

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"

gene A gene B gene C gene D

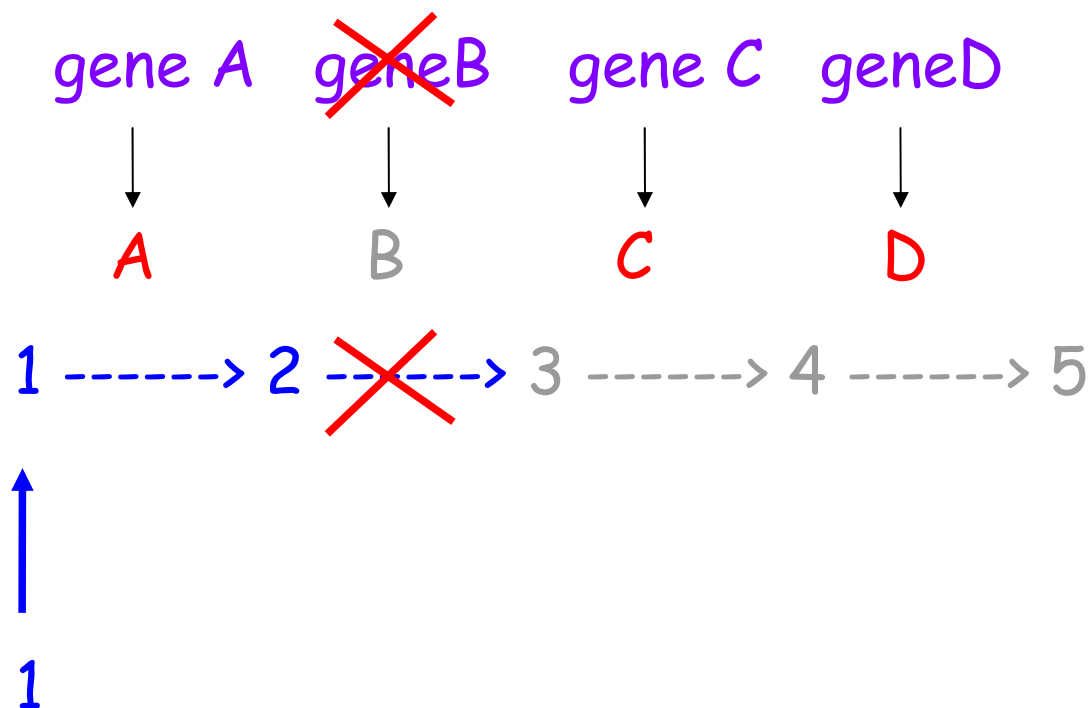


Se un mutante è bloccato in una tappa di una via metabolica, non sarà in grado di sintetizzare i prodotti intermedi che si trovano a valle del blocco:

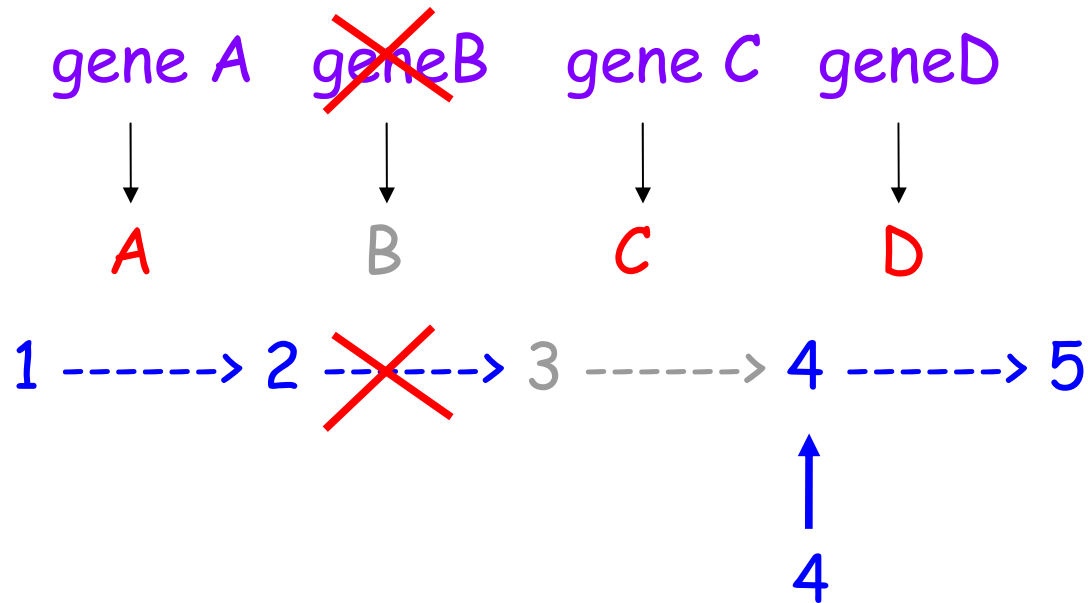
gene A ~~gene B~~ gene C gene D



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

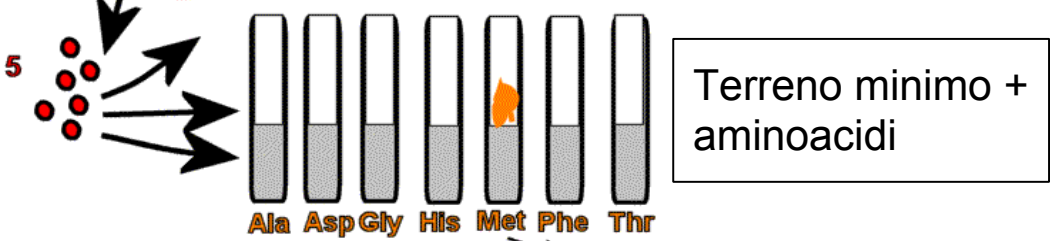
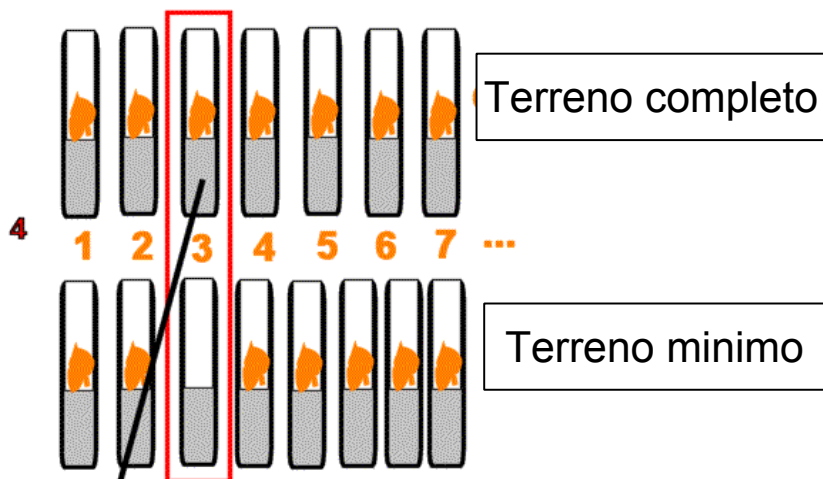
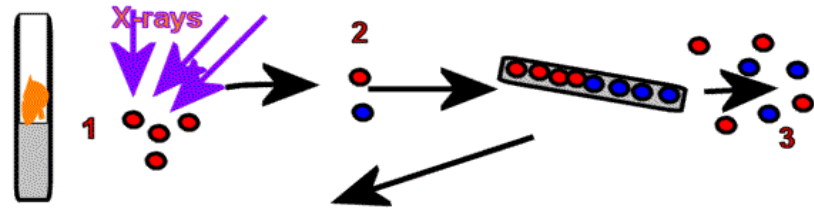


Se si fornisce al mutante uno dei prodotti intermedi a valle del blocco, si potrà avere la sintesi del prodotto finale:



- ▶ 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)



Mutante che richiede metionina

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

RELAZIONE GENE-PROTEINA

- Beet e Neel (1949): genetica dell'anemia falciforme
- Pauling (1949): differenze fra HbA e HbS
- Ingram (1957): la mutazione di un gene corrisponde al cambiamento della proteina
- Yanofsky (1967): colinearità fra gene e proteina

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

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)

IL GENE ERA VISTO COME:

L'UNITA' **FONDAMENTALE** DELL'EREDITA', NON
DIVISIBILE PER CROSSING OVER

L'UNITA' **FONDAMENTALE** DI CAMBIAMENTO
(= MUTAZIONE)

L'UNITA' **FONDAMENTALE** DI FUNZIONE

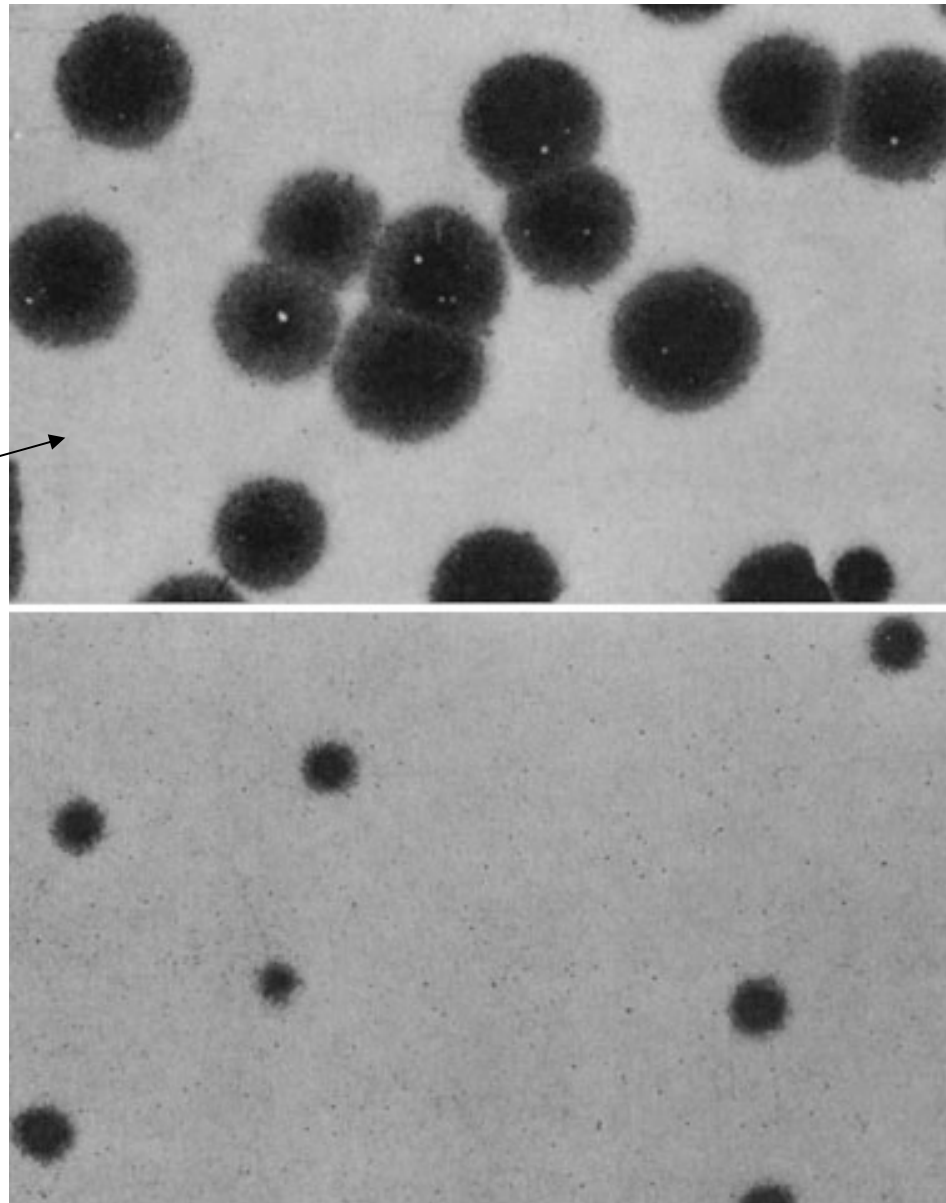
PERCHE' IL FAGO T4 ?

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

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

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

r+



	<u>Ceppo batterico</u>	
<u>genotipo T4</u>	<u>E. coli B</u>	<u>E. coli K</u>
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

due *cistroni* (unità funzionali o geni)



I mutanti nel cistrone A possono dare complementazione con quelli nel cistrone B

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).

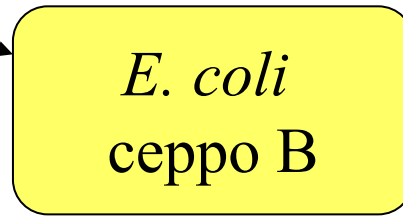
IL GENE NON E' PIU' L'UNITA' DI FUNZIONE UNICA
E NON DIVISIBILE

Qual'è l'unità fondamentale di ricombinazione?

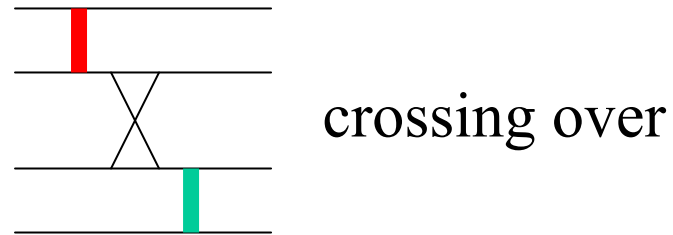
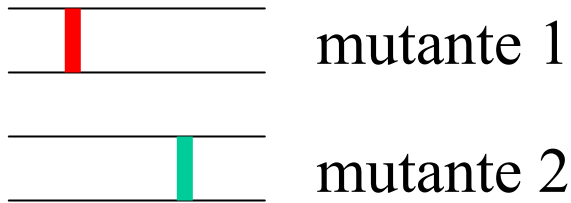
- Co-infezione di *E. coli* ceppo B con due fagi mutati nella stessa unità funzionale (cistrone)
- La progenie fagica ottenuta viene usata per infettare il ceppo K (non permissivo): solo i fagi nei quali è avvenuto un evento di ricombinazione all'interno del cistrone (intragenica) potranno formare placche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

Fago rII mutante 1

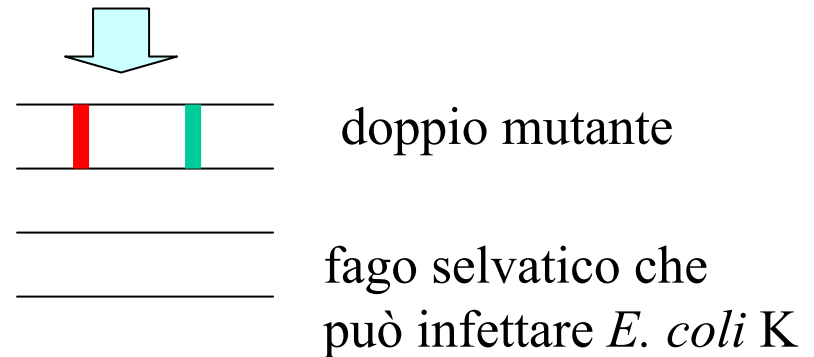
Fago rII mutante 2



Il lisato fagico
viene usato per infettare
E. coli ceppo K



Nessuno dei due fagi
è capace da solo di
infettare il ceppo batterico K



MAPPAGGIO MEDIANTE DELEZIONE

REVERSIONE

Mutazione puntiforme:

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

Delezione:

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

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+

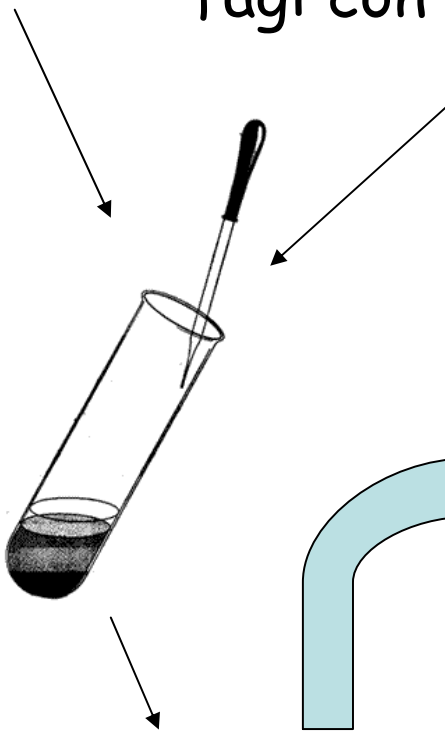
IL MUTANTE ? SI TROVA ALL'INTERNO DELLA
DELEZIONE PRESENTE NEL MUTANTE D2

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

SPOT TEST

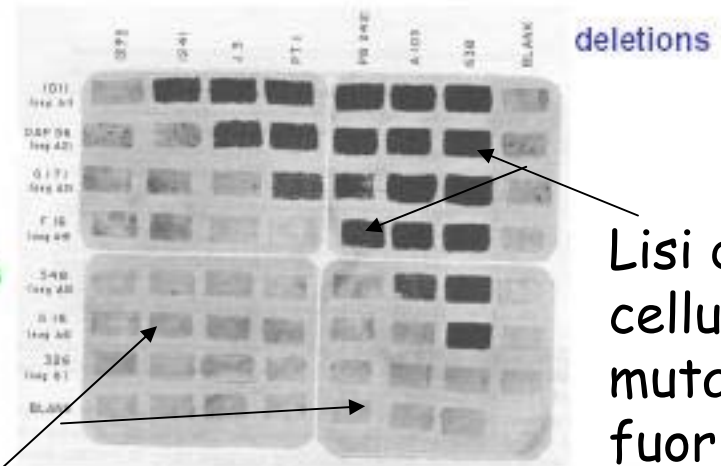
fagi con delezione

fagi con mutazione da mappare



E.coli ceppo B

E. coli ceppo K

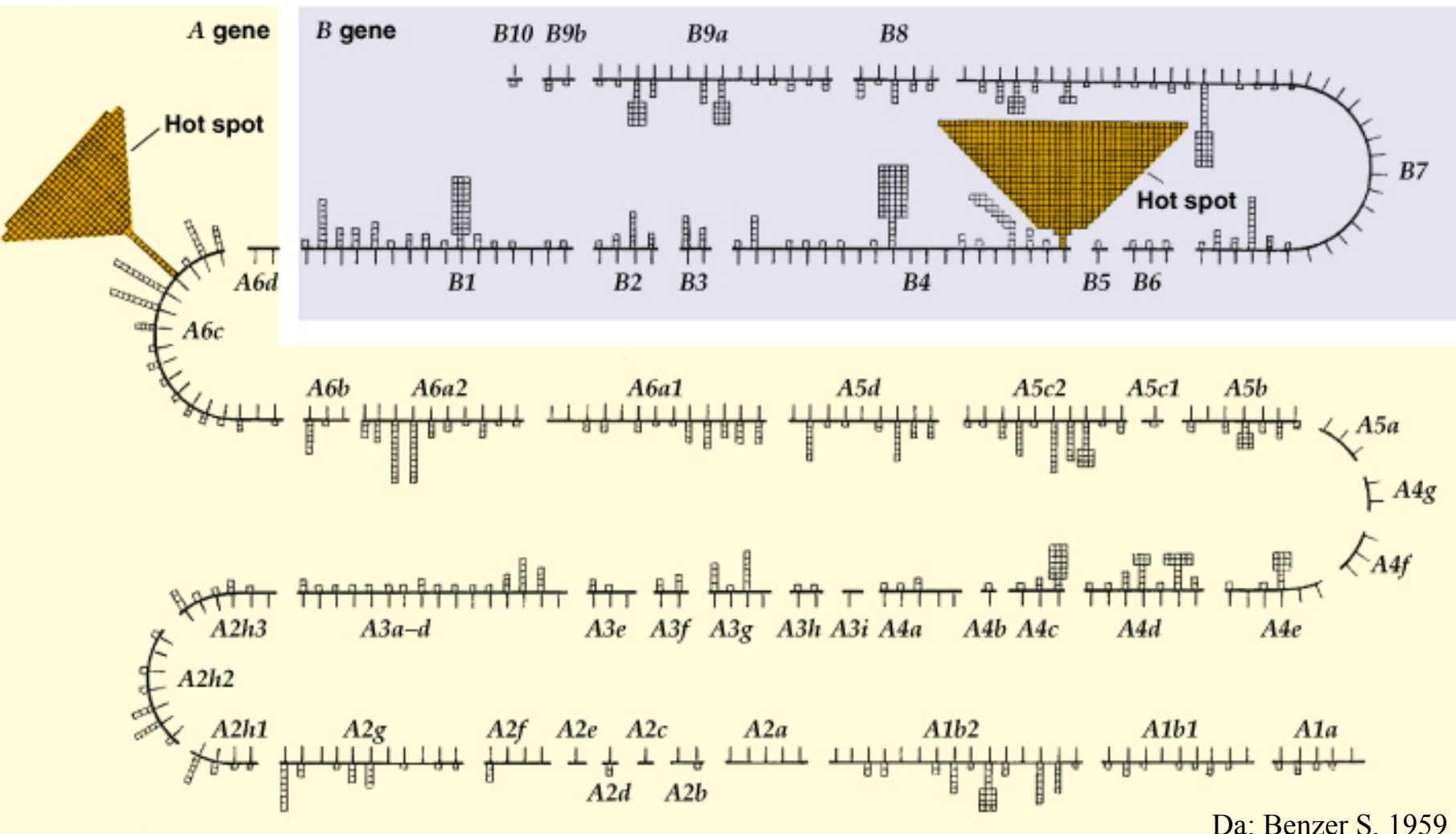


point mutants

No lisi delle cellule K:
mutazione dentro la
delezione

Lisi delle
cellule K:
mutazione
fuori della
delezione

LA TOPOGRAFIA DELLA REGIONE rII



Da: Benzer S, 1959

Benzer analizzò 1612 mutazioni rII spontanee che mappavano su 251 siti

Benzer identificò le unità minime di

- ✓ funzione
- ✓ mutazione
- ✓ ricombinazione

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