

Traduzione

Dai geni alle proteine si ha un cambiamento di linguaggio. Non più sequenza di nucleotidi ma sequenze di amminoacidi.

Le regole che stabiliscono la relazione tra la sequenza di nucleotidi nell'mRNA e la sequenza degli amminoacidi in una proteina, sono le regole del **codice genetico**, che non è il genoma ma è un insieme di regole che permettono di capire come si passa dalla sequenza nucleotidica alla sequenza amminoacidica sulle proteine. Per arrivare alla decifrazione del codice genetico ci sono voluti tanti anni di studio e di esperimenti.

Una prima considerazione fu questa: era noto che nelle proteine erano presenti 20 amminoacidi per cui l'ipotesi poteva essere una corrispondenza 1:1 ma ciò avrebbe potuto fornire la codifica di soltanto 4 amminoacidi. Si poteva quindi supporre che la combinazione di due nucleotidi potesse specificare per 16 amminoacidi. Ma rimangono fuori 4 amminoacidi.

Allora si ipotizzò che le combinazioni potessero essere 3 nucleotidi per amminoacidi, quindi $4^3 \rightarrow 64$ amminoacidi (comprende tutti gli amminoacidi possibili).

L'idea era che la corrispondenza tra nucleotidi e amminoacidi fosse 3 nucleotidi: 1 amminoacido. La sequenza di tre nucleotidi viene detta tripletta o codone.

La decifrazione del codice genetico è avvenuta grazie a una serie di esperimenti, condotti tra gli anni '50 e '60.

Esperimento di V. Ingram sull'emoglobina

Queste triplette venivano lette in maniera sequenziale o il codice era sovrapposto?

Il codice non è sovrapposto ma viene letto in maniera sequenziale e non ci sono dei nucleotidi senza significato tra una tripletta e la tripletta successiva: non è presente una punteggiatura.

Il fatto che le triplette non fossero sovrapposte era già stato ipotizzato da Ingram grazie a osservazione sulla catena β dell'emoglobina che presenta la mutazione di un singolo amminoacido così come molte altre mutazioni proteiche dipendono dalla mutazione di un singolo amminoacido. Se cambio un amminoacido cambia la tripletta che la modifica: in un codice sovrapposto mi aspetterei che sia probabile che se cambio un nucleotide in una tripletta siano influenzate più triplette. Il fatto che quando si trovava una proteina con un amminoacido variato singolo faceva pensare a un codice non sovrapposto.

Ciò fu confermato dagli esperimenti di Brenner e Crick

Questi esperimenti si basano sugli esperimenti del fago T4 che contiene un DNA a doppio filamento che può infettare normalmente E. Coli e in particolare due suoi ceppi, il ceppo K e il ceppo B. Quando si fa un'infezione fagica si mescolano i batteri insieme ai fagi e si rovescia questa miscela su una piastra, questa miscela si solidifica e si ha uno strato di batteri uniforme. Dove avviene l'infezione si formano come dei buchi che sono delle placche di lisi perché questo strato di batteri non c'è più perché i batteri vengono lisi dai fagi.

Utilizzando un agente mutageno cioè la proflavina, ottennero delle mutazioni che derivano dall'inserimento o la delezione di un nucleotide che sono chiamate mutazioni per scivolamento del codice di lettura o frameshift. Tra i vari mutanti ottenuti, a livello del gene R2 i mutanti non erano più in grado di infettare il ceppo K anche se infettavano al ceppo B. Questo era importante per capire l'ospite dove poter duplicare il virus.

A quei tempi i metodi per sequenziare il DNA non c'erano ma si poteva individuare la posizione di una mutazione mediante la mappatura per ricombinazione.

Gene wild type: fornisce una frase di senso compiuto di triplette

Se tratto i fagi con l'agente mutageno ottengo fagi che non crescono nel K, li isolo e trovo che ci sono dei mutanti a livello di questo gene e lo rappresentiamo così: l'agente mutageno o introduceva o causava la delezione di una base e da quel punto la cornice di lettura scivola e da dove è stata inserita o deleta la lettera perdo completamente la capacità di leggere una frase di senso compiuto. Ciò vuol dire che inserisco o tolgo un nucleotide, siccome ho un scivolamento avrò amminoacidi diversi rispetto al wild type \rightarrow proteina non più attiva, perciò il T4 non infetta il K.

Brenner e Crick presero questi primi mutanti che non crescono nel K e li trattarono con dosi maggiori sempre con la proflavina e ottennero mutanti con fenotipo revertante cioè in grado di crescere sul ceppo K. Se tolgo nel mutante un nucleotide queste mutazioni sono successivamente vicine, a valle della seconda la cornice di lettura risulta corretta: correlazione tra numero di nucleotidi e di amminoacidi, perché se introduco una mutazione che reverte il fenotipo è in grado quindi di riportare la corretta cornice di lettura. Anche mutanti privi di tre delezioni o inserzioni erano in grado di ripristinare la cornice di lettura. Si poteva quindi pensare a un codice letto in triplette.

Da queste osservazioni si deduce che il codice non è sovrapposto:

Se ho un codice sovrapposto, l'inserzione o la delezione di un nucleotide causerebbe la modifica di alcuni amminoacidi adiacenti ma non avrebbe effetto su quelli successivi; mentre ciò che osservavano era che tutte le volte che si aveva l'inserzione o la delezione di un nucleotide si ottenevano mutanti in cui a livello del gene R2 c'è uno scivolamento del codice di lettura, se si fosse ristabilita a cornice avrebbe dovuto ottenere dei mutanti in grado di crescere nel ceppo K.

Per dimostrare corrispondenza tra codoni e amminoacidi : **esperimenti di Nirenberg e Matthaei**

Presero un estratto citoplasmatico dei batteri, dei ribosomi, dell'ATP e sintetizzarono in laboratorio dei piccoli RNA fatti o solo di uracile, o solo di A o solo di cisteina. Nel primo caso ottenevano polipeptidi costituiti solo di fenilalanina, nel secondo caso ottenevano solo lisine, nel terzo caso proline.

Non c'è GGG perché non gli riusciva.

Utilizzavano un enzima che univa i nucleotidi in maniera casuale: se prendo due nucleotidi e li unisco con l'enzima che li unisce in maniera casuale, posso ottenere 8 diverse combinazioni di triplette che si susseguono nel polipeptide. Anche se dall'esperimento posso ottenere una sequenza di amminoacidi ma la corrispondenza tra amminoacidi e la tripletta non la so. Quindi dovevano trovare un modo per innanzitutto unire i nucleotidi in modo specifico gli uni agli altri.

Esperimento di Khorana per risolvere questo problema.

Esperimento di Nirenberg e Leder

Decifrare tutto il codice genetico

Sintetizzarono delle triplette, piccoli RNA costituiti da tre nucleotidi. Utilizzarono un sistema in vitro dove c'erano i ribosomi e i tRNA legati agli amminoacidi e sapevano che amminoacidi avevano messo. Poi isolarono il complesso ribosoma-piccola tripletta-tRNA-amminoacido; riuscirono a stabilire quali triplette legano un determinato amminoacido tramite un tRNA.

Dalla combinazione degli esperimenti di Khorana e del gruppo di Nirenberg si poté risalire alla decifrazione del tutto il codice.

Degenerazione del codice genetico o ridondanza: più triplette codificano lo stesso amminoacido.

Alcuni amminoacidi sono codificati da ben 4 triplette, alcuni da 2. In rosso 3 codoni che vengono chiamati codoni di stop che indicano la terminazione della sintesi proteica. Non esiste nessun amminoacido corrispondente a questi codoni.

Il codice genetico è universale (cioè quasi identico in tutte le specie presenti sulla terra, cioè tutti gli organismi utilizzano la stessa corrispondenza tra nucleotidi e amminoacidi; rarissime eccezioni a livello del DNA mitocondriale e da alcuni particolari batteri e protozoi. L'universalità del codice ci dice che è antico, cioè questa correlazione si è stabilita precocemente nello sviluppo degli organismi: l'antenato comune aveva già questa corrispondenza. L'universalità ci permette numerose applicazioni biotecnologiche: l'insulina veniva presa dal maiale perché era la più simile; se conosciamo il gene umano dell'insulina possiamo inserirne le sequenze codificanti in un plasmide inserirlo in un batterio e siccome la corrispondenza codone amminoacido dei batteri è uguale a quella dell'uomo, il batterio diventa la fabbrica della proteina che mi serve. Idem per i vaccini), possiede codoni di inizio e di stop, è degenerato o ridondante.

Attori della traduzione: i ribosomi, l'mRNA e i tRNA.

tRNA

Sono molecole di RNA che non viene tradotto (t per *transfer* → trasferimento). Già Watson e Crick avevano immaginato che ci fossero dei traduttori, cioè che l'mRNA non fosse letto direttamente ai ribosomi ma dei tramiti.

Presenta due strutture chiave: una regione dell'anticodone, complementare ai codoni dell'mRNA che conseguentemente si adatterà sull'mRNA stesso mediante le regole di complementarità tra le basi azotate; alla parte opposta viene legato l'amminoacido specificato dal codone complementare all'anticodone. Ad esempio se l'anticodone è complementare alla glicina, questo tRNA trasporta la glicina.

Nelle anse del tRNA ci sono delle basi modificate; tutti i tRNA presentano un braccio variabile più o meno lungo che dipende da quanti nucleotidi compongono il tRNA, di solito composto da una 70 di nucleotidi e la distanza tra le due regioni verticalmente opposte deve essere costante → quei tRNA che hanno maggior numero di nucleotidi hanno l'ansa variabile più grande.

L'estremità termina sempre con CCA,

mRNA

Sia quello nei procarioti che quello negli eucarioti vi sono delle regioni al 5' e al 3' che non vengono tradotte: le sequenze UTR. La traduzione inizia a livello del codone di inizio AUG che codifica per la metionina e termina a livello di uno dei tre codoni di stop UAG UAA UGA (non esiste nessuno tRNA corrispondente a questi tre codoni). Nell'mRNA dei procarioti (o eucarioti???) al 5' e al 3' abbiamo delle modifiche (cap e poliA) importanti per la formazione del complesso di inizio della traduzione.

Fase ATP dipendente della traduzione: la formazione dell'aminoacyl-tRNA

Ci deve essere un enzima che attacca in maniera specifica l'amminoacido al tRNA giusto, quindi esistono nella cellula una classe di enzimi (almeno 20) che prendono l'amminoacido e l'attaccano al tRNA corrispondente. Questa classe è quella degli aminoacyl-tRNA-sintetasi responsabili dell'attacco dell'amminoacido al corrispondente tRNA.

Sono ATP dipendenti.

L'enzima ha regione di legame per l'amminoacido, per il tRNA e per l'ATP in modo tale che ciascun aminoacyl-tRNA sintetasi possa riconoscere specificatamente il proprio amminoacido e il proprio tRNA. Si ha quindi legame per l'amminoacido, legame per l'ATP e la formazione di un intermedio in cui l'ATP viene idrolizzato a AMP che si lega all'amminoacido → si forma una aminoacyl-AMP che è pronto per essere utilizzato, cioè trasferire l'amminoacido sul tRNA per formare l'aminoacyl-tRNA.

Si forma l'aminoacyl-AMP arriva il tRNA specifico che si lega all'amminoacido e viene rilasciato l'AMP.

1. $aa + ATP \rightarrow aaAMP + PP_i$
2. $aaAMP + tRNA \rightarrow aa-tRNA$

Quando l'amminoacido viene trasferito al 3' ossidile del tRNA è di nuovo il gruppo carbossilico che si lega con legame estere. Quindi dell'amminoacido rimarrà libera la regione dell' NH_2 .

Ipotesi del vacillamento:

I codoni codificanti sono 61. Sperimentalmente nella cellula è stato trovato che esistono in media una 50 di tRNA, il numero può variare a seconda delle specie ma non abbiamo comunque cellule in cui ci sono 61 tRNA: o alcune triplette non vengono usate (che non è vero) o evidentemente ci deve essere un tRNA in grado di riconoscere e più triplette purché codificanti per lo stesso amminoacido, cioè il codice genetico è ridondante cioè più triplette che codificano lo stesso amminoacido ed è necessario che il tRNA riconosca più codoni purché questi codifichino per lo stesso amminoacido (se così non fosse mi troverei in una situazione di ambiguità).

I codoni si leggono a partire dal 5' verso 3'. 'appaiamento è sempre antiparallelo nel tRNA, per cui il primo nucleotide dell'anticodone è 1 cfr slide (il terzo nucleotide del codone corrisponde al primo nucleotide dell'anticodone).

A livello di questa corrispondenza c'è una possibilità di appaiamento che viene definita *vacillante*, cioè non stringente: il primo nucleotide dell'anticodone può andare in contro a legami con il codone di tipo insolito: la base 3 è detta vacillante e se a livello di essa troviamo una guanina questa può riconoscere nell'mRNA sia una citosina che un uracile, se troviamo l'inosina (base modificata) può riconoscere tre nucleotidi differenti contenenti C A e U. La corrispondenza è con la terza base del codone: quando più codoni codificano per lo stesso amminoacido, la differenza sta nella terza base.

La serina è codificata da UCC e UCU che differiscono per la terza base ed esiste un medesimo tRNA che possiede a livello della posizione 1 (cioè il primo nucleotide dell'anticodone) una G che si può associare in maniera standard con la C ma anche in maniera vacillante con l'U.

Questa vacillanza deriva dalla conformazione che assume il tRNA → legami non convenzionale possono essere possibili.

L'ipotesi del vacillamento ci spiega come un numero inferiore di tRNA possa garantire la traduzione di tutte le triplette.

Le fasi GTP dipendenti della traduzione: inizio, allungamento e terminazione

La fonte di energia per questa fase è l'idrolisi del GTP.

La direzione della traduzione dell'mRNA è 5'→3'. La sintesi della proteina parte dall'amminoacido N-terminale: il primo amminoacido è quello dalla parte N-terminale. Gli amminoacidi all'interno di una proteina sono numerati, il primo è quello ammino-terminale.

L'mRNA è tradotto mentre viene sintetizzato (esclusivamente nei procarioti): la traduzione è un evento cotrascrizionale. Un'altra caratteristica della traduzione è che lo stesso mRNA viene legato contemporaneamente da più ribosomi in modo tale che la stessa molecola di RNA possa essere tradotta in più proteine, sempre uguali ma in numero maggiore.

Inizio

Il primo amminoacido introdotto nei batteri è una metionina modificata: formilmetionina, con gruppo formile. È l'amminoacido iniziatore che viene legato a un tRNA che quando lega la formilmetionina riconosce in maniera specifica l'AUG iniziale: il primo tRNA nei batteri non porta la metionina vera e propria ma la formilmetionina.

Nei batteri esistono due tRNA che riconoscono l'AUG di cui uno lega la formilmetionina e l'altro la metionina non modificata che riconoscerà gli altri AUG all'interno dell'mRNA (per altre metionine presenti nella struttura primaria).

Sequenze Shine-Dalgarno

Nei batteri e negli eucarioti esiste una regione al 5' non tradotta ed è di fondamentale importanza per individuare l'AUG a partire dal quale la traduzione deve iniziare. Un AUG potrebbe esserci in tante parti dell'mRNA e inoltre non solo deve essere individuato l'AUG giusto ma deve esser anche nella giusta cornice di lettura (se no scivolamento del codice di lettura).

Nei procarioti il sistema per fare ciò c'è la sequenza di Shine-Dalgarno che permette di individuare il corretto AUG che si trova alcune basi a valle della sequenza stessa. La sequenza Shine-Dalgarno viene riconosciuta da una sequenza complementare di pirimidine sull'rRNA 16S della subunità ribosomiale minore 30S.

C'è una fase di inizio dove si forma il complesso di inizio con riconoscimento dell'mRNA da parte del ribosoma, l'arrivo del tRNA che si lega a AUG, arriva la subunità maggiore, si chiude il ribosoma.

Poi nella fase di allungamento arriveranno tutti gli altri tRNA.

Nella terminazione grazie al codone di stop avviene la fine della sintesi proteica.

Struttura del ribosoma

Ci sono regioni specifiche che si formano nel ribosoma complessivo e che sono il sito A, il sito P e il sito E.

Il *sito A* è il sito amminoacilico, dove si lega l'amminoacido dove normalmente arriva il tRNA contenente l'amminoacido che corrisponde a quella tripletta che in quel momento si troverà nel sito A.

Il *sito P* è il sito peptidilico e contiene un tRNA con il polipeptide in fase di allungamento.

Il *sito E* è il sito di uscita dal quale il tRNA che ha ceduto l'amminoacido alla catena polipeptidica in via di formazione si distacca.

Fase di inizio

Alla fase di inizio cooperano una serie di fattori.

Sulla subunità minore del ribosoma ci sono dei fattori di inizio 1 2 3. il 2 è importante per il posizionamento del tRNA che contiene la formilmetionina ed è dipendente dal GTP. Quindi nel complesso di inizio si

posizionano il fattore 1, il fattore 2 e il fattore 3: l'1 si posiziona nel sito A e lo occupa, perché il sito A è il sito dove si posizionano i tRNA con l'amminoacido però il primo tRNA della formilmetionina bisogna che si metta nel sito P perché l'A deve essere libero per il secondo tRNA; quindi il tRNA iniziatore si posiziona direttamente nel sito P. il fattore 3 serve a impedire un precoce assemblamento del ribosoma prima che tutto il complesso di inizio si sia formato direttamente.

Avviene l'idrolisi del GTP, vengono rilasciati i vari fattori, arriva la subunità maggiore e si forma il complesso di inizio dove il primo tRNA ha riconosciuto il codone AUG si trova nel sito P e il sito A è libero. A questo punto può arrivare il secondo amminoacido → fase di allungamento.

Fase di allungamento

Il sito A è vuoto, arriva il secondo tRNA carico trasportato da un fattore EF-Tu che serve a posizionare il tRNA a livello del secondo codone che dovrà essere tradotto.

Circa ogni ciclo di allungamento dura un ventesimo di secondo, che viene impiegato per lo più nel riconoscimento dell'amminoacido giusto e il meccanismo chiave è rappresentato da questi fattori EF-Tu che dipendono dal GTP. Quando ci sono molecole leganti il GTP, questi fattori che lo legano hanno anche attività GTPasica, cioè promuovere la sua idrolisi: sono considerati degli interruttori on/off.

Quando EF-Tu si posiziona a livello del sito A e controlla l'associazione del tRNA se il tRNA è quello giusto si formano i legami a H e quindi c'è una stabilità dell'intera struttura che permette al GTP di essere idrolizzato e all'EF-Tu di staccarsi → questo permette di riconoscere anche l'amminoacil-tRNA giusto.

Quindi il fattore EF-Tu si distacca e grazie a un ulteriore fattore si genera lo scambio GDP GTP in modo da rigenerare il fattore correttamente formato.

Arriva quindi il secondo amminoacido e a questo punto abbiamo la formazione del legame peptidico: gli amminoacidi sia in posizione 1 che 2, sono boccati dalla parte del gruppo carbossilico mentre il gruppo amminico è libero → per cui si forma un legame tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido legato al primo tRNA (metionina) con il gruppo amminico del secondo amminoacido; è come se l'amminoacido venisse dal primo tRNA al gruppo amminico (formazione del legame peptidico). Il tRNA legato al dipeptide si troverà nel sito A.

Il legame peptidico si forma grazie all'attività enzimatica dell'rRNA maggiore: l'enzima è un ribozima (costituito non da una proteina ma dall'unità maggiore del ribosoma).

Deve avvenire la traslocazione dal sito A al sito P. Il tRNA trasloca nel sito E per essere rilasciato. Il tRNA con la catena nascente e trasloca nel sito P. questo evento di traslocazione è sempre dipendente da molecole dipendenti GTP e grazie all'idrolisi del TP media quel cambiamento conformazionale necessario per la traslocazione dal sito A al sito P.

Questo ciclo si ripete per allungare la catena.

Terminazione

A livello del sito A se viene a trovarsi uno dei tre codoni di stop, viene riconosciuto da dei fattori proteici di rilascio. Idrolisi della catena, la molecola si distacca, i ribosomi si dissociano. Si ritorna alla fase iniziale.

Negli EUCARIOTI la differenza sta nella fase di inizio.

Non esiste negli eucarioti una sequenza di Shine-Dalgarno, però esiste una sequenza non complementare detta sequenza di Kozac che è una sequenza conservata molto simile a livello di tutti gli mRNA e da questa inizia la sintesi proteica, all'interno di essa c'è il primo AUG che deve essere tradotto: il ribosoma si lega al 5' UTR scorre fino alla sequenza di Kozac dove si blocca e si forma il complesso di inizio.

La formazione del complesso di inizio è più complessa rispetto ai procarioti, ci sono più fattori,

La terminazione ha un solo fattore, nei procarioti 3.

Formazione del complesso di inizio: fattori di tipo 4 che riconoscono la regione del cap; proteina legante la coda poliA che la riconosce e tra queste due proteine si formano delle interazioni per cui l'mRNA che viene tradotto ha durante la traduzione una forma ciclica e i ribosomi scorrono lungo questo cerchio. Quindi i fattori di tipo 4 legano il cap, la proteina legante la coda di poliA e poi ci sono i fattori di inizio 1, 2 e 3 con funzioni simili ai procarioti. Gli eIF servono per la formazione del complesso di inizio.

Differenza tra eucarioti e procarioti: nel citoplasma quando arriva un mRNA questo viene legato a livello del cap dai fattori di tipo 4 e la proteina poliA. Dall'altra parte abbiamo la subunità maggiore, l'amminoacil-tRNA

con la metionina già dove c'è il tRNA iniziatore nel sito P e i fattori di inizio. Anche in questo caso il fattore 2 è GTP dipendente. Fattore 1 si posiziona nel sito A.

Di fatto quando si collegano l'mRNA e il complesso di inizio di 43S si forma una grande struttura; vengono rilasciati alcuni fattori, arriva la subunità maggiore e si forma il complesso del ribosoma maturo pronto a tradurre la proteina.

La differenza tra eucarioti e procarioti è il numero differente di fattori che intervengono nella formazione del complesso di inizio.

Recentemente è stato scoperto che sia nei batteri che nei procarioti esistono all'interno delle proteine ulteriori amminoacidi (la selenocisteina – che si trova sia negli eubatteri che negli eucarioti – e la pirrolisina – negli Archea). Hanno un gruppo R diverso dagli altri e per tanto si è pensato derivassero da modifiche di amminoacidi precedentemente codificati. Invece sono incorporati come tali durante la sintesi proteica: ma i codoni per questi amminoacidi dove stanno?

Questi amminoacidi vengono codificati da dei codoni di stop presenti in particolari strutture tridimensionali dell'mRNA: se il codone di stop è presente in regioni che assumono una forma tridimensionale a forcina, possono essere letti dai tRNA che portano o la selenocisteina o la pirrolisina.

Per la selenocisteina UGA deve essere o in una struttura a forcina oppure subito prima di essa.

Per la pirrolisina il codone UAG è seguito da una struttura a forcina.

Nei mammiferi non esiste l'amminoacil-tRNA-sintetasi per la selenocisteina, viene utilizzato quello della serina che attacca la serina a un tRNA che se è quello per il codone di stop un ulteriore enzima modifica la serina a selenocisteina.

ANTIBIOTICI CHE AGISCONO NELLA SINTESI PROTEICA

Gli antibiotici devono agire su dei meccanismi peculiari dei batteri e non della cellula ospite.

Siccome i batteri presentano caratteristiche a livello dei ribosomi specifici, ci sono degli inibitori della sintesi proteica nei batteri che non agiscono sulla sintesi proteica degli eucarioti e per questo possono essere utilizzati come antibiotici.

Ci sono delle molecole che agiscono su entrambi i tipi di sintesi proteica, come la puromicina (sia procarioti che eucarioti) → no antibiotico perché non è selettiva.

Tetraciclina, cloramfenicolo, tossina difterica (inibiscono in maniera specifica alcune funzioni della sintesi proteica)

La tossina difterica causa la difterite: agisce sulla sintesi proteica dei procarioti: causa una modifica del fattore di traslocazione perché causa il trasferimento dalla molecola del NAD di un ADB-ribosio → arresto della sintesi.

MUTAZIONI

- Mutazioni geniche o puntiformi, coinvolgono il cambiamento della sequenza nucleotidica
- Mutazione cromosomica, coinvolge estese regioni dei cromosomi
- Mutazioni genomiche, riguardano il numero dei cromosomi

Mutazioni geniche o puntiformi

Sostituzione di un singolo nucleotide che possono avere vari risultati

- *Mutazioni samesense/silenti*: quando un codone viene sostituito con un altro che però codifica per lo stesso amminoacido, a livello della proteina non ho variazione
- *Mutazioni missense/di senso*: viene cambiato il nucleotide che cambia il significato del codone
 - *Missenso vero e proprio*: un amminoacido viene sostituito con un altro amminoacido completamente diverso, per cui la struttura locale della proteina cambia
 - *Neutre*: l'amminoacido sostituito ha caratteristiche simili a quello precedente e quindi la proteina funziona allo stesso modo.

L'anemia falciforme è causata da una mutazione di senso che fa perdere la funzionalità all'emoglobina.

- *Mutazioni non senso*: causano la generazione di un codone di stop; molto grave → perdita del funzionamento della proteina a meno che non sia un cambiamento prossimo alla fine della proteina.
- *Mutazioni di frameshift*: inserzione o delezione di un nucleotide → causano uno scivolamento della cornice di lettura

