

# Soluzioni del Capitolo 8

**8.1** a. 5; b. 10; c. 8; d. 12; e. 6; f. 2; g. 9; h. 14; i. 3; j. 13; k. 1; l. 7; m. 15; n. 11; o. 4; p. 16.

**8.2** a. 4; b. 6; c. 1; d. 2; e. 3; f. 5.

**8.3** a. GU GU GU GU GU or UG UG UG UG

b. GU UG GU UG GU UG GU UG GU

c. GUG UGU GUG U ecc.

d. GUG UGU GUG UGU GUG UGU GUG UGU GU (a seconda di dove si cominci)

e. GUG UGU GU or UGU GUG UG (a seconda di dove si cominci)

**8.4** a. Comparando la sequenza del mutante a quella del selvatico, potete vedere dove sono avvenute inserzioni, corrispondenti a mutazioni +, e delezioni, corrispondenti a mutazioni –.

b. Sono mostrati gli amminoacidi nella proteina selvatica e mutante:

Lys Ser Pro Ser Leu Asn Ala

Selvatico: 5'AAA AGT CCA TCA CTT AAT GCC 3' (-) (+)

Mutante: 5'AAA GTC CAT CAC TTA ATG GCC 3'

Lys **Val His His Leu Met** Ala

I cinque amminoacidi tra le mutazioni – e + sono differenti dal selvatico.

b. Le sostituzioni di amminoacidi tra le mutazioni – e + nel mutante non devono modificare la struttura della proteina in modo abbastanza significativo da alterare la funzione proteica.

**8.5** a. Una retromutazione FC0 → rIIB<sup>+</sup>.

b. Le mutazioni FC0 e FC7 potrebbero essere separate per ricombinazione producendo di nuovo i cromosomi mutanti, una retromutazione no.

c. Incrociandoli con i mutanti originali FC0 e FC7.

d. Facendo ricombinare mutanti che portano una o più mutazioni dello stesso segno.

**8.6** Hb<sup>c</sup> precede Hb<sup>s</sup> nella mappa del gene della β-globina

**8.7** a. Se l'Asn6 (5'AAC) è sostituita da un residuo di Tyr, il cambio di nucleotide è in un UAC. Nella

proteina B ciò significa che la Gln (5'CAA) in posizione 3 diventa una Leu (5'CUA).

b. La Leu (5'CUA) in posizione 8 è sostituita da una Pro (5'CCA). Nella proteina B la Thr (5'ACU) in posizione 5 è ancora un residuo di Thr, anche se il codone è differente. (5'ACC).

c. Quando la Gln (5'CCA) in posizione 8 nella proteina B è sostituita da una Leu (5'CUA), il codone della Lys (5'AAG) in posizione 11 nella proteina A è cambiato in un codone di stop (un 5'UAG).

d. Ci sono due ragionevoli possibilità.

1. Come la parte a-c mostra, una mutazione nella regione di sovrapposizione ha un'elevata probabilità di causare alterazioni in entrambe le proteine contemporaneamente. Ogni cambiamento in questa sequenza di DNA ha il potenziale di colpire due proteine invece che solo una, e un organismo sarebbe meno adeguato a tollerare mutazioni che interessano la produzione di due proteine, piuttosto che mutazioni che riguardano la produzione di una singola proteina. Ci dovrebbe quindi essere una forte pressione evolutiva a sfavore dei registri di lettura che si sovrappongono.

2. Se una regione di DNA si è evoluta in modo da codificare una proteina con una conformazione tridimensionale stabile, è molto improbabile che una proteina stabile possa essere prodotta dalla sequenza spostata di un nucleotide. Questo perché il registro di lettura alternato può avere un codone di stop ogni 3 codoni da 64. Ciò significa che, in realtà, tra i molto pochi esempi di registri di lettura che si sovrappongono esistenti, o una o entrambe le proteine sono molto piccole, composte solo di pochi amminoacidi.

**8.8** Ricordate che la proflavina causa mutazioni nel registro di lettura (inserzioni e delezioni di singole basi) nel DNA. Tutti i mutageni operano a livello del DNA, anche se i cambiamenti sono

spesso scritti a livello dell'mRNA! La sequenza dell'mRNA del gene selvatico sarebbe:

Gly Ala Pro Arg Lys

mRNA

selvatico: 5' GGN GCN CCN AGA/G AAA/G 3'  
CGN

mRNA

mutante: 5' GGN CAU/CCAA/G GGN AAA/G 3'  
Gly His Gln Gly Lys

Dopo aver comparato la sequenza del selvatico e del mutante, potete vedere che il primo nucleotide del secondo codone era deletto per rendere la sequenza mutante. La sequenza di DNA dedotta del selvatico è:

5' GGN GCA CCA AGG AAA 3'

**8.9 a.** Alto contenuto  $Mg^{2+}$ : polipeptide costituito da Cys e Val; Basso  $Mg^{2+}$ : nessun polipeptide.

**b.** Alto o basso  $Mg^{2+}$ : His, Ala, Cys e Met.

**c.** c.. Alto o basso  $Mg^{2+}$ : Val, Cys, Met e Tyr.

**8.10** Codone stop UGA: UGU, UGC, UGG, CGA, AGA, GGA, UCA, UUA e così via per gli altri due codoni di stop.

**8.11 a.** Otto: UUU, UUG, UGU, GUU UGG, GUG GGU, GGG.

**b.** Sei: Phe, Leu, Val, Cys, Trp, Gly.

**c.** Lo stesso amminoacido è specificato da parecchi codoni diversi: GUU o GUG = Val, GGU o GGG = Gly.

**d.**  $f(UUU) = 27/64$ ,  $f(UUG) = f(UGU) = f(GUU) = 9/64$ ,  $f(UGG) = f(GUG) = f(GGU) = 3/64$ ,  $f(GGG) = 1/64$ .

**e.**  $Phe(UUU) = 27/64$ ,  $Leu(UUG) = 9/64$ ,  $Cys(UGU) = 9/64$ ,  $Val(GUU \text{ o } GUG) = 12/64$ ,  $Trp(UGG) = 3/64$ ,  $Gly(GGU \text{ o } GGG) = 4/64$ .

**f.** Phe = UUU, Val, Leu e Cys sono costituiti da codoni che sono G + 2U e Trp e Gly provengono da codoni che sono 2G + U.

**8.12** Le possibili sequenze sono:

GCU	CCU	CAU	UGG	CGU	AAA	GGU	GUU	ACU
C	C	C		C	G	C	C	C
A	A			A		A	A	A
G	G			G		G	G	G
				AGA				
				G				

**a.** Mutazioni del quarto codone da UGG a UGA o UAG creano un codone di stop, per cui la traduzione si arresterebbe al terzo codone, cioè con His.

**b.** Altri codoni di stop si possono formare: nel quinto codone per una mutazione CGA  $\gg$  UGA; nel sesto codone per una mutazione AAA  $\gg$  UAA; nel settimo codone per una mutazione GGA  $\gg$  UGA.

**8.13** Tre: due sul filamento superiore e uno sul filamento inferiore.

**8.14 a.** La distanza di mappa dipende sì dalla distanza fisica fra due siti, ma anche dalla presenza di sequenze che promuovono l'evento ricombinazionale (vedi anche la risposta b).

**b.** Tra i siti 49 e 211 la distanza di mappa è minore della distanza fisica, quindi nella regione la frequenza di crossing-over è più bassa. Al contrario, tra 15 e 22 la frequenza di crossing-over è più elevata.

**8.15 a.** Yanofsky ha potuto eseguire lo screening per gli auxotrofi  $Trp^-$  crescendo batteri selvatici in presenza di un mutageno e quindi piastrando la coltura per ottenere colonie singole su una piastra contenente terreno minimo addizionato con triptofano. Ogni colonia della piastra verrebbe quindi replicata su una piastra con terreno minima; le colonie che non crescono sulla piastra di replica sono auxotrofi  $Trp^-$ .

**b.** Le colonie  $trpA^-$  sono distinte da tutti gli altri auxotrofi in quanto richiedono il triptofano per crescere e invece non sono in grado di crescere con l'aggiunta di qualsiasi altro intermedio del pathway.

**8.16 a.** Mutante 1: trasversione da Arg a Pro; mutante 2: la delezione di una singola coppia di nucleotidi cambia Val in Trp e poi determina uno stop; mutante 3: transizione Thr (silente); mutante 4: l'inserzione di una singola coppia di nucleotidi cambia molti amminoacidi e poi determina uno stop; mutante 5: una transizione cambia Arg in un codone di stop; mutante 6: un'inversione cambia l'identità di 6 amminoacidi.

**b.** EMS: 1, 3, 5; Proflavina: 2, 4.

**8.17** La mutazione frameshift prodotta dalla proflavina genera un codone di stop molto vicino al sito di inserzione/delezione.

**8.18** I mitocondri non usano lo stesso codice genetico! Se volete assicurarvi che la proteina corretta venga prodotta nelle cellule di lievito, dovrete mutare tutti i codoni 5' CUA 3', nel gene mitocondriale, in 5' ACN 3', prima di inserire il gene in un cromosoma nel nucleo di lievito.

**8.19** Trascrizione: l'aggiunta dell'appropriato ribonucleotide complementare allo stampo; traduzione: il codone dell'mRNA e l'anticodone del tRNA sono complementari.

**8.20** La replicazione del DNA è un evento permanente: le nuove cellule figlie riceveranno ciascuna solo una copia della molecola di DNA. Quella copia deve servire come stampo per la trascrizione e per la replicazione del DNA durante le successive divisioni cellulari. Questo non è vero per la tra-

scrizione, e di conseguenza ci sono diversi motivi per cui è tollerato un più alto livello di errore durante la trascrizione:

1. La trascrizione produce un prodotto transitorio. Le molecole di mRNA persistono solo per periodi relativamente brevi (l'emivita di un mRNA batterico è in genere solo di pochi minuti, mentre quelle per gli mRNA eucariotici possono variare da ~ 15 minuti a ~ 1 giorno), mentre le molecole di DNA devono essere mantenute per tutta la vita dell'organismo e anche oltre.

2. Le cellule contengono più copie di ogni tipo di mRNA. Anche se una molecola di mRNA contiene errori gravi che producono proteine non funzionali, la cellula ha molte altre molecole di mRNA trascritte dallo stesso gene e la maggior parte di esse non contiene errori in posizioni critiche.

3. Inoltre, la degenerazione del codice genetico limita gli effetti degli errori nella trascrizione perché molti singoli errori produrranno cambiamenti silenti e altri porteranno a sostituzioni conservative.

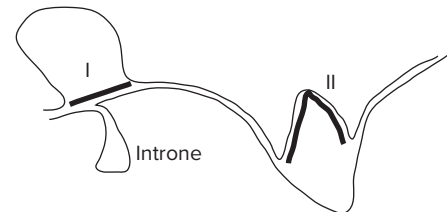
4. Nella maggior parte dei casi, porzioni del trascritto di RNA primario prodotto dalla trascrizione saranno eliminate dallo splicing. Per esempio, solo lo 0,6% del trascritto primario della distrofina sarà presente nell'mRNA maturo; l'intervallo per questo valore in diversi geni varia dal 100% allo 0,6%. Gli errori che vengono commessi nella trascrizione delle regioni non tradotte (UTR 5' e 3' e introni) non hanno alcun effetto sulla sequenza amminoacidica del polipeptide.

5. Infine, un organismo produce molte più proteine di quelle richieste per la maggior parte dei geni. Molte malattie causate dalla mancanza di funzione proteica (per es., fibrosi cistica, distrofia muscolare, albinismo tirosinasi negativo, emofilia e altri difetti della coagulazione) sono recessive. Ciò significa che un individuo con un allele mutante non funzionale e un allele normale e funzionale di questi geni produrrà solo circa la metà dei livelli normali di proteine funzionali. Eppure questi individui hanno un fenotipo completamente normale. Pertanto, una piccola percentuale di molecole di mRNA anormali che non danno origine a nessuna proteina (o anche a una proteina anormale) non influenzerà il fenotipo dell'individuo.

**8.21** Gene *F*: filamento inferiore; gene *G*: filamento superiore.

**8.22** Le linee più spesse nella figura che segue rappresentano l'mRNA da due geni differenti, I e II; due geni sono rappresentati per mostrare che i risultati sarebbero lievemente differenti, in base alla presen-

za o assenza di introni nel gene. In generale i filamenti di DNA formano una struttura di DNA doppia elica, eccetto dove il loro appaiamento è interrotto dalla presenza di eteroduplex mRNA/DNA. Il gene II si appaia con il filamento stampo del DNA, forzando l'altro filamento a formare un'ansa. Il gene I ha un introne che è stato processato dall'mRNA maturo. Quando l'mRNA si appaia con il filamento stampo del DNA, c'è un'ansa del DNA nella regione corrispondente all'introne.

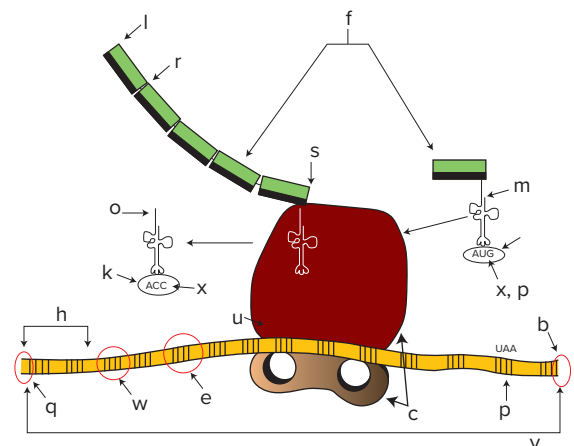


**8.23** Gli amminoacidi extra potrebbero venire da un introne che non ha subito splicing, a causa di una mutazione nel sito di splicing. La sequenza di DNA genomico in cellule normali conterrebbe questa sequenza. Un'alternativa è che gli amminoacidi extra possano derivare da inserzioni del DNA da altre regioni del genoma, come l'inserzione di un piccolo elemento trasponibile. In questo caso, l'allele normale del gene non avrà questa sequenza.

**8.24** Attraverso lo splicing alternativo che giustappone una delle possibili isoforme della porzione extracellulare con una delle possibili isoforme della porzione intracellulare e della porzione transmembrana.

**8.25** L'appaiamento fra il codone sull'RNA e l'anticodone sul tRNA.

**8.26** Vedi Figure 8.18 per la struttura del tRNA, 8.20 per l'appaiamento codone/anticodone, 8.23 per la struttura del ribosoma e 8.25 per la traduzione.



I seguenti elementi non sono presenti in questa figura: a, d, g, i, j, n e t.

**8.27 a. Traduzione.**

**b.** La tirosina (Tyr) è l'amminoacido successivo da aggiungere e all'estremità C della catena in crescita, che, una volta completata, sarà lunga nove amminoacidi.

**c.** L'estremità C terminale della catena polipeptidica è il triptofano.

**d.** Il primo amminoacido all'N-terminale sarebbe fMet in una cellula procariotica e Met in una cellula eucariotica. L'mRNA avrebbe un cappuccio all'estremità 5' e una coda poli-Ad alla sua estremità 3' in una cellula eucariotica ma non in una cellula procariotica. Se l'mRNA fosse sufficientemente lungo, potrebbe codificare per più proteine in un procariote ma non in un eucariote.

**8.28 a. No, perché in base alle regole del vacillamento potrebbe appaiarsi con i codoni UUU (Phe), UUC (Phe) e UUA (Leu) e quindi avrebbe un significato ambiguo.**

**b.** Sì; Leu.

**8.29 a. Filamento simile all'RNA = 5' AAA, filamento stampo = 5' TTT.**

**b.** Filamento simile all'RNA = 5' TAA, filamento stampo = 5' TTA.

**8.30 Un aspetto della degenerazione del codice genetico è il vacillamento: a causa dell'insolito appaiamento di basi tra la base 5' dell'anticodone e la base 3' del codone, una singola specie di tRNA può legarsi a più di un codone. Un'ulteriore complicazione è che quando la base vacillante dell'anticodone del tRNA è A o U, gli enzimi modificano quella base dopo la trascrizione del tRNA. Nel caso del vacillamento U, sono possibili tre diverse modificazioni e la modificazione specifica determina la capacità di appaiamento delle basi dell'anticodone.**

È importante rendersi conto che gli enzimi che modificano la base vacillante riconoscono non solo la sequenza dell'anticodone, ma anche altri aspetti della struttura del tRNA (dettati dalla sequenza di base del tRNA). Questo fatto significa che due diversi tRNA trascritti da due diversi geni, entrambi con lo stesso anticodone, corrispondente allo stesso amminoacido, possono avere le loro basi vacillanti modificate in modo diverso.

**a.** Poiché l'inosina (I) nella posizione vacillante all'estremità 5' dell'anticodone può appaiarsi con U, A o C all'estremità 3' del codone, gli anticodoni con inosina come base vacillante devono corrispondere ai codoni in cui 5' XYU, 5' XYA o 5' XYC specificano tutti lo stesso amminoacido (X e Y sono due basi qualsiasi). Esaminando la tabella del codice genetico (Figura 8.2), si può notare che quei codoni sono: 5' CGN (Arg), 5' GGN

(Gly), 5' CCN (Pro), 5' UCN (Ser), 5' ACN (Thr), 5' GCN (Ala), 5' CUN (Leu), 5' GUN (Val) e 5' AU (U/A/C) (Ile). Pertanto, gli anticodoni che possono avere I come base vacillante sono: 5' ICG, 5' ICC, 5' IGG, 5' IGA, 5' IGU, 5' IGC, 5' IAG, 5' IAC e 5' IAU.

Poiché A non modificata nella posizione vacillante all'estremità 5' dell'anticodone può appaiarsi con U, A, G o C all'estremità 3' del codone, gli anticodoni con A non modificata in questa posizione devono corrispondere ai codoni in cui 5' XYU, 5' XYA, 5' XYG e 5' XYC specificano tutti lo stesso amminoacido (X e Y sono due basi qualsiasi). Esaminando la tabella del codice genetico (Figura 8.2), si può notare che quei codoni sono: 5' CUN (Leu), 5' GUN (Val), 5' UCN (Ser), 5' CCN (Pro), 5' ACN (Thr), 5' GCN (Ala), 5' CGN (Arg) e 5' GGN (Gly). Gli anticodoni che possono avere A non modificata come base vacillante sono: 5' AAG, 5' AAC, 5' AGA, 5' AGG, 5' AGU, 5' AGC, 5' ACG e 5' ACC.

**b.** Si ricordi che quando U è in posizione di vacillamento all'estremità 5' dell'anticodone, o non è modificato o è modificato in uno dei tre modi mostrati in Figura 8.21. Qualsiasi tipo di tRNA (cioè un tRNA codificato da un singolo gene tRNA) con U in posizione di vacillamento è sempre o non modificato oppure modificato solo in uno di questi tre modi (non è un caso che alcune molecole di un tipo di tRNA vengono modificate in un modo e altre molecole dello stesso tipo non vengono modificate o sono modificate in modo diverso). Pertanto, i tRNA con U oscillante modificato in  $xm^5U$  o  $xm^5s^2U$  sono specifici per codoni le cui estremità 3' sono A/G; i tRNA con U oscillante non modificati o modificati in  $xo^5U$  riconosceranno i codoni con A/G/U/C alle estremità 3'.

Indipendentemente da come viene modificata la U vacillante all'estremità 5' dell'anticodone, può sempre appaiarsi con A o G all'estremità 3' del codone. Questo fatto significa che tre sequenze di anticodoni non potrebbero mai avere una 5' U: (1) 5' UUA; in qualunque modo questo anticodone venga modificato, si appaierà sempre con i codoni di stop 5' UAG e 5' UAA. (2) 5' UCA; si appaierà sempre con i codoni 5' UGG (Trp) e 5' UGA (stop). (3) 5' UAU; si appaierà sempre con i codoni 5' AUG (Met) e 5' AUA (Ile). Il contrario di questa affermazione è che  $xm^5U$  e  $xm^5s^2U$  possono essere la base vacillante per tutti gli anticodoni a eccezione di: 5' UUA, 5' UCA e 5' UAU.

Alcuni codoni 5' UNN non possono esistere non modificati o modificati in  $xo^5U$ . Per esempio, i codoni 5' UAA potrebbero riconoscere solo i co-



doni Leu se la U oscillante è stata modificata in  $xm^5U$  o  $xm^5s^2U$ , ma se la U non è stata modificata o alterata in  $xm^5U$ , un tale tRNA riconoscebbe entrambi i codoni Phe e Leu.

**c.** La tabella che segue mostra gli anticodoni (scritti nella direzione da 5' a 3') di un singolo tipo di tRNA che potrebbe rispondere in modo specifico a tutti i codoni contenuti nella casella con una particolare tonalità di blu, che rappresenta un particolare amminoacido. La tabella è disposta in modo identico alla tabella dei codici genetici in Figura 8.2. Le caselle rosse corrispondono ai codoni di stop nel codice genetico.

Si può osservare che a causa del vacillamento è necessario un minimo di 23 tRNA per codificare tutti i 20 amminoacidi. (Gli amminoacidi che richiederebbero 2 tRNA sono Leu, Ser e Arg; tutti gli altri amminoacidi richiederebbero la presenza di un solo tRNA.)

Nell'uomo sono necessari due tRNA speciali aggiuntivi. Uno di questi è un tRNA iniziale con un anticodone 5' CAU caricato con metionina. Sebbene questo sia lo stesso anticodone utilizzato per i normali tRNA caricati anche con metionina, il tRNA iniziale deve essere diverso in modo che possa essere riconosciuto dai fattori di iniziazione e quindi entrare nel sito P ribosomiale piuttosto che nel sito A (vedi Figura 8.25). Il secondo tRNA speciale è per la selenocisteina. (La pirrolisina si trova solo nelle cellule procariotiche, quindi non è considerata qui.). Contando questi due tRNA speciali, il numero minimo di tRNA richiesti nell'uomo è 25.

GAA	AGA o UGA	GUA	GCA
$xm^5UAA$ o $xm^5s^2UAA$			
			CCA
AAG o UAG	AGG o UGG	GUG	ACG o UCG
		$xm^5UUG$ o $xm^5s^2UUG$	
IAU	AGU o UGU	GUU	GCU
CAU		$xm^5UUU$ o $xm^5s^2UUU$	$xm^5UCU$ o $xm^5s^2UCU$
		GUC	
AAC o UAC	AGC o UGC	$xm^5UUC$ o $xm^5s^2UUC$	ACC o UCC

**8.31 a.** Molti dei 500 geni del tRNA umano sono funzionalmente ridondanti. Esistono solo 61 diversi codoni di senso, quindi 500 diversi tRNA sono impossibili.

**b.** Avere molti geni diversi che codificano per lo stesso tRNA è un modo per produrre le grandi quantità di molecole di tRNA di cui le cellule han-

no bisogno. Inoltre, più geni per ciascun tRNA proteggono l'organismo dagli effetti di mutazioni nei geni del tRNA. Se uno dei geni per un tipo specifico di tRNA subisce una mutazione con perdita di funzione, quella specie di tRNA non viene persa perché gli altri geni che codificano per lo stesso tRNA possono compensare la perdita.

**8.32 a.** La lunghezza minima della regione codificante è  $477 \text{ amminoacidi} \times 3 \text{ basi/codone} = 1431 \text{ coppie di basi}$ .

**b.** 5' ACCCUGGACUAGUCGAAAGUUAACUU AC 3'.

**c.** La sequenza amminoacidica di questa regione della proteina del fuso mitotico è: N... Pro Trp Thr Ser Gly Lys Leu Thr Tyr... C.

**8.33** Per prima cosa si guarda la sequenza per determinare dove sono codificati gli amminoacidi Met Tyr Arg Gly Ala. Il filamento superiore chiaramente non codifica per questi amminoacidi. Sul filamento inferiore, ci sono i codoni Met Tyr all'estrema destra (lettura da 5' a 3') e Arg Gly Ala molto più avanti sullo stesso filamento. Perché questi codoni non sono adiacenti? Perché è presente un introne nella sequenza del DNA che viene eliminato dal trascritto primario. Pertanto, dopo lo splicing, l'mRNA maturo codificherà per questa breve proteina.

**a.** Il filamento inferiore è il filamento simile all'RNA, quindi il filamento superiore è lo stampo. L'RNA polimerasi si sposta copiando lo stampo da 3' a 5'; cioè nella direzione da destra a sinistra rispetto alla sequenza scritta.

**b.** La sequenza dei nucleotidi nell'mRNA maturo (dopo lo splicing) è mostrata di seguito. La giunzione tra gli esoni è contrassegnata da una linea verticale:

5' GCC AUG UAC AG|G GGG GCA UAG GGG 3'

La sequenza di questo mRNA contiene nucleotidi prima del codone di inizio AUG (in verde) e dopo il codone di arresto UAG (in rosso), sottolineando che l'mRNA non inizia e non finisce con questi codoni. Si ricordi che gli mRNA contengono regioni non tradotte (UTR) sia al 5' sia al 3'.

[Nota: questo problema presenta una sequenza di DNA semplificata per facilitare l'analisi. La sequenza ha sequenze canoniche di donatore e accettore di splicing al confine tra l'introne e i due esoni che lo fiancheggiano. Tuttavia, l'introne non contiene un sito di ramificazione canonico. (Vedi Figura 8.15 per la natura delle tre sequenze necessarie per lo splicing, quindi provare a verificare queste affermazioni da soli.) In realtà,

gli introni più corti sono lunghi circa 50 nt, invece dei 24 nt nel problema, e devono contenere un sito di diramazione a lazo.]

**c.** Thr all'estremità C-terminale della proteina tronca potrebbe presentarsi se la base G sul filamento inferiore che precede appena la giunzione tra l'introne e il primo esone [sottolineato nella risposta alla parte (b)] fosse mutata in una C. Questa sostituzione di base altererebbe anche il sito del donatore di splicing, che quindi non si verifica. Il successivo codone dopo l'ACG per Thr è un codone di stop UAA, quindi il polipeptide codificato dall'RNA non maturato è lungo solo tre amminoacidi. La sequenza dell'mRNA mutante è:

5' GCC AUG UAC ACG UAA GUG UUU UGA  
UCC UCC CCC AGG GGG GCA UAG GGG 3'

**8.34** Ordine: c e i f a k h d b j g.

**8.35 a.** Tutti questi elementi sono nell'RNA (cioè i termini sono abbreviati) eccetto il promotore (c) e il terminatore della trascrizione (g).

**b.** a, e, f e i si trovano parzialmente o completamente nel primo esone; a, h e k si trovano parzialmente o completamente nell'introne; e b, d, j e g si trovano parzialmente o completamente nel secondo esone.

**8.36** Il diagramma che segue la risposta alla parte (q) indica come affrontare tutte le parti di questo problema.

**a.** Per calcolare la dimensione del gene, si devono semplicemente sommare tutti gli esoni e gli introni e ignorare 5' UTR e 3' UTR (perché questi sono già considerati come parti di esoni):  $119 + 532 + 337 + 1431 + 208 + 380 + 444 + 99 + 546 = 4096$  bp.

**b.** Per calcolare la dimensione del trascritto primario, si prende la dimensione del gene (esoni più introni) = 4096 nucleotidi = 4096 nt. Questa risposta sarebbe corretta in base alla Figura 8.14. Tuttavia, in realtà il cappuccio al 5' e la coda poli-A all'estremità 3' vengono aggiunti molto rapidamente al trascritto primario, di solito prima dello splicing, quindi alcuni ricercatori ritengono che il trascritto primario contenga queste modifiche, come appena mostrato nella figura precedente. Con questa definizione alternativa di trascritto primario, si devono aggiungere 150 basi della coda poli-A all'estremità 3':  $4096 + 150 = 4246$  bp. (Si potrebbe anche aggiungere un nucleotide per tenere conto del cappuccio al 5':  $4096 + 150 + 1 = 4247$  nt.)

**c.** Per calcolare la dimensione dell'mRNA maturo, si sommano tutti gli esoni da soli e si aggiun-

gono 150 basi di coda poli-A (e possibilmente un nucleotide per il cappuccio 5'):  $119 + 337 + 208 + 444 + 546 + 150 (+1) = 1804$  nt (1805 nt con il cappuccio al 5').

**d.** Per determinare dove si trova il codone di inizio ATG, si confronta la dimensione del 5' UTR con quella del primo esone. Parte o tutto il primo esone deve essere il 5' UTR. In questo caso, il 5' UTR (174 bp) è maggiore del primo esone (119 bp) e deve quindi includere l'intero primo esone più ulteriori 55 bp ( $174 - 119 = 55$ ). Il secondo esone (337 bp) è maggiore di 55 bp, quindi il codone di inizio deve trovarsi nell'esone 2.

Come suggerimento per le parti successive di questo problema, si noti qui che i primi 55 bp del secondo esone sono il rimanente del 5' UTR, mentre  $337 - 55 = 282$  bp del secondo esone sono la sequenza codificante (cioè, corrispondono ai codoni dell'mRNA).  $282/3 =$  esattamente 94 amminoacidi. L'introne 2 si trova quindi tra i codoni.

**e.** Ora si dovrebbe determinare l'estensione del 3' UTR usando lo stesso metodo della parte (d). Il 3' UTR è 715 bp, mentre l'esone 5 (l'ultimo esone) è 546 bp. Pertanto, tutto l'esone 5 è nel 3' UTR e il 3' UTR si estende per  $715 - 546 = 169$  bp nell'esone 4, che è più di 169 bp (è 444 bp), quindi il codone di stop deve essere nell'esone 4.

Per le parti successive del problema, è necessario sapere dove si trova esattamente il codone di stop nell'esone 4. Questa determinazione è influenzata da una certa confusione semantica sul fatto che il 3' UTR contenga o meno il codone di stop, ma risulta più facile se si considera che il 3' UTR includa il codone di stop. Quindi la parte codificante dell'esone 4 è  $444 - 169 = 275$  bp.

**f.** Nessuna coppia di basi codifica il cappuccio al 5' perché il cappuccio viene aggiunto dopo la trascrizione.

**g.** Il promotore è a monte del 5' UTR e, quindi, non è incluso in nessuna delle sequenze di DNA elencate nel problema.

**h.** Introne 4 [vedi parte (e)].

**i.** L'esone 4 contiene il codone di stop [vedi parte (e)] e il codone che lo precede codifica per l'amminoacido finale (C-terminale).

**j.** La sequenza che codifica per la coda poli-A non esiste nel gene perché la poli-A viene aggiunta post-trascrizionalmente dalla poli-A polimerasi. Il gene include sequenze che specificano dove deve essere aggiunta la coda poli-A [vedi parte (o) più avanti], ma queste non contengono le T che vengono copiate nella poli-A.

**k.** Abbiamo già stabilito che ci sono 282 bp di regione codificante nell'esone 2 [vedi parte (d)], e che questo corrisponde a 94 codoni. Questo fatto significa che l'esone 3 inizia con il primo nucleotide di un codone. Ci sono 208 bp nell'esone 3, che corrisponde a  $208/3 = 69,33$  codoni = 69 codoni + un nucleotide. Pertanto, l'introne 3 è posto tra il 1° e il 2° nucleotide del codone successivo. La regione codificante dell'esone 4 è 275 bp [vedi parte (e)], che corrisponde a  $275/3 = 91,67$  codoni, cioè 91 codoni + 2 nucleotidi. Pertanto, la regione codificante del gene è:  $282 + 208 + 275 = 765$  bp. (Nota: questo calcolo presuppone che il 3' UTR includa il codone di stop e che la regione codificante non includa il codone di stop.)

**l.** Come spiegato nella parte (k):  $94$  (Esone 2) +  $69 \frac{1}{3}$  (Esone 3) +  $91 \frac{2}{3}$  (Esone 4) = 255 amminoacidi.

**m.** L'introne 3 interrompe un codone [vedi parte (k)].

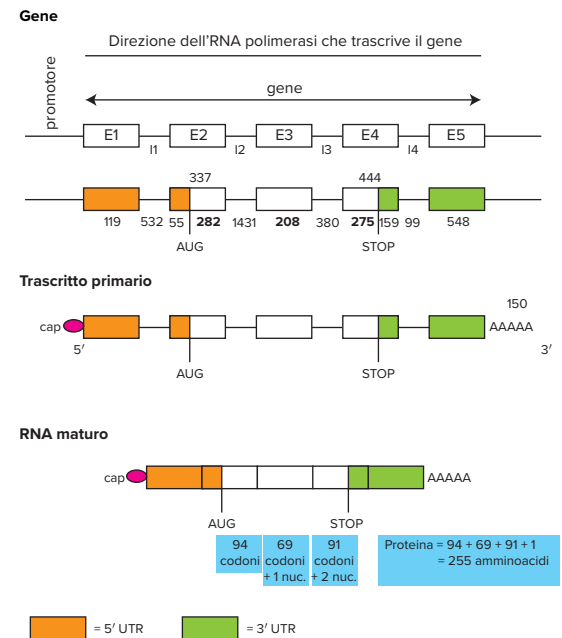
**n.** L'introne 2 si trova tra i codoni [vedi parte (k)].

**o.** La sequenza che specifica l'aggiunta di poli-A è la sequenza AAUAAA (o varianti simili a questa), e questa sequenza si trova nell'esone finale del gene (Esone 5) nel 3' UTR, nel trascritto primario e nell'mRNA maturo. Una ribonucleasi taglia il trascritto primario circa 20 nucleotidi a valle (verso l'estremità 3') di questa sequenza e la poli-A polimerasi aggiunge quindi 150–200 A.

**p.** Poiché questo prodotto proteico più breve è prodotto mediante un processo normale, potrebbe essere spiegato da uno splicing alternativo in cui l'esone 2 è collegato all'esone 4 o all'esone 5, oppure l'introne 2 non viene rimosso affatto. I 94 amminoacidi sono quelli codificati dall'Esone 2. A volte, anche nelle cellule normali, i trascritti primari subiscono raramente processi di splicing in mRNA alternativi che non hanno funzioni; le giunzioni insolite di splicing sono chiamate giunzioni criptiche di splicing.

**q.** Supponendo che il prodotto di 114 nucleotidi sia un prodotto di giunzione criptico contenente l'esone 2, qualsiasi cosa sia connessa agli esoni non ha alcun codone normale (introne 2 o esone 5) o è fuori frame rispetto all'esone 2 (Esone 5). In ognuno di questi casi, ci si aspetterebbe che le sequenze che seguono l'esone 2 codifichino alcuni amminoacidi. Il motivo per cui ci si attenderebbe che ~20 amminoacidi non siano presenti nella proteina più grande è che  $3/64 \approx 1/21$  dei codoni nel codice genetico sono codoni di stop, quindi in media ci si imbatterebbe in un codone

di stop dopo ~20 amminoacidi quando vengono tradotte sequenze di DNA casuali.



**8.37 a.** Quattro basi producono  $4^3 = 64$  codoni differenti. Sei basi produrrebbero  $6^3 = 216$  codoni diversi.

**b.** Per incorporare PrK e pAzF negli amminoacidi, le cellule necessitano anche di geni per tRNA<sup>PrK</sup> e tRNA<sup>pAzF</sup>, e anche di PrK tRNA sintetasi e pAzF tRNA sintetasi.

**c.** L'RNA polimerasi deve essere in grado di incorporare nucleotidi contenenti PrK e pAzF nei trascritti.

**8.38** I geni eucariotici contengono introni che, non essendo mantenuti nell'RNA maturo, non devono necessariamente contenere registri aperti di lettura.

**8.39 a.** Le differenze nella trascrizione e nella traduzione tra procarioti (batteri) ed eucarioti (umani) elencate di seguito indicano che i sistemi di trascrizione e traduzione procariotici non possono produrre una proteina funzionale dal gene umano dell'insulina.

1. I promotori del gene dell'insulina umana potrebbero non funzionare in *E. coli*, bloccando così la trascrizione del gene.

2. Uno dei problemi principali è che il gene dell'insulina umana ha introni che vengono trascritti e poi eliminati dallo spliceosoma. Le cellule batteriche non hanno introni e quindi non hanno sviluppato il macchinario necessario per rimuoverli dall'RNA.

3. Altre modifiche post-trascrizionali eucariotiche, come l'aggiunta del cappuccio al 5', si trovano negli eucarioti ma sono assenti nei procarioti.

4. L'mRNA dell'insulina umana potrebbe non avere sequenze come il box Shine-Dalgarno necessarie per un inizio efficiente della traduzione all'AUG.

5. Infine, è anche possibile che il corretto ripiegamento del polipeptide e altre modificazioni post-traduzionali non si verifichino allo stesso modo nelle cellule procariotiche.

**b.** Per creare fabbriche di insulina batterica, si dovrebbero trasformare le cellule di *E. coli* con un gene composito (o di fusione) in cui alcune parti provenissero dal gene dell'insulina umana e altre parti da un gene di *E. coli* altamente espresso. Le uniche parti del gene dell'insulina umana che sarebbero necessarie sono le sequenze codificanti gli esoni della proteina. Questi devono essere opportunamente ligati (rimuovendo gli introni) prima di trasformare i batteri. Il modo più semplice per ottenere queste sequenze è fare una copia di DNA di una molecola dell'mRNA dell'insulina (nota come cDNA), un metodo che verrà spiegato nel Capitolo 10. Tutte le sequenze di DNA che controllano l'espressione genica (promotore, sequenza Shine-Dalgarno, terminatore di trascrizione) dovrebbero provenire da un gene di *E. coli* che viene trascritto e tradotto a livelli molto elevati. In sostanza, basta sostituire la parte codificante le proteine del gene batterico con la parte codificante le proteine (correttamente ligate) del gene dell'insulina umana.

**8.40 a.** Le code poli-A vengono aggiunte alle estremità 3' di mRNA dopo la trascrizione, dall'enzima poli-A polimerasi. Pertanto, la sequenza di A alle estremità 3' degli mRNA eucariotici non viene trascritta dal genoma.

**b.** Gli scienziati raramente sanno dove si arresta la trascrizione della maggior parte degli mRNA eucariotici perché le estremità 3' degli mRNA non sono le posizioni in cui l'RNA polimerasi II interrompe la trascrizione. Infatti, l'enzima continua a trascrivere il gene ben oltre la sequenza di addizione della coda poli-A, che definisce dove si troverà l'estremità 3' dell'mRNA. Cioè, il trascritto primario viene tagliato circa 24 basi a valle della sequenza di aggiunta del poli-A e la coda poli-A viene aggiunta in quella posizione, ma l'RNA polimerasi II può continuare a sintetizzare il trascritto primario per diverse migliaia di basi oltre questo punto.

**8.41** Il ribosoma riconosce un complesso proteico all'estremità 5' degli mRNA eucariotici e scansiona l'RNA nella direzione da 5' a 3' per trovare il primo AUG; la traduzione inizia lì. Questo metodo

garantisce che solo il primo ORF in un mRNA eucariotico venga tradotto, quindi gli mRNA policistronici non possono esistere negli eucarioti. Al contrario, i ribosomi procariotici legano sequenze specifiche sull'mRNA che si trovano appena a monte dei codoni di inizio. Poiché i ribosomi possono riconoscere indipendentemente più di uno di questi siti di legame del ribosoma (RBS; chiamati anche sequenze Shine-Dalgarno) sullo stesso mRNA, gli mRNA procariotici possono essere multicistronici. Come vedremo nel Capitolo 17, ciò fornisce alle cellule batteriche un modo conveniente per regolare simultaneamente l'espressione di più geni dello stesso pathway.

**8.42** Le mutazioni non senso o frameshift che interessano i codoni per gli amminoacidi vicino al C-terminale sono generalmente meno gravi delle mutazioni non senso o frameshift nei codoni per gli amminoacidi vicino all'N-terminale, perché sarà interessata una parte più piccola della proteina.

**a.** Effetto molto grave in quanto non ci saranno proteine funzionali.

**b.** Probabilmente effetto lieve se nessuno degli ultimi amminoacidi è importante per la funzione.

**c.** Effetto molto grave poiché la maggior parte degli amminoacidi nella proteina non sarà corretta.

**d.** Probabilmente un effetto lieve poiché solo gli ultimi amminoacidi saranno interessati.

**e.** Nessun effetto perché per definizione una mutazione silente mantiene lo stesso amminoacido.

**f.** Da lieve a nessun effetto in quanto la sostituzione è con un amminoacido con proprietà chimiche simili.

**g.** Effetto grave poiché è probabile che la mutazione distrugga l'attività della proteina.

**h.** L'effetto potrebbe essere grave se colpisce la struttura della proteina abbastanza da ostacolare l'azione della proteina, o potrebbe essere lieve se la funzione della proteina può tollerare la sostituzione.

**8.43 a.** L'omologo con la delezione ha di fatto un allele nullo per tutti i geni all'interno della delezione, perché i geni non sono affatto presenti. Pertanto, se un genotipo *mutante/delezione* ha lo stesso fenotipo mutante del genotipo *mutante/mutante*, è probabile che l'allele mutante abbia lo stesso livello di attività di un allele con attività zero (la delezione).

Una limitazione di questo test è che presuppone che il fenotipo sia proporzionale alla quantità di attività dell'enzima. Tuttavia, questa ipotesi non è sempre valida perché alcuni fenotipi implicano un livello soglia di attività enzimatica. In al-



tre parole, l'organismo mostra il fenotipo mutante a condizione che il livello di attività dell'enzima sia al di sotto di una certa soglia critica. Una volta che il livello di attività enzimatica supera questo livello, il fenotipo diventa selvatico.

Come esempio di questa limitazione, si immagina una situazione in cui qualsiasi individuo ha il fenotipo mutante se l'attività enzimatica è  $< 30\%$ . Supponiamo che l'allele  $m$  di un gene autosomico produca un enzima con il 20% dell'attività dell'enzima codificato dall'allele wild-type. Pertanto, un individuo  $m/m$  avrebbe il 20% dell'attività enzimatica degli omozigoti di tipo selvatico e un eterozigote  $m/delezione$  avrebbe solo il 10% della normale attività enzimatica. A causa della soglia, entrambi questi individui avrebbero lo stesso fenotipo mutante, ma l'allele  $m$  chiaramente non è nullo.

**b.** (I) Gli anticorpi possono essere utilizzati per rilevare proteine specifiche, presenti negli organismi  $m/m$  o  $m/delezione$ . (II) Esistono metodi molecolari per rilevare mRNA corrispondenti a geni specifici. Supponendo che i metodi utilizzati siano altamente sensibili (una condizione importante), l'assenza della proteina o dell'mRNA significherebbe che  $m$  è un allele nullo. Si noti, tuttavia, che la presenza di RNA o proteine non significa necessariamente che l'allele non sia nullo. Il motivo è che l'RNA o la proteina potrebbero avere un cambiamento in una base o in un amminoacido che lo rende non funzionale. (III) Infine, l'analisi della sequenza del DNA di un allele mutante può spesso aiutare a determinare se è probabile che l'allele mantenga qualche funzione (per esempio, se esiste una mutazione frame-shift). Tutte queste tecniche saranno discusse in dettaglio nei capitoli successivi. In generale, può essere abbastanza difficile determinare con certezza se un allele è nullo o meno.

- 8.44** La dimensione della proteina è di 2532 amminoacidi. Pertanto, l'mRNA deve essere minimo  $2532 \times 3 = 7,6$  kb e potrebbe essere considerevolmente più grande quando si tiene conto degli UTR e della coda poli-A. Per essere rilevabile, qualsiasi modificazione deve essere superiore all'1% della dimensione o della quantità normale. Le risposte seguenti sono presentate nell'ordine di (I) dimensione dell'mRNA; (II) quantità di mRNA; (III) dimensione delle proteine; (IV) quantità di proteine. Un "+" significa che ci sarà una variazione  $> 1\%$ , mentre un "-" significa che non ci sarà alcuna modificazione. Assumiamo nelle risposte seguenti [tranne la parte (j)] che gli

mRNA o le proteine mutanti abbiano una stabilità normale, sebbene questo non sia sempre vero nella pratica.

**a.** — — — — Questa è una sostituzione amminocidica non conservativa che modifica l'identità di un solo nucleotide nell'mRNA e di un singolo amminoacido nella proteina. La mutazione può influenzare la capacità della proteina di funzionare normalmente, ma non influenzerà le dimensioni o la quantità di mRNA o proteine.

**b.** — — — — Questo è un cambiamento conservativo dell'amminoacido, quindi probabilmente non influenzerà la funzione della proteina.

**c.** — — — — Questo è un cambiamento silente, quindi non influirà su alcun parametro rilevabile.

**d.** — — + — Questa è una mutazione non senso, quindi non influenzerà la dimensione o la quantità di mRNA, né la quantità di proteine. Influirà sulla dimensione della proteina, rendendola notevolmente più corta.

**e.** — — — + AUG1AGG molto probabilmente significa che non viene prodotta alcuna proteina, perché il ribosoma non può iniziare la traduzione da un codone Arg (AGG). Tuttavia, è concepibile che una versione troncata N-terminale della proteina normale possa essere realizzata se esiste un altro codone 5'AUG a valle, in-frame, che può essere utilizzato per avviare la traduzione. Se la traduzione da questo codone di inizio alternativo è altrettanto efficiente del normale codone di inizio, la risposta sarebbe invece — — + —. Se la proteina sia più piccola di più dell'1% dipende dalla posizione di tale 5'AUG a valle. Ancora un'altra possibilità è che la traduzione inizi da un 5'AUG che è fuori frame. In questo caso, è probabile che venga prodotta una proteina molto piccola non correlata alla proteina normale; ci si attende che in una sequenza casuale di coppie di basi un codone di stop appaia dopo circa 20 triplette.

**f.** — + — + Una mutazione nel promotore molto probabilmente renderebbe il promotore più debole, quindi l'RNA polimerasi si legherebbe meno efficientemente. Con meno mRNA, verrebbero prodotte meno proteine.

**g.** — — + — Questo cambiamento non è rilevabile nell'mRNA, ma provocherà una mutazione frameshift che influenzerà ovviamente le dimensioni della proteina.

**h.** — — — — Una delezione di 3 basi (un codone) rimuoverebbe solo 1 amminoacido/2532 amminoacidi; questa è una variazione  $< 1\%$  nella dimensione dell'mRNA o della proteina.

**i.** + - + - Questa mutazione provoca lo splicing alternativo, rimuovendo l'esone 19. Se l'esone 20 inizia nello stesso frame dell'esone 19, questa mutazione rimuoverebbe gli amminoacidi codificati dall'esone 19 e questo potrebbe facilmente avere un effetto  $>1\%$  sulla dimensione dell'mRNA e della proteina a seconda della dimensione dell'esone 19. Se l'esone 20 inizia in un frame diverso rispetto all'esone 19, la mutazione causerebbe uno spostamento del frame nell'mRNA che altererebbe la dimensione della proteina.

**j.** + + + - La rimozione del sito di addizione di poli-A potrebbe influenzare la dimensione dell'mRNA in due modi diversi. In primo luogo, la mancanza di una coda poli-A renderebbe l'mRNA un po' più piccolo; se la coda poli-A è normalmente di 200 nt, allora un mRNA privo della coda sarebbe di circa il 2,6% più corto  $[(200/7600) \times 100]$ . D'altra parte, tuttavia, la mutazione del sito di addizione della poli-A potrebbe comportare un mRNA più lungo del normale perché il trascritto primario non verrebbe tagliato nel sito giusto. L'estremità 3' dell'mRNA sarebbe quindi definita dal punto in cui si interrompe la trascrizione, che potrebbe essere di molti kb a valle.

Si noti che una delle principali funzioni della coda poli-A è mantenere la stabilità dell'mRNA. Quindi, la perdita del sito poli-A dovrebbe ridurre la stabilità dell'mRNA. Se l'mRNA viene rapidamente degradato, verranno tradotte meno proteine.

**k.** - - - - Una sostituzione di base al 5' UTR non avrebbe alcun effetto sulla dimensione dell'mRNA e probabilmente nessun effetto sulla stabilità dell'mRNA. Questo cambiamento non avrebbe alcun effetto sulla dimensione delle proteine e molto probabilmente nessun effetto sulla quantità di proteine. Tuttavia, esistono scenari in base ai quali una sostituzione di base al 5' UTR potrebbe potenzialmente influenzare la localizzazione o la stabilità dell'mRNA e quindi influenzare indirettamente le quantità di proteine. Inoltre, anche se sono presenti quantità normali di mRNA, questa mutazione potrebbe plausibilmente influenzare la capacità del ribosoma di legarsi all'mRNA o di "scansionare" l'mRNA per trovare il codone di inizio. In tal caso, la traduzione dell'mRNA in proteine sarebbe meno efficiente.

**l.** - - - - Se questo inserimento è in un introne, allora dovrebbe essere eliminato dal trascritto

primario, producendo un mRNA maturo di tipo selvatico.

**8.45 a.** Definiamo qui mutanti nulli quelli senza attività proteica. Nei casi peggiori, le seguenti modificazioni potrebbero portare alla perdita dell'attività enzimatica:

a. (se questa sostituzione amminoacidica blocca l'attività proteica);

b. (se questa sostituzione amminoacidica blocca l'attività proteica);

c. (la proteina tronca non avrebbe attività proteica);

d. (se non avviene l'inizio della traduzione);

e. (se il promotore non funziona);

f. (il frameshift altererebbe la maggior parte della sequenza amminoacidica della proteina);

g. (è possibile che la delezione di un amminoacido blocchi la funzione della proteina o alteri la struttura terziaria o quaternaria della proteina);

h. (verrà prodotta una proteina tronca priva degli amminoacidi codificati dall'esone 19 o degli amminoacidi codificati dall'esone 19 e di tutti gli esoni a valle);

i. (potrebbe rendere l'mRNA completamente instabile. Nota: di solito, questo tipo di mutazione ha effetti meno gravi sulla stabilità dell'mRNA.);

j. (se l'mRNA è stato completamente degradato o la traduzione è stata completamente bloccata. Nota: in pratica, è altamente improbabile che questo tipo di mutazione causi una riduzione così grave dell'espressione genica).

**b.** È probabile che qualsiasi mutazione che produca una proteina alterata con funzione ridotta o livelli inferiori di proteine altrimenti funzionali sia recessiva sul tipo selvatico. Per la maggior parte, gli alleli nulli o ipomorfi sono in realtà mutazioni recessive con perdita di funzione. Sono recessivi perché, per la maggior parte dei geni, l'omozigosi per l'allele di tipo selvatico produce più del doppio della quantità di proteine richiesta per un fenotipo di tipo selvatico. La perdita di una delle due copie del gene non altererà quindi il fenotipo wild-type. Per questo motivo, una qualsiasi delle mutazioni nell'elenco (tranne c e j) potrebbe essere recessiva rispetto al tipo selvatico. Come spiegato nella risposta alla parte (a), è improbabile che le mutazioni j e k producano conseguenze abbastanza gravi da alterare i fenotipi, ma raramente potrebbero farlo.

**c.** Qualsiasi mutazione diversa da c e j potrebbe essere potenzialmente dominante rispetto al tipo selvatico. Tuttavia, si deve ricordare che la maggior parte degli scenari descritti di seguito, che

portano a fenotipi dominanti, è generalmente molto meno comune degli effetti recessivi dovuti alla perdita di funzione.

Per la maggior parte di queste mutazioni potenzialmente dominanti, se l'allele fosse nullo o fortemente ipomorfo la dominanza potrebbe essere dovuta all'aploinsufficienza, in cui un allele di tipo selvatico del gene non esprime abbastanza prodotto genico per un fenotipo selvatico. Questa possibilità vale per qualsiasi mutazione che alteri il prodotto proteico in termini di dimensioni o quantità.

Qualsiasi mutazione che modifica la dimensione o la sequenza della proteina potrebbe potenzialmente avere effetti dominanti negativi o neomorfi che dipenderebbero dalla proteina (per esempio, se è multimerica) e dalle esatte conseguenze della mutazione.

Infine, è possibile che una mutazione del promotore, come in g, possa "accendere" un gene nel tessuto sbagliato o nel momento sbagliato, portando a un allele neomorfo dovuto all'espressione ectopica.

**8.46 a.** L'esone 1 codifica parte del 5' UTR.

**b.** Le mutazioni elencate molto probabilmente influenzano lo splicing del trascritto primario dell'RNA, in particolare lo splicing degli esoni 1 e 2. La Figura 8.15 mostra che la sequenza di consenso del donatore di splicing all'estremità 5' degli introni è GUPuPu (dove Pu = purine). I geni *SMARCAD1* nelle famiglie 1, 2 e 4 hanno sostituzioni di base nella G o nella U della sequenza del donatore di giunzione. La famiglia 3 ha una sostituzione nella base che segue il GUPuPu. Anche questa mutazione potrebbe influenzare lo splicing perché molti ricercatori considerano la sequenza consenso GUPuPuGU. Il fatto che la mutazione di *SMARCAD1* nella famiglia 3 sia una sostituzione G → C nella quinta base del consenso esteso fornisce la prova che l'identità di questa base è davvero importante per lo splicing.

**c.** Queste mutazioni di *SMARCAD1* sono molto probabilmente a perdita di funzione. Se l'introne 1 è grande, probabilmente contiene un AUG. La traduzione partirebbe dall'AUG intronico e quindi bloccherebbe il corretto avvio della traduzione. Il prodotto di traduzione mutante molto probabilmente non sarebbe in-frame con il vero ORF a valle. Anche se fosse a registro, l'aggiunta di molti amminoacidi "superflui" all'N-terminale potrebbe impedire alla proteina *SMARCAD1* di ripiegarsi correttamente. Inoltre, la mancata rimozione del primo introne potrebbe destabiliz-

zare l'mRNA o impedire lo splicing di altri introni.

È possibile, sebbene altamente improbabile, che le mutazioni dell'adermatoglia siano a guadagno di funzione. Se la traduzione a partire dall'interno dell'introne 1 fosse a registro con il normale ORF, la proteina risultante con diversi amminoacidi "superflui" all'N-terminale potrebbe plausibilmente acquisire una nuova funzione.

**8.47 a.** In tutti e tre i casi, si osservano proteine tronche perché è stata generata una mutazione non senso (famiglie 1 e 3) o una mutazione frameshift (famiglia 2). Nella famiglia 1, una mutazione G → A all'interno dell'ORF dell'esone 15 potrebbe, per esempio, modificare un codone di senso TGG in un codone di stop TAG. Nella famiglia 3, una mutazione C → G all'interno dell'ORF dell'Eso- ne 10 potrebbe, per esempio, modificare un codone TAC in TAG. Il fatto che la proteina prodotta nella famiglia 3 (458 amminoacidi) sia molto più corta di quella prodotta nella famiglia 1 (898 amminoacidi) favorisce questa idea perché una mutazione non senso nell'esone 10 (famiglia 3) terminerebbe la traduzione prima nell'ORF di una mutazione non senso nell'esone 15 (famiglia 1).

Il problema non specifica la posizione della singola coppia di basi eliminata nella famiglia 2. Molto probabilmente, la coppia di basi era in un esone; questa mutazione frameshift genererebbe un codone di stop a un certo punto a valle della delezione. È anche concepibile, sebbene meno probabile, che la coppia di basi si trovi in un introne e faccia parte di una sequenza necessaria per uno splicing corretto. Un mRNA non maturato correttamente avrebbe probabilmente un codone di arresto a valle della giunzione impropria.

**b.** Gli alleli mutanti sono molto probabilmente a perdita di funzione e amorfi. Due fatti sono più coerenti con questa ipotesi: (1) solo gli omozigoti sono interessati; (2) le proteine sono molto più accorciate rispetto alle proteine normali ed è quindi probabile che non abbiano alcuna funzione. Tuttavia, se le proteine tronche conservassero un dominio funzionale, gli alleli potrebbero essere ipomorfi.

**c.** Probabilmente, gli individui avranno fenotipi normali se i loro nervi hanno il 50% o più della quantità normale della proteina SCA9A del canale del sodio.

**8.48** Negli eterozigoti per un allele antimorfo e un allele normale, la proteina antimorfa inibisce la funzione di alcune, ma non tutte, le proteine normali. Pertanto, la quantità di attività proteica normale

in un eterozigote *antimorfo/wild type* potrebbe essere simile alla quantità di attività proteica in un omozigote per un allele ipomorfo dello stesso gene. Per esempio, supponiamo che un allele antimorfo del gene A inibisca l'80% della normale attività genica e un allele ipomorfo del gene A abbia il 10% della normale attività genica. Quindi, un eterozigote *antimorfo/wild type*, così come un omozigote per un allele ipomorfo, avrebbero ciascuno il 20% della normale attività genica.

- 8.49 a.** In una data specie, l'uso di codoni sinonimi non è uniforme; in altre parole, alcuni codoni per un determinato amminoacido verranno usati più frequentemente di altri. Queste preferenze di codone sono specie-specifiche. Spesso, inoltre, tRNA diversi normalmente decodificano codoni diversi che specificano lo stesso amminoacido. Per esempio, supponiamo che in una specie particolare un tRNA<sup>Ser</sup> con l'anticodone 3'AGI5' decodifichi i codoni 5'UCU/C/A3' e un tRNA<sup>Ser</sup> diverso, con l'anticodone 3'AGC5', decodifichi i codoni 5'UCG3'. Supponiamo inoltre che i codoni 5'UCG3' siano rari in questa specie, così come le molecole tRNA<sup>Ser</sup> con l'anticodone 3'AGC5'. Una mutazione che cambia un codone 5'UCU3' in un codone 5'UCG3' potrebbe comportare che l'allele mutante venga tradotto in modo meno efficiente dell'allele normale e, quindi, dall'allele mutante verrebbe prodotta una quantità di proteine minore del normale.
- b.** In generale, gli effetti fenotipici delle mutazioni che cambiano un codone in uno sinonimo dovrebbero essere lievi. Il motivo è che per ogni dato codone, l'aspettativa è che ci sia sempre un tRNA presente in grado di decodificarlo.

- 8.50 a.** Sia gli alleli a perdita di funzione sia quelli a guadagno di funzione possono essere dominanti rispetto agli alleli normali.
1. *GLI3*<sup>-</sup> è un allele a perdita di funzione dominante su *GLI3*<sup>+</sup> perché il gene *GLI3* è aploinsufficiente; gli eterozigoti *GLI3*<sup>-</sup>/*GLI3*<sup>+</sup> hanno la metà della normale quantità di proteina Gli3, il che si traduce in dita sopranumerarie.
  2. *FGFR3*<sup>G480R</sup> è ipermorfo; produce una proteina costitutivamente attiva che inibisce la crescita ossea in modo più efficiente rispetto alla normale proteina *FGFR3* (vedi Figura 8.31). *FGFR3*<sup>G480R</sup> è dominante rispetto a *FGFR3*<sup>+</sup> perché negli eterozigoti *FGFR3*<sup>G480R</sup>/*FGFR3*<sup>+</sup>, la presenza della normale proteina *FGFR3* non impedisce alla proteina *FGFR3*<sup>G480R</sup> anormale di inibire eccessivamente la crescita ossea.
  3. L'allele *HD*<sup>-</sup> è neomorfo; produce una proteina con una regione poliQ estesa che interferisce

con la funzione delle cellule nervose, anche in presenza della normale proteina HD in un eterozigote *HD*<sup>-</sup>/*HD*<sup>+</sup> (vedi Figura 1.19 nel Capitolo 1 e Figura A nel riquadro "Uno sguardo in avanti" Malattie da ripetizioni di triplette nel Capitolo 6).

4. *Axin*<sup>Kinky</sup> è un allele dominante negativo; produce una proteina mutante che impedisce il funzionamento della normale proteina Axin. *Axin*<sup>Kinky</sup> è dominante rispetto ad *Axin*<sup>+</sup> perché negli eterozigoti *Axin*<sup>Kinky</sup>/*Axin*<sup>+</sup> la funzione della normale proteina Axin è ridotta (vedi Figura 8.33).

**b.** 1. Gli omozigoti *GLI3*<sup>-</sup> muoiono prima della nascita perché il gene *GLI3* è pleiotropico: funziona nel formare il numero corretto di dita e anche in altri processi vitali durante lo sviluppo.

2. Gli omozigoti *FGFR3*<sup>G480R</sup> muoiono prima della nascita per due motivi. Uno è che l'inibizione dello sviluppo osseo è più grave che negli eterozigoti. (Se questo effetto da solo provoca la morte dell'embrione, potremmo sostenere che l'allele *FGFR3*<sup>G480R</sup> e l'allele *FGFR3*<sup>-</sup> non sono completamente dominanti.) Un'altra ragione è che il gene *FGFR3* è pleiotropico; è coinvolto nello sviluppo di tessuti diversi dall'osso. Negli omozigoti *FGFR3*<sup>G480R</sup>/*FGFR3*<sup>G480R</sup>, l'effetto del doppio della quantità di proteina *FGFR3*<sup>G480R</sup> iperattiva rispetto agli eterozigoti *FGFR3*<sup>G480R</sup>/*FGFR3*<sup>+</sup> è la letalità.

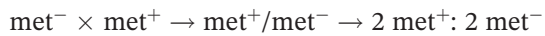
3. Esistono individui *HD*<sup>-</sup>/*HD*<sup>-</sup> con la malattia di Huntington. Avere due dosi della proteina mutante HD provoca una malattia più grave (esordio precoce) rispetto a quella osservata negli eterozigoti, ma non è letale. Ci si aspetterebbe che l'assenza della normale proteina HD sia letale, ma esistono individui *HD*<sup>-</sup>/*HD*<sup>-</sup> perché oltre alla sua funzione anormale, la proteina mutante *HD*<sup>-</sup> mantiene la normale funzione proteica.

4. Gli omozigoti *Axin*<sup>Kinky</sup> muoiono perché mancano completamente della normale proteina Axin. Il gene *Axin* è pleiotropico; la normale proteina Axin interviene in molti processi di sviluppo oltre alla formazione della coda, alcuni dei quali sono vitali.

- 8.51** Si incrociano ciascuna delle colonie revertanti con un aploide di tipo selvatico per generare un eterozigote diploide (fenotipo di tipo selvatico). Quindi si lascia sporulare il diploide e si esamina il fenotipo delle spore. Si potrebbero sezionare i singoli aschi e quindi osservare i fenotipi delle 4 spore che contengono, ma si può anche determinare il fenotipo delle spore in totale e osservare il rapporto tra Met<sup>+</sup> e Met<sup>-</sup>.



Se il fenotipo  $Met^+$  è dovuto a una vera reversione, allora l'incrocio era:



Se c'è una mutazione soppressore non linked in un altro gene, il soppressore ( $su^-$ ) e la mutazione originale  $met^-$  dovrebbero assortire indipendentemente durante la meiosi:  $met^- su^-$  (fenotipicamente  $Met^+$ )  $\times$   $met^+ su^+$  (tipo selvatico)  $\rightarrow$  diploide  $met/met^+; su^-/su^+ \rightarrow 1 met^- su^-$  ( $Met^+$ );  $1 met^- su^+$  ( $Met^-$ );  $1 met^+ su^-$  ( $Met^+$ );  $1 met^+ su^+$  ( $Met^+$ ) = 3  $Met^+$ : 1  $Met^-$ .

Da notare che se i due geni ( $met$  e  $su$ ) sono associati, si otterrebbero comunque le stesse quattro classi, ma le proporzioni dei gameti ricombinanti aumenteranno all'aumentare della distanza tra i due geni. L'unico dei due tipi ricombinanti che verrà rilevato sarà  $met^- su^+$  perché è l'unico con un fenotipo  $Met^-$ . Pertanto, tra le spore casuali, la frequenza di  $Met^-$  diminuirà dal 50% al 25% all'aumentare della distanza tra i due geni.

È ora possibile determinare la sequenza di DNA dell'intero genoma del lievito in modo relativamente economico, quindi si potrebbero anche sequenziare i genomi del ceppo  $met^-$  originale e delle cinque apparenti reversioni per osservare se la coppia di basi responsabile della mutazione è ancora presente.

- 8.52** Le tRNA sintetasi riconoscono molti aspetti della forma di un tipo di tRNA, dettati dalla sequenza di base, e l'anticodone è solo un aspetto della forma tridimensionale di un tRNA. Poiché il suo anticodone ha una sequenza di basi alterata, il  $tRNA^{Tyr}$  mutante soppressore potrebbe non essere riconosciuto in modo altrettanto efficiente del  $tRNA^{Tyr}$  di tipo selvatico dalla Tyr tRNA sintetasi. Tuttavia, viene caricato di Tyr in modo abbastanza efficiente da funzionare come un soppressore di mutazione non senso.

- 8.53 a.** L'anticodone in questo tRNA soppressore è 5'CUA. Le regole del vacillamento (Figura 8.21b) prevedono che un anticodone con una base 5' C può accoppiarsi solo con un codone che ha una G come base 3', e nessun'altra base 5' può accoppiarsi solo con G come 3'. Pertanto, 5'CUA3' può accoppiarsi con un codone di stop 5'UAG ma non con qualsiasi altra tripletta.

**b.** Il  $tRNA^{Gln}$  wild-type riconosce un codone 5'CAA o 5'CAG. Solo un singolo nucleotide è stato modificato per trasformare il tRNA di tipo selvatico nel soppressore di non senso. Pertanto, la mutazione deve essere stata la 3'A dell'anticodone

mutante 5'CUA. La sequenza dell'anticodone nel tRNA wild-type è quindi 5'CUG. Il filamento stampo impiegato per produrre il tRNA è complementare alla sequenza di tRNA stessa, quindi la sequenza del filamento di DNA stampo per il gene  $tRNA^{Gln}$  wild-type è 5'CAG.

**c.** Una cellula wild-type di qualsiasi specie deve avere almeno un gene  $tRNA^{Gln}$ . L'unico tRNA che codifica deve essere in grado di riconoscere entrambi i codoni Gln normali: 5'CAA e 5'CAG. Le regole del vacillamento dicono che un tRNA con un anticodone 3'GUU può riconoscere entrambi i codoni Gln se la U vacillante nell'anticodone viene modificata in  $xm^5U$  o  $xm^5s^2U$ , quindi uno sarebbe il numero minimo di geni  $tRNA^{Gln}$  in qualsiasi organismo. Tuttavia, *B. adonis* è una specie che può ospitare il  $tRNA^{Gln}$  che sopprime il non senso discusso nella parte (a). Pertanto, almeno due geni  $tRNA^{Gln}$  devono esistere in una cellula di *B. adonis* di tipo selvatico. Uno codificherebbe il  $tRNA^{Gln}$  (anticodone 5'CUG) che è stato trasformato in un soppressore di non senso e l'altro gene codificherebbe il  $tRNA^{Gln}$  (anticodone di 5' $xm^5UUG$  o 5' $xm^5s^2UUG$ ) che riconosce entrambi i codoni Gln normali.

- 8.54 a.** C'è una progressione delle mutazioni dai codoni Pro (5'CCN, tipo selvatico) a Ser (5'UCN, non funzionale) a Trp (5'UGG, ceppo B, funzione normale). Il codone della prolina wild-type originale doveva essere 5'CCG, quindi la sequenza del DNA in questa regione doveva essere:

5'CCG3'

3'GGC5'

**b.** L'amminoacido wild-type è Pro (prolina). L'amminoacido nella stessa posizione nel ceppo B è Trp (triptofano). Sebbene gli amminoacidi siano diversi, il fenotipo del ceppo B è di tipo selvatico. Ciò significa che Trp in posizione 5 è compatibile con la normale funzione dell'enzima codificato dal gene. Questo fatto implica che il passaggio da Pro a Trp è una sostituzione conservativa. Infatti, nella Figura 7.8b si osserva che Pro e Trp sono entrambi amminoacidi con gruppi R non polari. La mutazione originale ha cambiato Pro in Ser (serina). Questo mutante non è funzionale, quindi Ser in posizione 5 non è compatibile con la funzione enzimatica: è una sostituzione non conservativa. La Figura 7.8b mostra che Ser ha un gruppo R polare non carico, quindi è probabile che le sue proprietà chimiche siano molto diverse da quelle di Pro.

**c.** Il ceppo C non ha alcuna proteina rilevabile, quindi è probabile che sia una mutazione non

senso che interrompe la traduzione dopo che sono stati aggiunti solo pochi amminoacidi. Un modo in cui ciò sarebbe potuto accadere è che il codone per Ser nel mutante (5'UCG) potrebbe essere stato modificato dalla mutazione in 5'UAG. Tuttavia, la mutazione non senso potrebbe essersi verificata anche in altre posizioni nella regione codificante del gene.

**d.** Il ceppo C-1 è un revertante dello stesso sito [per esempio, 5'UAG → codone di senso in uno scenario delineato nella parte (c)] o di un secondo sito in un altro gene (quasi certamente una mutazione del tRNA che sopprime il non senso). Poiché la mutazione di reversione non mappa nel locus dell'enzima, deve essere una mutazione in un gene per un tRNA che codifica un tRNA soppressore di non senso.

**8.55** Un tRNA soppressore della mutazione di senso ha una mutazione nel suo anticodone, in modo che il tRNA riconosca un codone che non corrisponde all'amminoacido che trasporta. I tRNA soppressori di senso inseriscono quindi un amminoacido inappropriato in risposta a quel codone. Il problema 53 riguardava il cambiamento dell'anticodone tRNA<sup>Gln</sup> da 3'GUC5' a 3'AUC5', creando un tRNA soppressore di non senso. Si immagina invece che l'anticodone tRNA<sup>Gln</sup> sia mutato in 3'GCC5'. Questo tRNA mutante si appaierà ai codoni 5'CGG3', inserendo così Gln in una proteina al posto di Arg. Questo è un esempio di soppressore di mutazioni di senso.

**a.** Consideriamo qui l'effetto della presenza in una cellula di un tRNA di senso o non senso sulle proteine normali che sono codificate da geni wild-type senza mutazioni di senso o non senso. Un tRNA che sopprime le mutazioni di senso ha il potenziale per cambiare l'identità di un amminoacido specifico che si trova in molti siti di molte proteine normali. Usando l'esempio sopra riportato di un soppressore di senso che sostituisce Arg con Gln, la maggior parte delle proteine ha molti amminoacidi Arg, quindi un soppressore di senso potrebbe potenzialmente sostituire Gln con Arg in molti siti in ogni proteina. Al contrario, una mutazione che sopprime il non senso può interessare solo una singola posizione nell'espressione di qualsiasi gene di tipo selvatico (cioè il codone di stop che termina la traduzione), allungando una proteina normale. La proteina più lunga avrà ancora tutti gli amminoacidi che compongono la sua controparte normale. Insieme, queste considerazioni significano che la presenza di un tRNA soppressore di senso ha più

probabilità di alterare le proteine sintetizzate nella cellula rispetto alla presenza di un tRNA soppressore di non senso.

**b.** Oltre alla situazione sopra descritta, in cui una mutazione in un gene tRNA cambierebbe l'anticodone per riconoscere un codone diverso, esistono altri modi per generare la soppressione di senso, tra cui:

1. una mutazione in un gene del tRNA in una regione diversa da quella che codifica per l'anticodone stesso, così che l'amminoacil-tRNA sintetasi sbagliata a volte riconoscerebbe il tRNA e lo caricherebbe con l'amminoacido sbagliato;
2. una mutazione in un gene dell'amminoacil-tRNA sintetasi, che produce un enzima che a volte legherebbe l'amminoacido sbagliato su un tRNA;
3. una mutazione in un gene che codifica per una proteina ribosomiale, un RNA ribosomiale o un fattore di traduzione che renderebbe il ribosoma più soggetto a errori, inserendo l'amminoacido sbagliato nel polipeptide;
4. una mutazione in un gene che codifica per una subunità della RNA polimerasi che a volte farebbe trascrivere la sequenza da parte dell'enzima in modo errato.

**8.56** Se un tRNA sopprime le mutazioni frameshift +1, allora deve avere un anticodone complementare a 4 basi, invece di 3.

**8.57** Utilizzare le regole del vacillamento (Figura 8.21b) per risolvere questo problema.

**a.** I codoni non senso che differiscono solo alle estremità 3' sono 5'UAG e 5'UAA.

**b.** Un tRNA con l'anticodone 5'xm<sup>5</sup>UUA o 5'xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>UUA potrebbe riconoscere entrambi i codoni non senso perché la U modificata all'estremità 5' dell'anticodone potrebbe appaiarsi con G o A all'estremità 3' dei codoni non senso e l'anticodone non potrebbe riconoscere alcun altro codone.

**c.** Questa domanda chiede quali tRNA di tipo selvatico potrebbero avere i loro anticodoni mutati a 5'UUA da un singolo cambiamento nucleotidico. Considerando la tabella del codice genetico e le regole del vacillamento, pensiamo a quali anticodoni potrebbero essere mutati in 5'UAA. Si ricordi che un anticodone può esistere solo se è specifico per un singolo amminoacido.

Per prima cosa, si immagina che la A finale nell'anticodone 5'UUA sia la base mutante. Si supponga che, proprio come nel tRNA mutante, la U vacillante sia modificata in xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U nel tRNA normale. In tal caso, un anticodone 5'UUG

sarebbe stato un tRNA<sup>Gln</sup> [codone = 5'CA (A/G)], un anticodone 5'UUC un tRNA<sup>Glu</sup> [codone = 5'GA (A/G)] e un 5' UUU anticodone a tRNA<sup>Lys</sup> [codone = 5'AA (A/G)].

Quindi, supponiamo che la base centrale in 5'UAA3' sia quella mutante, e supponiamo ancora che la U vacillante sia modificata in xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U nel tRNA normale. Un anticodone 5'UAA sarebbe un tRNA<sup>Leu</sup> [codone = 5' UU (A/G)] e un anticodone 5'UGA sarebbe un tRNA<sup>Ser</sup> [codone = 5'UC (A/G)]. L'anticodone 5'UCA potrebbe essere un tRNA<sup>Trp</sup> solo se la U vacillante viene modificata in xm<sup>5</sup>U [in modo che venga riconosciuto solo UGG e non UGA (stop)], il che significa che la mutazione dell'anticodone in 5'UUA ha alterato la modificazione della U vacillante in xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U. (Si noti che tutti gli anticodoni suggeriti sopra come possibilità per il tRNA di tipo selvatico originale sono specifici per un singolo amminoacido indipendentemente dal fatto che la loro U vacillante sia modificata in xm<sup>5</sup>U o xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U.)

Infine, si supponga che la base vacillante del tRNA 5'UUA sia quella mutante. Non può esistere un anticodone 5'UA, perché riconoscerebbe i codoni 5'UA (U/C/A) e 5'UAA è un codone di stop. Allo stesso modo, l'anticodone 5'CUA non può esistere in quanto riconoscerebbe il codone di stop 5'UAG. L'anticodone 5'GUA sarebbe tRNA<sup>Tyr</sup>.

Raccogliendo insieme queste risposte: Gln, Glu, Lys, Leu, Ser, Tyr e forse Trp.

- 8.58** Nella seconda specie batterica in cui l'isolamento dei soppressori non senso non era possibile, dovevano esservi un solo gene tRNA<sup>Tyr</sup> e un singolo gene tRNA<sup>Gln</sup>. Pertanto, se uno dei due geni mutasse in un soppressore di non senso, sarebbe letale per la cellula, poiché non ci sarebbe alcun tRNA che potrebbe aggiungere Tyr o Gln nei siti che lo richiedono (il Problema 53c utilizzava lo stesso tipo di ragionamento). In questo scenario, il singolo tRNA<sup>Tyr</sup> dovrebbe avere un anticodone di 3'AUG5' per riconoscere i due codoni Tyr di 5'UAU3' e 5'UAC3' in base alle regole del vacillamento (Figura 8.21b). Il singolo tRNA<sup>Gln</sup> dovrebbe avere un anticodone di 3'GUxm<sup>5</sup>U5' o 3'GUxm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U5' per riconoscere entrambi i codoni Gln 5'CAG3' e 5'CAA3'.

- 8.59 a.** Il gene mutante codificava per un tRNA il cui anticodone poteva riconoscere il codone di stop 5'UAG. Supponendo che il tRNA soppressore non senso fosse specifico per quel codone di stop (ovvero, il soppressore non riconosceva nessuno

degli altri due codoni di stop), la sequenza dell'anticodone mutante era 5'CUA o 5'xm<sup>5</sup>UUA.

**b.** Ciascuna proteina M ha probabilmente subito un singolo cambiamento amminoacidico nella sua sequenza polipeptidica; l'amminoacido con cui è stato caricato il tRNA soppressore del non senso è stato inserito al posto dell'amminoacido specificato dal codone normale che è stato cambiato in UAG dalla mutazione non senso.

[Note: (I) Anche se la sequenza amminoacidica non è identica al tipo selvatico, una proteina M prodotta dai fagi mutanti nei batteri *su<sup>-</sup>* potrebbe ancora avere una funzione di tipo selvatico a condizione che l'amminoacido inserito dal tRNA soppressore del non senso in quella posizione specifica della proteina sia compatibile con la funzione della proteina. (II) Sebbene il problema affermi che i mutanti mostrati in Figura 8.8 producono proteine con sequenze di amminoacidi diverse dal tipo selvatico, qualche altra proteina M prodotta da un fago con una mutazione non senso diversa potrebbe avere una sequenza di amminoacidi di tipo selvatico se, casualmente, il tRNA soppressore di non senso fosse stato caricato con l'amminoacido specificato dal codone originale.]

- 8.60 a.** In primo luogo, i meccanismi con cui tRNA<sup>Pyl</sup> e tRNA<sup>Sec</sup> vengono caricati con amminoacidi differiscono. Esiste una Pyl tRNA sintetasi specifica per caricare tRNA<sup>Pyl</sup> con Pyl. Al contrario, tRNA<sup>Sec</sup> è riconosciuto da una Ser tRNA sintetasi che carica il tRNA con Ser; Ser viene successivamente modificata enzimaticamente in Sec.

In secondo luogo, sebbene sia Sec che Pyl siano codificati da codoni non senso (stop), il modo in cui UGA viene riconosciuto come un codone Sec differisce dal modo in cui UAG viene utilizzato come codone Pyl. Per l'incorporazione di Sec, una speciale struttura di mRNA chiamata elemento SECIS, a valle dell'UGA, impedisce al ribosoma di terminare la traduzione. Il tRNA<sup>Pyl</sup> invece probabilmente funziona come un tRNA mutante soppressore di non senso. (Nei batteri che incorporano Pyl nei polipeptidi, ci si potrebbe aspettare che per i geni il cui registro di lettura aperto termina con UAG, venga prodotta una proteina più lunga del normale. Forse le cellule possono gestire questi polipeptidi più lunghi se le quantità prodotte sono piccole, o forse l'evoluzione contro-seleziona la comparsa di codoni UAG alla fine delle ORF dei geni in cui un prodotto polipeptidico più lungo del normale sarebbe deleterio.)

Terzo, qualcosa nella struttura dell'elemento tRNA<sup>Sec</sup> e/o SECIS consente un insolito appaiamento della base U nella posizione 5'dell'anticodone soltanto con A nel codone. Nel tRNA<sup>Sec</sup>, la U nella posizione di vacillamento può essere modificata in modo inusuale. L'interazione codone-anticodone che coinvolge tRNA<sup>Pyl</sup> non richiede alcun vacillamento non canonico.

**b.** Il tRNA<sup>Pyl</sup> caricato con Pyl deve raggiungere l'UAG sul ribosoma prima che il ribosoma interrompa la traduzione e rilasci l'mRNA. Inoltre, come appena descritto, sia il meccanismo di incorporazione di Pyl sia la soppressione del non senso potrebbero portare alla produzione di alcuni polipeptidi più lunghi del normale.

**8.61 a.** Le piante potrebbero aver sviluppato la capacità di produrre canavanina come protezione dai predatori. La canavanina è tossica per gli animali che mangiano la pianta; gli animali imparerebbero rapidamente a non usare la pianta come fonte di cibo.

**b.** Le piante che producono canavanina hanno sviluppato un gene che codifica per un'arginina amminoacil-tRNA sintetasi che non può caricare la canavanina sul tRNA<sup>Arg</sup>.

**c.** Anche il coleottero ha sviluppato un gene che codifica per un'arginina amminoacil-tRNA sintetasi che non può caricare la canavanina sul tRNA<sup>Arg</sup>.