

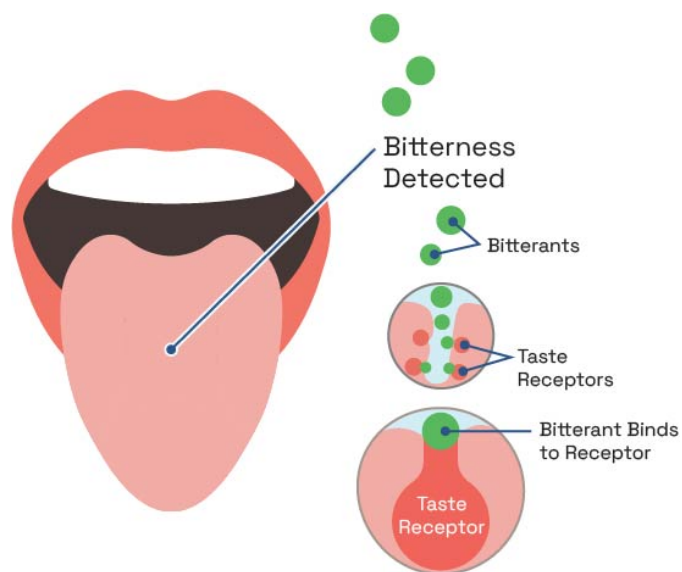


Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

QUESTIONI DI GUSTO

- Biotecnologie per l'analisi di polimorfismi -

Utilizzo di tecniche di analisi del DNA per studiare la variazione genetica del gene TAS2R38 associata alla percezione dell'amaro



Università degli Studi di Milano

Conoscenze propedeutiche, obiettivi e metodi sperimentali

Per poter svolgere questa attività, gli studenti devono avere precedentemente acquisito le conoscenze relative a: le leggi di Mendel, basi di genetica classica, mitosi e meiosi, geni indipendenti e geni associati, replicazione del DNA.

Obiettivi

Questo laboratorio tratta alcuni concetti importanti in genetica e biologia molecolare:

- rapporto fra genotipo e fenotipo
- i polimorfismi del DNA
- come i polimorfismi di singolo nucleotide (SNP) e le loro combinazioni (aplotipi) possono essere utilizzati per predire la sensibilità al gusto amaro .

Metodi sperimentali

- Amplificazione di una regione specifica del DNA con PCR
- Digestione con enzimi di restrizione dei prodotti di PCR
- Analisi dei prodotti della digestione con elettroforesi su gel di agarosio
- Bioinformatica: uso di BLAST per identificare sequenze all'interno di un database
- Posizionamento dei primer di PCR su una sequenza e calcolo della lunghezza dei prodotti di PCR

Enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione (ER) sono “forbici molecolari” in grado di tagliare la doppia elica del DNA in siti specifici (lunghi 4-8 paia di basi) detti “siti di restrizione” generando una serie di frammenti di diversa lunghezza, detta pattern di restrizione, specifica per il DNA di ogni individuo. Gli ER sono prodotti dai batteri che li utilizzano per difendersi dagli attacchi di un DNA estraneo, per esempio di un virus. Il DNA endogeno viene protetto modificando residui di adenina e citosina con l'aggiunta di gruppi metile (-CH₃).

Dal punto di vista biochimico gli ER sono delle endo-desossi-ribonucleasi che scindono un legame fosfodiesterico. Sono stati purificati 1027 enzimi di restrizione prodotti da 861 tipi di batteri diversi (Tab.1).

Una mutazione della sequenza di basi del DNA può creare o distruggere un sito di restrizione; digerendo il DNA di individui diversi con uno stesso ER, si osserva quindi un polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (in inglese Restriction Fragment Length Polymorphism o RFLP, pronuncia riflip).

Nome dell' ER	Pronuncia	Organismo di provenienza	Sito di restrizione e posizione del taglio
BamHI	bam-acca-uno	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G/GATC C C CTAG/G
EcoRI	eco-erre-uno	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATT C C TTAA/G
HindIII	indi-tre	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A/AGCT T T TCGA/A
DdeI	di-di-e-uno	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	C/TNA G G ANT/C

Nome dell' ER	Pronuncia	Organismo di provenienza	Sito di restrizione e posizione del taglio
MstII	emme-esse-ti-due	<i>Microcoleus species</i>	CC/TNA GG GG ANT/CC
SmaI	sma-uno	<i>Serratia marcescens</i>	CCC/GGG GGG/CCC

Tabella 1. Enzimi di restrizione e il loro sito di taglio. Gli enzimi di restrizione si indicano con un sistema di lettere e numeri che si riferisce al ceppo batterico da cui sono stati isolati. Nella tabella vengono mostrati alcuni esempi di enzimi di restrizione, le sequenze di DNA che questi tagliano e i prodotti di scissione. Alcuni enzimi tagliano le sequenze in modo da dare origine ad estremità coesive, mentre altri effettuano un taglio netto.

Come tutti i polimorfismi, i RFLP sono ereditabili come caratteri mendeliani semplici (Fig.1 A) e sono trasmessi come caratteri codominanti. Il fenotipo di un RFLP è evidenziabile in termini di differenze di numero e/o dimensione dei frammenti di DNA ottenuti dalla digestione con un certo enzima di restrizione. I frammenti sono visibili dopo migrazione elettroforetica su gel (Fig. 1 B).

Gli ER si possono suddividere in varie classi a seconda della specificità e della modalità di taglio.(Tab1); ER diversi riconoscono e tagliano, in linea di massima, sequenze diverse, dette sito di restrizione.

Uno stesso enzima taglia qualsiasi tipo di DNA dovunque trovi il proprio sito di restrizione. I siti di restrizione sono sequenze palindromiche, ovvero sequenze che possono essere lette in entrambe le direzioni, come ad esempio le parole ANNA o ETNA GIGANTE, di poche coppie di nucleotidi, in genere 4, 5 o 6.

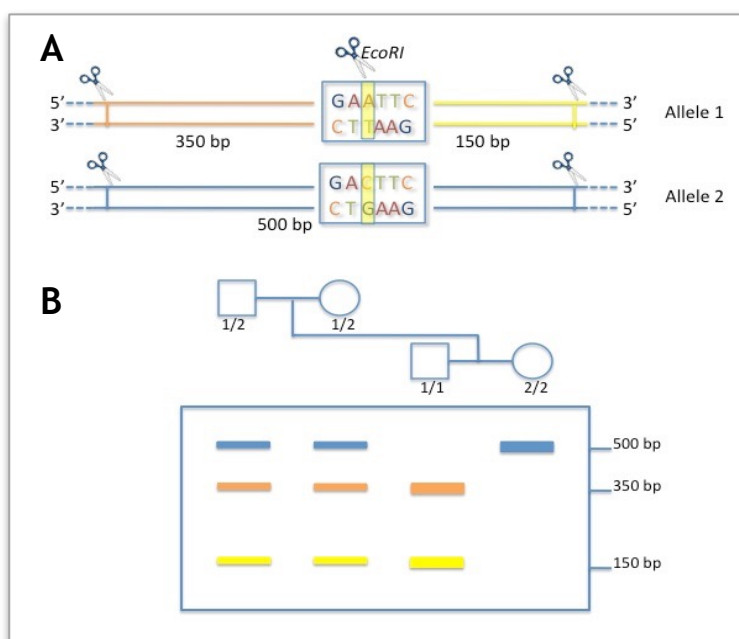


Fig 1. Albero genealogico in presenza di un RFLP. A. Frammenti di restrizione ottenuti con digestione mediante l'enzima EcoRI di due alleli (1 e 2) di un gene. B. Analisi del DNA di una famiglia composta da padre, madre, figlio e figlia. I frammenti di DNA ottenuti dalla digestione con EcoRI vengono separati mediante corsa elettroforetica. Il DNA dei genitori rivela 3 bande corrispondenti a frammenti da 500, 350 e da 150 pb (paia di basi), dimostrando che sono eterozigoti (1/2); il DNA del figlio risulta diviso in 2 bande corrispondenti a frammenti da 350 e 150 pb, è quindi omozigote per l'allele 1 (1/1); mentre il DNA della figlia, che mostra una sola banda da 500 pb, è omozigote per l'allele 2 (2/2).

Gli ER sono uno strumento fondamentale per l'analisi e la manipolazione del DNA. La scoperta degli ER ha aperto la strada all'ingegneria genetica, ossia alla possibilità di "tagliare e cucire" il DNA in modo riproducibile e di costruire molecole di DNA ricombinante.

Tagliando due molecole di DNA diverse con uno stesso enzima si mettono allo scoperto le stesse sequenze nucleotidiche, generando delle estremità adesive o coesive complementari una all'altra. Questo permette di costruire molecole di DNA ricombinante (Fig.2). Gli ER consentono di costruire vettori ricombinanti (un vettore è molecola di DNA capace di replicarsi in una cellula ospite), in cui sono state inserite sequenze di DNA, della stessa specie o di una specie diversa, utili allo scopo che si vuole raggiungere. Esempi di vettori usati per le nuove biotecnologie sono quelli per costruire vaccini o produrre molecole di uso terapeutico, per la terapia genica, per modificare geneticamente piante o animali.

Tagliando il DNA con un dato enzima di restrizione si ottengono frammenti di lunghezza discreta e riproducibile. Questo consente il clonaggio di frammenti di DNA e l'analisi del DNA genomico.

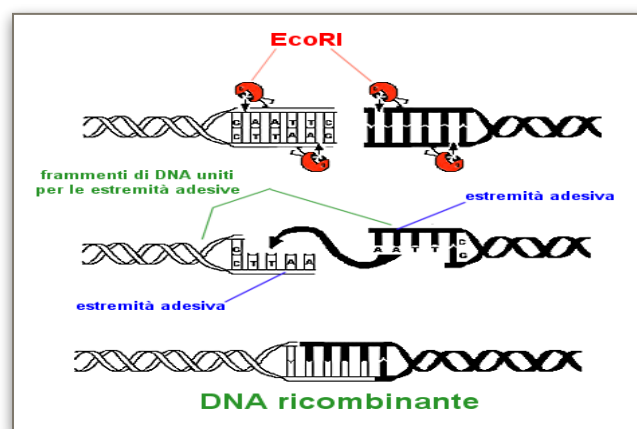


FIG. 2. Costruzione di una molecola di DNA ricombinante. Due molecole di DNA provenienti da fonti diverse (bianca e nera) si "legano" una all'altra dopo essere state entrambe tagliate con lo stesso enzima di restrizione EcoRI, formando una molecola di DNA ricombinante.

Polimorfismi del DNA

Il termine polimorfismo significa "esistenza di forme diverse". In genetica, il polimorfismo può essere analizzato a livello di proteina, polimorfismo proteico, oppure di materiale genetico, polimorfismo genetico. Nel secondo caso, le varianti genetiche possono riguardare un tratto di DNA codificante una proteina, ovvero un gene, oppure un tratto di DNA non codificante. Nel primo caso, si parla di polimorfismo allelico, nel secondo caso di polimorfismo di sequenza del DNA.

Polimorfismi allelici

Per polimorfismi allelici si intende l'esistenza di due o più alleli di uno stesso gene o locus. Gli alleli di un gene si formano uno dall'altro per mutazione, ossia per variazione della sequenza nucleotidica di un gene. Gli alleli di un gene possono determinare fenotipi diversi, ad esempio capelli neri o biondi, quindi vengono identificati dal fenotipo. Se gli alleli di un gene sono due, il polimorfismo si chiama polimorfismo biallelico. Se gli alleli sono in numero maggiore di due, come nel sistema di gruppo sanguigno ABO, il polimorfismo è detto polimorfismo multiallelico.

Polimorfismi di sequenza

Nel caso dei polimorfismi del DNA, contrariamente ai polimorfismi allelici, la variazione di sequenza nucleotidica avviene in genere in un tratto di DNA non codificante, che nel suo complesso costituisce circa il 98% del genoma. I polimorfismi del DNA sono quindi più frequenti dei polimorfismi allelici e conseguentemente più utili nella ricerca genetica.

Poiché interessano generalmente il DNA non codificante, i polimorfismi del DNA rappresentano differenze tra individui, senza conseguenze sul fenotipo. Quindi, non è possibile rilevarli osservando le caratteristiche fenotipiche di un individuo.

Esistono diversi tipi di polimorfismi del DNA:

1. polimorfismi di singolo nucleotide = SNP (Single Nucleotide Polymorphism)
2. polimorfismi di ripetizione = VNTR (Variable Number Tandem Repeats)
3. polimorfismi di restrizione = RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), una forma particolare di SNP

Polimorfismi di singolo nucleotide (SNP)

Un polimorfismo di singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism o SNP, che si pronuncia "snip") è un polimorfismo del DNA, cioè una variazione a livello di sequenza, che si presenta tra individui della stessa specie, caratterizzata da una differenza a carico di un singolo nucleotide. Confrontando il genoma di due esseri umani, il 99.9 % delle basi sono identiche, il rimanente 0.1 % è costituita da SNPs e determina l'unicità dell'individuo. Nel genoma umano si verificano SNPs all'incirca uno ogni 100-300 paia di basi. Questo significa che su 3 miliardi di nucleotidi presenti nel genoma umano avremo circa 10-30 milioni di SNPs. Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane.

Non bisogna confondere una mutazione puntiforme con uno SNP! Anche se si assomigliano, non sono la stessa cosa:

- sono entrambe differenze di singoli nucleotidi, ma per parlare di SNP bisogna che questo sia presente in almeno 1% della popolazione
- molte mutazioni correlate a malattie sono più rare
- le mutazioni con effetti fenotipici si trovano all'interno delle regioni codificanti di un gene o in quelle regolatorie e interessano la proteina corrispondente. Viceversa, la maggior parte degli SNPs non sono localizzati nei geni o nelle loro vicinanze e non hanno effetti fenotipici.

In base a quanto detto possiamo distinguere gli SNPs in due principali categorie:

1. Linked SNPs: non si trovano all'interno dei geni e non alterano la funzione della proteina. Possono essere associati (linked), ossia vicini a una sequenza codificante o regolatoria di un gene, e quindi essere dei marcatori genetici importanti. La sfida per la ricerca è identificare gli SNPs associati con un particolare effetto fenotipico (vedi sotto).

2.

Causative SNPs: alterano il funzionamento di una proteina, correlando lo SNP ad una malattia o ad un tratto fenotipico. Si distinguono due tipi di causative SNPs:

- Coding SNPs: localizzati nella regione codificante del gene, cambiano la sequenza di aminoacidi nella proteina;
- Non Coding SNPs: situati nella regione regolatoria del gene, cambiano la quantità di proteina prodotta.

Nella Figura 3 è rappresentato un esempio di linked SNP. Si nota che il soggetto sano (DNA 1) possiede una citosina (C) in un particolare locus SNP in stretta prossimità del locus malattia, c'è quindi bassissima probabilità che queste due regioni vengano separate durante un crossing-over alla meiosi. Nel soggetto malato (DNA 2), la presenza di un SNP C/T strettamente associato all'allele patologico può essere utilizzata come marcatore genetico. Pertanto, la ricerca e individuazione di una timina (T) in quella determinata posizione in un altro membro della famiglia indica, con buona probabilità, la presenza dell'allele patologico.

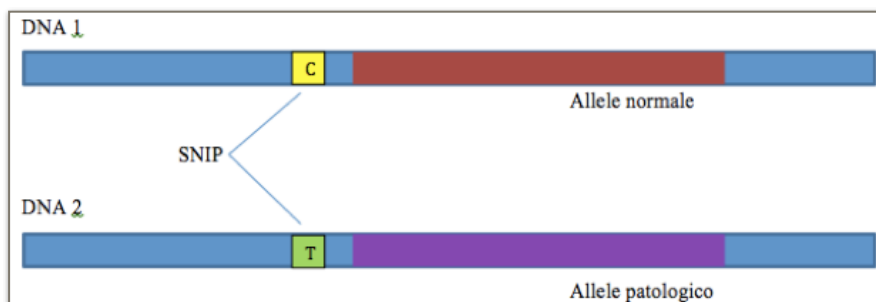


fig 3. linked SNPs e loro utilizzo nella diagnostica. rappresentazione del DNA di due membri di una famiglia, entrambi omozigoti, uno normale (DNA 1) e l'altro con una malattia genetica autosomica recessiva (DNA 2).

Polimorfismi di ripetizione, VNTR o DNA microsatellite

Il DNA microsatellite è formato da monomeri di 1-5 paia di basi ripetuti 10-30 volte, presenti in blocchi distribuiti nelle regioni non codificanti di diversi cromosomi. Il numero di ripetizioni può essere diverso da un individuo all'altro e questo conferisce ai microsatelliti un elevato grado di polimorfismo all'interno della popolazione umana.

Questo è noto come polimorfismo di lunghezza, in quanto il numero di ripetizioni determina la lunghezza del microsatellite analizzato (Figura 4).

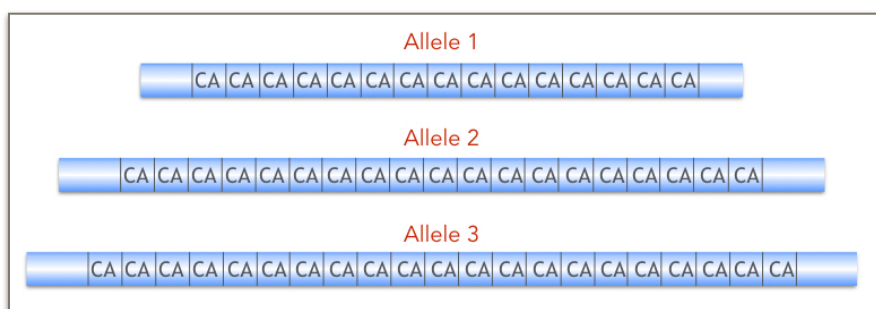
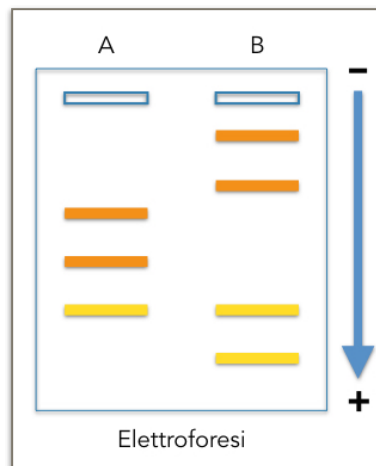


fig 4. polimorfismo di lunghezza: in questo esempio la ripetizione ca presente in un particolare locus cromosomico ha tre forme alleliche da 15, 19 e 21 ripetizioni.

Come per tutti i loci genici, anche per i microsatelliti i singoli individui possono essere omozigoti o eterozigoti; se un individuo è omozigote per il locus analizzato sui due cromosomi omologhi sarà presente lo stesso numero di ripetizioni. Se invece un individuo è eterozigote, sui due cromosomi omologhi ci sarà un numero di ripetizioni diverso.

Nel caso dei polimorfismi di lunghezza del DNA, la diversità fra due individui si può mettere in evidenza "misurando" la lunghezza dei microsatelliti. Questo polimorfismo è utilizzato per costruire il fingerprinting del DNA, ossia un profilo che permette di distinguere ogni individuo da un altro. Il DNA fingerprinting viene anche utilizzato nel campo forense, per individuare, ad

esempio, a chi appartiene il DNA ritrovato sulla scena di un crimine (vedi la dispensa del DNA Fingerprinting sul sito del CusMiBio). Tutte le regioni vengono amplificate per mezzo della PCR utilizzando due primer complementari a sequenze uniche fiancheggianti ogni singolo microsatellite. I frammenti così ottenuti sono successivamente analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio: i frammenti più corti migreranno più velocemente di quelli più lunghi, generando un profilo di bande simile ad un codice a barre, caratteristico per ciascun individuo (Figura 5).



Polimorfismi di restrizione, RFLP

Il polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP che si pronuncia "riflip"), detto polimorfismo di restrizione, è dovuto alla presenza di uno SNP all'interno di una sequenza del DNA, che crea o distrugge il sito di taglio di un enzima di restrizione (Figura 6).

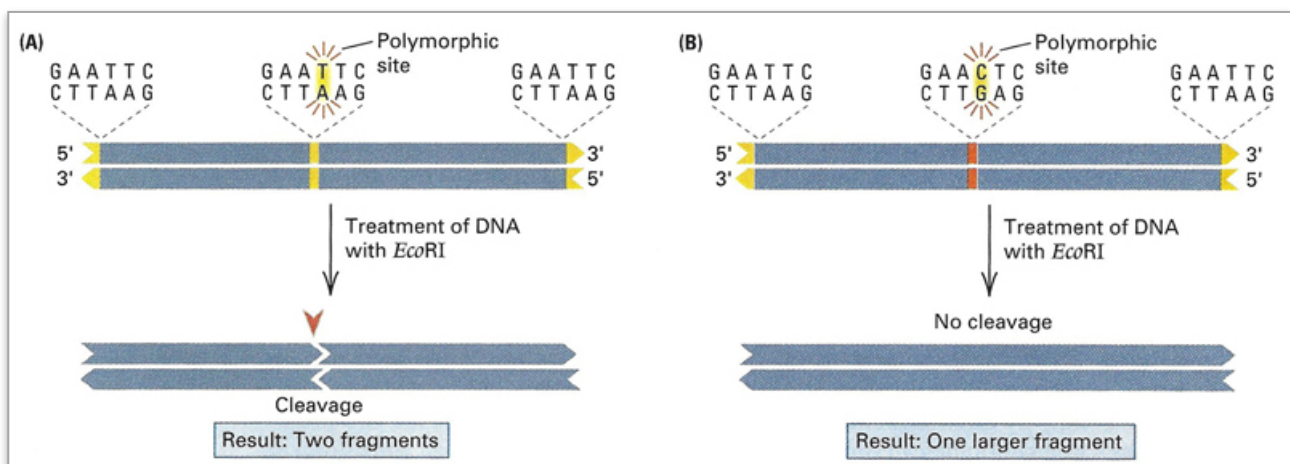


Fig 6. Esempio di RFLP. **A.** Il frammento di DNA analizzato contiene la sequenza riconosciuta dall'ER *EcoRI*. L'enzima taglia il DNA in corrispondenza dei siti di restrizione e genera due frammenti di DNA. **B.** Lo SNP si trova all'interno della sequenza riconosciuta dall'ER e determina la perdita del sito di restrizione. In questo caso, l'enzima non è in grado di tagliare il frammento di DNA, e il risultato della digestione sarà un frammento unico.

Digerendo il DNA di individui diversi con un dato ER, si osserverà quindi un polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione. Se un RFLP coincide o è strettamente associato ad una

mutazione patologica, l'analisi del RFLP può avere utilità diagnostica. È quello, ad esempio, che accade nella anemia falciforme (sickle cell disease), in cui la mutazione di un singolo nucleotide causa la sostituzione aminoacidica che genera la globina betaS ma anche la perdita del sito di restrizione dell'enzima MstII.

Analizziamo, ad esempio, guardando la Figura 7, l'azione degli ER sul frammento di DNA ottenuto per PCR da un soggetto normale (DNA1) e da un soggetto malato, che presenta uno SNP associato alla mutazione-malattia (DNA2). In un soggetto omozigote, nel tratto di DNA1 sono presenti tre siti di restrizione che vengono riconosciuti e tagliati dall'ER con la formazione di quattro frammenti. Nello stesso tratto del DNA2, a seguito della perdita di un sito di restrizione a causa del SNP, lo stesso enzima fa solo due tagli e genera solamente tre frammenti di restrizione. Eseguendo l'elettroforesi dei frammenti di restrizione è possibile individuare le due condizioni: DNA1, soggetto omozigote normale con quattro bande, e DNA2, soggetto omozigote malato con tre bande. Il DNA di un soggetto eterozigote, sottoposto a digestione con quell'enzima, mostrerà un profilo elettroforetico con 5 bande (DNA 3).

Come abbiamo visto per gli SNPs associati, se lo SNP utilizzato come marcatore genetico è localizzato nel gene (caso estremo l'anemia falciforme in cui SNP e mutazione/malattia coincidono) o vicino al gene, sia gene che marcatore segregheranno congiuntamente e l'analisi elettroforetica permetterà di individuare il genotipo del soggetto e l'eventuale condizione patologica.

Oltre che nella diagnostica, l'identificazione degli SNP è alla base della farmacogenomica, ossia la "medicina personalizzata", che sarà parte integrante della medicina in un prossimo futuro. La farmacogenomica si avvale delle variazioni nei geni o di SNP associati per predire la risposta individuale ad un determinato farmaco. Attualmente, è circoscritta solo ad alcuni farmaci, per lo più usati nella chemioterapia dei tumori, per stabilire protocolli terapeutici "su misura" rispetto al profilo genetico di un determinato paziente. Tuttavia, lo screening genetico degli SNP includerà, in breve tempo, la risposta a molti farmaci di largo uso, molto efficaci nella maggior parte dei casi, ma con noti e potenti effetti collaterali su alcuni soggetti. Attualmente, la grande sfida per la ricerca genomica è quella di identificare i profili di SNPs associati a malattie complesse e multigeniche come il diabete, malattie cardio-vascolari, ipertensione, obesità, sindrome bipolare.

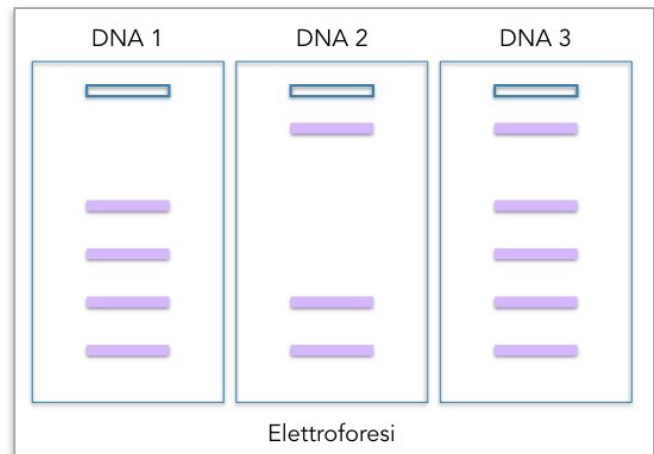


Fig 7. Analisi di RFLP e diagnostica. Azione di un ER su un frammento di DNA ottenuto per PCR di un soggetto normale (DNA1), di un soggetto malato con SNP associato all'allele malattia (DNA2) e di un soggetto eterozigote (DNA3).

Utilizzo dei Polimorfismi del DNA

I polimorfismi del DNA sono utili come:

- IDENTIFICATORI di INDIVIDUALITA':
 - controllo delle relazioni parentali in famiglie con malattie mendeliane
 - genetica di popolazione
 - indagini di paternità (DNA fingerprinting)
 - indagini di medicina legale (DNA fingerprinting)
- MARCATORI GENETICI e ANALISI DI LINKAGE:
 - identificazione di geni-malattia (diagnosi del portatore)
 - mappaggio genetico (ordinamento dei geni sui cromosomi) e fisico (distanza fisica tra i geni)
 - analisi del rischio di sviluppare patologie complesse e di risposte ai farmaci

La percezione del gusto: segnali, cellule e recettori

Il gusto e la scoperta delle differenze di sensibilità all'amaro

Il gusto è uno dei cinque sensi che ci mette in relazione con il mondo esterno. Ci fornisce informazioni sulle caratteristiche chimiche delle sostanze che ingeriamo; quindi, ci permette di valutare la qualità del cibo ed evitare le sostanze nocive.

Il gusto utilizza il sistema chemiorecettoriale dei recettori, localizzati principalmente nella lingua, in grado di captare stimoli chimici e di inviare segnali al sistema nervoso che li interpreta e ne rielabora la risposta. Al polo basale le cellule gustative formano sinapsi con i dendriti dei neuroni sensoriali (fibre afferenti gustative primarie), che trasmettono le informazioni al cervello. Le cellule gustative hanno una forma a botticella (bottone gustativo): nella porzione apicale sono presenti microvilli, per assicurare un buon contatto con la saliva e le sostanze in essa disciolte, mentre in quella basale avviene il contatto sinaptico con più fibre nervose afferenti (Figura 8).

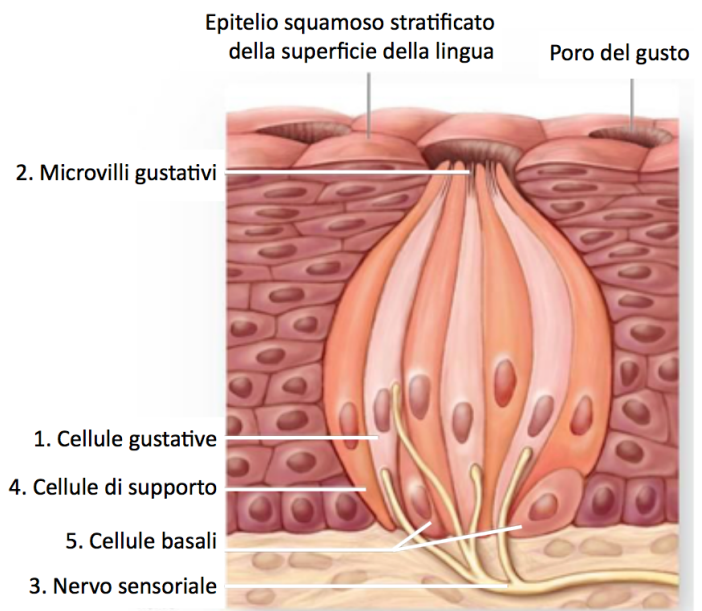


Fig 8. Bottone gustativo. Bottone gustativo è formato da: 1. cellule gustative, di forma allungata provviste di recettori del gusto sui microvilli (2) della membrana apicale e innervate al polo basale dal nervo sensoriale (3); 4. cellule di supporto; 5. Cellule basali

Anche se le molecole presenti negli alimenti sono numerosissime, solo cinque rappresentano le qualità gustative di riferimento: dolce, salato, umami, amaro e acido (Figura 9).

Il dolce indica la presenza di zuccheri e quindi di fonti energetiche. Il salato viene percepito dall'assunzione di sodio e altri ioni, essenziali per il mantenimento dell'equilibrio idro-salino.

L'umami, descritto per la prima volta da uno scienziato giapponese poco più di un secolo fa, è il gusto saporito proprio di alcuni alimenti ricchi in glutammato monosodico come la salsa di soia, il brodo di carne, i pomodori maturi e il formaggio parmigiano. Così come il dolce e il salato, anche

l'umami genera una risposta positiva allo scopo di favorire l'assunzione di cibi ricchi di proteine. Amaro e acido, invece, lanciano un "segnale d'allarme": molte sostanze tossiche e velenose presenti in natura nei vegetali hanno un sapore amaro; l'acido può indicare cibi avariati in cui potrebbero essersi sviluppati microrganismi dannosi, allo stesso tempo avvisa anche sulla maturazione dei frutti.



Fig 9. I cinque sapori percepiti dal gusto. salato, dolce, umami, amaro e acido.

La percezione dell'amaro è il carattere maggiormente studiato a partire dall'osservazione fatta nel 1931 dal chimico A. Fox. Mentre versava del feniltiocarbammide (PTC) in una bottiglia un po' di polvere si disperse nell'aria: un collega che lavorava in laboratorio percepì un sapore amaro mentre Fox non sentì alcun gusto. Per capire meglio le differenze di sensibilità, Fox fece assaggiare la polvere di PTC a numerose altre persone (il PTC è tossico solo ad elevate concentrazioni). Rilevò che la maggior parte degli individui si divide in due categorie: quelli in grado di percepire l'amaro anche a piccole concentrazioni (tasters) e quelli incapaci di percepire l'amaro (non tasters). Gli studi di popolazioni pubblicati dal genetista Albert Blakeslee nel 1932 dimostrarono che il carattere taster è determinato geneticamente, viene ereditato come un carattere mendeliano dominante e la sua frequenza varia nelle diverse popolazioni (Figura 10, Blakeslee AF. 1932. Genetics of sensory thresholds: taste for phenyl thio carbamide. Proc Natl Acad Sci 18: 120-130).

GENETICS OF SENSORY THRESHOLDS: TASTE FOR PHENYL THIO CARBAMIDE

BY ALBERT F. BLAKESLEE

CARNEGIE INSTITUTION OF WASHINGTON, DEPARTMENT OF GENETICS, COLD SPRING HARBOR, N. Y.

Read before the Academy Tuesday, November 17, 1931

Fig 10. lavoro di Albert Blakeslee del 1932

Struttura dei recettori del gusto dolce, umami e amaro

I recettori che intervengono nella percezione di dolce, amaro e umami hanno struttura simile. Come abbiamo detto, appartengono alla famiglia dei GPCR (G Protein Coupled Receptor), la più grossa famiglia genica presente nel genoma umano. I suoi membri, più di 800, sono deputati alla ricezione di segnali, non solo gustativi e olfattivi, ma anche di neurotrasmettitori, ormoni e ferormoni e sono le molecole bersaglio di oltre il 30% dei farmaci.

Sono proteine di membrana costituite da una singola catena polipeptidica che attraversa 7 volte la membrana plasmatica. Il dominio N-terminale è extracellulare e ha lunghezza variabile, mentre il

C-terminale è intracellulare. Sono anche chiamati recettori a serpentina (serpentine receptors) o recettori eptaelicali (heptahelical receptors).

I recettori presentano struttura diversa a seconda del gusto (Figura 11).

L'uomo possiede circa 30 recettori per l'amaro e poiché sono state identificate più di 500 molecole in grado di legarsi e molte di più sono le sostanze dal sapore amaro esistenti in natura è probabile che ogni singolo recettore risponda a più composti. Il recettore per l'amaro (TAS2R38), ad esempio, che si lega al gruppo tiocianato (N-C=S), è considerato poco selettivo e risponde anche a sostanze prive del gruppo N-C=S.

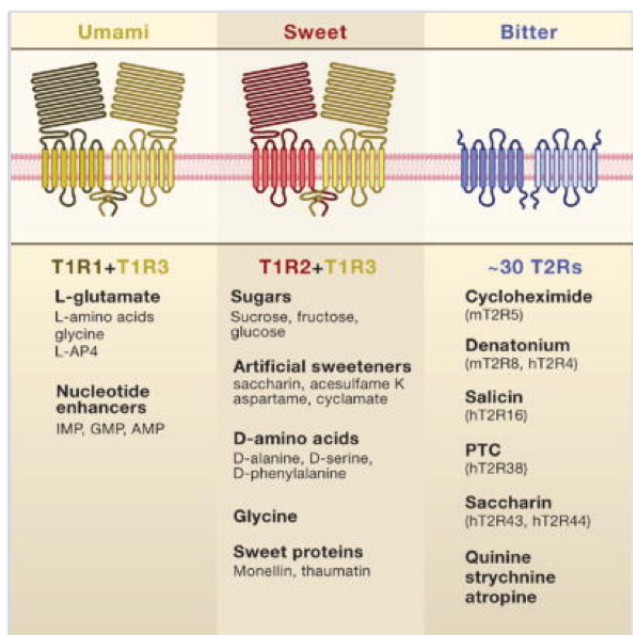


Fig 11. I recettori del gusto umami, dolce e amaro

I geni della percezione del sapore amaro

Numerosi sono i geni che codificano per i recettori del "gusto amaro", localizzati in cellule specializzate (TRCs o Taste Receptor Cells) che si trovano all'interno dei bottoni gustativi della lingua. Nell'uomo è stata identificata una famiglia di 25 geni indicati dalle sigle T2Rs o TAS2Rs localizzati sui cromosomi 12, 7 e 5 che presiedono alla percezione del gusto amaro (Figura 12).

La percezione gustativa varia tra gli individui in funzione di variazioni genetiche (alleli) nei geni che codificano i recettori del gusto.

Il gene TAS2R38

Il gene TAS2R38 (Chr 7) è uno dei più studiati e codifica per il recettore TAS2R38 (bitter taste receptor). Come altri recettori del gusto (e degli odori), TAS2R38 è un piccolo gene con un singolo esone di circa 1000 nucleotidi, senza introni. Per la loro piccola dimensione, questi geni si sono duplicati facilmente durante l'evoluzione e questo spiega la loro presenza in cluster in alcune regioni cromosomiche (Figura 12). Varianti genotipiche di questo gene influenzano la capacità di gustare, ossia di sentire il sapore amaro di sostanze come il PROP (6-n-Propiltiouracile) e il PTC (feniltiocarbammide), tiouree che contengono il gruppo tiocianato (N-C=S), responsabile appunto del gusto amaro (Figura 13).

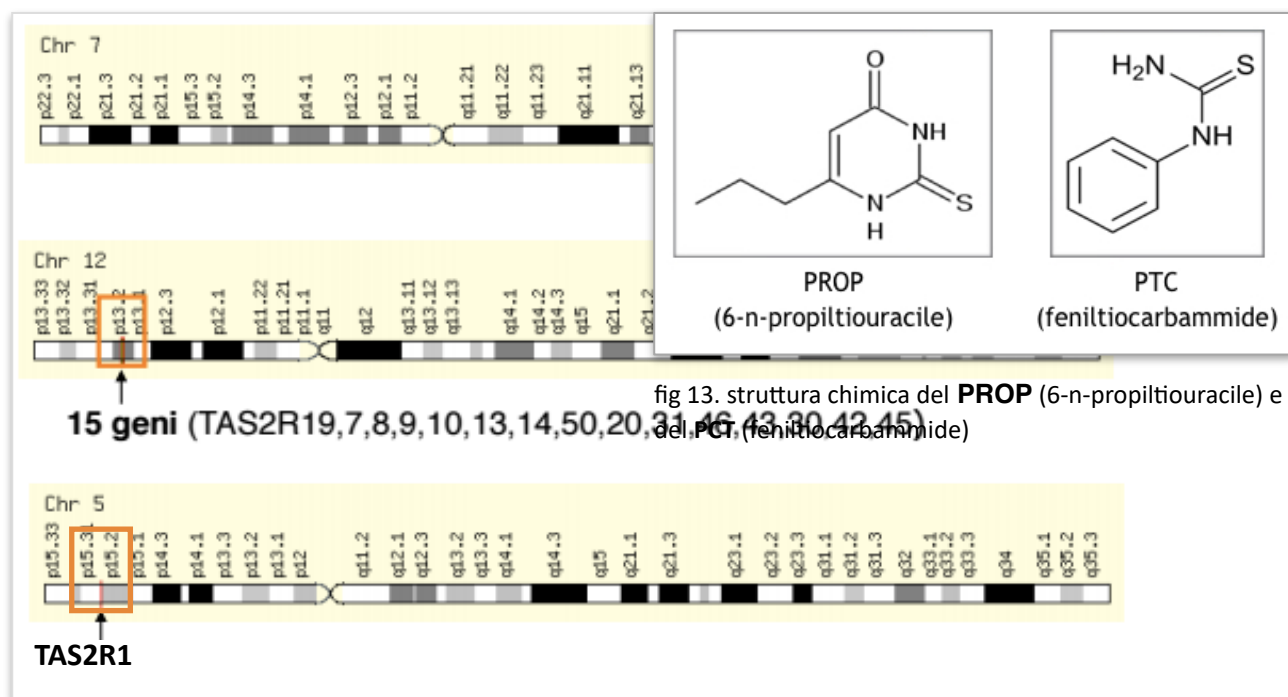


Fig 12. I cluster dei geni per i recettori dell'amaro. Localizzano sul braccio lungo (q) del cromosoma 7 e sul braccio corto (p) dei cromosomi 12 e 5.

SNPs e aplotipi del gene TAS2R38

Il gene TAS2R38 è presente nella popolazione umana in diverse forme alleliche determinate da tre SNPs in posizioni specifiche, esattamente a livello dei nucleotidi 145, 785 e 886 (Tabella 2).

Nella popolazione umana i diversi alleli di questo polimorfismo presentano in posizione 145 il nucleotide C o G, in posizione 785 una C o una T, in posizione 886 una G o una A. Questi SNPs portano alla sostituzione di aminoacidi nella proteina, con conseguente cambiamento nella funzionalità della proteina stessa.

La combinazione degli SNP nell'allele TASTER produce una proteina che contiene gli aminoacidi Prolina-Alanina-Valina (PAV). L'allele NON-TASTER, invece, produce una proteina che contiene aminoacidi Alanina-Valina-Isoleucina (AVI), rispettivamente nelle posizioni 49, 262, 296.

posizione SNP	allele PTC-taster			allele PTC-non taster			posizione aminoacido
	nucleotide	codone	aminoacido	nucleotide	codone	aminoacido	
145	C	CCA	P (prolina)	G	GCA	A (alanina)	49
785	C	GCT	A (alanina)	T	GTT	V (valina)	262
886	G	GTC	V (valina)	A	ATC	I (isoleucina)	296

Tabella 2. SNPs del gene TAS2R38. La combinazione degli SNP nell'allele TASTER produce una proteina che contiene gli aminoacidi Prolina-Alanina-Valina (PAV) nelle posizioni indicate. L'allele NON-TASTER, invece, produce una proteina che contiene gli aminoacidi Alanina-Valina-Isoleucina (AVI).

Le combinazioni di SNPs in una definita regione di DNA prendono il nome di aplotipi.

I tre SNPs del gene TAS2R38 possono trovarsi in 2^3 combinazioni e quindi in otto differenti aplotipi. Nella popolazione umana sono diffusi principalmente gli aplotipi PAV e AVI. Il fenotipo PAV è dominante sul fenotipo AVI. Gli aplotipi segregano in modo mendeliano, sono quindi possibili le combinazioni omozigoti PAV/PAV o AVI/AVI e quella eterozigote PAV/AVI.

Il genotipo AVI/AVI è ampiamente diffuso negli individui che manifestano il carattere fenotipico di non taster (tt) (86% degli individui AVI/AVI sono non taster), mentre le combinazioni PAV/PAV e PAV/AVI sono presenti nella maggior parte dei fenotipi super taster (TT) e medium taster (Tt). Questa ulteriore suddivisione dei taster è basata sull'intensità della risposta e fu introdotta con lo sviluppo degli studi e l'impiego nelle prove di assaggio del composto PROP, oltre al PTC. Si è visto che il 68% degli individui PAV/PAV sono TT e 64% degli individui PAV/AVI sono Tt.

Nella nostra popolazione il 70% è classificato come taster, mentre il 30% è non-taster, con distribuzione dei tre fenotipi all'incirca: 30% Non-taster, 45% Medium-taster, 25% Super-taster (Tabella 3).

Oltre agli aplotipi PAV e AVI, solo alcuni aplotipi rari (AAV, AAI, e PVI), che presentano una sensibilità intermedia, sono stati descritti limitatamente a specifiche popolazioni o in determinate aree geografiche (AAI popolazione sub-Sahariana), come si legge nel paragrafo successivo.

Come si evince da questi dati, i genotipi di TAS2R38 non sono in grado di predire la totalità delle variazioni nel fenotipo della sensibilità al gusto amaro, e ciò implica che altri fattori (genetici e epigenetici) possano essere coinvolti nell'espressione di questo carattere genetico (Figura 14).

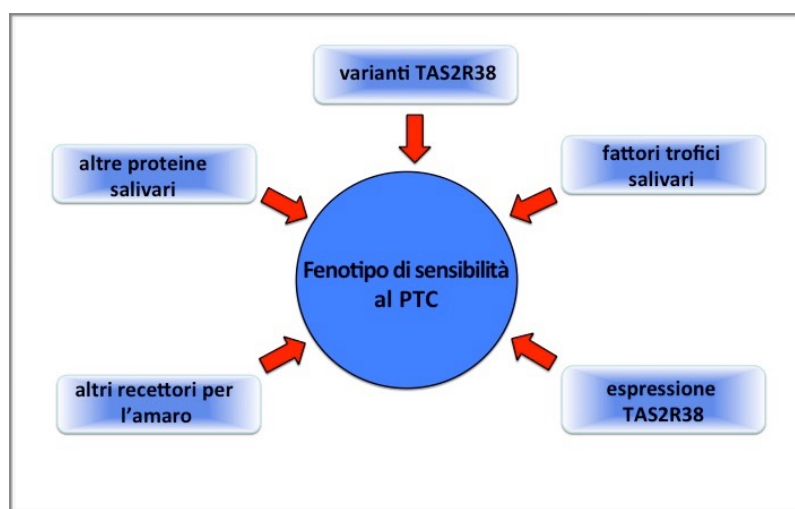


Fig 14. Fattori genetici, e non, che influenzano la percezione del gusto amaro delle tiouree

Evoluzione e distribuzione degli aplotipi del gene TAS2R38 in diverse popolazioni umane

Il gene TAS2R38 è comune a molti esseri viventi, e gioca un ruolo importante nella determinazione di specifiche caratteristiche. Il saper riconoscere un sapore amaro ha preservato la vita a molti animali, uomo compreso, condizionando e guidando le loro abitudini alimentari. Infatti, moltissime sostanze tossiche di origine vegetale, come la stricnina e il chinino, sono amare: saperle riconoscere attraverso il gusto ha consentito la sopravvivenza sia a uomini che animali.

L'interesse per capire come nel corso dell'evoluzione la selezione naturale abbia operato sugli alleli dell'amaro ha portato alla realizzazione di numerose ricerche. Nel caso specifico del gene TAS2R38 tali ricerche sono state favorite dalla facilità d'identificazione della variabilità fenotipica al PTC, dalla modalità mendeliana di trasmissione del carattere e, più di recente, dalla possibilità di analizzare le sequenze del DNA.

È stato condotto uno studio sulle frequenze alleliche degli aplotipi PAV e AVI nella popolazione umana, utilizzando un campione di europei, asiatici, africani e nord americani, numericamente non omogenei tra loro. L'analisi delle sequenze del gene TAS2R38 ha evidenziato che i due aplotipi PAV e AVI sono presenti in più del 90% dei cromosomi analizzati, mentre gli aplotipi AAV, AAI e PVI sono rari e diffusi soprattutto in Africa. Emerge anche, in più popolazioni, che la selezione naturale ha conservato i due alleli taster e non-taster in forma pressochè bilanciata. Tuttavia, in casi come il Nord America, devono esserci state pressioni selettive che hanno favorito l'allele taster (v. Figura 15).

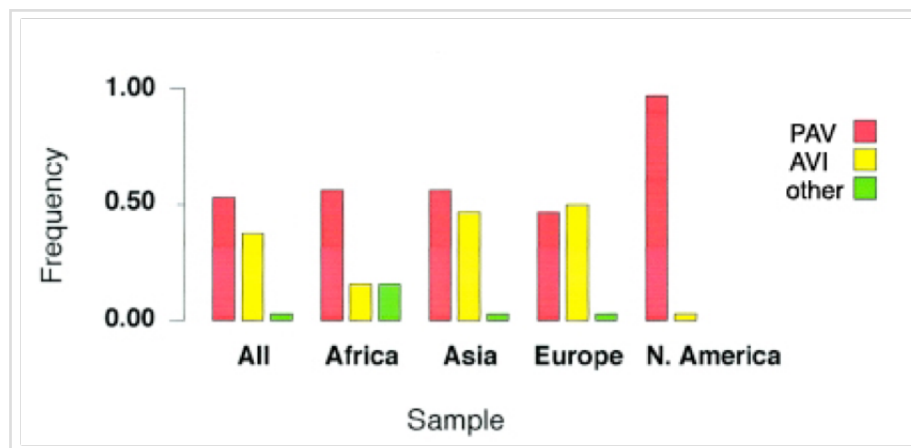


Fig 15 Istogramma con evidenziate le frequenze alleliche in diverse popolazioni. Da Wooding e al. Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene, 2004.

Per spiegare la conservazione degli alleli non taster si ipotizza che i recettori che esprimono l'aplotipo AVI siano in grado di legare molecole dell'amaro diverse da quelle che interagiscono con il recettore espresso dall'aplotipo PAV. Ciò conferirebbe un vantaggio selettivo agli eterozigoti, che sono così in grado di percepire più molecole dell'amaro rispetto agli omozigoti. Questo spiegherebbe il perché del mantenimento dell'allele non taster nelle popolazioni umane.

Gli studi sull'origine evolutiva della sensibilità al PTC hanno evidenziato che si tratta di un carattere ancestrale e che le varianti genetiche nella percezione gustativa di Homo sapiens si svilupparono molto prima della comparsa dell'uomo moderno. L'antica età della variazione è stata supportata dall'analisi di un campione di osso appartenuto a un uomo di Neanderthal, vissuto circa 48000 anni fa e rinvenuto a El Sidron, nel nord della Spagna.

Un'ulteriore conferma del carattere ancestrale è data dal confronto delle sequenze nucleotidiche di TAS2R38 PAV di Homo sapiens con quelle di altri primati (scimpanzè, gorilla, orango, ecc) che indica la presenza nelle stesse posizioni dei medesimi aminoacidi (prolina, alanina, valina). Possiamo dedurre che l'uomo e gli altri primati hanno ereditato gli stessi alleli taster e non-taster da un antenato comune.

Tecniche utilizzate

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Si tratta di una tecnica che consiste nell'amplificazione specifica di segmenti di DNA mediante reazioni a catena della DNA polimerasi.

Il metodo di analisi del DNA mediante PCR presenta vantaggi molto evidenti:

- è molto rapido (da 60 a 90 minuti),
- la manualità è semplicissima,
- è automatizzato,
- i risultati sono visualizzabili con facilità mediante elettroforesi del DNA

Strumenti e materiali

- Termociclatore

Fig 17. Cella elettroforetica orizzontale per l'elettroforesi del DNA su gel di agarosio e alimentatore.

Il successo della PCR è dovuto in gran parte alla possibilità di far avvenire l'intero processo in modo automatico all'interno di strumenti detti termociclatori (thermal cyclers), in grado di variare ciclicamente la

temperatura tra le varie fasi di ogni ciclo di PCR.

Un esempio di profilo di amplificazione standard impostato mediante un termociclatore (Fig. 16) è il seguente:

1. denaturazione del DNA: 30 sec a 94°C
2. appaiamento (annealing) dei primers: 30 sec a 50°-60°C
3. sintesi (extension) di DNA: 30 sec- 5 minuti a 72°C

Le fasi 1, 2 e 3 possono ripetersi per 30-35 cicli, dipende dal frammento che si deve amplificare.

- Taq polimerasi

Il successo della PCR è stato possibile grazie anche all'uso di una DNA polimerasi termostabile estratta da batteri termofili (che vivono ad elevate temperature). Una DNA polimerasi utilizzata nelle reazioni della PCR è la Taq polimerasi, estratta dal batterio *Thermus aquaticus*. L'isolamento di DNA polimerasi termostabili ha sollevato gli operatori dall'ingrato compito di aggiungere enzima fresco ad ogni ciclo di reazione!

Quando bisogna amplificare frammenti di DNA molto lunghi (5kb-20kb), è necessario utilizzare Taq polimerasi particolari.

- Primers

Per ogni PCR, è necessario usare due primer (forward e reverse). La scelta della coppia di primer è critica per una buona riuscita della PCR, ovvero per ottenere l'amplificazione di un tratto di DNA in modo specifico. I primer devono essere "disegnati" a livello di sequenze uniche nel genoma (presenti una sola volta), in modo che possano appaiarsi al DNA solo nella zona di interesse e non in altre zone.

Elettroforesi su gel di agarosio

È una tecnica che consente di separare in base alle loro dimensioni (peso molecolare) molecole dotate di carica, facendole migrare su un gel in presenza di un campo elettrico. Il gel può essere immaginato come una rete tridimensionale attraverso le cui maglie migrano le molecole sotto l'azione di un campo elettrico. Il campo elettrico è generato da un apparecchio, detto alimentatore e la migrazione avviene nel gel immerso in una soluzione tampone, all'interno di una cella

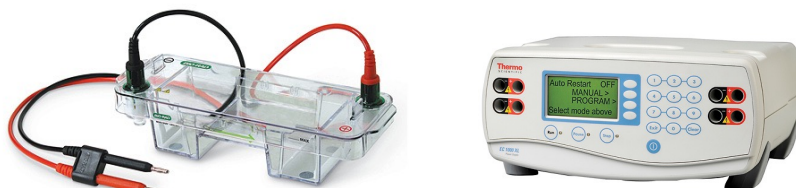
elettroforetica (Fig. 17).

Per separare molecole di DNA si usano gel di agarosio. Le molecole di DNA sono cariche negativamente per la presenza di gruppi fosfato e migrano dal polo negativo verso il polo positivo. Per un certo intervallo di pesi molecolari, la velocità di migrazione è funzione del loro peso molecolare: tanto più grande è la molecola di DNA, tanto minore è la velocità di migrazione, tanto più piccola è la molecola di DNA, tanto più velocemente migra. Le molecole di DNA di diversa lunghezza vengono pertanto separate in base alla diversa velocità di migrazione.

Per poter determinare la lunghezza delle molecole di DNA in esame separate mediante elettroforesi, viene "caricato" sul gel anche il cosiddetto marcatore di peso molecolare, ossia una miscela di frammenti di DNA di cui è noto il peso molecolare. Confrontando la posizione dei frammenti a peso molecolare noto con quella dei frammenti di DNA in esame, è possibile calcolarne il peso molecolare, ossia la lunghezza.

Dato che il peso molecolare di un frammento di DNA è proporzionale al numero di coppie di nucleotidi (basi) che lo costituiscono, di solito esso viene espresso in paia di basi (bp).

Al termine della corsa elettroforetica, i vari frammenti di DNA, essendo incolori, possono essere visualizzati, immergendo il gel in un colorante. Per poter visualizzare il DNA, durante la preparazione del gel, all'agarosio si aggiunge Eurosafe, una sostanza che ha la proprietà di legarsi al DNA e di emettere fluorescenza se esposta a luce UV. Alla fine della corsa, le bande si visualizzano esponendo il gel alla luce ultravioletta.

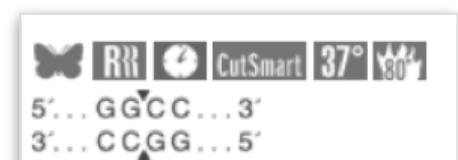


In laboratorio

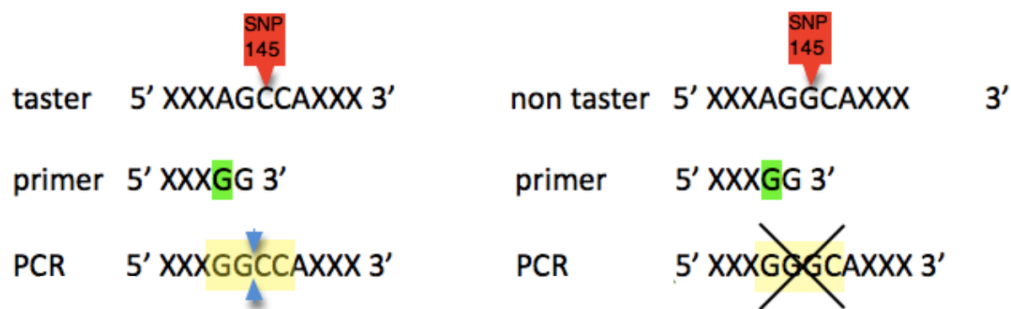
Identificazione del genotipo mediante analisi del SNP C/G in posizione 145

Per identificare il polimorfismo C/G in posizione 145 è necessario prima amplificare un frammento di DNA del gene TAS2R38 contenente la posizione 145. È necessario quindi disegnare i primer opportuni per effettuare la PCR e scegliere un ER adatto a distinguere una forma del polimorfismo dall'altro.

Come si vede qui sotto, l'ER HaeIII (*Haemophilus aegypticus*) riconosce e taglia la sequenza palindromica di 4 pb GGCC.



Osservando le sequenze del taster e non taster, si nota che la base che genera il polimorfismo (posizione 145) si trova all'interno di una sequenza molto simile a quella riconosciuta dall'ER HaeIII. Introducendo un mismatch A/G in posizione 143 nel primer forward, tutti i prodotti di PCR avranno in quella posizione una G al posto di una A. Amplificando il DNA taster con questo primer, si crea il sito di restrizione per l'enzima HaeIII (143-146). Il sito HaeIII non si crea nei prodotti di PCR da DNA non taster in cui è presente il polimorfismo C/G (145).



L'amplificazione con PCR e la digestione dei prodotti con HaeIII consente quindi di determinare il genotipo.

Identificazione del genotipo degli individui testati

La digestione del frammento di DNA taster con HaeIII genera prodotti di 177 e 44 bp.

Quindi, dopo corsa elettroforetica, ci dobbiamo attendere, per i 3 genotipi, i seguenti risultati:

Genotipo	Lunghezza frammenti (bp)	Sito di restrizione
T/T	177+44	presente in omozigosi
T/t	221+177+44	presente in eterozigosi
t/t	221	assente in omozigosi

Marker = marcatore di peso molecolare,
 U = undigested (controllo non digerito con ER),
 D = digested

