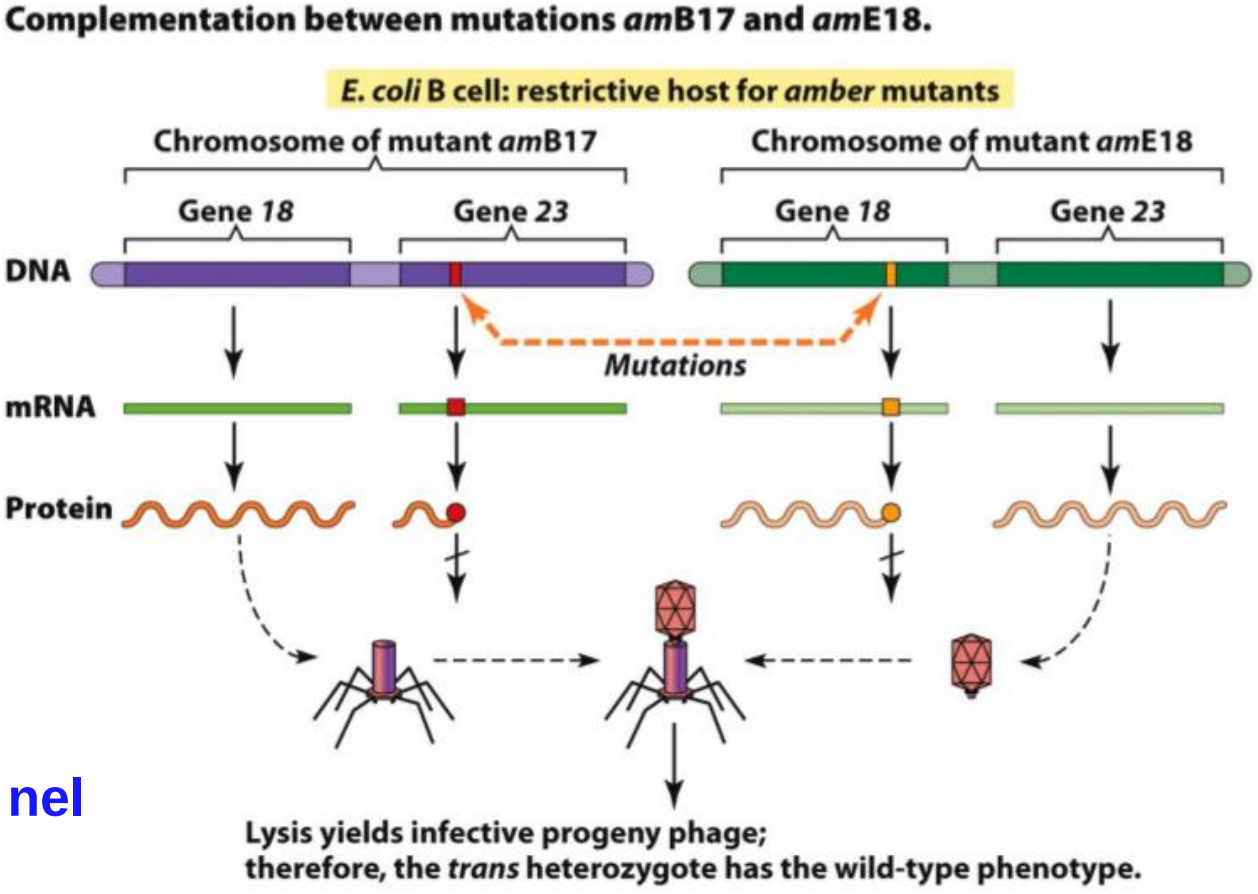
- Il gene viene **definito operativamente** come unità funzionale dal **test di complementazione o test in *trans*;**
- tale test viene utilizzato per determinare se le mutazioni sono localizzate nello stesso gene o in geni differenti.

- Questo test è uno dei tre mezzi basilari a disposizione della genetica;
  gli altri due sono la **ricombinazione e la mutazione.**

Complementazione Intragenica

a) Complementazione

Complementazione e assenza di complementazione negli eterozigoti in *trans*.



a) **Complementazione nel fago T4, tra**

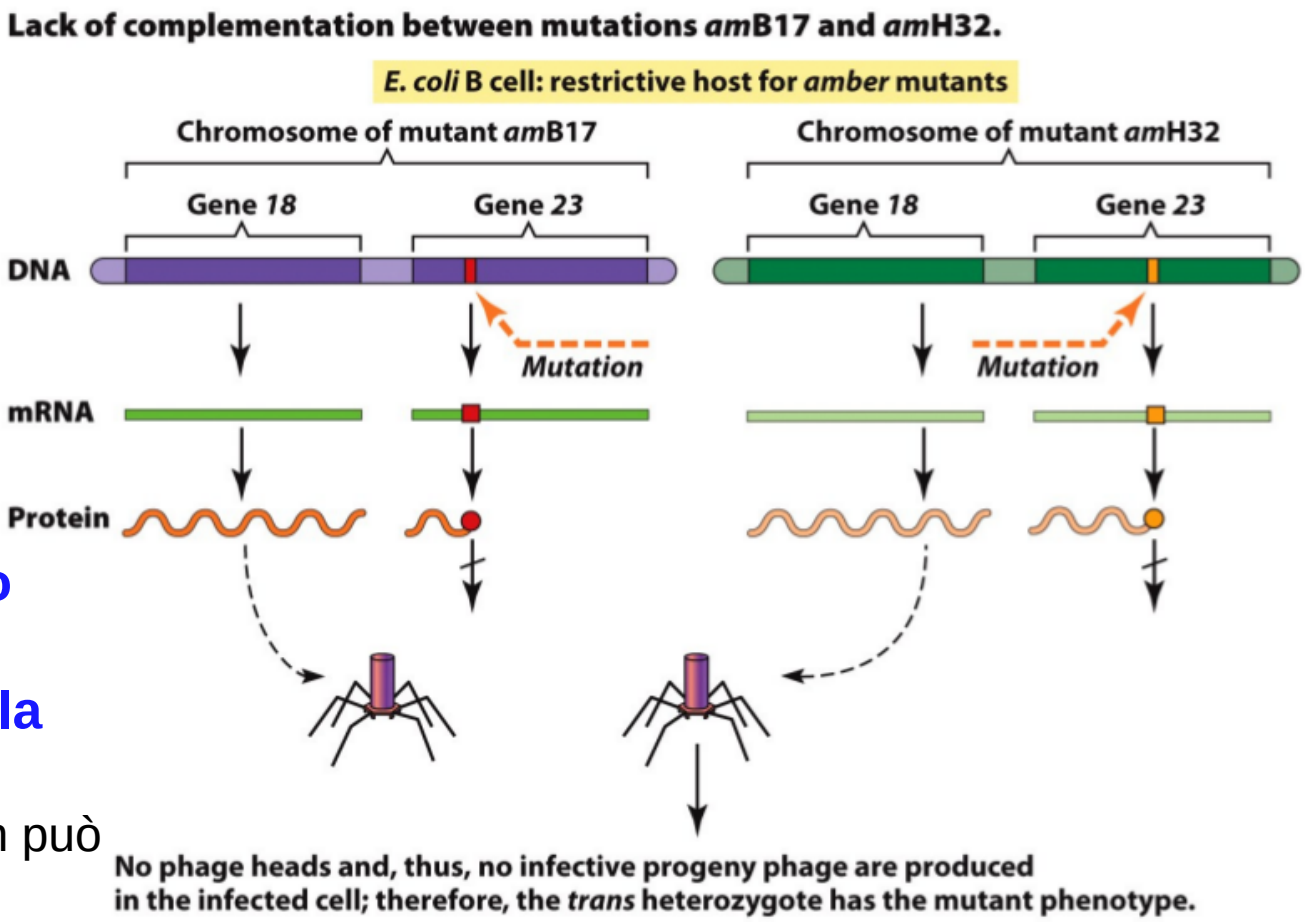
- mutazione **amB17 del gene 23** (**codifica** la **proteina principale della testa**,)
- mutazione **amE18 del gene 18** (codifica la **proteina principale della coda.**
- **All' interno della cellula vengono sintetizzate sia la testa sia la coda del fago, con produzione di progenie infettiva,**

Complementazione e assenza di complementazione negli eterozigoti in *trans.*

b) assenza complementazione

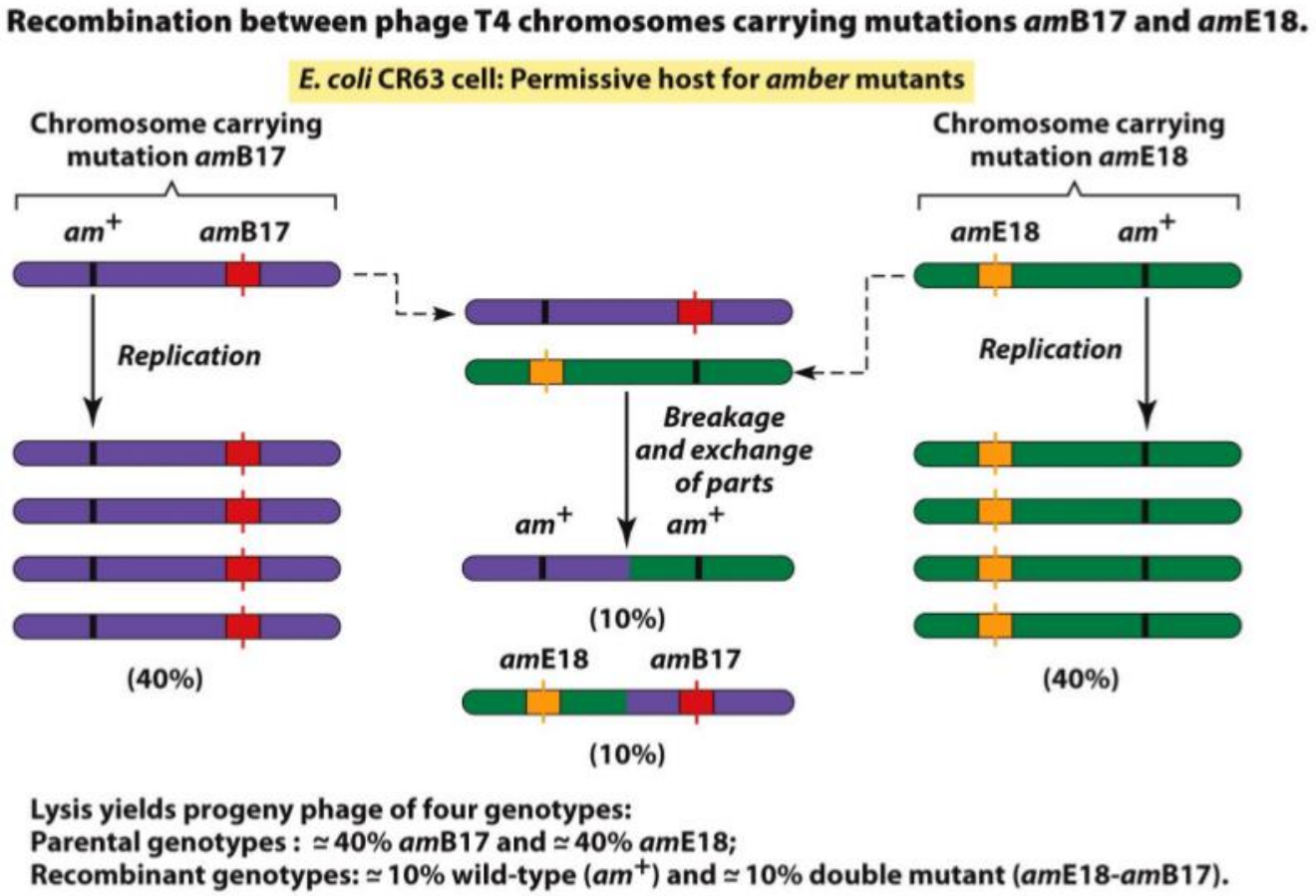
b)

- Quando l'eterozigote in trans contiene **due mutazioni (amB17 e amH32) nello stesso gene 23**,
- **non viene prodotta la testa fagica**
- pertanto la progenie non può essere assemblata



Ricombinazione tra i cromosomi del fago T4 con le mutazioni amB17 (gene 23) e amE18 (gene 18)

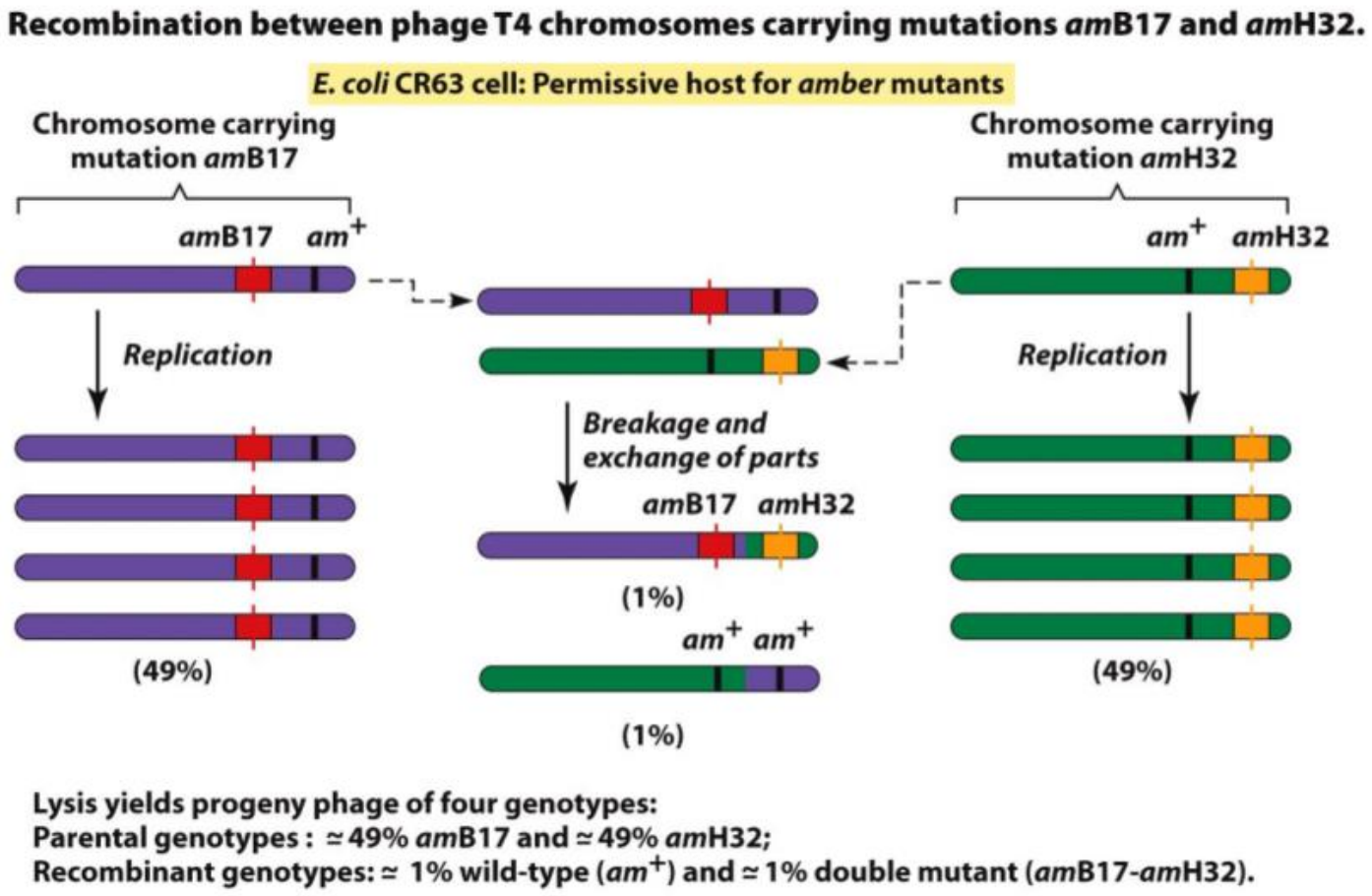
A) mutazioni in grado di complementare



A) **mutazioni in grado di complementare, amB17 (gene 23) e amE18 (gene 18)**

Ricombinazione tra i cromosomi del fago T4 con le mutazioni amB17 (gene 23) e amH32 (gene 23)

B) mutazioni non in grado di complementare

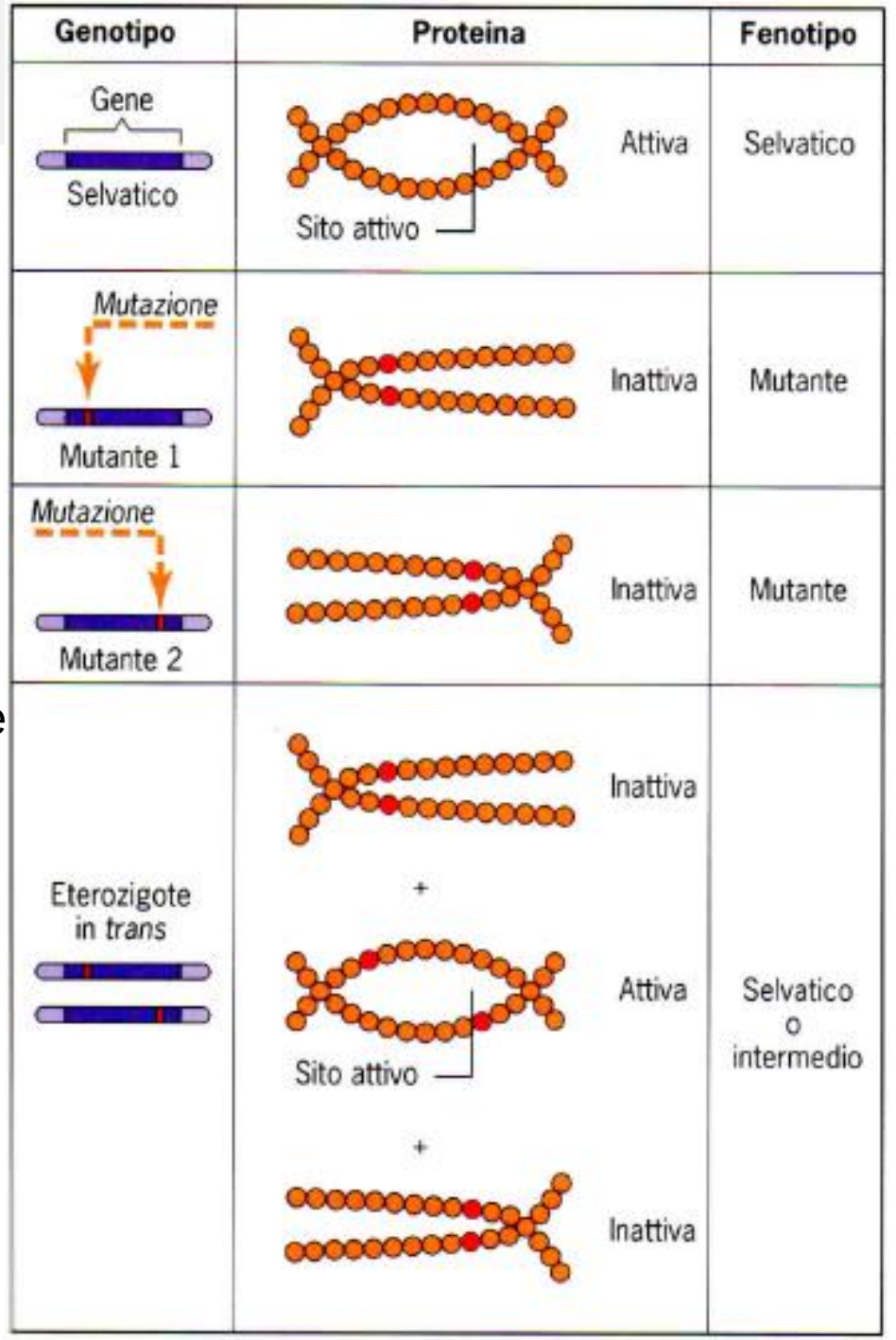


- Mutazioni amB17 e amH32 (entrambe nel gene 23).
- La ricombinazione avviene in entrambi i casi;
- tuttavia, nelle cellule infettate da amB17 e amH32 viene prodotto un numero minore di ricombinanti, in quanto le **due mutazioni sono strettamente associate**.

Complementazione intragenica

- **Complementazione:**
  - **interazione tra i prodotti genici** specificati dai cromosomi che hanno **due mutazioni differenti**,
  - quando sono presenti contemporaneamente nello stesso protoplasma.

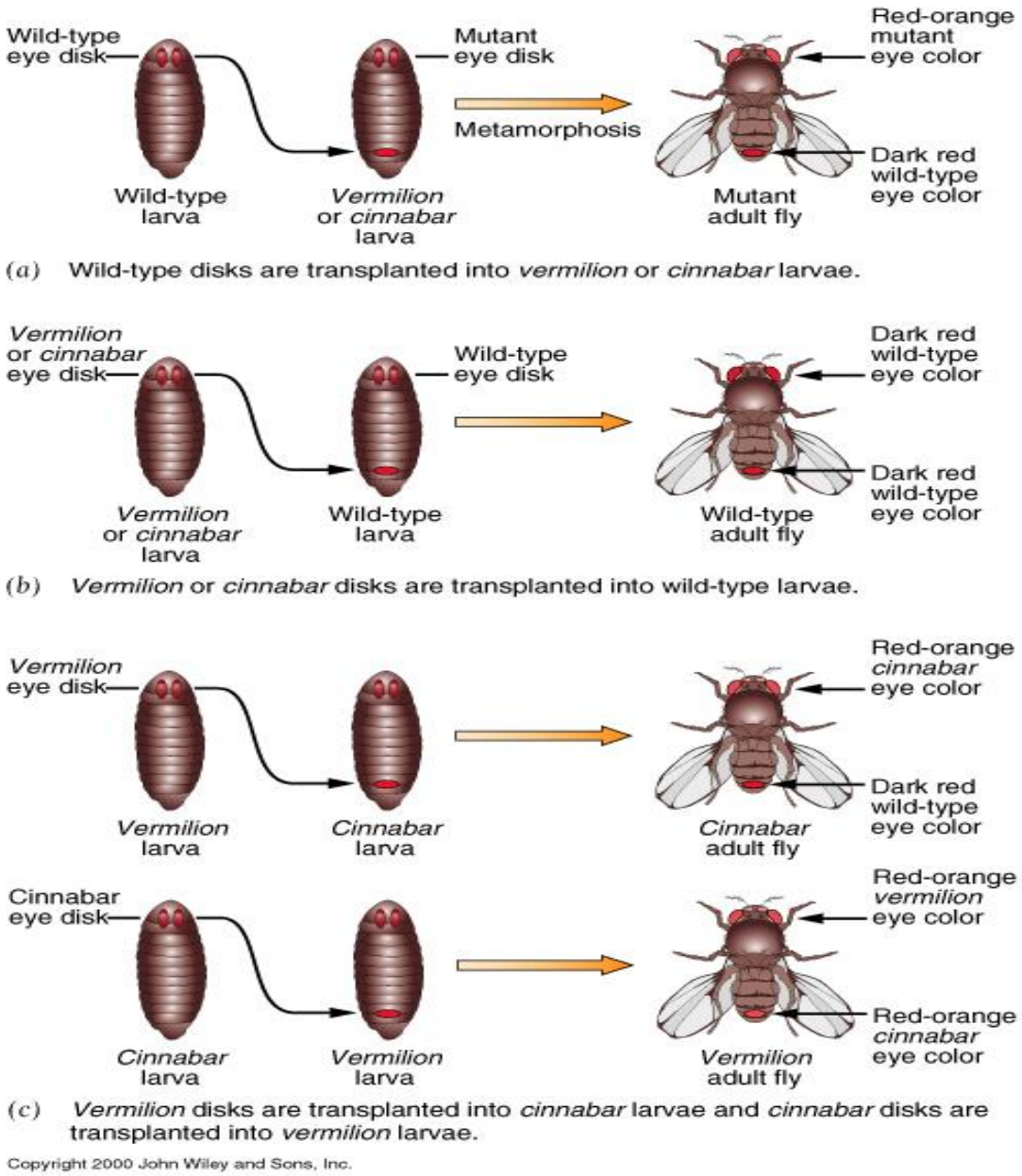
- In alcuni casi **avviene complementazione *intra* genica** quando **la forma attiva di un enzima o di una proteina strutturale è un multimero** che contiene almeno due copie di ogni prodotto genico.
- In questo caso, la forma funzionale dell'enzima è un dimero costituito da due polipeptidi codificati da un unico gene.
- Gli AA alterati dalle mutazioni sono raffigurati da cerchi rossi nelle catene polipeptidiche;
- impediscono la formazione della normale struttura tridimensionale della proteina.



Mutazioni metaboliche in *Drosophila*

(Beadle and Ephrussi)

- Occhi della mosca sono di norma rosso scuro per due pigmenti:
  - **uno rosso brillante**
  e
  - **uno marrone.**
- Mutanti in *v* or *cn* hanno occhi rossi perchè mancano del pigmento marrone.
- Esperimenti di trapianto dei dischi imaginali (abbozzi degli organi) mostrano che **l'ospite wild-type produce una sostanza diffusibile che può permettere a dischi *v* o *cn* di formare occhi rossi scuri.**
- dischi *v* trapiantati in ospiti *cn* pure sviluppano normalmente, ma dischi *cn* trapiantati in ospiti *v* danno ancora occhi rosso brillanti!



Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Spiegazione: *v* e *cn* influenzano differenti passaggi dello stessa vai metabolica

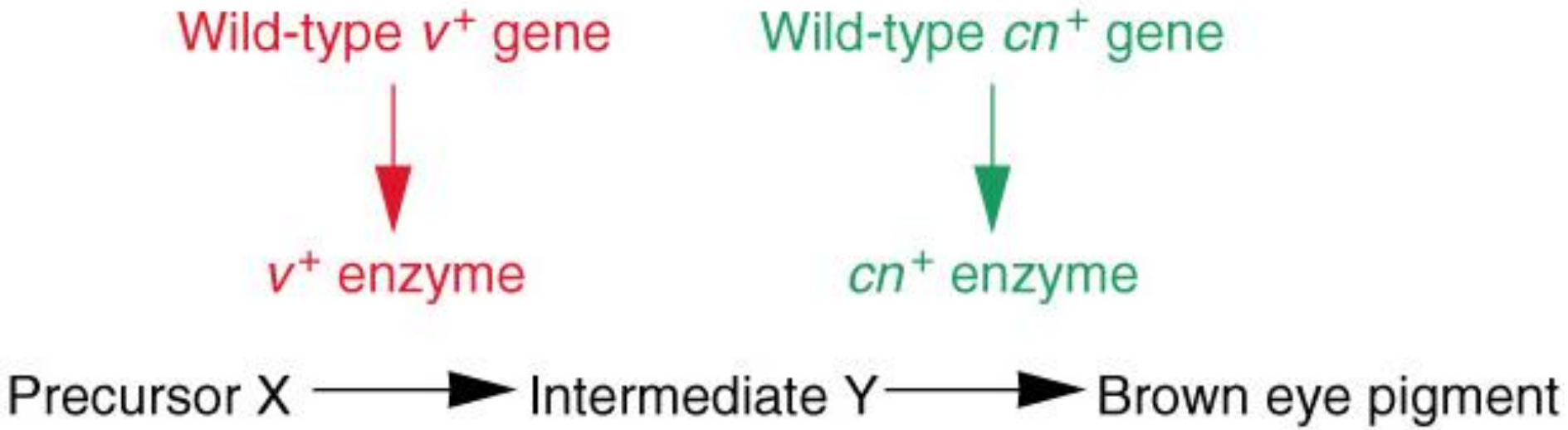
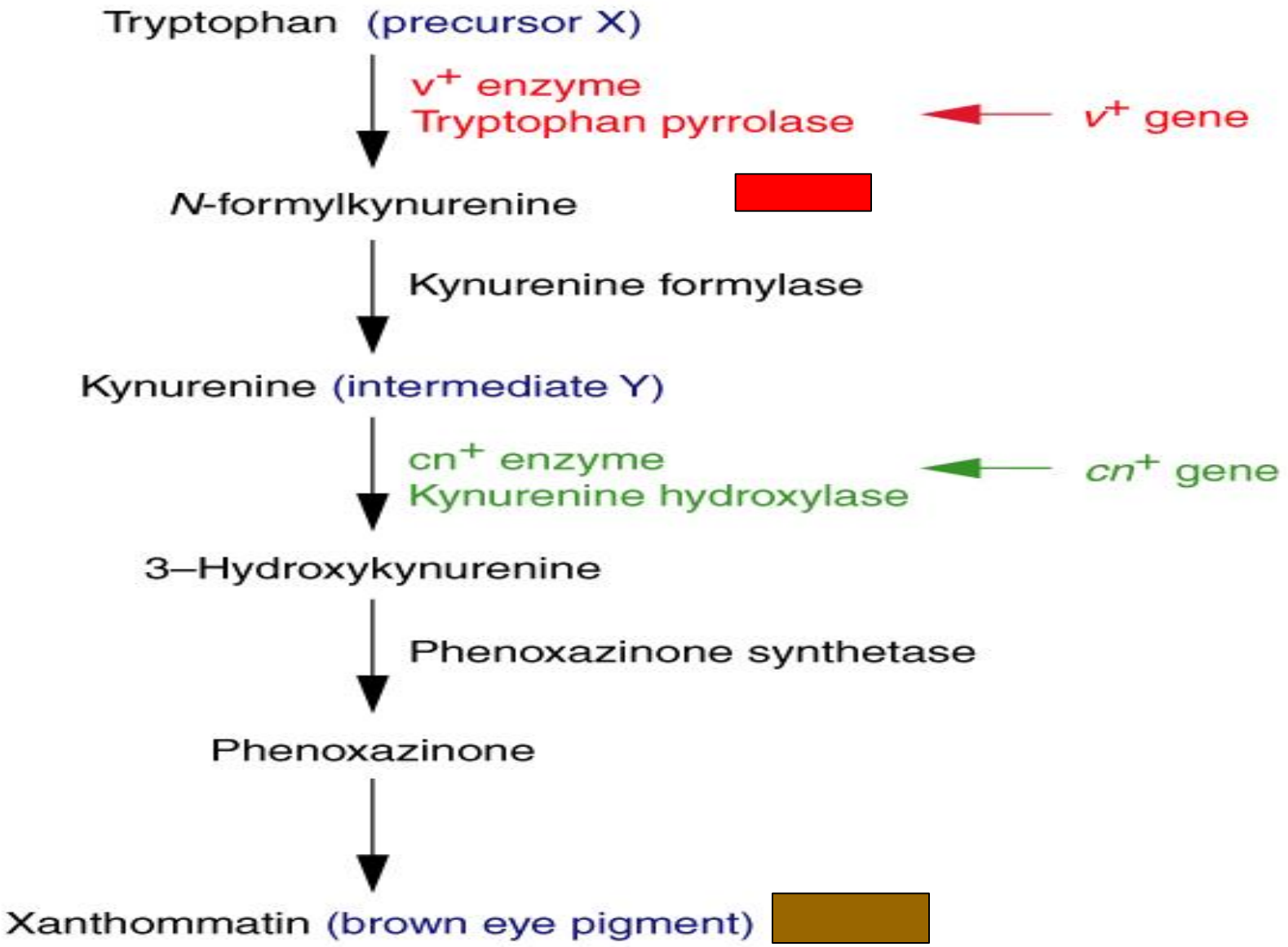


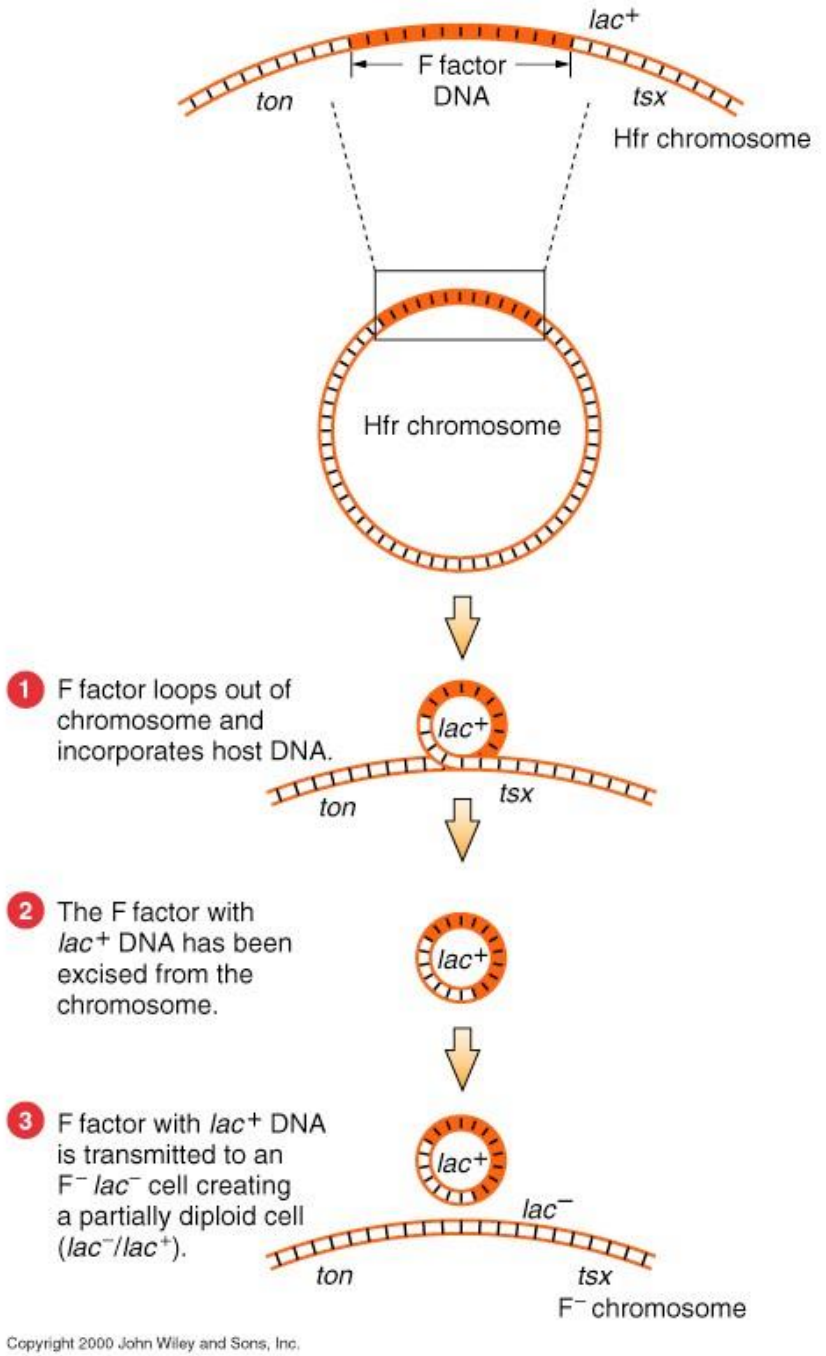
Figure 15.5 Beadle and Ephrussi's interpretation of the results of their reciprocal transplants of *vermilion* and *cinnabar* eye disks in *Drosophila*. They proposed that the v^+ and cn^+ genes control two different steps in the synthesis of the brown eye pigment and that the v^+ gene product acts before the cn^+ gene product.

Oggi è nota la precisa via biosintetica



Test di Complementazione: batteri

- **Nei batteri** il test si effettua costruendo diploidi parziali stabili mediante **sesduzione**



3. TEST di Ricombinazione: Concetto di allele secondo la teoria classica



P occhio bianco (w) × occhio color albicocca (w^{ap})

F_1 occhio albicocca chiaro

Non complementano-→ alleli dello stesso gene.

Pertanto i genotipi sono:

$$P \quad \frac{w}{w} \times \frac{w^{ap}}{w^{ap}}$$

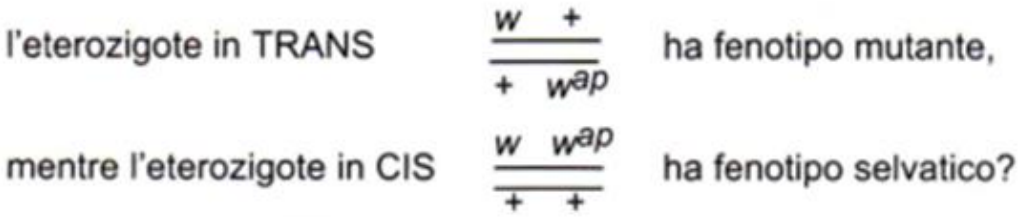
$$F_1 \quad \frac{w}{w^{ap}}$$

TEST di Ricombinazione: Concetto di allele secondo la teoria classica

- **In F2 non** era quindi atteso trovare **alcun ricombinante**.
- Invece, se pure con frequenza molto bassa, si osservarono mosche a fenotipo selvatico!
- Il genotipo dell'eterozigote si dovrebbe allora scrivere più correttamente come:

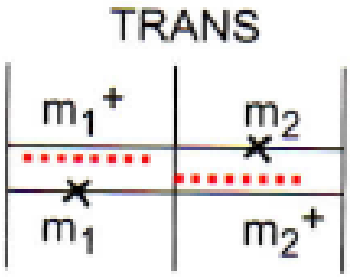


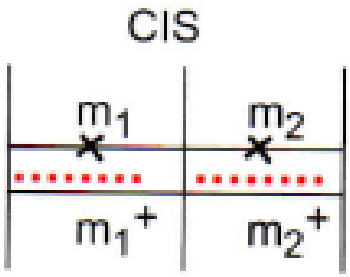
- Quindi l'unità **funzionale non è un monoblocco**, ma può essere suddivisa strutturalmente in unità più piccole.
- . Peraltro, a questo punto sorgeva un altro problema: perchè



TEST di Ricombinazione: Concetto di allele secondo la teoria classica

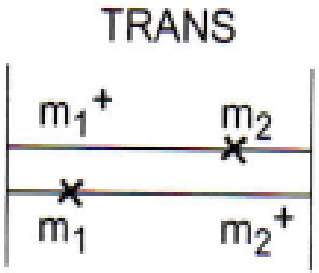
1. *Quando le mutazioni coinvolgono geni diversi, il genotipo è indicato come:*

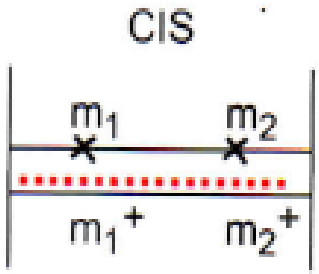




- **geni complementano sia in *CIS* sia in *TRANS***

2. *Quando le mutazioni sono nello stesso gene i genotipi sono:*



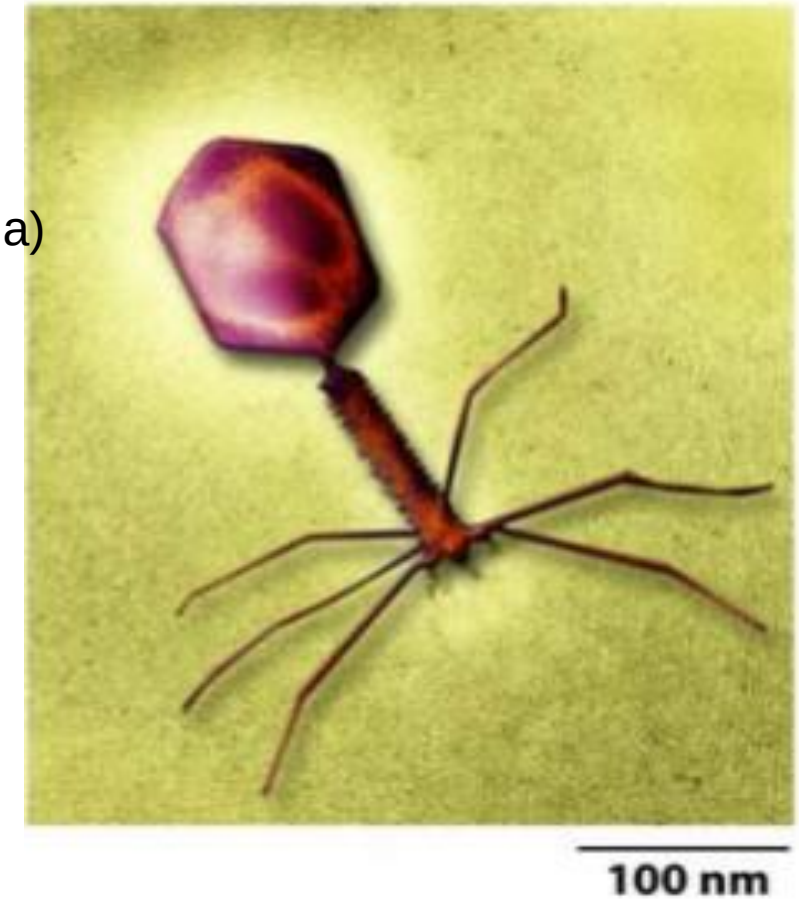


- geni **complementano in *CIS* non in *TRANS***

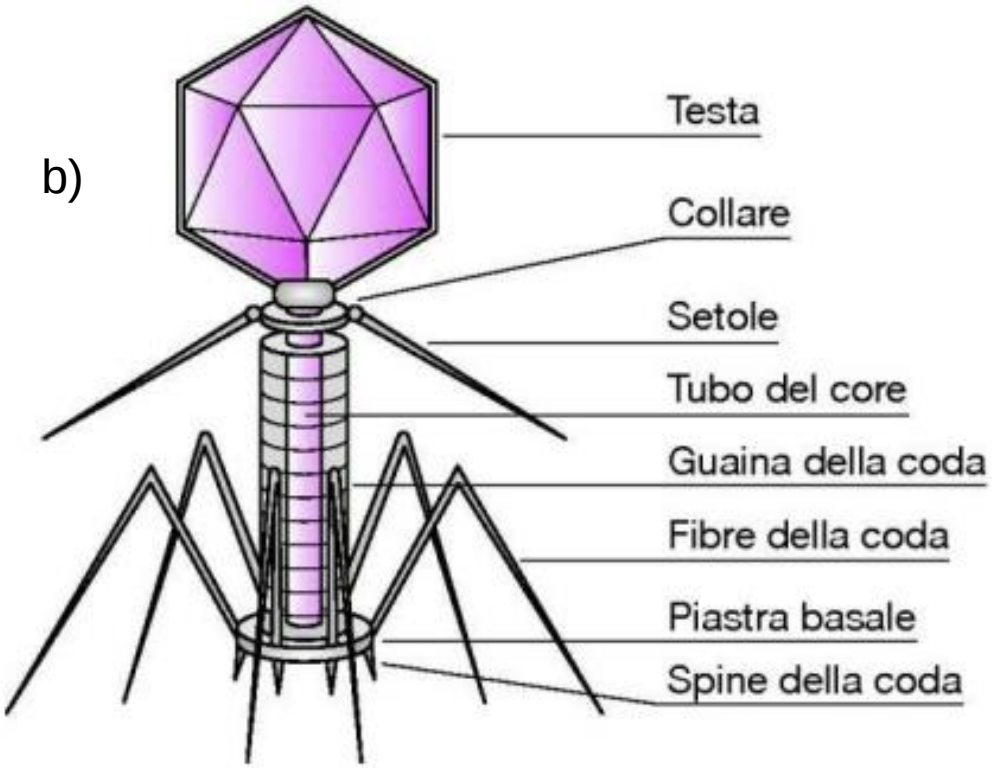
Ricombinazione intragenica nel fago T4

Benzer's (1950s) ha svolto una analisi dettagliata del locus *rII* del fago T4 per produrre una mappa genetica dello stesso.

a)



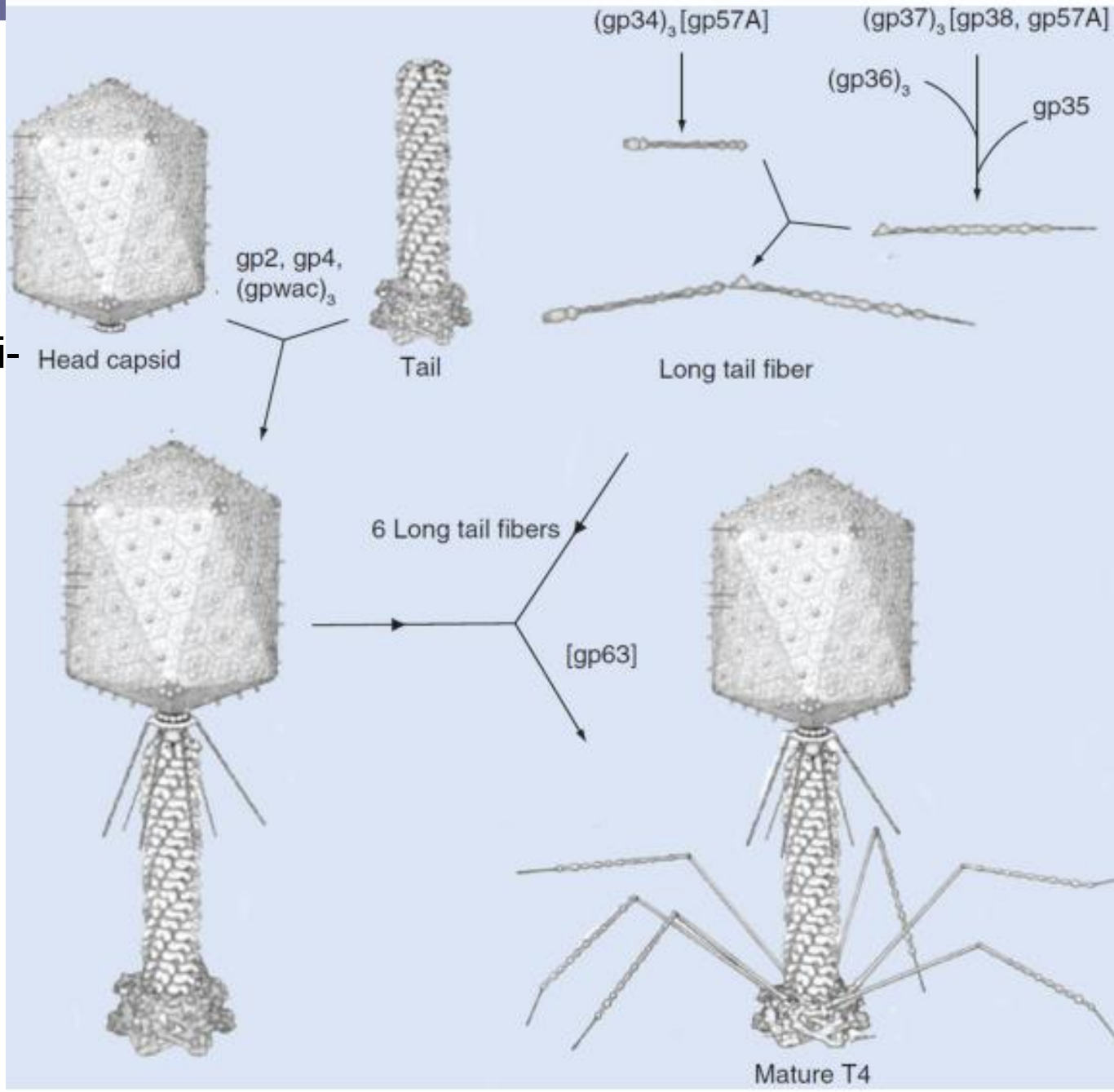
b)



Micrografia elettronica (a) e diagramma (b) che mostrano la struttura del batteriofago T4.

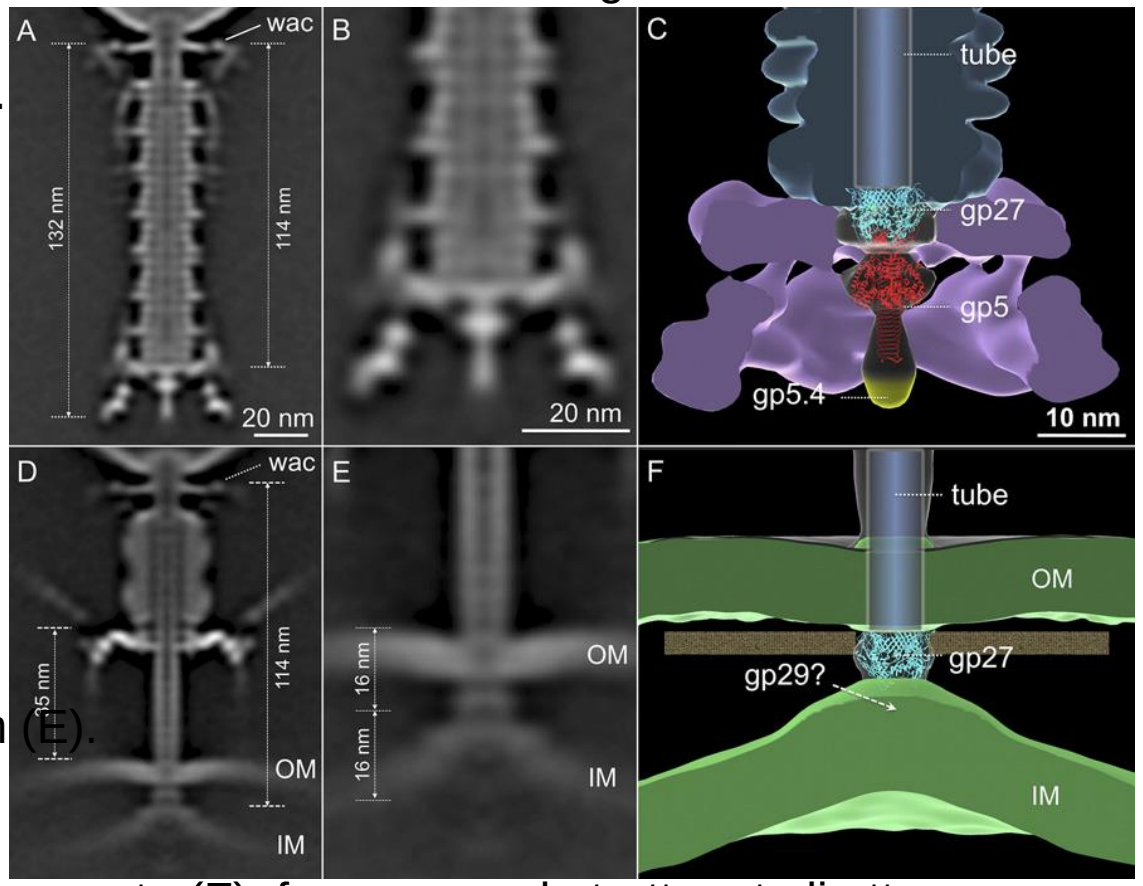
Percorso di assemblaggio del fago T4

- L'assemblaggio di T4 in può essere suddiviso in tre sottoinsiemi indipendenti:
  - testa,
  - coda
  - fibre lunghe della coda
- La coda si lega alla testa a seguito **dall'attacco di fibritina** alla regione del collo.
- Sei fibre lunghe si attaccano quindi alla coda per formare un virione T4 vitale.

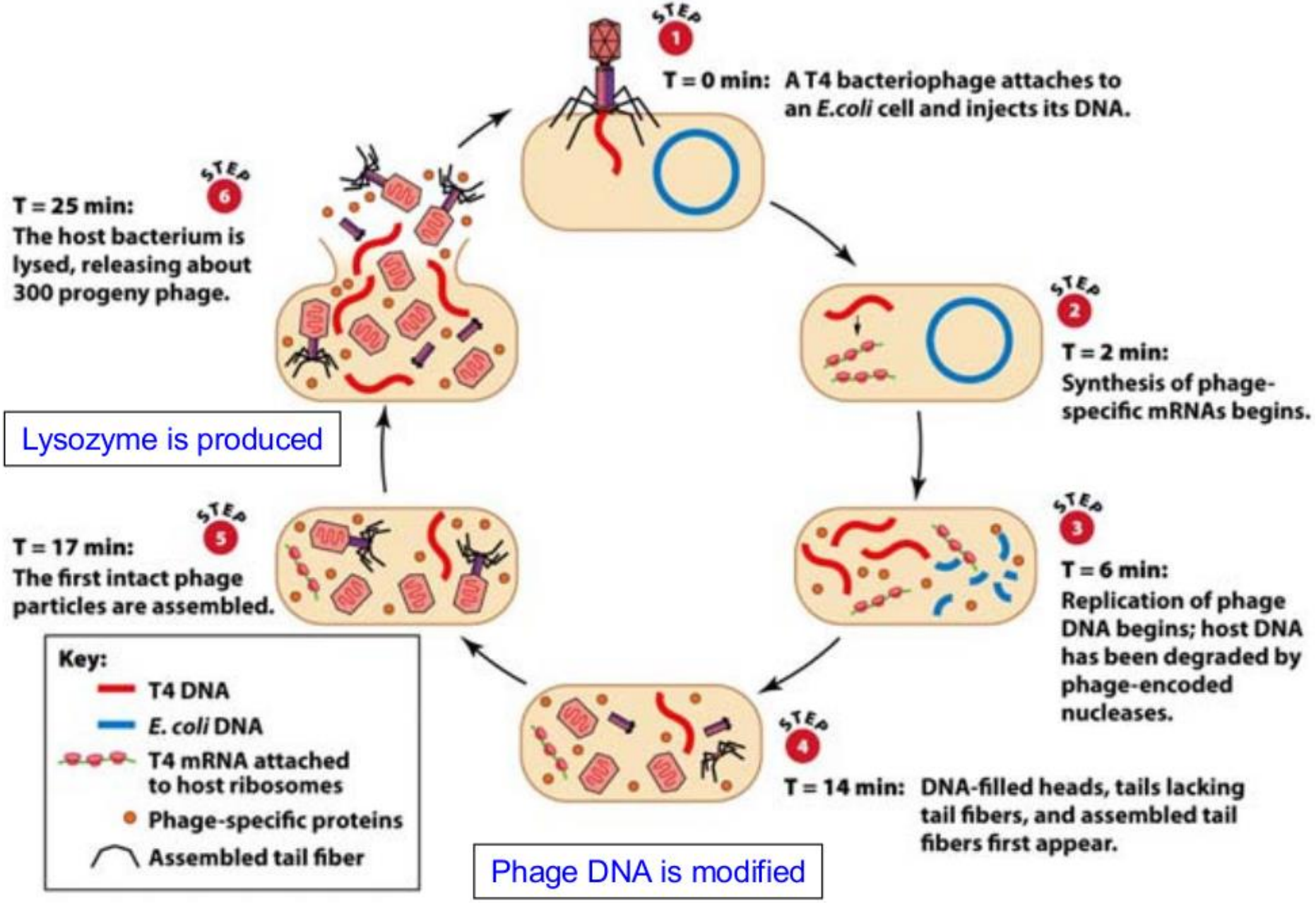


Modello di canale transmembrana in T4.

- La struttura complessa del filamneto della coda nel perno è posizionata nella mappa (C) derivata dai virioni T4 liberi (A; ingrandita in B). gp27, gp5 e la punta dell'ago gp5.4 sono rispettivamente di colore ciano, rosso e giallo.
- Prima della contrazione (A), la coda è di 132 nm in lunghezza.
- Dopo la contrazione (D), il complesso del tubo della coda è di circa 114 nm, con il distale 16 nm all'interno della cellula.
- La coda raggiunge la superficie esterna della membrana interna (IM), che ha subito un cambio conformazionale significativo muovendosi l'esterno di ~ 16 nm (E).
- Considerando la dissociazione di gp5* e gp5C-gp5.4, si propone che gp27 poggi sulla membrana sporgente (F), forse essendo trattenuto li attraverso la sua interazione con la dimensione della proteina gp29 espulsa dal nastro, che potrebbe contribuire alla densità elettronica della membrana.



The lytic life cycle of bacteriophage T4.



Batteriofago T4

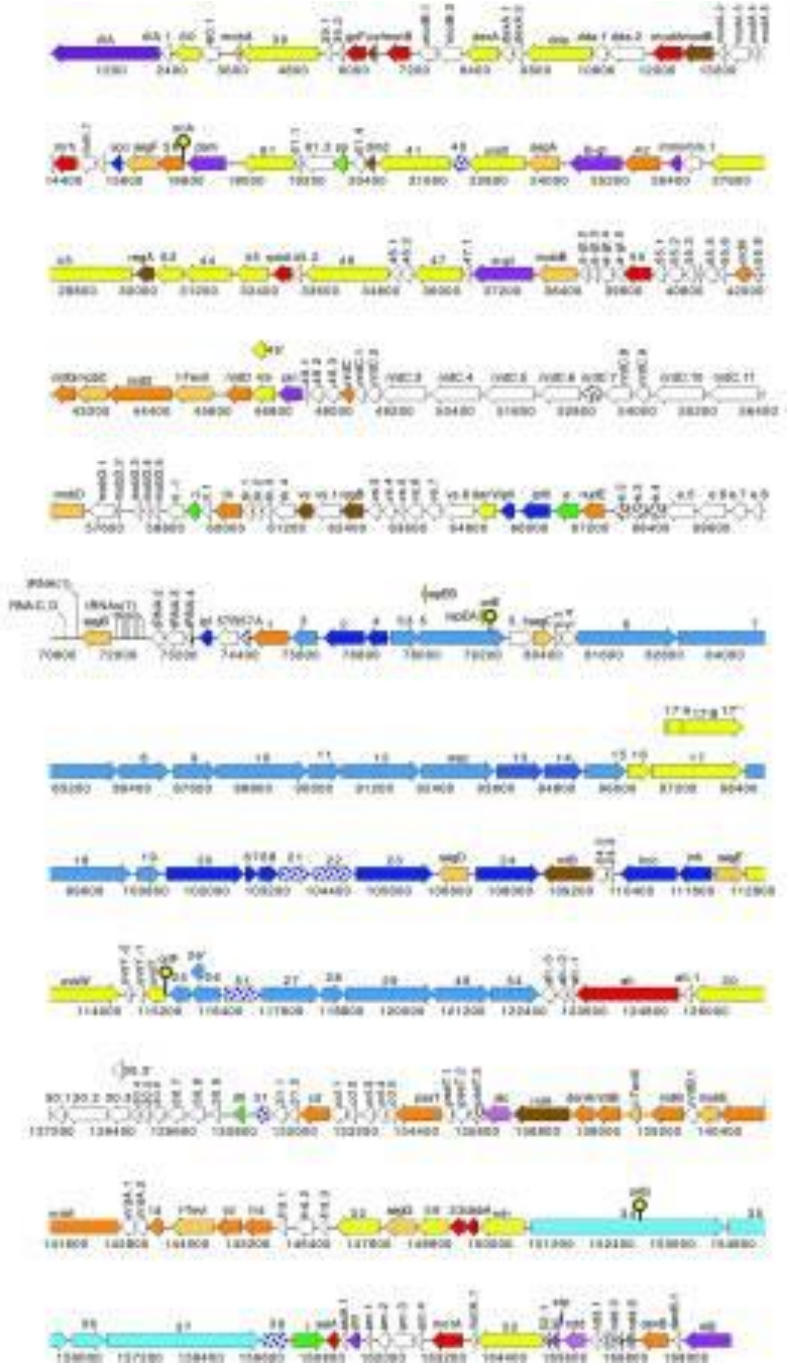
- Batteriofago T4 è un grosso virus che porta la sua informazione genetica in una molecola di DNA a doppio filamento impaccata entro una testa proteaginosa.



- Il suo genoma contiene 168.903 bp e codifica per circa 300 prodotti genici.
- T4 un fago litico; questo indica che segue un ciclo vitale litico riassumibile nei seguenti passaggi:
  1. Iniezione del DNA virale all'interno di una cellula di *E. coli*
  2. Sintesi di specifica mRNA fagici che **codificano proteine che bloccano l'espressione di geni batterici**
  3. Replicazione del DNA del fago.
  4. Sintesi di parti del fago.
  5. Assemblaggio di particelle fagiche.
  6. Lisi del batterio ospite con rilascio di circa **300 progenie fagiche**.

Functional genome map of bacteriophage T4.

The coding capacity of the T4 genome is shown for both characterized and hypothetical ORFs. The color scheme (by gene function) is as defined in Table Table3.3. Origins of DNA replication (ori) indicated are those that are best characterized. Locations of the multiple promoters and terminators can be determined from Table



Functional categories of T4 genes

A. Transcription [red]

asiA, dsbA, goF, modA, motA, motB, mrh, rpbA, srd, srh, 33, 55 (*alc, alt, 45*)

B. Translation [brown]

cef, dmd, modB, regA, regB, vs, rnlA, rnlB (*modA*), tRNAR, tRNAI, tRNAT, tRNAS, tRNAP, tRNAG, tRNAL, tRNAE; *rnaC, rnaD*

C. Nucleotide metabolism [orange]

cd, denA, denB, frd, nrdA,B,C,D,G,H, nudE, pseT, td, tk, 1, 42, 56

D. DNA replication, recombination, repair, packaging, and processing [yellow]

dda, denV, dexA, repEA, repEB, rnh, uvsW, uvsX, uvsY, 16, 17, 30, 32, 39, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 59, 52, 60, 61/58, 62

E. Virion proteins [blue]

Head: *soc, hoc, inh, ipI, ipII, ipIII, 2, 4, 20, 23, 24, 67, 68,* (*22, 21*) [dark blue]

Neck: *13, 14* [medium blue]

Tail: *3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 48, 53, 54* [light blue]

Tail fiber: *wac, 34, 35, 36, 37* (*rnlA*) [pale blue]

Milleret al-. Microbiol Mol Biol Rev. 2003, 67:86

Functional categories of T4 genes (cont)

F. Chaperonins/assembly catalysts [stippled blue]

21, 22, 31, 38, 40, 51, 57A, rnlA

G. Lysis [green]

e, rI, rIII, sp, t (*rIIA, rIIB*)

H. Host or phage interactions [purple]

ac, arn, α-gt, β-gt, dam, imm, pin, rIIA, rIIB, stp, (*gol, pseT, rnlA*)

I. Host alteration/shutoff [pink]

alc, alt, gol, ndd (*denA, denB, modA, modB*)

J. Homing endonucleases and homologs [peach]

I-*Tev*I-III, *mobA-mobE, segA-segG*

K. Predicted integral membrane or periplasmic proteins [squiggle]

denB.-1, e.2, e.3, e.4, ndd.3, ndd.4, ndd.5, nrdC.7, pseT.3, tRNA.4, 47.1, 52.1, 55.8 (*ac, imm, rI, t, 7, 29*)

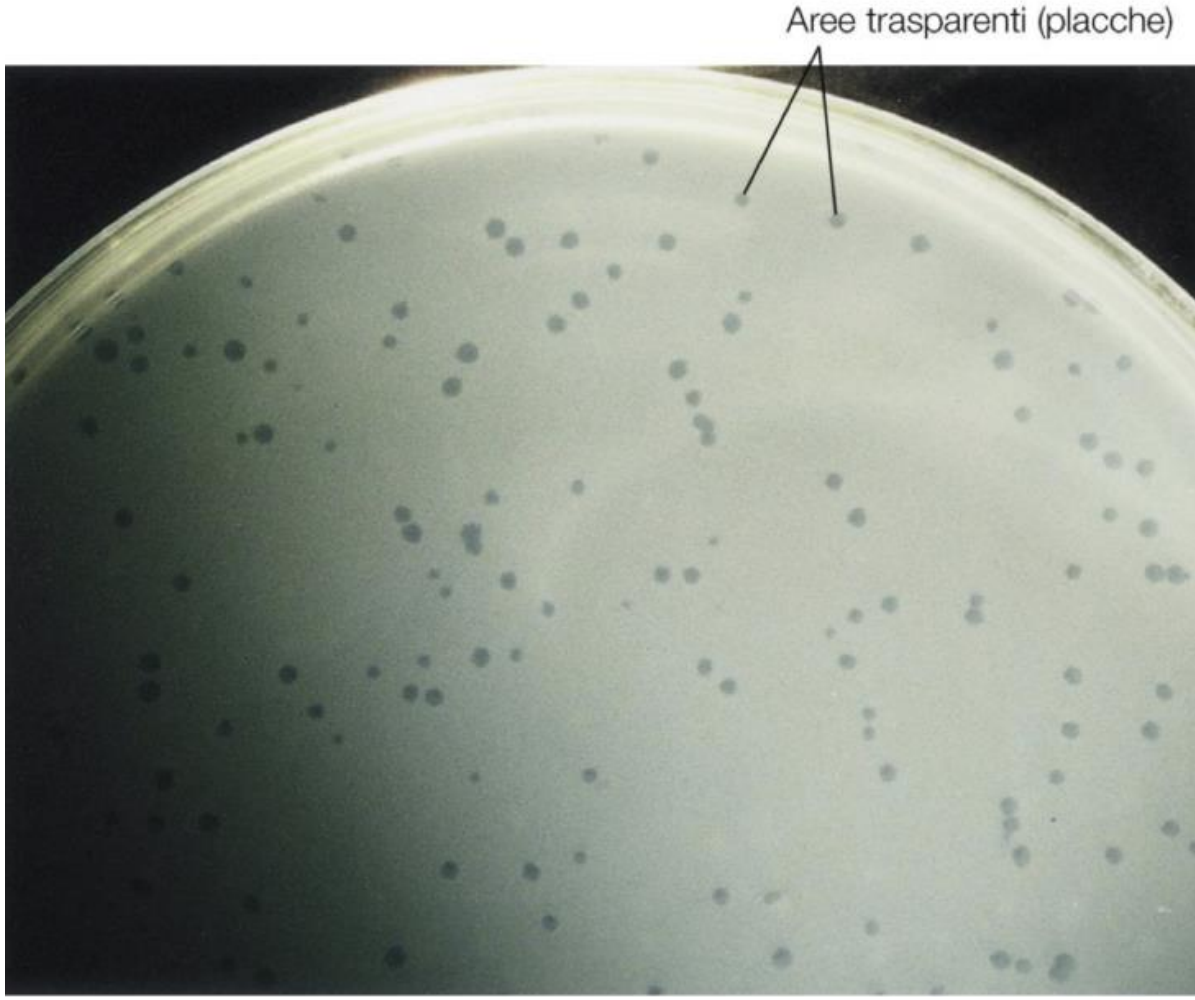
L. Unknown function [white]

Batteriofagi possono essere impiegati nell'analisi genetica

- Si possono incrociare due diversi fenotipi fagici per misurare la ricombinazione e quindi **mappare il genoma virale**

- Un singolo fago attraverso infezioni ripetute

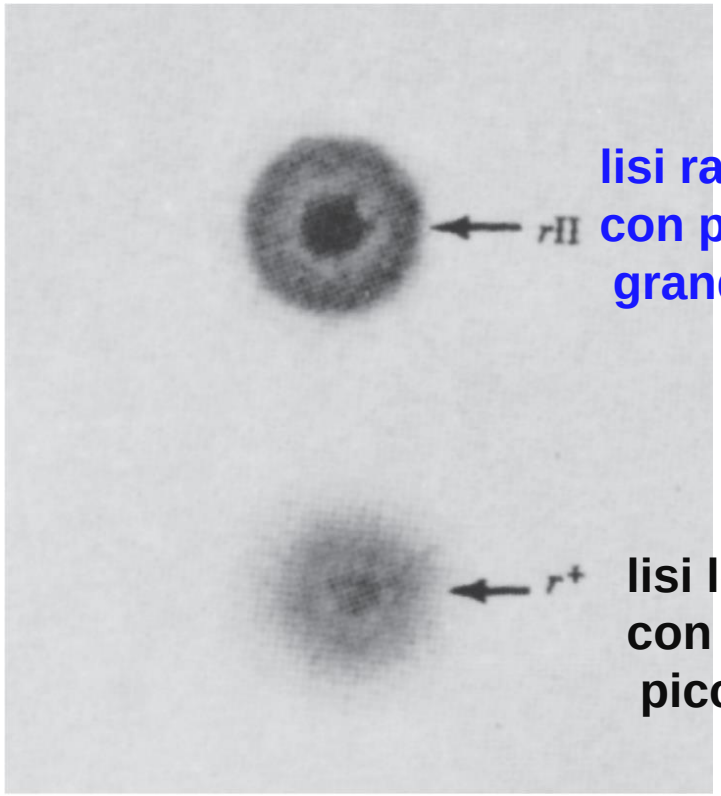
- e produzione di progenie forma una placca (area trasparente) su un tappetto opaco di cellule batteriche



Morfologia della placca e specificità dell'ospite sono alcuni utili marcatori genetici

Fenotipi fagici:

lisi rapida, lisi lenta
***r*II** ***r*$^+$**

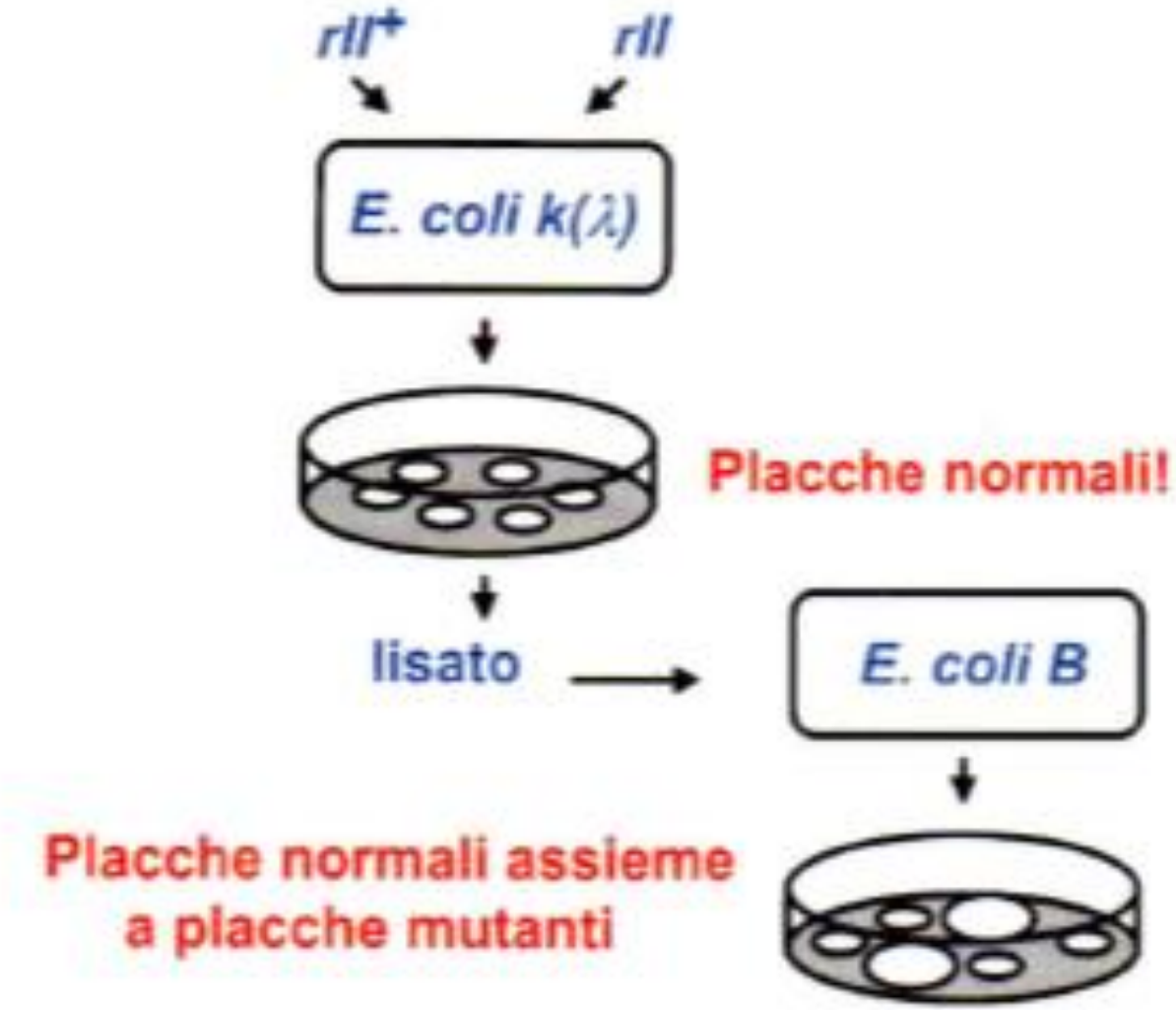


lisi rapida con placche grandi

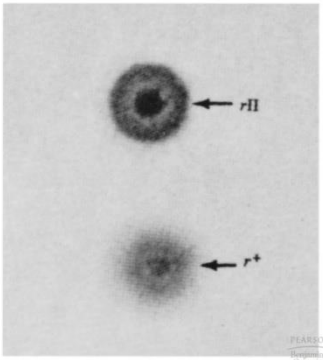
lisi lenta con placche piccole

- **mutanti *rII***, *il* cui fenotipo è lisi rapida (placche di lisi più grandi del selvatico) sono capaci:
  - infettare e lisare solo ceppo B di *E.coli*
  - non infettano ceppo k (λ) che contiene un profago (λ).
- **fagi selvatici *r*$^+$** riescono a lisarle entrambe

2. Test di eterozigosi nel fago T4



Benzer's general procedure for determining the number of r^+ recombinants from a cross involving two *rII* mutants of T4



rII mutant 1

rII mutant 2

E. coli B cells

Progeny

rII mutant 1	*rII* mutant 2	Double mutant 1, 2	Wild type r^+

Parental types

Recombinant types

Samples of progeny phages plated on lawn of *B*

Samples of progeny phages plated on lawn of *K12*(λ)

E. coli B cells

All four phage types can grow in *E. coli B*

Only r^+ recombinant phage can grow in *E. coli K12*(λ)

Incubation at 37°C: formation of plaques

Plaques of the three *rII* phage types and of the r^+ phage type

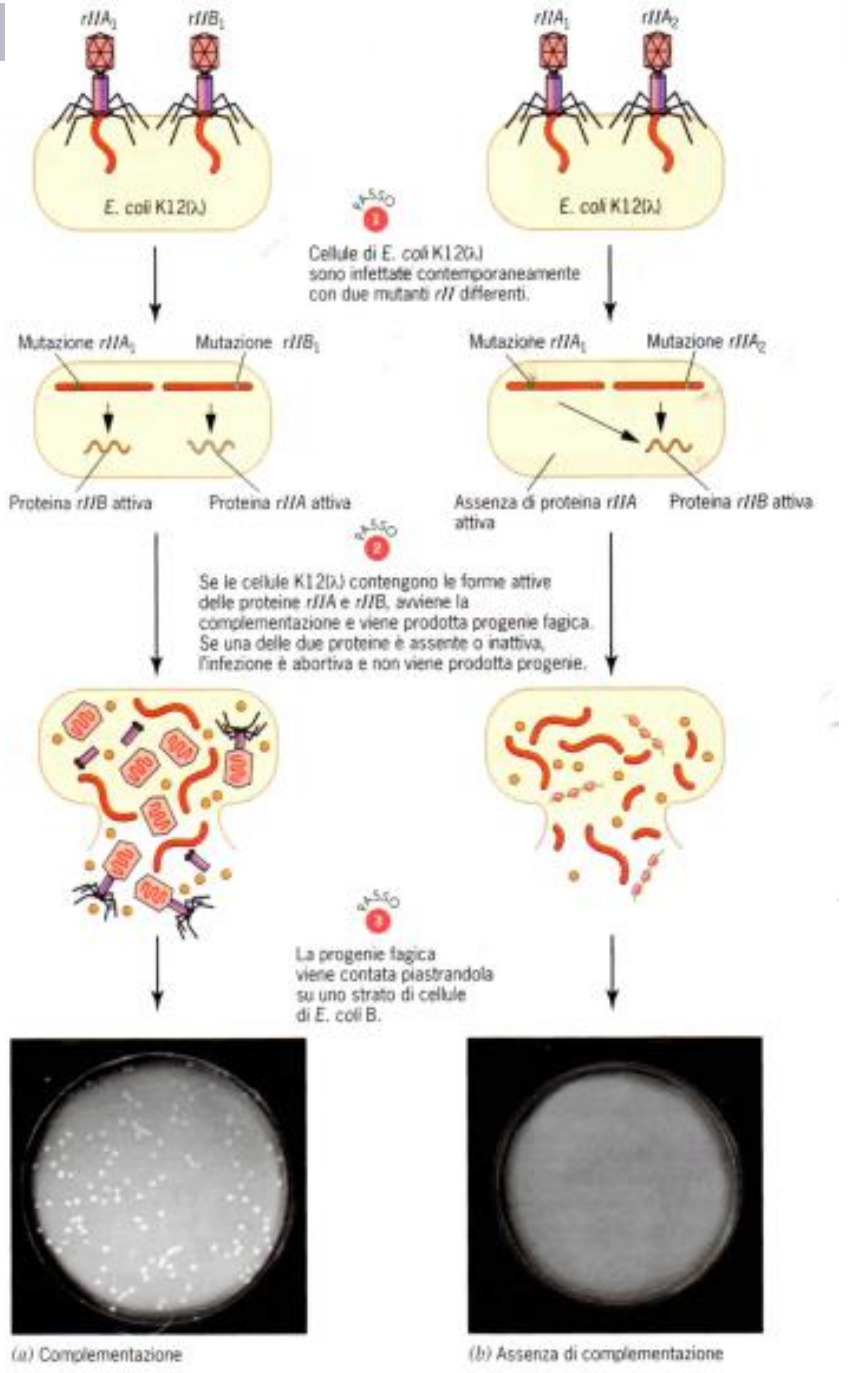
Plaques of r^+ phage

Test di complementazione tra mutanti *rII del fago T4.*

- Le cellule di *E. coli K12(λ)* sono Infettate contemporaneamente con due mutanti *rII* differenti.

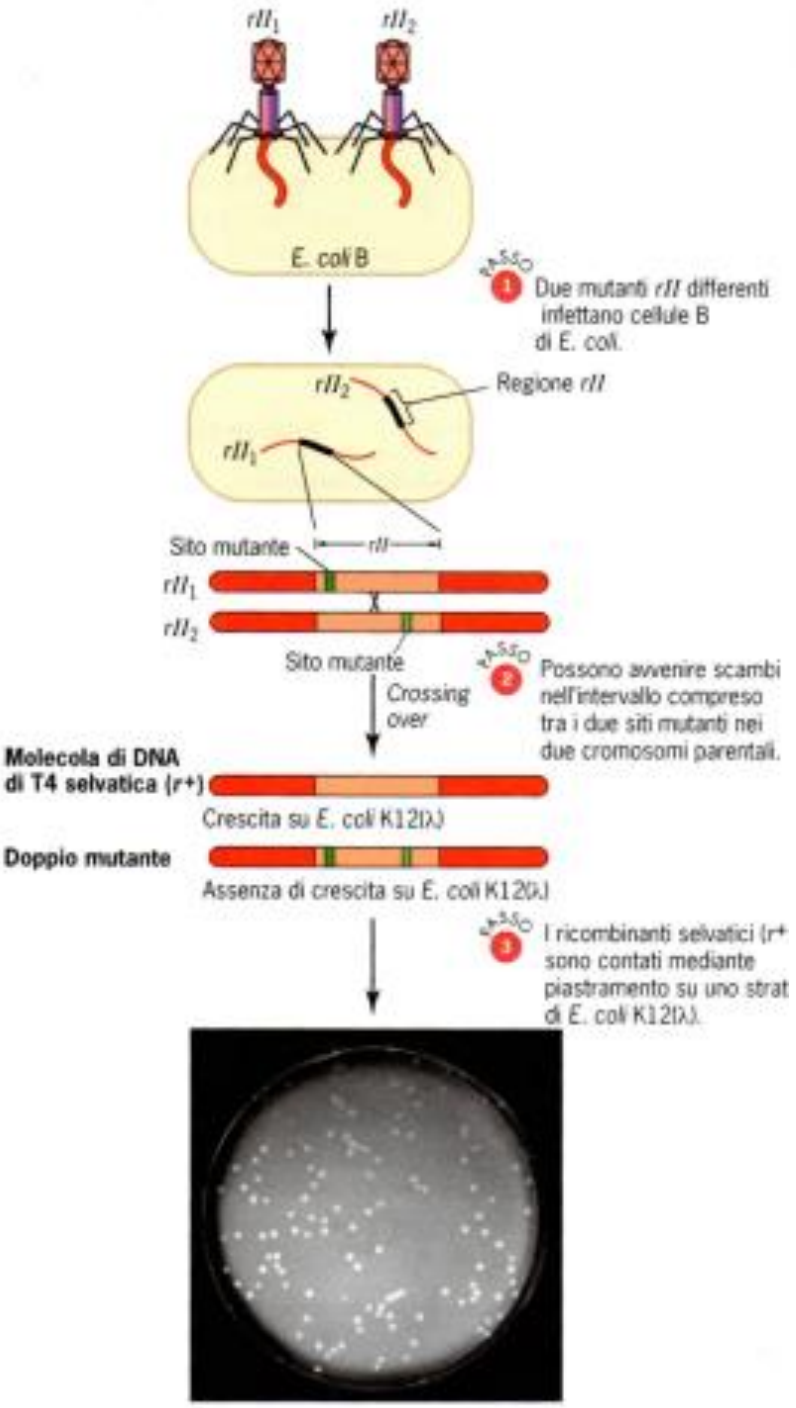
a) Se le due **mutazioni sono in geni differenti**, avverrà **complementazione** e **sarà prodotta una progenie fagica .**

b) Se le due **mutazioni sono nello stesso gene**, **non complementano** e **non sarà prodotta una progenie fagica**

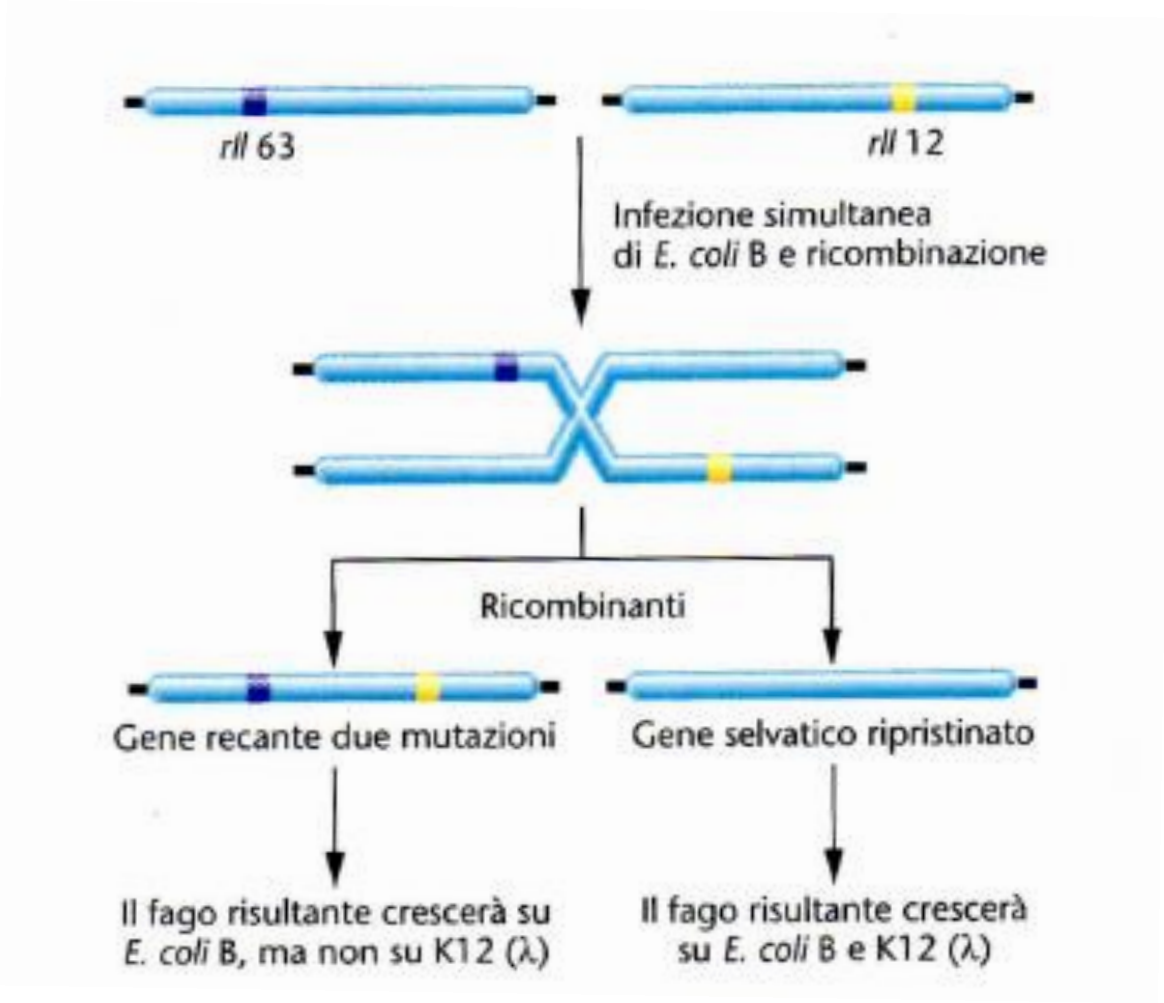


Incrocio in cui cellule di *E. coli B* infettate con due fagi T4 mutanti *rII* isolati indipendentemente.

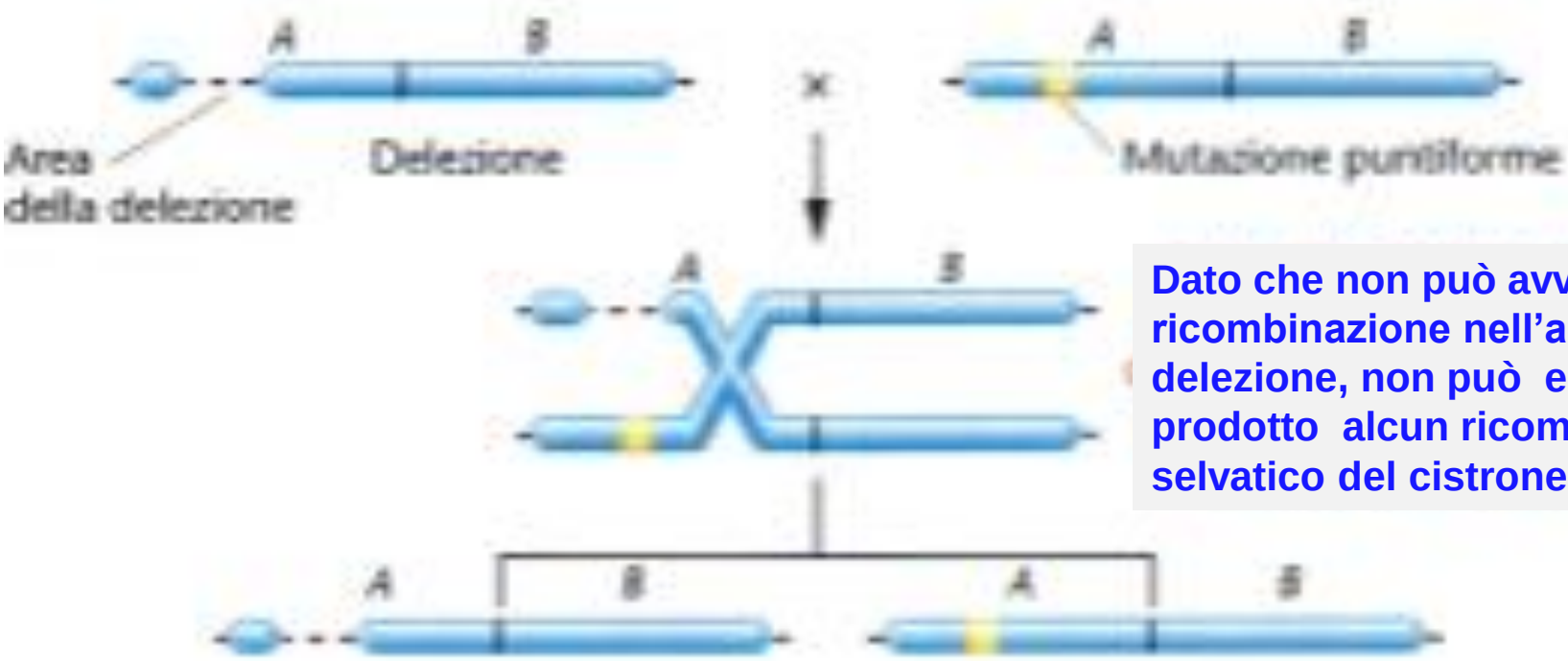
- La progenie ricombinante è selvatica (*r*+) e doppiamente mutante.



Ricombinazione intragenica tra due mutazioni del locus *rII del fago T4.*



Dimostrazione che la ricombinazione tra un cromosoma fagico con una delezione nel cistrone A e un altro fago con una mutazione puntiforme sovrapposta a tale delezione non può produrre un cromosoma con cistroni A e B selvatici.



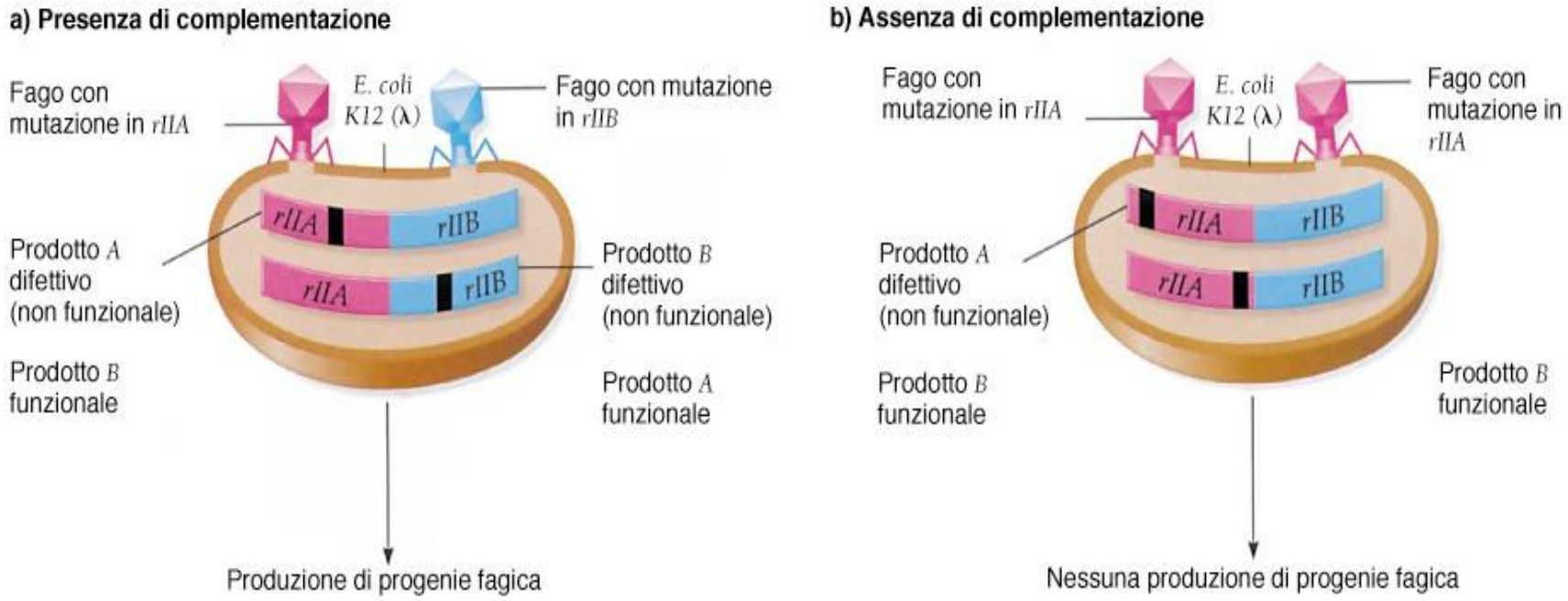
Dato che non può avvenire ricombinazione nell'area della delezione, non può essere prodotto alcun ricombinante selvatico del cistrone A

Saggio di Benzer

- Isolamento di circa 3000 mutanti *rII*
- test a coppie per vedere se erano allelici o no

	rII	*rII*$^+$
K(λ)	assenza di lisi	placche piccole margini irregolari
B	placche grandi margini netti	placche piccole margini irregolari

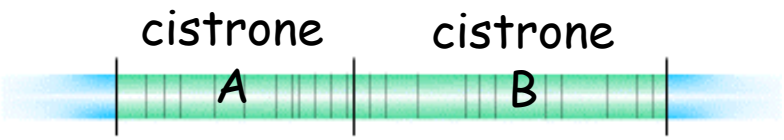
Benzer fece delle doppie infezioni nel ceppo di *E. coli K(λ)*



- Dai dati di complementazione capì che le **mutazioni *rII* mappavano in due unità di funzione il cistrone A ed il cistrone B**

- **I mutanti del cistrone A non complementavano** tra loro
  - ma **complementavano con tutti i mutanti del cistrone B**.
  - I mutanti del cistrone B non complementavano tra loro ma complementavano con tutti i mutanti del cistrone A.

Locus rII



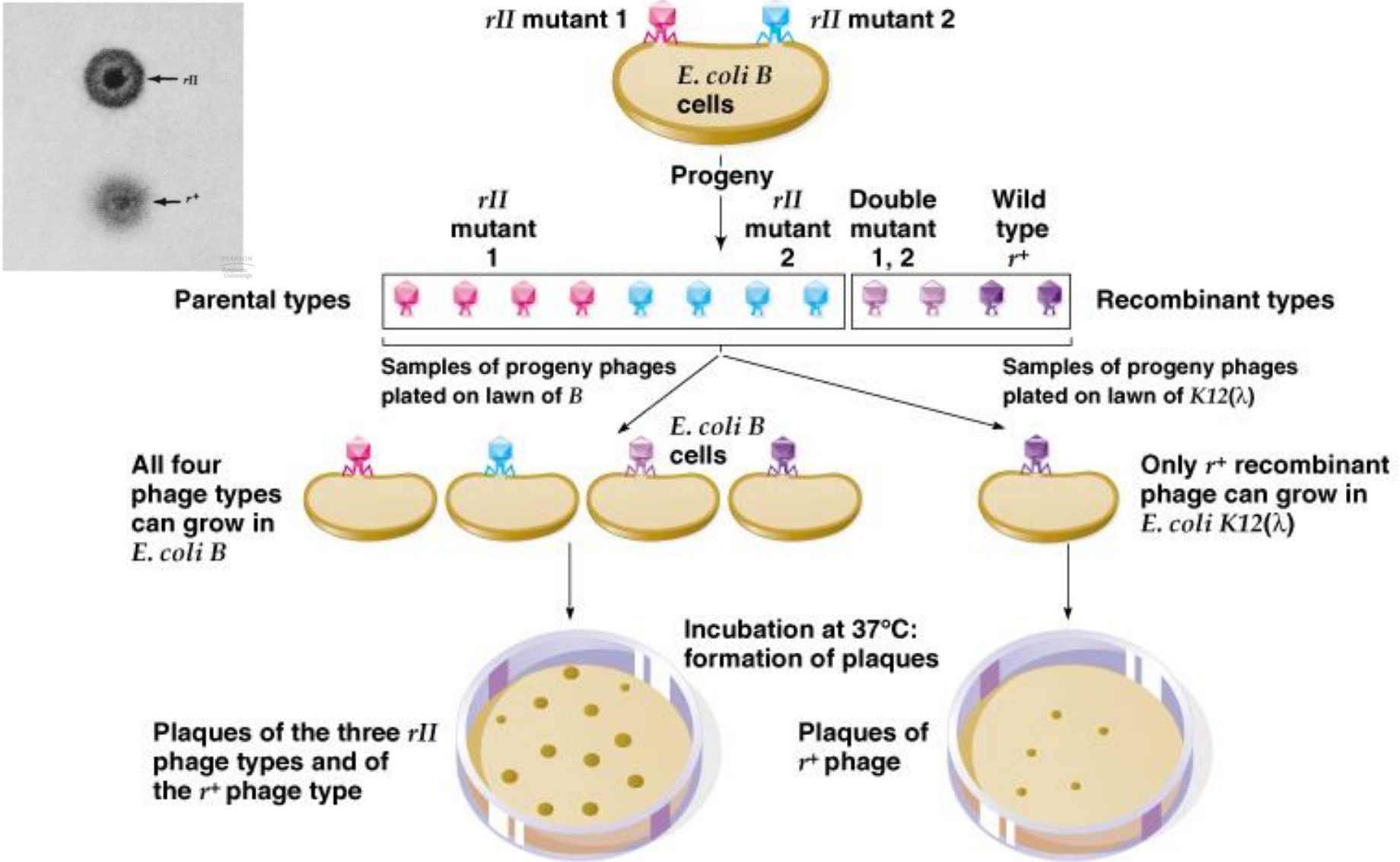
- Il numero dei mutanti assegnati a ciascun cistrone risultò più o meno lo stesso (circa 1500)

- Benzer fece doppie infezioni con coppie di mutanti *rII* (tutti appartenenti allo stesso cistrone) sul **ceppo B**
  - quindi il lisato fagico ottenuto lo piastrò sul **ceppo K (λ)**

(sul quale potevano crescere solo i ricombinanti selvatici)

- ed ottenne **ricombinanti selvatici che** si erano originati **da ricombinazione intragenica.**

Fig. 18.17 Benzer's general procedure for determining the number of r^+ recombinants from a cross involving two *rII* mutants of T4

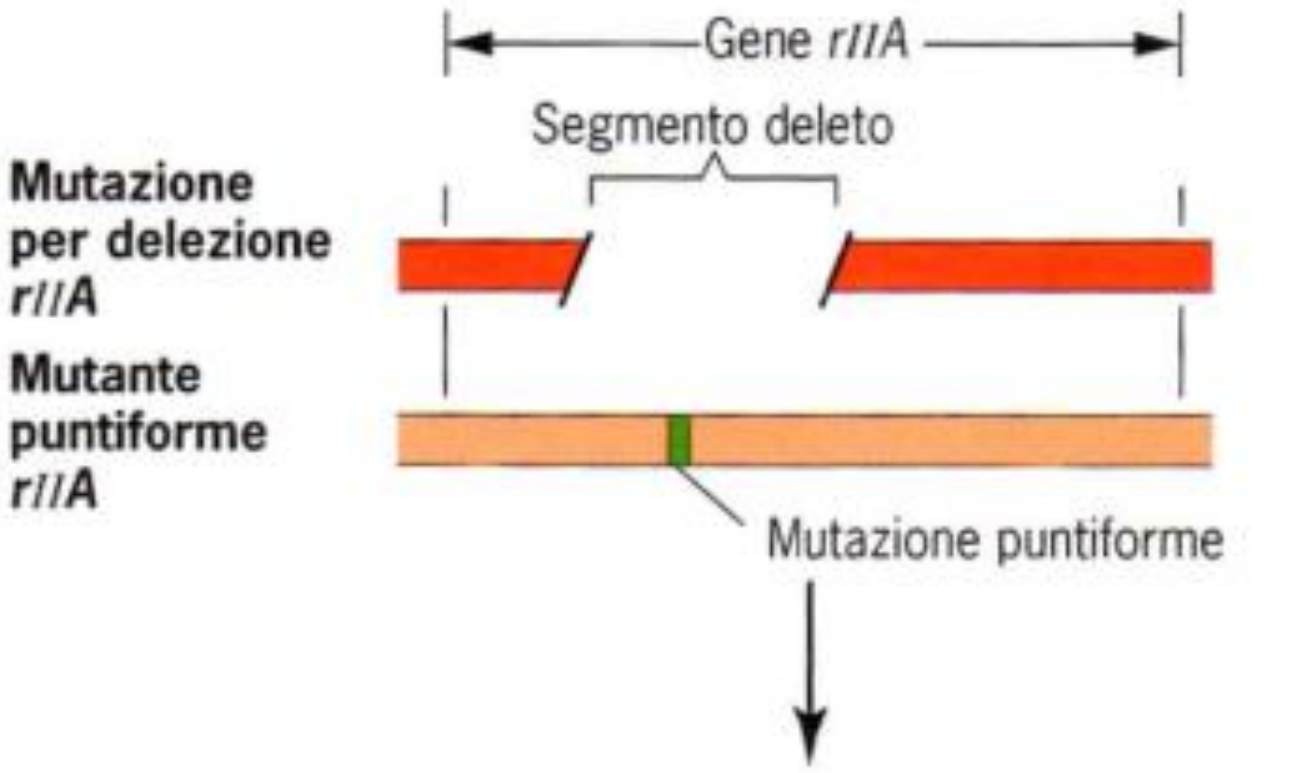


I dati di Benzer confermarono che la ricombinazione può avvenire anche tra siti all'interno di uno stesso gene.
(Questi siti furono chiamati **reconi)**

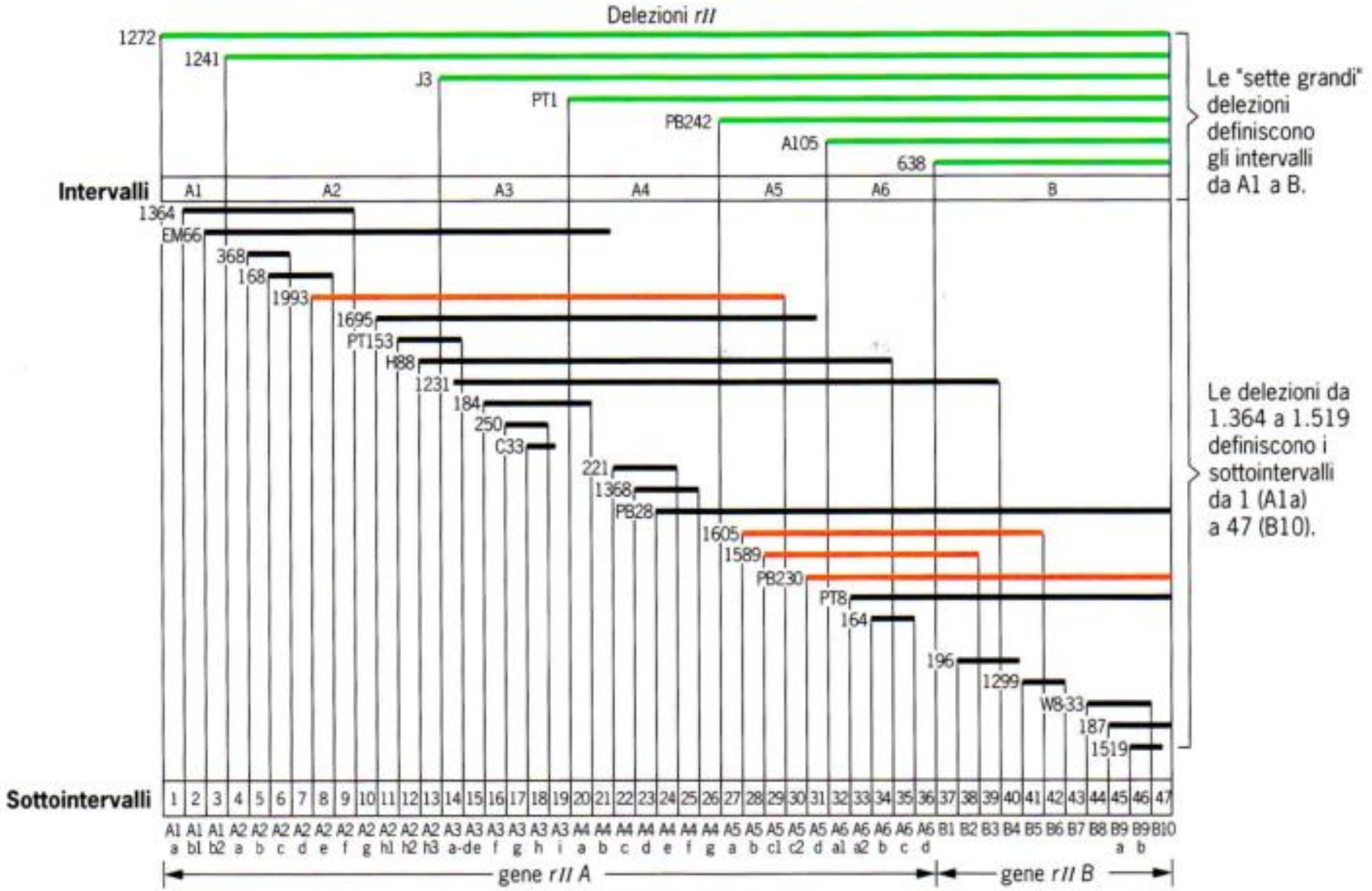
frequenza di ricombinazione tra due alleli = $\dfrac{\text{ricombinanti } rII+ \times 2}{\text{numero totale della progenie}}$

numero di placche presenti sul ceppo B

Incrocio tra un mutante puntiforme *rIIA* e un mutante per delezione rIIA.



I mutanti per delezione *rII del fago T4 utilizzati da Benzer*.



Le delezioni mostrate in arancione definiscono le quattro sottoregioni della regione A5 .

Procedura di Benzer della mappatura per piccole delezioni.

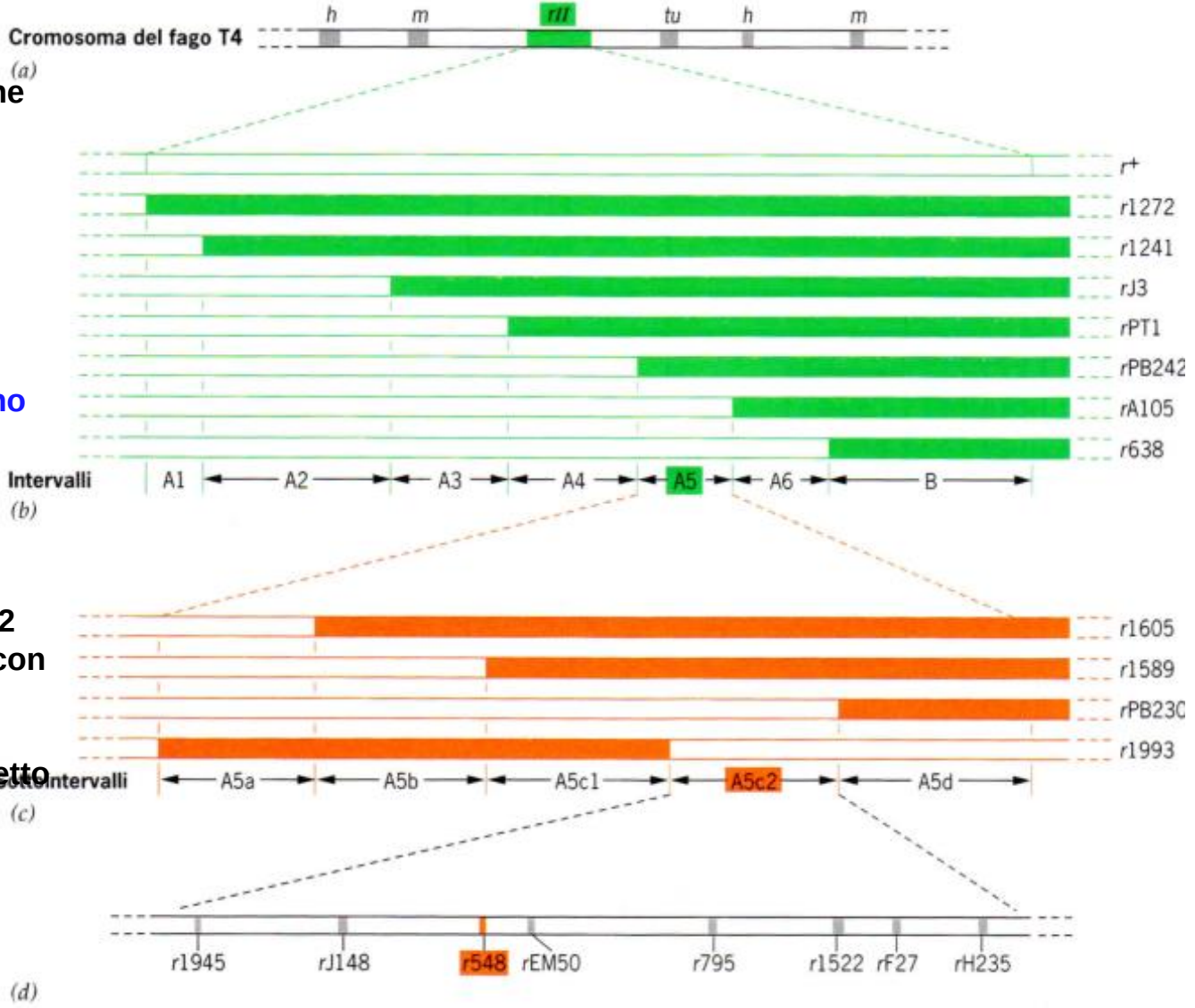
Il mutante r548 è utilizzato per illustrare come una mutazione puntiforme rII possa essere mappata con questa metodica,

***A*) Mappa di una piccola regione del cromosoma del fago T4 che comprende il locus rII.**

B) Le "sette grandi" delezioni sono state utilizzate per mappare r548 nell'intervallo A5.

C) Il mutante r548 è stato poi mappato nel sotto-intervallo A5c2 sulla base dei risultati di incroci con delezioni che terminavano nell'intervallo A5.

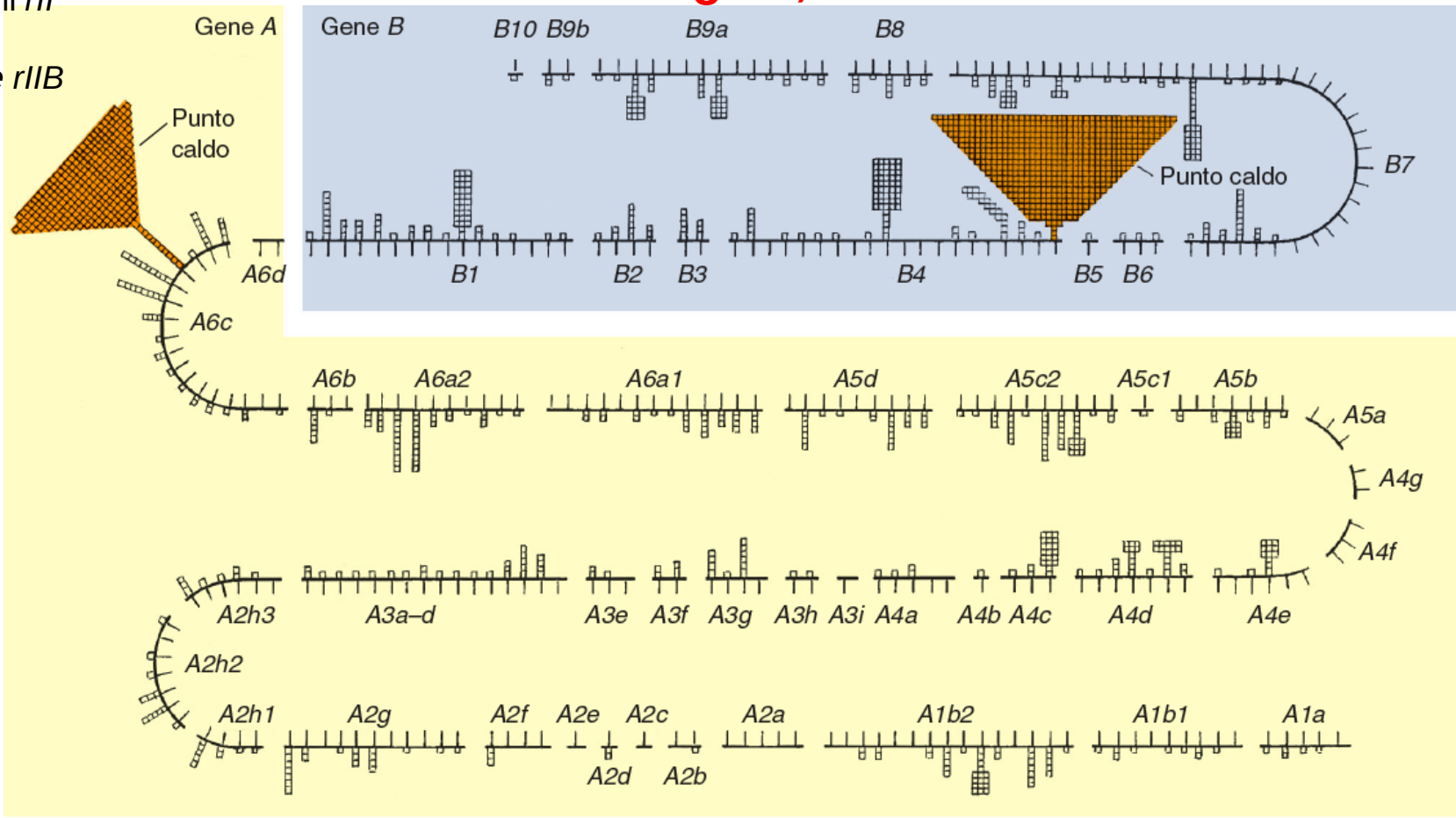
(d) La localizzazione di r548 rispetto ad altre mutazioni puntiformi nel sottointervallo A5c2 è stata determinata allestendo classici incroci a due e a tre fattori con queste mutazioni.



Mappa genetica del locus *rII* del fago T4.

Il locus contiene due geni, *rIIA e rIIB.*

2400 mutazioni *rII*
308 siti distinti
dei geni *rIIA e rIIB*



FR: 0,02%
2,3 bp

rIIA =2175 bp
rIIB.= 936 bp

➢ Ogni quadratino rappresenta la frequenza indipendente di una data mutazione spontanea nel sito. Le linee verticali in cui non compaiono quadratini rappresentano le posizioni definite da mutazioni indotte da mutageni. Alcuni siti, definiti punti caldi (hot spot), mutano con frequenze molto elevate.

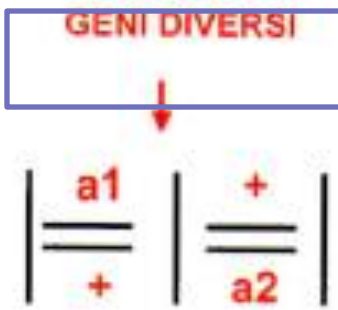
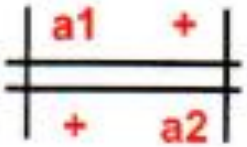
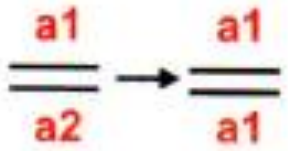
I dati suggeriscono che il limite fisico definito dalla più piccola unità di ricombinazione **(il recone)** coincideva con la singola **coppia nucleotidica**

Funzioni e fenotipi mutanti dei prodotti genici di T4

- ***rIIA.*** Proteina associata alla membrana (82,0 kd); influenza l'ATPasi della membrana dell'ospite. Lisi rapida

- ***rIIB*** Proteina associata alla membrana (32,4 kd); influenza l'ATPasi della membrana dell'ospite. Lisi rapida;

Caratteristiche tra alleli funzionali e strutturali

GENI DIVERSI	ALLELI DELLO STESSO GENE	STESSO ALLELE
		
Mappano in regioni diverse	nella stessa regione	nello stesso sito
Segregano o **ricombinano**	non segregano ma raramente ricombinano: a1 a2 / + +	non segregano non ricombinano
Complementano in CIS e in TRANS	complementano in CIS ma *non* in TRANS	non complementano mai
Controllano: tappe diverse dello stesso cammino	la stessa tappa (forme diverse dello stesso enzima)	la stessa tappa (un solo enzima)

Sintesi

- L'esistenza di un elemento genetico di base, il gene, che controlla uno specifico carattere fenotipico fu stabilita dal lavoro di Mendel del 1866.
- Durante lo scorso secolo, il concetto di gene si è evoluto:
  - dall'ipotesi del filo di perle non divisibili per ricombinazione o mutazione
  - a quella di sequenza di coppie nucleotidiche che codifica una catena polipeptidica o una molecola di RNA.
- Il test di complementazione, o test cis- trans, consente di definire il gene operativamente;
- è utilizzato per stabilire se le mutazioni si trovino nello stesso gene o in geni differenti.
- La **complementazione intragenica** può verificarsi quando **una proteina è un multimero** contenente almeno due copie di un prodotto genico.

- L'unità del materiale genetico **non è divisibile per ricombinazione o mutazione al di sotto della singola coppia nucleotidica.**