

LA STRUTTURA E LA FUNZIONE DEL DNA

La storia al tempo di...

ROSALIND FRANKLIN

(Londra, 1920 – Londra, 1958)

UN NOBEL MANCATO

Il 10 dicembre del 1962, Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins ritirano il premio Nobel per la Medicina per la scoperta della struttura del DNA e del suo meccanismo di replicazione. Tuttavia, alla lista dei vincitori mancava il nome di Rosalind Franklin. Infatti, le sue immagini ai raggi X del DNA hanno fornito la prova chiave per il modello della doppia elica, ma lei non ha mai ottenuto alcun riconoscimento.

LA SCOPERTA DELLA CRISTALLOGRAFIA A RAGGI X

Rosalind Franklin nasce in Inghilterra il 25 luglio del 1920 e fin da ragazzina vuole fare scienza. La famiglia la iscrive al Newnham College di Cambridge, dove si innamora della chimica. Durante la Seconda Guerra mondiale, Rosalind scopre la microstruttura di diversi tipi di carbone, argomento che sarà alla base dei suoi studi di dottorato all'università di Cambridge. In seguito, Franklin si sposta a Parigi, dove l'ambiente è più aperto nei confronti delle donne e scopre per la prima volta le tecniche di cristallografia a raggi X.

LA FOTOGRAFIA 51 E IL DNA

Nel 1951, Rosalind Franklin è già un'affermata ricercatrice a livello internazionale e, al King's College di Londra, si occupa di uno dei settori più effervescenti del periodo: comprendere la struttura

del DNA e il segreto della trasmissione dell'informazione genetica. Qui ottiene una serie di immagini incredibilmente nitide del DNA, tra cui la famosa *Photograph 51*, realizzata con un'esposizione lunghissima di una singola fibra di DNA, che mostra una distribuzione spaziale che per lei è compatibile soltanto con una struttura a doppia elica.

Nel 1953, *Nature* pubblica il famoso articolo sul DNA firmato da Watson e Crick, conseguito grazie alla prova definitiva fornita dalle immagini a raggi X ottenute da Franklin e trafugate dal suo superiore Wilkins.

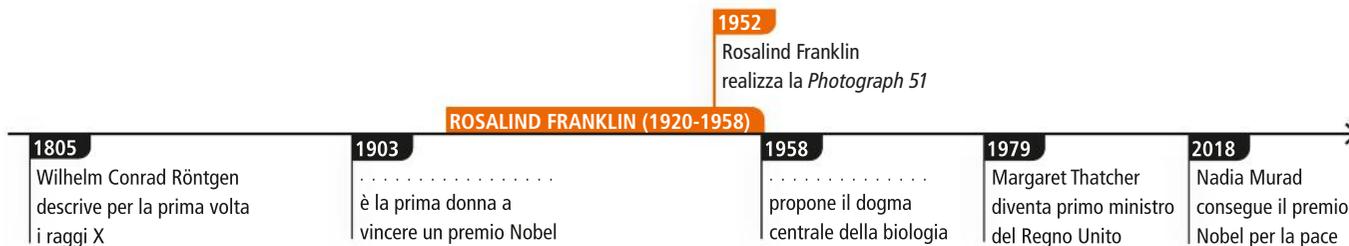
Rosalind Franklin muore a soli 37 anni per un tumore all'ovaio, senza il riconoscimento che le spetta. A rimettere nella giusta prospettiva la storia è la giornalista Brenda Maddox, che nel 2002 pubblica la biografia di Franklin: l'autrice di una delle foto più importanti della scienza.

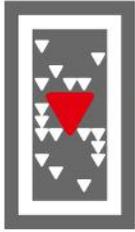
> Fai un passo in più

Leggi il libro di Brenda Maddox, *Rosalind Franklin. La donna che scoprì la struttura del DNA* e, attraverso una presentazione multimediale, ripercorri le tappe della breve storia di questa brillante scienziata, sottolineando in quanti e quali modi il suo talento è stato offuscato dai colleghi e dalle istituzioni scientifiche dell'epoca.



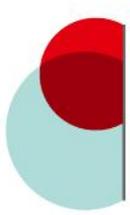
COMPLETA LA LINEA DEL TEMPO E AGGIUNGI QUALCHE ALTRO EVENTO STORICO LEGATO ANCHE AD ALTRE MATERIE





Linea del tempo
interattiva

Dalla scoperta
della nucleina
alla doppia elica



1. LA SCOPERTA E IL RUOLO DEL DNA

DALLA SCOPERTA DELLA NUCLEINA ALLO STUDIO DEI CROMOSOMI

Il materiale ereditario fu isolato per la prima volta nel 1869 dal medico tedesco Friedrich Miescher (Figura 1A), nello stesso decennio in cui Darwin pubblicava il libro *L'origine delle specie* e Mendel comunicava i risultati delle sue ricerche di genetica alla Società di storia naturale di Brünn.

La sostanza isolata da Miescher (Figura 1B) proveniva dal nucleo dei globuli bianchi (ricavati inizialmente dalle bende usate negli ospedali e poi dallo sperma dei salmoni) e per questo fu denominata **nucleina**. Negli anni seguenti, le analisi chimiche rivelarono che la nucleina era una sostanza acida e zuccherina, ricca di azoto e fosforo. In seguito alle scoperte sulle sue proprietà chimiche, la nucleina fu prima rinominata **acido nucleico** e poi **acido desossiribonucleico (DNA)**, per distinguerla da un'altra sostanza simile, l'acido ribonucleico (RNA).

Circa vent'anni dopo furono osservati al microscopio i **cromosomi** e, nel 1910, altri studi dimostrarono che questi erano la sede dell'informazione ereditaria. Negli anni Venti del Novecento gli scienziati erano ormai certi che i cromosomi fossero costituiti da DNA e proteine in quantità più o meno uguali, dunque, entrambe queste molecole erano candidate al ruolo di «materiale ereditario».

In un primo momento l'attenzione dei biochimici si concentrò sulle proteine, che sono polimeri formati dalla combinazione di venti amminoacidi diversi e presentano una grande varietà di strutture e funzioni. Sembrava decisamente più probabile che fossero gli amminoacidi a costituire una specie di «linguaggio della vita» capace di fornire le istruzioni per tutte le attività cellulari, rispetto al DNA, formato dalla combinazione di soli quattro tipi diversi di nucleotidi.

Grazie a una serie di esperimenti sui batteri e sui virus, l'ipotesi che l'informazione genetica fosse di natura proteica si rivelò errata e fu, invece, dimostrato che essa era rappresentata dal DNA.

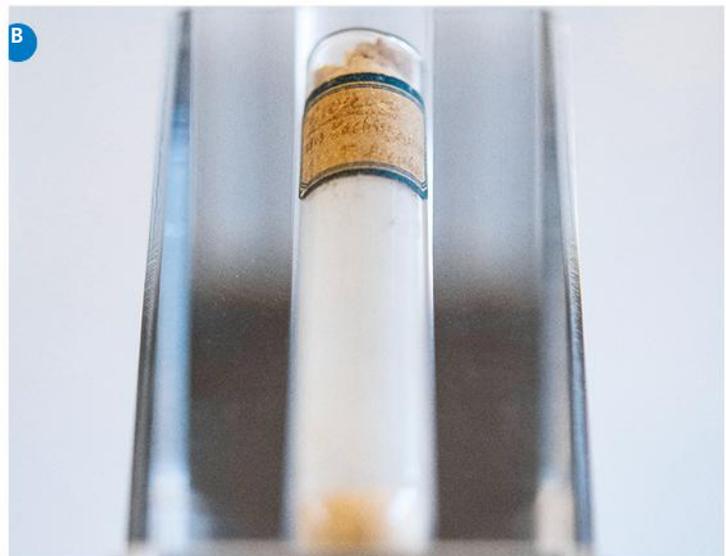
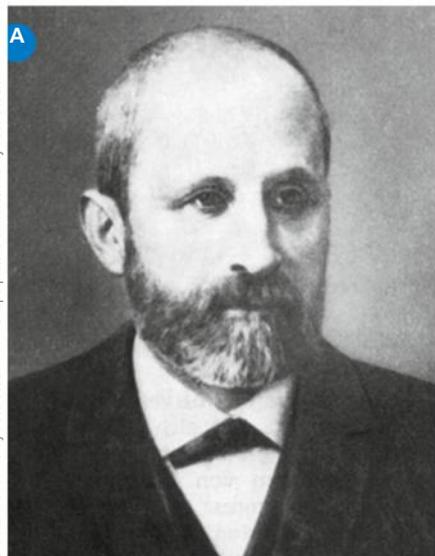
Sia i procarioti sia i virus hanno una struttura più semplice degli eucarioti e furono il modello ideale per ottenere prove sperimentali di questa ipotesi. Nei batteri, infatti, gli unici organuli presenti sono i ribosomi e non esiste un nucleo definito, ma il DNA è disperso nel citoplasma. Il numero di proteine presenti nei procarioti, inoltre, è inferiore rispetto a quello presente negli eucarioti, per cui risultò più semplice identificarne le funzioni. Uno dei batteri più usati per questi studi è stato *Escherichia coli*, ma sono state impiegate anche altre specie, come *Streptococcus pneumoniae*, il batterio patogeno che provoca la polmonite umana.

TI RICORDI?

La struttura di base delle **cellule procariotiche** è data dalla membrana plasmatica, che separa la cellula dall'ambiente circostante, dal citoplasma, nel quale avvengono le reazioni metaboliche, dai ribosomi e dal cromosoma batterico, che conserva le informazioni ereditarie.

Figura 1

(A) Fotografia del biologo tedesco Friedrich Miescher (1844-1895).
(B) Una provetta contenente la nucleina isolata da Miescher nel suo laboratorio, ora esposta al museo dell'Università di Tübingen.



GRIFFITH SCOPRÌ IL FATTORE DI TRASFORMAZIONE

Il primo esperimento fondamentale per comprendere il ruolo del DNA fu condotto nel 1928 dal medico inglese Frederick Griffith (1877-1941), che stava studiando il batterio *S. pneumoniae* (o più semplicemente pneumococco) per trovare un vaccino contro la polmonite, che all'epoca mieteva moltissime vittime, soprattutto bambini, visto che gli antibiotici non erano ancora stati scoperti.

Griffith stava lavorando su due diversi ceppi di pneumococco:

- il *ceppo S* (dall'inglese *smooth*, «liscio») era formato da cellule che producevano colonie dalla superficie piana e lucida. Le cellule del ceppo S sono ricoperte da una capsula di polisaccaridi che le protegge dal sistema immunitario dell'ospite. Infatti, una volta iniettati nel corpo dei topi di laboratorio, i batteri S si dividevano attivamente e provocavano la polmonite, rivelandosi un ceppo altamente patogeno;
- il *ceppo R* (dall'inglese *rough*, «ruvido») produceva colonie dalla superficie irregolare. Questi batteri sono privi della capsula protettiva, quindi vengono facilmente aggrediti dal sistema immunitario dell'ospite e non sono patogeni. Infatti, quando i batteri R venivano inoculati nei topi non erano in grado di generare la malattia e permettevano alle cavie di sopravvivere.

Griffith inizialmente inoculò in alcuni topi gli pneumococchi del ceppo S virulento che erano stati preventivamente esposti a calore intenso e osservò che non erano più capaci di produrre l'infezione e uccidere i topi. Quando, però, Griffith somministrò a un altro gruppo di topi una miscela di batteri S virulenti trattati con il calore e di batteri R non virulenti vivi, osservò con stupore che gli animali si ammalavano e morivano. Eseguendo l'autopsia dei topi, Griffith trovò all'interno dei loro tessuti un gran numero di cellule batteriche vive, sia del ceppo S sia del ceppo R. Lo scienziato concluse che, in presenza degli pneumococchi S uccisi, alcuni pneumococchi R si erano trasformati in batteri del ceppo patogeno S (Figura 2).

Questa *trasformazione* non avveniva solo nei tessuti del topo, ma si verificava anche in provetta: incubando una coltura di batteri R non virulenti vivi insieme a batteri S virulenti uccisi dal calore, si ottenevano batteri S vivi e dunque patogeni. Alcuni anni dopo, un altro gruppo di ricercatori scoprì che la trasformazione delle cellule R in cellule S si otteneva anche usando una miscela che conteneva tutti i componenti cellulari dei batteri S uccisi, ma non le cellule integre.

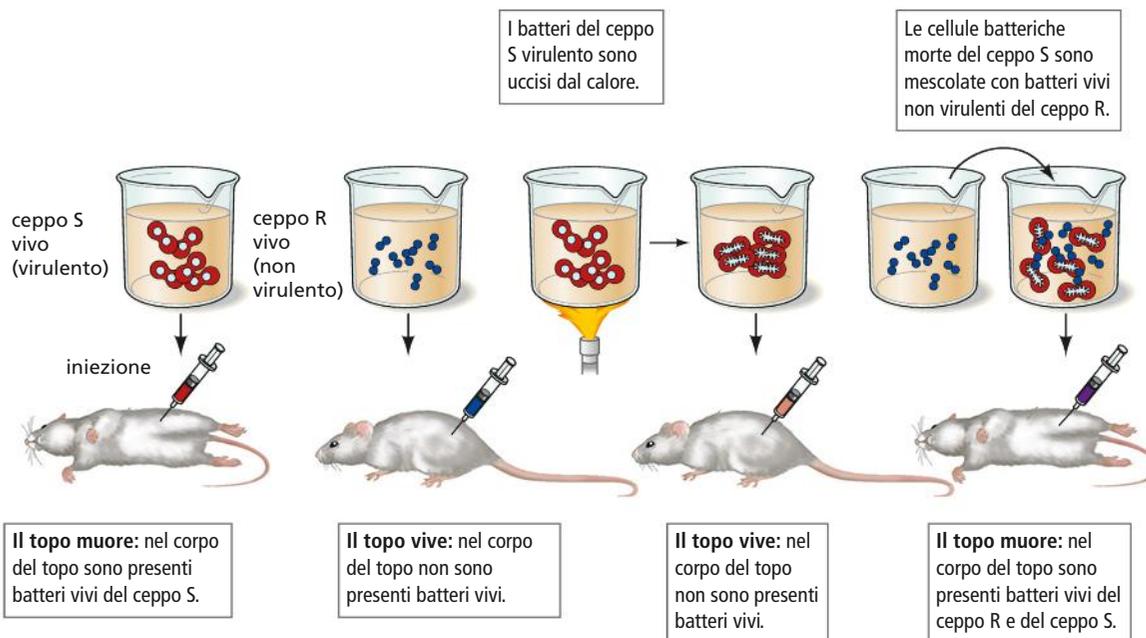
I risultati di Griffith indicavano che nei batteri S uccisi doveva esistere una sostanza che, una volta incorporata dalle cellule R vive, produceva in loro un cambiamento ereditario; questa sostanza, di cui non si conosceva ancora la natura chimica, fu chiamata **fattore di trasformazione**.

LE PAROLE

In microbiologia, un **ceppo batterico** è una popolazione di batteri che derivano tutti da un'unica cellula e che sono quindi geneticamente identici.

Figura 2

Gli esperimenti di Griffith dimostrarono che una sostanza presente nel ceppo S di pneumococco poteva trasformare e rendere virulento anche il ceppo R, inizialmente innocuo.



AVERY DIMOSTRÒ CHE IL FATTORE DI TRASFORMAZIONE È IL DNA

I risultati di Griffith furono ripresi all'inizio degli anni Trenta del Novecento dal gruppo di ricerca coordinato dal medico canadese Oswald Avery (1877-1955). Per quasi dieci anni, Avery e i suoi colleghi sottoposero i campioni contenenti il fattore di trasformazione del pneumococco a vari trattamenti, con lo scopo di distruggere selettivamente i diversi tipi di biomolecole (acidi nucleici, proteine, carboidrati e lipidi) e verificare, poi, la capacità dei campioni trattati di trasformare o meno le colture batteriche.

Gli esperimenti di Avery indicavano che se veniva degradato il DNA, il campione perdeva la sua capacità trasformante, mentre distruggendo le proteine, i lipidi oppure i carboidrati ciò non avveniva (Figura 3). Avery riuscì anche a isolare del DNA quasi puro e a dimostrare che da solo era sufficiente a indurre la *trasformazione batterica*.

Il lavoro di Avery, pubblicato per la prima volta nel 1944, rappresenta una tappa fondamentale del percorso che ha portato a stabilire che il materiale genetico è costituito da DNA e non dalle proteine, tuttavia, la comunità scientifica dell'epoca lo accolse con scetticismo. La molecola di DNA, costituita solamente da quattro diversi nucleotidi, sembrava troppo semplice per essere alla base dei complessi meccanismi ereditari; inoltre, nella prima metà

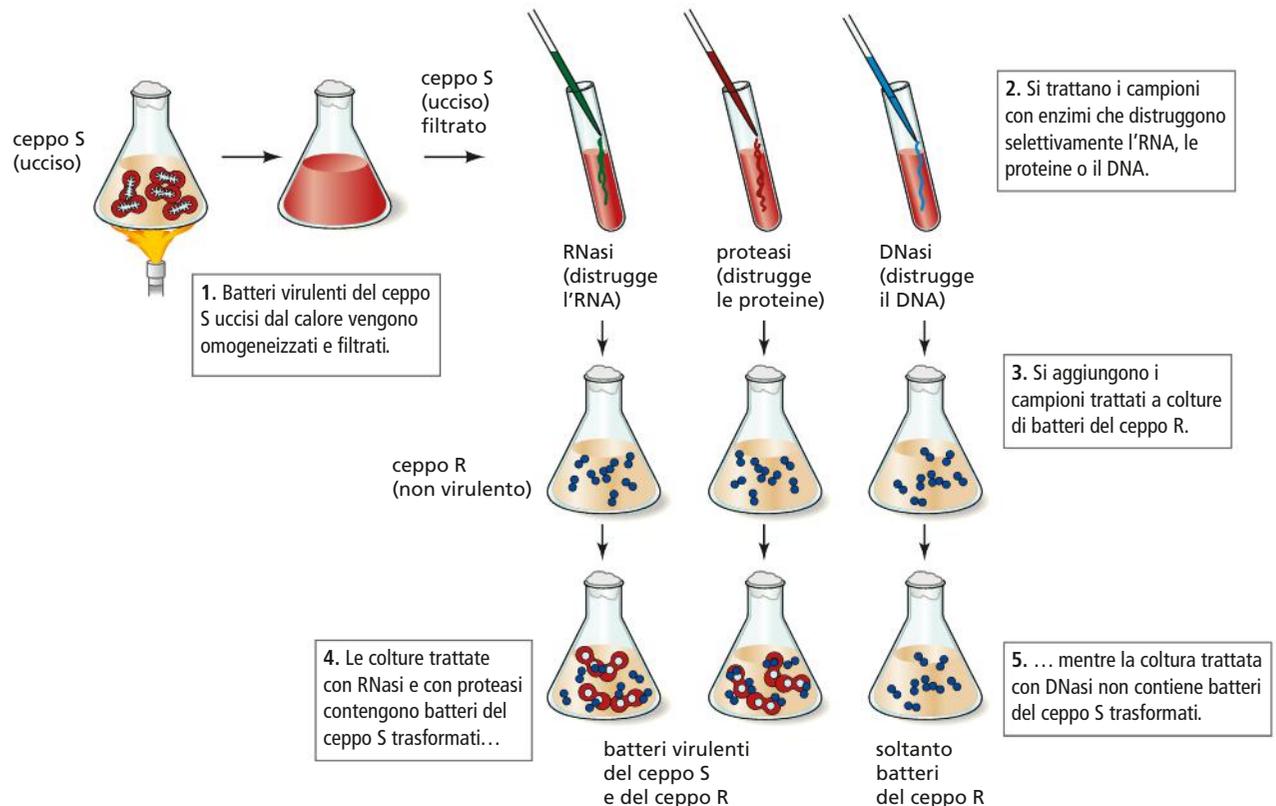
del Novecento la genetica batterica era un campo di studio ancora poco esplorato. Nella comunità scientifica, i procarioti erano considerati organismi «inferiori», al punto che alcuni scienziati dubitavano addirittura che possedessero dei geni. Infine, siccome il campione di DNA impiegato negli esperimenti condotti da Avery non era completamente puro, non si poteva escludere del tutto che la trasformazione dei batteri fosse dovuta alla presenza di proteine rimaste a contaminarlo. Per risolvere la controversia furono necessarie successive ricerche condotte su entità biologiche ancora più piccole e all'epoca sconosciute: i *virus*.

GLI ESPERIMENTI DI HERSHEY E CHASE CONFERMARONO CHE IL MATERIALE GENETICO È IL DNA

Nello stesso periodo in cui Avery pubblicava le sue scoperte, un gruppo di biologi e fisici iniziò a interessarsi alla genetica dei batteri e dei virus capaci di infettarli, chiamati **batteriofagi** o **fagi**; i ricercatori che studiavano i batteriofagi furono soprannominati «il gruppo del fago».

Questo gruppo di ricerca lavorava negli Stati Uniti e comprendeva microbiologi e biofisici provenienti da diversi Paesi, tra cui l'italiano Salvatore Luria, il tedesco Max Delbrück e l'americano Alfred Hershey, che condivisero il premio Nobel per la Medicina nel 1969. Il loro lavoro portò alla

Figura 3
Avery dimostrò che, tra tutte le biomolecole, soltanto il DNA era in grado di rendere patogeno il ceppo R.



nascita della **genetica dei microrganismi**, una nuova disciplina alla base di molte ricerche successive, tra cui l'esperimento di Hershey e Chase.

Negli anni Cinquanta del secolo scorso, Alfred Hershey (1908-1997) e la sua assistente Martha Chase (1927-2003) usarono il fago T2, che infetta il batterio *Escherichia coli*, al fine di stabilire una volta per tutte se il materiale genetico fosse costituito dal DNA oppure dalle proteine. I ricercatori sapevano che il fago T2 è composto esclusivamente da una molecola di DNA «nudo» (cioè non legato ad alcuna proteina), avvolta da un rivestimento proteico. T2 era, quindi, un ottimo modello per stabilire in quale delle due molecole fosse contenuta l'informazione genetica virale trasmessa con l'infezione. Quando il fago infetta un batterio, una parte del virus penetra nella cellula batterica (Figura 4); circa 20 minuti dopo, la cellula va incontro a lisi e libera decine di particelle virali, dimostrando che il fago è capace di replicarsi all'interno del batterio. Hershey e Chase ipotizzarono che l'ingresso di una qualche sostanza virale agisse sulla cellula ospite, trasformandola in una «fabbrica» di nuovi virus. Per stabilire se tale sostanza fosse costituita da DNA o da proteine, i ricercatori progettaronο un esperimento capace di rintracciare le molecole virali lungo tutto il ciclo vitale del fago.

I ricercatori prepararono due campioni distinti di fagi (Figura 5):

1. un campione era costituito da fagi T2 cresciuti in una coltura batterica contenente l'isotopo radioattivo del fosforo (^{32}P), che quindi era stato incorporato nel DNA virale;
2. il secondo campione era formato da fagi T2 cresciuti in una coltura batterica contenente l'isotopo radioattivo dello zolfo (^{35}S); in questo caso, lo zolfo radioattivo era stato incamerato dalle proteine virali.

Figura 4
Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di una cellula batterica (in verde) infettata da tre fagi T2 (in arancione).

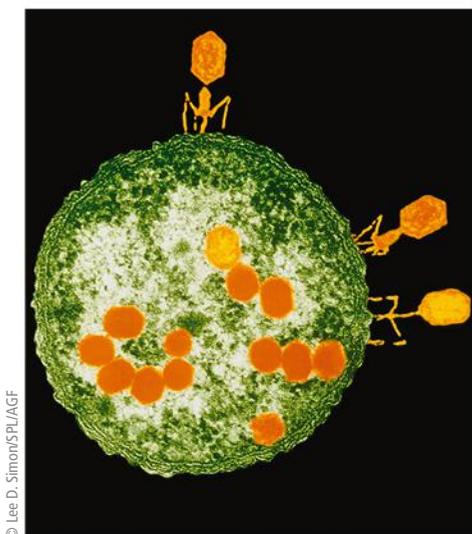
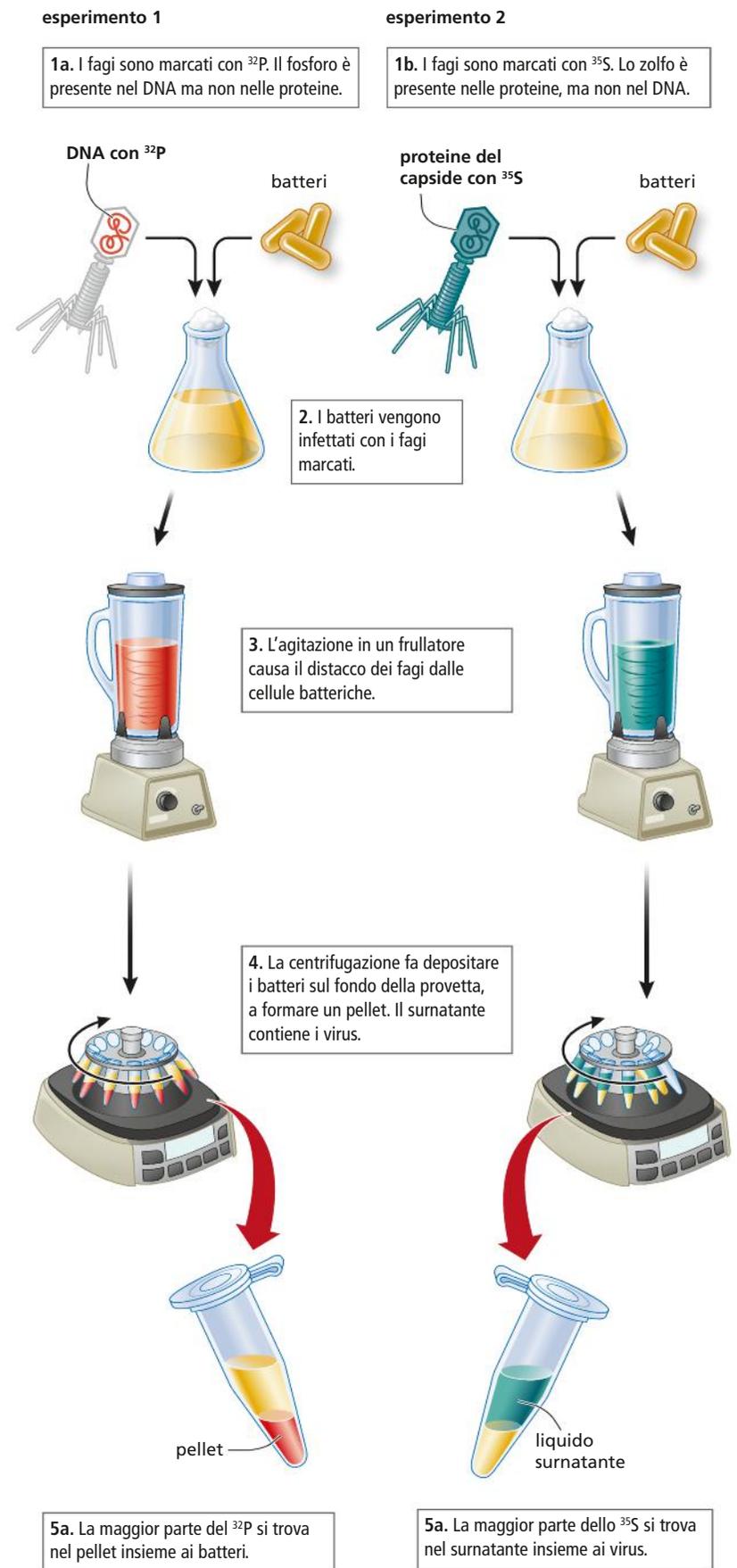


Figura 5

L'esperimento di Hershey e Chase: in cellule batteriche infettate con batteriofagi T2, soltanto il DNA radiomarcato si trovava nei batteri, mentre le proteine radiomarcate rimanevano nel liquido surnatante insieme ai virus.



SCOPERTA DEL DNA

MIESCHER

NUCLEINA

GRIFFITH

FATTORE DI TRASFORMAZIONE

AVERY

IL DNA È IL FATTORE DI TRASFORMAZIONE

HERSHEY-CHASE

IL DNA È IL MATERIALE GENETICO

In seguito, Hershey e Chase usarono i due campioni di fagi per infettare colture distinte di *E. coli* poste in fiasche separate. Venti minuti dopo l'infezione, le soluzioni contenenti i batteri vennero omogeneizzate, in modo da separare gli eventuali virus rimasti agganciati all'esterno delle cellule batteriche, e poi centrifugate. Grazie alla centrifuga, i batteri, che sono più pesanti, precipitano sul fondo della provetta (formando il *pellet*) e con essi il loro contenuto (compreso l'eventuale materiale virale inserito), mentre i virus, più leggeri, restano in sospensione costituendo il *surnatante* (vedi Figura 5).

I risultati erano chiari: il DNA marcato con ^{32}P si trovava sul fondo delle provette, mentre le proteine marcate con ^{35}S restavano in sospensione, quindi il DNA virale era stato trasferito all'interno delle cellule batteriche, ma ciò non era accaduto al capside proteico. Così si arrivò alla dimostrazione che il materiale genetico del fago è costituito da DNA.

Il lavoro di Hershey e Chase fu pubblicato nel 1952 e confermò definitivamente l'ipotesi di Avery, aprendo la strada alla scoperta della struttura molecolare degli acidi nucleici.

FACCIAMO IL PUNTO

Scegli il completamento corretto.

- Hershey e Chase dimostrarono che il materiale genetico è costituito da DNA perché
 - A il fosforo radioattivo si trovava nel surnatante.
 - B lo zolfo radioattivo si trovava nel pellet.
 - C il fosforo radioattivo si trovava nel pellet e lo zolfo nel surnatante.
 - D i batteri venivano infettati dai fagi.
- Completa le frasi.
 - a) La identificata da Miescher era l'insieme degli acidi nucleici e delle proteine associate.
 - b) L'esperimento di Avery dimostrò che la trasformazione batterica non si verificava se i batteri venivano sottoposti a vari trattamenti per il DNA.
- Vero o falso?
 - a) Distruggendo le proteine, i lipidi o i carboidrati, Avery osservò la presenza della capacità trasformante sul campione. V F
 - b) Hershey e Chase utilizzarono il batteriofago T2 perché composto solo da una molecola di DNA nudo. V F

1

Per saperne di più

QUALE FORMA HA IL DNA?

Risposta facile, direte voi... è una doppia elica destrógira, costituita da due filamenti a loro volta formati da nucleotidi. Eppure, questa risposta è incompleta. Il modello elaborato da Watson e Crick si basava sull'osservazione di poche paia di basi, 12 al massimo, e descrive bene la conformazione di piccolissimi frammenti di DNA. Allargando la visuale su frammenti via via più grandi, il quadro in realtà si complica.

ESISTE ANCHE UNA QUADRUPLA ELICA

Sessant'anni dopo la scoperta di Watson e Crick, un gruppo di ricercatori guidato dall'italiana Giulia Biffi, ha mostrato come il DNA possa assumere anche una conformazione a *quadrupla elica*.

Lo studio è il risultato di una ricerca lunga un decennio, culminata nella dimostrazione che queste particolari strutture, chiamate *G-quadruplexes*, esistono anche all'interno di cellule umane viventi. Queste quadruplette si formano in regioni del DNA particolarmente ricche di guanina, da cui deriva la G del nome inglese. In realtà, della loro esistenza *in vitro* si era a conoscenza già da alcuni decenni, ora però i ricercatori di Cambridge le hanno osservate *in vivo* per la prima volta e alcuni indizi fanno pensare che questo tipo

di situazione si verifichi più frequentemente nelle cellule che si dividono rapidamente, come quelle tumorali. Proprio gli esperimenti condotti da Giulia Biffi hanno permesso di identificare in modo più preciso il momento in cui la struttura a quattro eliche del DNA si manifesta con maggiore frequenza: la fase di **replicazione del DNA**, poco prima della divisione cellulare. Secondo i ricercatori, sebbene ci siano indizi, è ancora presto per indicare una relazione diretta tra le eliche quadruple e il cancro.

UNA VARIETÀ DI FORME E CONFIGURAZIONI TRIDIMENSIONALI

All'interno delle cellule, il DNA assume moltissime forme: si ripiega e si attorciglia creando strutture tridimensionali definite **superavvolgimenti** (dall'inglese *supercoiled*).

Grazie a una moderna tecnica di microscopia è stato possibile studiare i dettagli della doppia elica come mai prima d'ora. Gli autori dello studio, pubblicato sulle pagine di *Nature Communications*, hanno cercato di riprodurre in laboratorio i superavvolgimenti del DNA per poterne studiare la forma. Hanno riprodotto dei piccoli anelli di 336 coppie di nucleotidi, circa 10 milioni di volte più corti della

reale molecola di DNA umana, ma sufficientemente lunghi per essere un buon modello della realtà. Per analizzare le forme assunte da questi microanelli, gli scienziati hanno sovrapposto i risultati di due tecniche: la **tomografia crioelettronica**, che permette di ottenere immagini di materiale biologico attivo congelandolo, e la **simulazione al computer** del dinamismo del DNA e di tutte le forme che questo può assumere. Le immagini ottenute hanno mostrato la grande varietà delle forme assunte dalle molecole di DNA: cerchi ripiegati ad angolo vivo, altri simili a un otto, altri ancora che ricordano la cruna di un ago o compattati come un piccolo bastoncino.

Uno dei motivi per cui è importante studiare e comprendere la forma del DNA è il fatto che queste sono informazioni utili per migliorare l'azione di alcuni **farmaci** (come i chemioterapici) che agiscono direttamente sul DNA basandosi su un meccanismo a *incastro*, come una chiave con la propria serratura. Più dettagli si conoscono sulla forma della serratura, più probabile sarà modellare una chiave in grado di aprirla e, quindi, potrà essere più semplice sviluppare farmaci estremamente selettivi, costruiti appositamente sulla forma assunta dal DNA.

2.

LA STRUTTURA MOLECOLARE DEL DNA

LE REGOLE DI CHARGAFF AIUTARONO A COMPRENDERE LA STRUTTURA DEL DNA

Una volta compreso che il DNA è la molecola in cui risiede l'informazione genetica, gli scienziati iniziarono a domandarsi quale fosse la sua struttura molecolare. Per risolvere questo dilemma fu necessario raccogliere dati sperimentali di vario tipo e confrontarli con considerazioni teoriche.

La composizione chimica del DNA forniva già alcuni validi indizi, infatti, i biochimici erano a conoscenza del fatto che il DNA è un polimero costituito da nucleotidi e che ciascun nucleotide è formato da tre componenti:

- una molecola di desossiribosio (uno zucchero a cinque atomi di carbonio);
- un gruppo fosfato;
- una base azotata, cioè una molecola organica con struttura ad anello, contenente azoto e con proprietà debolmente basiche.

Oggi sappiamo come sono uniti tra loro questi componenti nella formazione di un nucleotide: il gruppo fosfato è legato al desossiribosio tramite un legame covalente con il carbonio in posizione 5' (si legge *cinque primo*), mentre la base azotata è legata al primo carbonio dello zucchero, che si trova dalla parte opposta del gruppo fosfato (Figura 6A).

La sola differenza tra i quattro nucleotidi presenti nel DNA risiede proprio nella base azotata, che può essere una molecola di *guanina* (G), *adenina* (A), *citocina* (C) oppure *timina* (T). La guanina e l'adenina sono chiamate **purine** e hanno una struttura a due anelli, mentre la citosina e la timina sono dette **pirimidine** e sono formate da un anello semplice (Figura 6B).

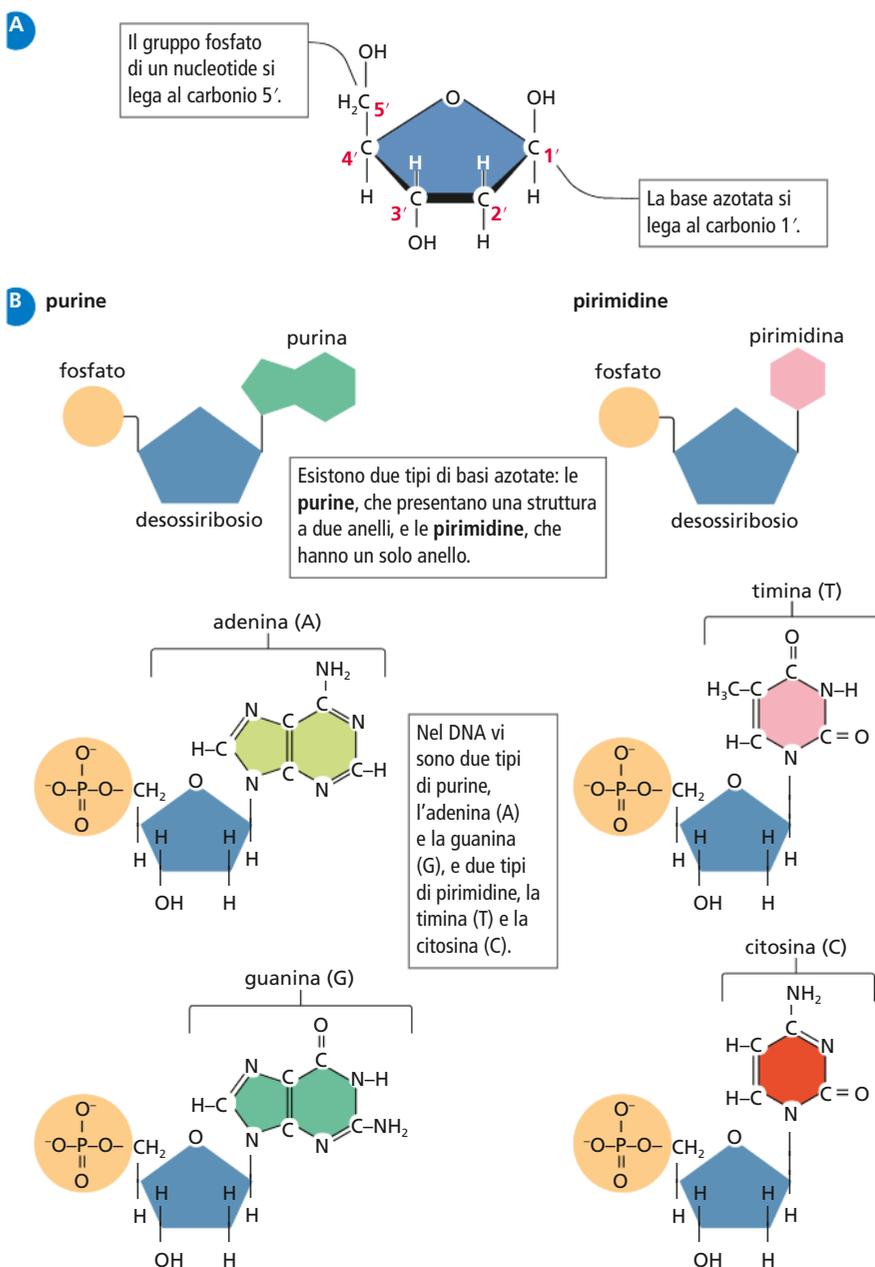
Inoltre, nel 1950 il chimico austriaco Erwin Chargaff (1905-2002) pubblicò uno studio sul confronto del DNA di organismi di specie diverse, riscontrando alcuni aspetti comuni:

- la composizione percentuale delle basi azotate del DNA è diversa da una specie all'altra;
- campioni di DNA isolati da tessuti diversi di organismi della stessa specie mostrano la stessa composizione percentuale di basi;
- la composizione percentuale delle basi non è influenzata dall'età dell'organismo, ma nemmeno dal suo stato di nutrizione oppure dalle specifiche condizioni ambientali in cui vive;

- in tutti i DNA cellulari, indipendentemente dalla specie in esame, la quantità di adenina è sempre uguale alla quantità di timina ($A=T$) e la quantità di guanina corrisponde sempre a quella di citosina ($G=C$); di conseguenza, la quantità totale delle purine ($A + G$) è identica a quella delle pirimidine ($T + C$).

Figura 6

Il desossiribosio e le posizioni degli atomi di carbonio nella formazione di un nucleotide (A). Ogni nucleotide è dato da una base azotata, che può essere una purina o una pirimidine, dallo zucchero desossiribosio e da un gruppo fosfato (B).



Queste relazioni quantitative, dette **regole di Chargaff**, furono indispensabili per stabilire la struttura tridimensionale del DNA e il modo in cui le informazioni genetiche sono codificate al suo interno.

GLI STUDI DI ROSALIND FRANKLIN FURONO FONDAMENTALI PER DEFINIRE LA STRUTTURA A DOPPIA ELICA

Nello stesso periodo in cui Chargaff metteva a punto i suoi risultati, i biofisici Rosalind Franklin (1920-1958) e Maurice Wilkins (1916-2004) del *King's College* di Londra utilizzavano i raggi X per studiare la disposizione degli atomi all'interno delle molecole di DNA. La **diffrazione ai raggi X** è una tecnica che permette di ottenere informazioni sulla struttura interna di una sostanza, che per essere sottoposta a questo tipo di analisi deve trovarsi in forma cristallina, cioè in uno stato in cui le sue molecole siano disposte in modo ordinato. Questa tecnica si basa sul fatto che nei cristalli gli atomi sono disposti secondo schemi tridimensionali ripetuti che danno origine a piani paralleli interni al cristallo stesso. Quando un fascio di raggi X attraversa il cristallo, questi piani si comportano come specchi che riflettono una parte dei raggi solo in certe direzioni. Ponendo una lastra fotografica dietro al cristallo, questa verrà impressionata dai raggi riflessi dai diversi piani di atomi e si formeranno così delle macchie scure. L'analisi della forma e della disposizione di ogni macchia (*diffratogramma*) permette di dedurre la disposizione degli atomi all'interno delle molecole (**Figura 7**).

Attraverso la diffrazione ai raggi X, nel 1951 Linus Pauling determinò la struttura ad α -elica delle proteine e nello stesso anno Rosalind Franklin e Maurice Wilkins ottennero le immagini che suggerivano la struttura del DNA: una struttura fortemente simmetrica, con forma di **elica destrogira**, cioè avvolta da sinistra verso destra, con un diametro costante di 2 nm.

WATSON E CRICK DEFINIRONO IL MODELLO TRIDIMENSIONALE A DOPPIA ELICA DEL DNA

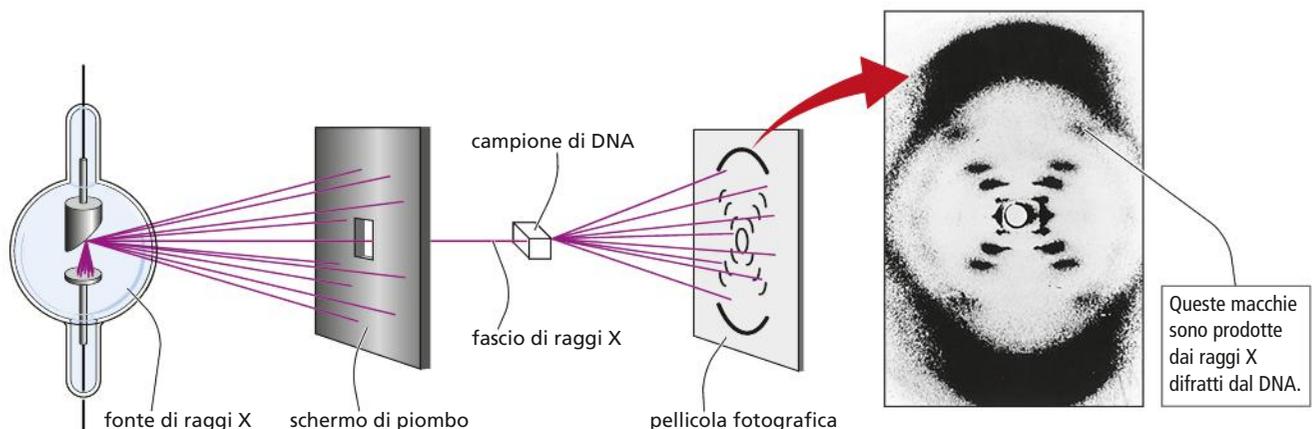
All'inizio degli anni Cinquanta del Novecento, il biologo statunitense James Watson (1928) vinse una borsa di studio presso la *Cavendish Laboratory* di Cambridge, in Inghilterra, per approfondire la struttura delle proteine mediante la diffrazione ai raggi X; qui incontrò il fisico inglese Francis Crick (1916-2004). Watson proveniva dal «gruppo del fago» di Hershey e Luria, mentre Crick era un esperto nell'interpretazione delle immagini ai raggi X delle molecole. Sebbene il loro progetto di ricerca riguardasse le proteine, entrambi i ricercatori erano interessati a scoprire in che modo l'informazione genetica fosse custodita all'interno del DNA.

Prendendo in esame tutti i dati disponibili fino a quel momento, nel 1951 Watson e Crick iniziarono a elaborare un modello tridimensionale della molecola di DNA. In particolare, i due scienziati considerarono tre fattori:

1. le analisi delle immagini ai raggi X di Franklin e Wilkins mostravano che la molecola di DNA aveva la forma di un'elica destrogira;
2. i dati fisici e chimici suggerivano che nella molecola ci fossero due catene polinucleotidiche affiancate;
3. la regola di Chargaff indicava che la quantità totale delle purine fosse sempre pari a quella delle pirimidine.

Il 25 aprile del 1953, Watson e Crick pubblicarono sulla rivista scientifica *Nature* il loro modello della struttura del DNA, in grado di spiegare le proprietà della molecola e di aprire la strada alla comprensione delle sue funzioni. Per questo risultato, nel 1962 Watson, Crick e Wilkins ricevettero il premio Nobel per la Medicina, mentre Rosalind Franklin, che nel frattempo era morta di cancro a causa della prolungata esposizione alle radiazioni, non ricevette neppure un elogio postumo (*vedi Apertura*).

Figura 7
Modello dell'esperimento di diffrazione ai raggi X del DNA (a sinistra) e fotografia del risultato ottenuto (a destra).



IL DNA È SORRETTO DA LEGAMI ZUCCHERO-FOSFATO ED È STABILIZZATO DA LEGAMI A IDROGENO

Secondo il modello di Watson e Crick, il DNA è composto da una doppia elica costituita da due catene di polinucleotidi.

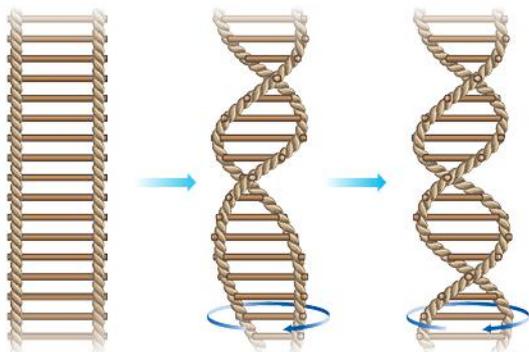
Per visualizzare questa struttura puoi immaginare di prendere una scala a pioli e di ruotarla in modo da formare una spirale, mantenendo i pioli perpendicolari all'asse di rotazione (Figura 8). I due montanti della scala rappresentano lo *scheletro zucchero-fosfato*, cioè la sequenza di molecole di zucchero e gruppi fosfato alternate, mentre ogni piolo perpendicolare ai montanti rappresenta *due basi azotate appaiate*: adenina (A) e timina (T), oppure guanina (G) e citosina (C). Lo scheletro zucchero-fosfato ha un'elevata carica negativa dovuta alla presenza dei gruppi fosfato (PO_4^{3-}) e forma facilmente legami a idrogeno con le molecole di acqua; le basi azotate, al contrario, sono apolari.

I nucleotidi sono tenuti insieme da un legame covalente tra il gruppo fosfato legato al carbonio in posizione 5' di un nucleotide e il carbonio in posizione 3' del nucleotide successivo. Questo **legame fosfodiesterico** costituisce la struttura portante dello scheletro zucchero-fosfato. Il legame fosfodiesterico si forma per *condensazione* tra l'ossidrile del desossiribosio e un ossidrile inizialmente presente nel fosfato, pertanto ogni nucleotide forma legami con altri due nucleotidi. Questo legame attribuisce anche a ciascun filamento una direzionalità (Figura 9), in quanto ogni filamento possiede un'estremità 5' (che termina con un nucleotide che possiede un gruppo fosfato libero) e un'estremità 3' (che termina con un nucleotide che possiede un gruppo ossidrile -OH libero, non legato a un gruppo fosfato di un altro nucleotide).

Nella doppia elica, i due filamenti hanno verso opposto: uno è orientato in direzione da 5' a 3' ($5' \rightarrow 3'$), l'altro è orientato in direzione $3' \rightarrow 5'$. Per questo, i filamenti si dicono **antiparalleli**.

Figura 8

La doppia elica del DNA è come una scala a pioli fatta ruotare intorno al proprio asse perpendicolare.

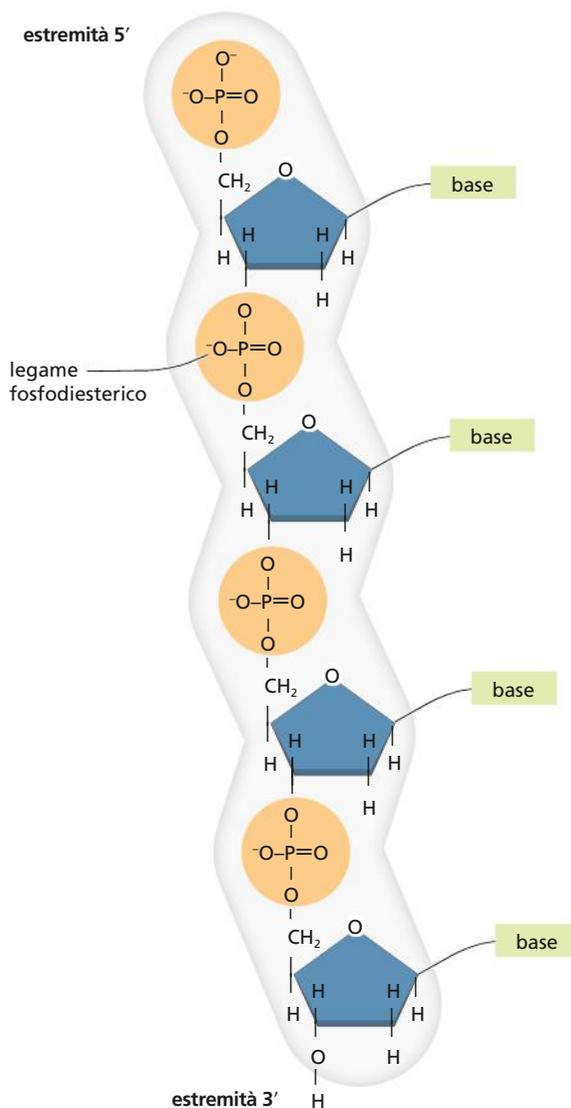


Dallo scheletro zucchero-fosfato di ciascun filamento si dipartono le basi azotate dirette verso il centro della doppia elica; ogni base di un filamento ha la possibilità di appaiarsi alla base che si trova sul filamento opposto per mezzo di legami a idrogeno. I legami a idrogeno sono relativamente deboli, ma nel complesso contribuiscono a dare stabilità alla doppia elica.

Un altro fattore che contribuisce alla stabilità del DNA è il cosiddetto «impilamento delle basi», un fenomeno secondo cui le basi azotate di un filamento si compattano perché, a causa della loro natura idrofobica, tendono a rimanere vicine tra di loro per allontanarsi il più possibile dall'acqua. La distanza tra i due «montanti», calcolata in base alle immagini ottenute dalla Franklin, è di 2 nm.

Figura 9

Il legame fosfodiesterico fa sì che il DNA possieda una direzionalità, in quanto ogni filamento ha un'estremità 5' (che termina con un gruppo fosfato libero) e un'estremità 3' (che termina con un gruppo ossidrile libero).



TI RICORDI?

I **legami a idrogeno** sono legami intermolecolari di natura elettrostatica che si instaurano, per esempio nell'acqua, tra le parziali cariche negative dell'atomo di ossigeno di una molecola e le parziali cariche positive degli atomi di idrogeno di altre due molecole; sono legami deboli: in media la loro forza è pari al 5-10% di quella dei legami covalenti.

La combinazione di due purine misurerebbe *più* di 2 nanometri, mentre due pirimidine appaiate occuperebbero *meno* di 2 nm; ma se una purina è sempre appaiata a una pirimidina, si genera una perfetta corrispondenza e, in ogni suo punto, la molecola di DNA presenta la stessa larghezza.

Procedendo su tale strada, Watson e Crick arrivarono a costruire un modello della molecola in ferro e stagno, collocando al posto giusto ogni tassello di questo puzzle tridimensionale (Figura 10). Lavorando con il modello, i due ricercatori scoprirono che i nucleotidi potevano essere disposti lungo un singolo filamento in qualunque ordine. Dal momento che una molecola di DNA può essere lunga migliaia di nucleotidi, nella sequenza delle basi è possibile un'enorme varietà: uno dei requisiti fondamentali che deve possedere il materiale genetico per generare la straordinaria variabilità dei viventi.

Quando si misero a costruire il secondo filamento, Watson e Crick si trovarono di fronte a un altro importante vincolo: l'adenina poteva appaiarsi soltanto con la timina mediante **due legami a idrogeno** (A=T) e la guanina soltanto con la citosina, formando **tre legami a idrogeno** (G≡C); le basi appaiate erano, pertanto, **complementari** (Figura 11). Questo modello forniva una spiegazione convincente alla regola di Chargaff e aveva una seconda implicazione: la sequenza dei nucleotidi lungo un filamento era in grado di determinare la sequenza sul filamento complementare. Crick ri-

mase molto colpito da quest'ultimo aspetto, tanto che suppose fosse utile anche per capire i meccanismi di replicazione e trascrizione del DNA.

Misurazioni successive, effettuate sulle molecole di DNA, hanno mostrato che ogni giro dell'elica misura 3,4 nm di lunghezza, equivalenti a 10,5 coppie di basi. Le coppie di basi, o paia di basi (indicate come **bp** oppure **bps** dall'inglese *base pair*), sono comunemente utilizzate come misura della lunghezza degli acidi nucleici (DNA e RNA).

Quando i due filamenti si avvolgono a formare la doppia elica, tra i gruppi fosfato restano esposti due solchi di diversa ampiezza: il **solco minore** è largo 1,2 nm, mentre il **solco maggiore**, dove avvengono principalmente le interazioni tra il DNA e le proteine che ne regolano l'attività, risulta largo 2,2 nm.

IL MODELLO A DOPPIA ELICA COLLEGA LA STRUTTURA DEL DNA ALLE SUE FUNZIONI

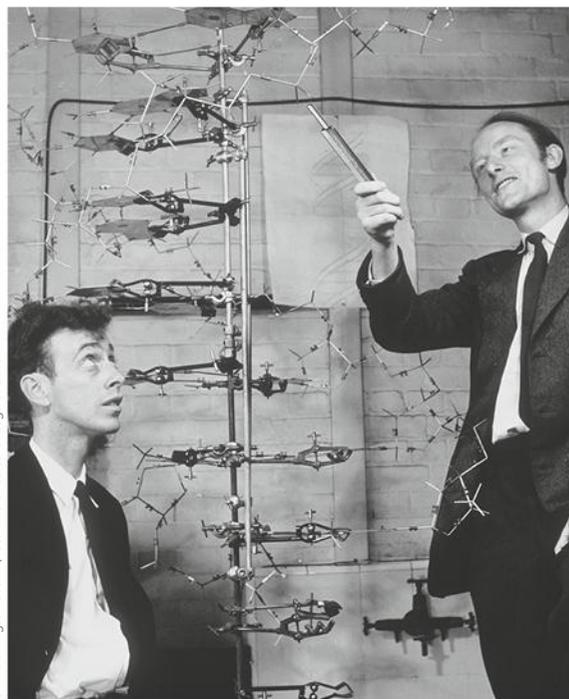
Come abbiamo visto, un requisito fondamentale del materiale genetico è la capacità di contenere informazioni: un aspetto primario della scoperta di Watson e Crick fu proprio il fatto che il loro modello del DNA dimostrava come le **informazioni genetiche** fossero indicate dalla sequenza delle basi azotate. È tale sequenza a dettare le regole per la sintesi delle proteine che avviene nel citoplasma.

Poiché il numero di nucleotidi contenuti nel DNA varia da circa 5000 per i virus più semplici ai 670 miliardi di nucleotidi del protozoo *Amoeba dubia*, le combinazioni possibili raggiungono un numero elevatissimo. Il DNA di una cellula umana, costituito da circa 6 miliardi di nucleotidi (quindi circa 3 miliardi bp), può contenere informazioni equivalenti a 600 000 pagine di un libro, con 500 parole ognuna. Questi numeri spiegano come la struttura del DNA possa essere la sede delle istruzioni per l'infinita diversità degli esseri viventi.

Un'altra caratteristica del materiale genetico è la capacità di produrre copie identiche di sé stesso ogni volta che la cellula si divide. Infatti, ogni volta che una cellula affronta la fase S (di sintesi) del proprio ciclo cellulare il DNA si replica in modo tale da permettere alle cellule figlie di ricevere la corretta quantità di materiale genetico. Questo processo di replicazione deve essere estremamente rapido, per consentire una veloce divisione delle cellule, ma allo stesso tempo deve essere preciso, per evitare errori che potrebbero portare anche a gravi conseguenze.

Già Watson e Crick nel loro primo articolo sulla struttura molecolare del DNA fecero riferimento al fatto che il loro modello a doppia elica ben si prestasse a un particolare meccanismo di replicazione.

Figura 10
Il modello del DNA in ferro e stagno, costruito da Watson e Crick.



© A. Barrington Brown, Gonville & Caius College/SPL/AGF

FACCIAMO IL PUNTO

Scegli il completamento corretto.

1. Secondo le regole di Chargaff

- A la composizione percentuale delle basi azotate del DNA è sempre la stessa.
- B la composizione percentuale delle basi può variare in base alle condizioni ambientali in cui si trova l'organismo.
- C la quantità totale delle purine è sempre identica a quella delle pirimidine.
- D nella molecola ci sono due catene polinucleotidiche affiancate.

2. Il legame fosfodiesterico unisce

- A le basi azotate.
- B i nucleotidi complementari.
- C gli zuccheri pentosi del DNA direttamente tra di loro.
- D gli zuccheri e i gruppi fosfato.

3. Completa le frasi.

- a) L'adenina si appaia alla timina mediante legami a idrogeno, e la guanina

con la citosina, formando legami a idrogeno.

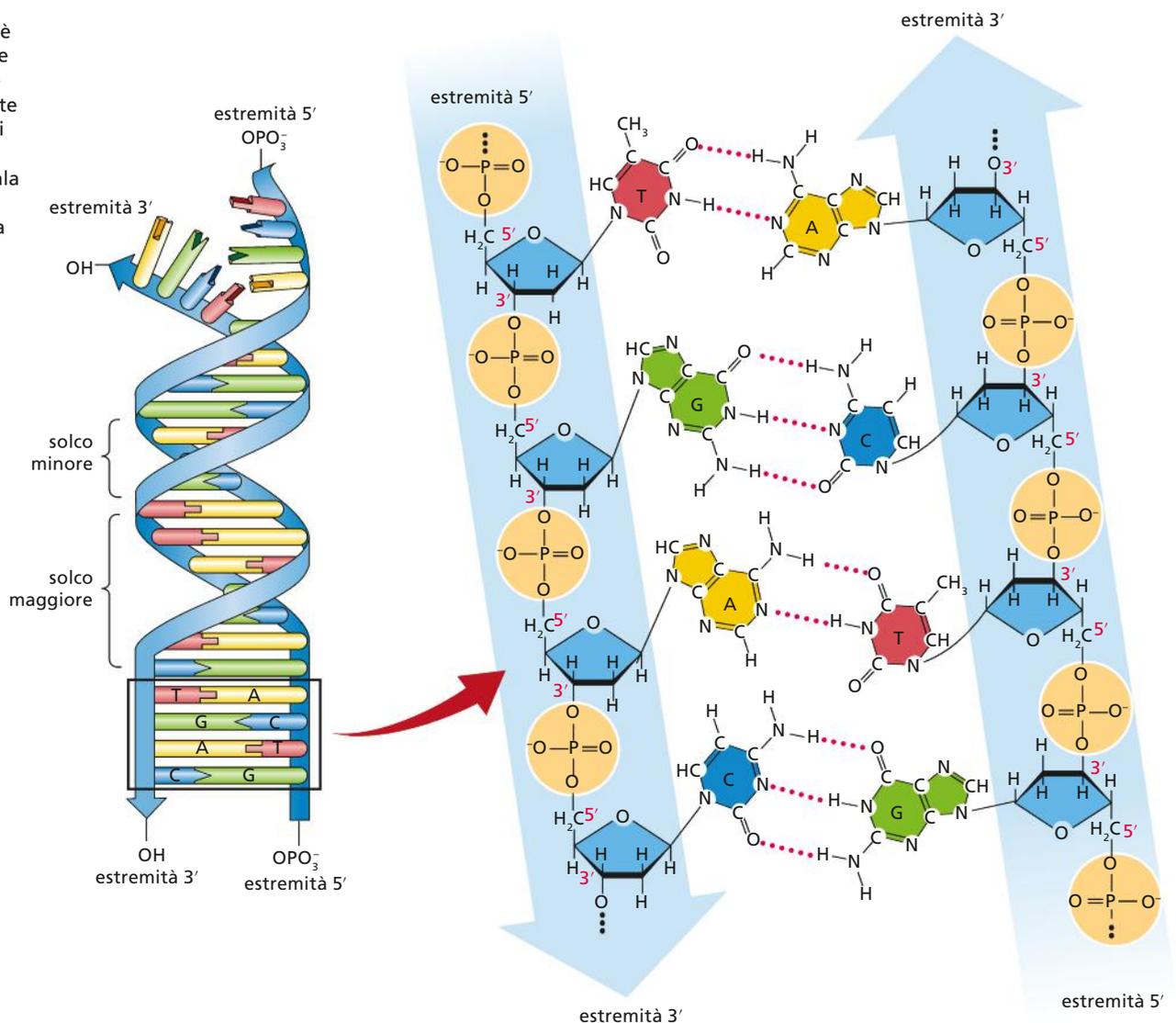
- b) I due filamenti di DNA sono perché uno è orientato in direzione 5'→3', l'altro in direzione 3'→5'.
- c) Quando i due filamenti si avvolgono a formare la doppia elica, tra i gruppi fosfato restano esposti due di diversa ampiezza.

4. Vero o falso?

- a) La combinazione di due purine misurerebbe più di 2 nanometri, mentre due pirimidine appaiate occuperebbero meno di 2 nanometri. V F
- b) La base azotata di ogni nucleotide si lega all'atomo di azoto dello zucchero pentoso. V F
- c) Le immagini ai raggi X ottenute da Rosalind Franklin dimostrarono che il DNA ha larghezza costante. V F
- d) Dato un filamento di DNA è sempre noto anche il suo filamento complementare. V F

Figura 11

L'appaiamento delle basi è complementare. Le purine (A e G) si appaiano con le pirimidine (rispettivamente T e C) a formare coppie di basi di uguale lunghezza, simili ai gradini di una scala a pioli. La scala si avvolge su se stessa a formare una struttura a doppia elica.



3. LA REPLICAZIONE DEL DNA

TI RICORDI?

Il **ciclo cellulare** è l'insieme degli eventi compresi tra la formazione di una cellula e la sua divisione in due cellule figlie. Il ciclo è suddiviso in due fasi, a loro volta divise in sottofasi: l'interfase comprende le fasi G₁, S e G₂, mentre la fase mitotica è divisa in mitosi e citodieresi.

LA REPLICAZIONE DEL DNA È SEMICONSERVATIVA

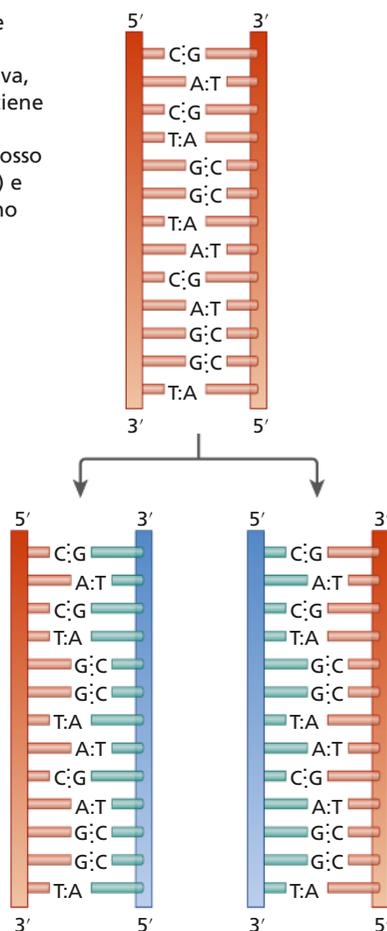
Non è sfuggito alla nostra attenzione il fatto che lo specifico appaiamento delle basi da noi ipotizzato, suggerisce un possibile meccanismo di replicazione per il materiale genetico.

Queste righe facevano parte dell'articolo di Watson e Crick del 1953. Negli anni successivi, la ricerca si concentrò proprio nello scoprire il meccanismo esatto grazie al quale si replica il materiale genetico.

L'articolo di Watson e Crick suggeriva una modalità di replicazione del DNA di tipo **semiconservativo** (vedi Scheda 2). Ricerche successive dimostrarono che l'ipotesi era corretta: ogni filamento della molecola parentale funziona da *stampo* per un nuovo filamento, cosicché le due molecole di DNA neoformate contengono un filamento «vecchio» e uno di nuova sintesi (Figura 12).

Figura 12

La replicazione del DNA è semiconservativa, per cui si mantiene un filamento originario (in rosso nell'immagine) e se ne forma uno nuovo (in blu).



La replicazione del DNA richiede, oltre al DNA da replicare, la presenza di altre molecole, tra cui enzimi e nucleotidi. La formazione dei nuovi filamenti avviene grazie al principio della *complementarietà tra le basi*: se sul filamento stampo è presente un nucleotide con la base azotata T, soltanto la base A potrà prendere il posto corrispondente sul nuovo filamento; allo stesso modo, G si appaierà soltanto con C e viceversa. Grazie a questo principio di corrispondenza univoca, alla fine del processo si ottengono due copie identiche tra loro e identiche alla molecola originaria.

Negli eucarioti, la replicazione del DNA si verifica durante la **fase S** del ciclo cellulare e, nella maggior parte delle cellule eucariotiche, è seguita dalla **mitosi**; nelle cellule sessuali, invece, è seguita dalla **meiosi**. Il processo avviene molto velocemente: nei mammiferi, per esempio, vengono legati circa 50 nucleotidi al secondo, mentre nei procarioti si arriva anche a 1000 nucleotidi al secondo. In questo modo, il batterio *Escherichia coli* può replicare i suoi 4,7 milioni di basi in soli 20-40 minuti. Negli eucarioti, la velocità di replicazione è decisamente minore, per esempio, nelle cellule della rana *Xenopus laevis* è di 10 nucleotidi al secondo, mentre nell'essere umano e nel topo domestico è di circa 50 basi ogni secondo.

LA REPLICAZIONE DEL DNA È BIDIREZIONALE

La replicazione del DNA, secondo cui ogni filamento della doppia elica serve da stampo per la costruzione di un nuovo filamento, richiede un gran numero di proteine ed enzimi.

La replicazione inizia quando un complesso proteico, chiamato **complesso di replicazione**, si lega al DNA in corrispondenza di una specifica sequenza di basi, che fa da **origine di replicazione** e viene detta **ori**. A partire dall'origine di replicazione, il DNA si replica in entrambe le direzioni, formando la **bolla di replicazione** (Figura 13). In corrispondenza di entrambe le estremità della bolla, dove i vecchi filamenti vengono separati e stanno per essere sintetizzati i nuovi filamenti complementari, la molecola forma una struttura a Y, nota come **forcella di replicazione**.

La replicazione avviene in due direzioni opposte rispetto al punto di origine, perciò è definita **bidirezionale**.

La replicazione, quindi, si verifica a mano a mano che la bolla si propaga nelle due direzioni fino a incontrare una bolla adiacente; nel momento in cui tutte le bolle si fondono tra loro, l'intero cromosoma sarà stato replicato.

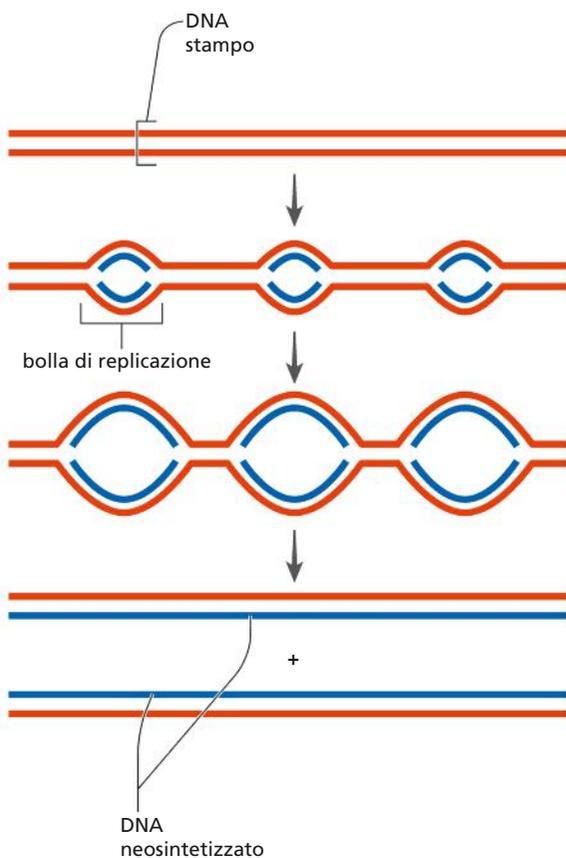
Quando termina la sintesi dei nuovi filamenti di DNA, le due catene si separano, formando due nuove doppie eliche, ciascuna costituita da un filamento originario e un filamento nuovo.

In passato, si riteneva che il complesso di replicazione si muovesse lungo la molecola di DNA come una locomotiva sui binari ferroviari; in realtà sembra che sia il DNA a scorrere attraverso il complesso di replicazione che, invece, rimane ancorato a strutture nucleari e quindi resta fermo.

Nei cromosomi circolari dei procarioti, in genere, è sufficiente una sola origine della replicazione, mentre nelle cellule eucariotiche, che possiedono una quantità maggiore di DNA, su ogni cromosoma lineare sono presenti numerose *ori*. In questo modo, gli eucarioti possono aumentare la velocità di replicazione, poichè la molecola sarà completamente replicata soltanto quando tutte le bolle di replicazione che si allargano in modo bidirezionale si incontrano.

Figura 13

In corrispondenza delle *ori*, il complesso di replicazione apre le bolle di replicazione e sintetizza i filamenti, che poi si uniscono a formare nuove molecole di DNA.



LA REPLICAZIONE DEL DNA È CATALIZZATA DA NUMEROSI ENZIMI

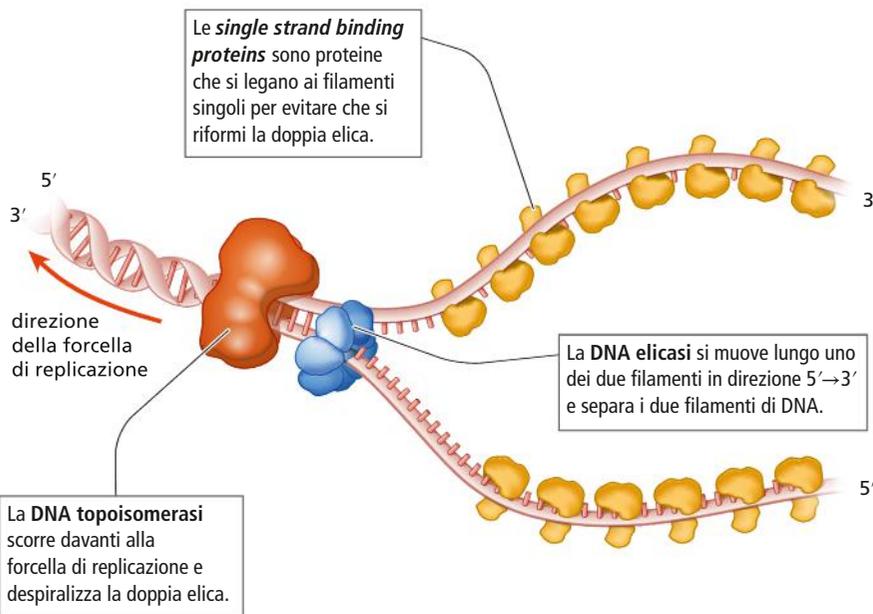
Il complesso di replicazione contiene numerosi enzimi che intervengono in tutte le fasi del processo (Figura 14 e Video 1); in *E. coli* sono solo 17, ma nei genomi eucariotici sono molti di più.

La replicazione del DNA si svolge in due fasi.

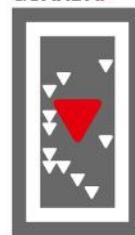
1. Nella prima fase, l'enzima **topoisomerasi** despiralizza la doppia elica (il DNA è compattato così da occupare il minor spazio possibile nel nucleo) e l'enzima **elicasi** rompe i legami a idrogeno tra le coppie di basi appaiate; in questo modo, i due filamenti si allontanano e ognuno può funzionare da stampo per la sintesi dei nuovi filamenti. Non appena l'elicasi apre la doppia elica, però, i filamenti devono essere mantenuti separati, altrimenti tenderebbero spontaneamente ad appaiarsi di nuovo. A svolgere questo compito sono le *single strand binding proteins* (SSBP), proteine che si legano ai filamenti singoli per tenerli divisi.
2. Nella seconda fase, avviene la sintesi vera e propria dei nuovi filamenti, grazie all'azione delle **DNA polimerasi**, una serie di enzimi che aggiunge i nucleotidi esclusivamente all'estremità 3' dei filamenti in formazione, saldandoli mediante legami fosfodiesterici. Si tratta di DNA polimerasi DNA dipendenti, ovvero di enzimi capaci di sintetizzare una molecola di DNA partendo da uno stampo costituito sempre da DNA.

Figura 14

Le proteine coinvolte nelle prime fasi della replicazione sono la topoisomerasi, l'elicasi e le SSBP.



GUARDA!



Video 1
La replicazione del DNA / DNA replication

I DUE FILAMENTI DI DNA SI REPLICANO CON VELOCITÀ E MODALITÀ DIVERSE

Le **DNA polimerasi** sono enzimi molto grandi, con una forma che ricorda una mano semiaperta (**Figura 15**): «nel palmo» si trova il sito attivo dell'enzima che avvicina i nucleotidi allo stampo, mentre «le dita» riconoscono la forma delle diverse basi azotate, permettendo alla polimerasi di legare, di volta in volta, un nucleotide complementare a quello presente sul filamento stampo. Nei batteri come *E. coli* esistono cinque tipi di DNA polimerasi, coinvolte in diversi processi cellulari, tra cui la replicazione e la riparazione del DNA.

Tutte le DNA polimerasi sono capaci di allungare una catena polinucleotidica preesistente aggiungendo un nucleotide alla volta solamente all'estremità 3'. Inoltre, le DNA polimerasi non possono iniziare dal nulla la sintesi di una nuova catena, poiché hanno bisogno di un **innesco** (o *primer*) che sia complementare al DNA stampo e che abbia un'estremità 3' libera alla quale aggiungere i nucleotidi (**Figura 16**). Il *primer* è una **breve sequenza di RNA**, sintetizzata dall'enzima **RNA primasi** (una RNA polimerasi DNA dipendente), che al termine della replicazione deve essere rimossa e sostituita da un tratto corrispondente di DNA.

Il fatto che le DNA polimerasi possano procedere solamente nella direzione 5'→3', aggiungendo nucleotidi all'estremità 3' della catena, genera un problema. Infatti, i due filamenti di DNA sono antiparalleli, quindi, l'allungamento deve avvenire in modo diverso nelle due direzioni (**Figura 17**).

- Il filamento neosintetizzato 5'→3' è detto *veloce* perché può allungarsi in maniera continua via via che la forcella di replicazione si apre; tale filamento, che quindi ha l'estremità 3' libera, è quello complementare al filamento stampo (3'→5');
- l'altro filamento neosintetizzato, quello in direzione 3'→5', è detto *lento*, perché il complesso di replicazione procede nello stesso senso in cui scorre il filamento stampo, dunque a ritroso rispetto all'apertura della forcella. Di conseguenza, la sintesi del nuovo filamento di DNA avviene in modo discontinuo e a più riprese con la formazione di tratti relativamente corti di DNA; questi segmenti sono detti **frammenti di Okazaki** e sono lunghi 100-200 nucleotidi negli eucarioti e 1000-2000 nucleotidi nei batteri.

Figura 16

La DNA polimerasi ha bisogno di un *primer* formato da pochi nucleotidi di RNA per dare inizio alla sintesi di DNA, inoltre può aggiungere nucleotidi solo in direzione 5'→3'.

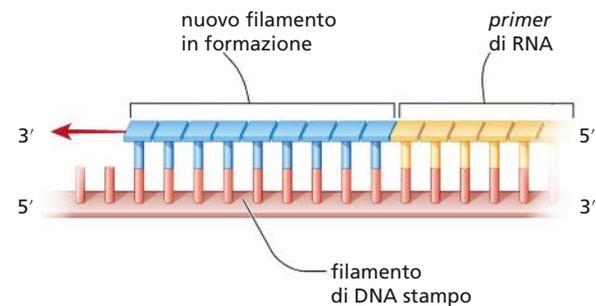
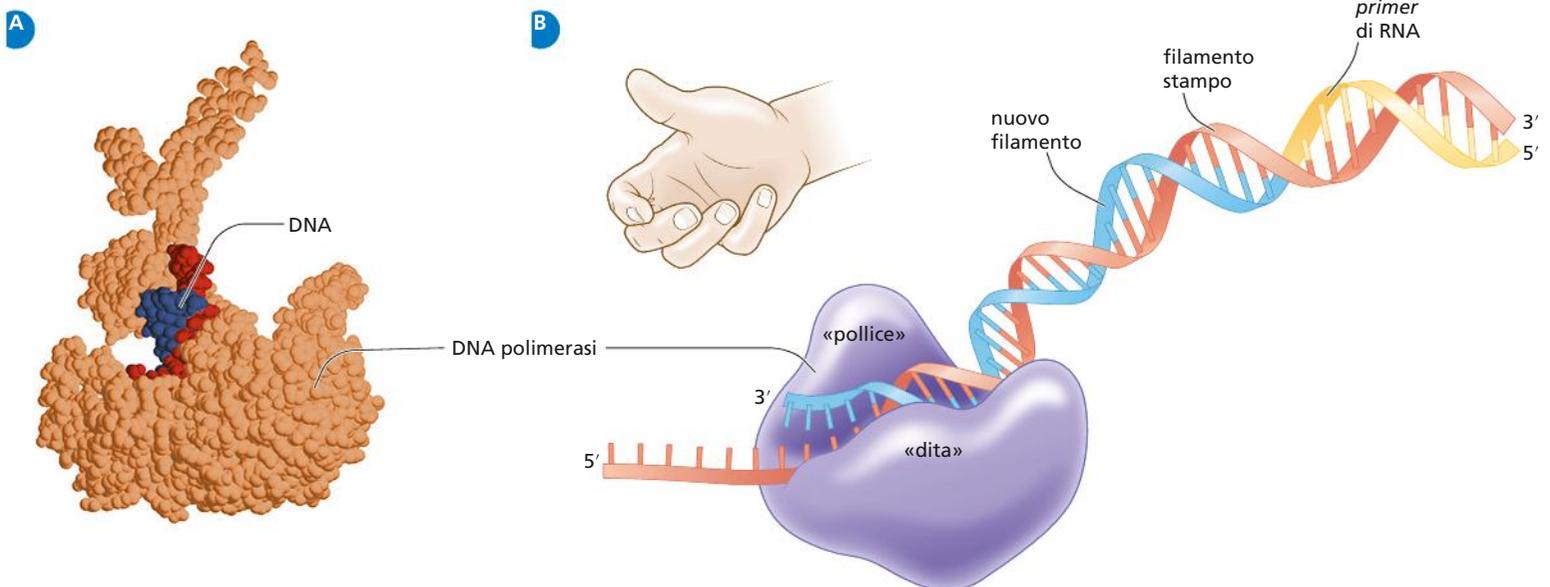


Figura 15

L'enzima DNA polimerasi (in arancione) è molto più grande della molecola di DNA (rossa e blu) (**A**). La DNA polimerasi ha una struttura a forma di mano, le cui «dita» si avvolgono attorno al DNA e riconoscono la diversa forma delle quattro basi azotate (**B**).



Sul filamento veloce, il *primer* di RNA è unico e si trova all'inizio della catena da replicare (Figura 18A); sul filamento lento, invece, i *primer* sono molteplici e si trovano di volta in volta in prossimità della forcella di replicazione (Figura 18B e C). Questo è dovuto al fatto che la DNA polimerasi non può catalizzare la sintesi dei frammenti di Okazaki se non trova un punto di attacco sul filamento da replicare; a mano a mano che la doppia elica di DNA stampo si svolge, quindi,

la DNA polimerasi sintetizza i frammenti muovendosi sul filamento stampo in direzione 3'→5' e producendo un nuovo filamento che avrà direzione 5'→3', opposta a quella in cui si muove la forcella. Dopo essere stati utilizzati, i *primer* vengono eliminati dall'RNA e sostituiti da DNA sintetizzato da una specifica DNA polimerasi; i vari frammenti sono poi uniti dall'enzima DNA ligasi, che riforma i legami covalenti tra zucchero e fosfato in modo da generare un filamento unico (Figura 18D).

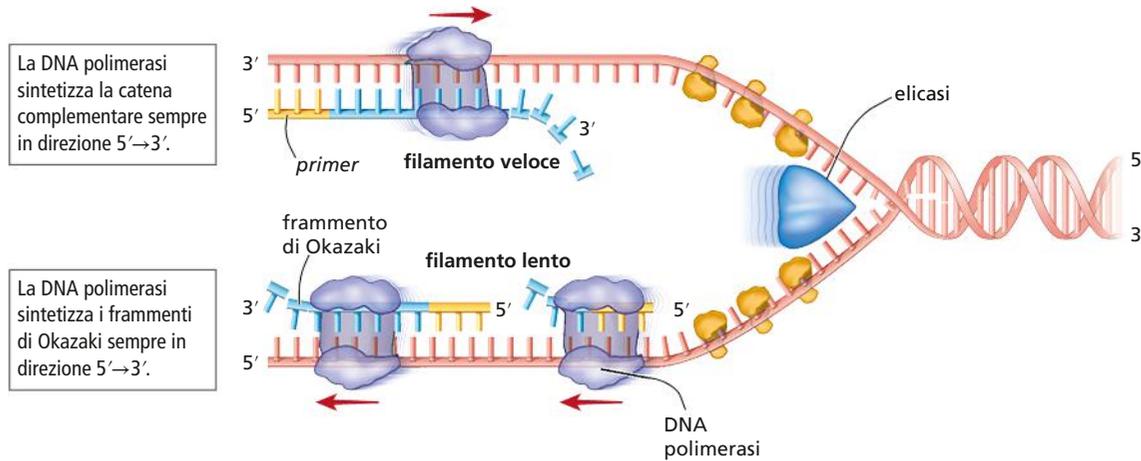
A colpo d'occhio

REPLICAZIONE



Figura 17

La replicazione avviene a velocità diverse sui due filamenti stampo.

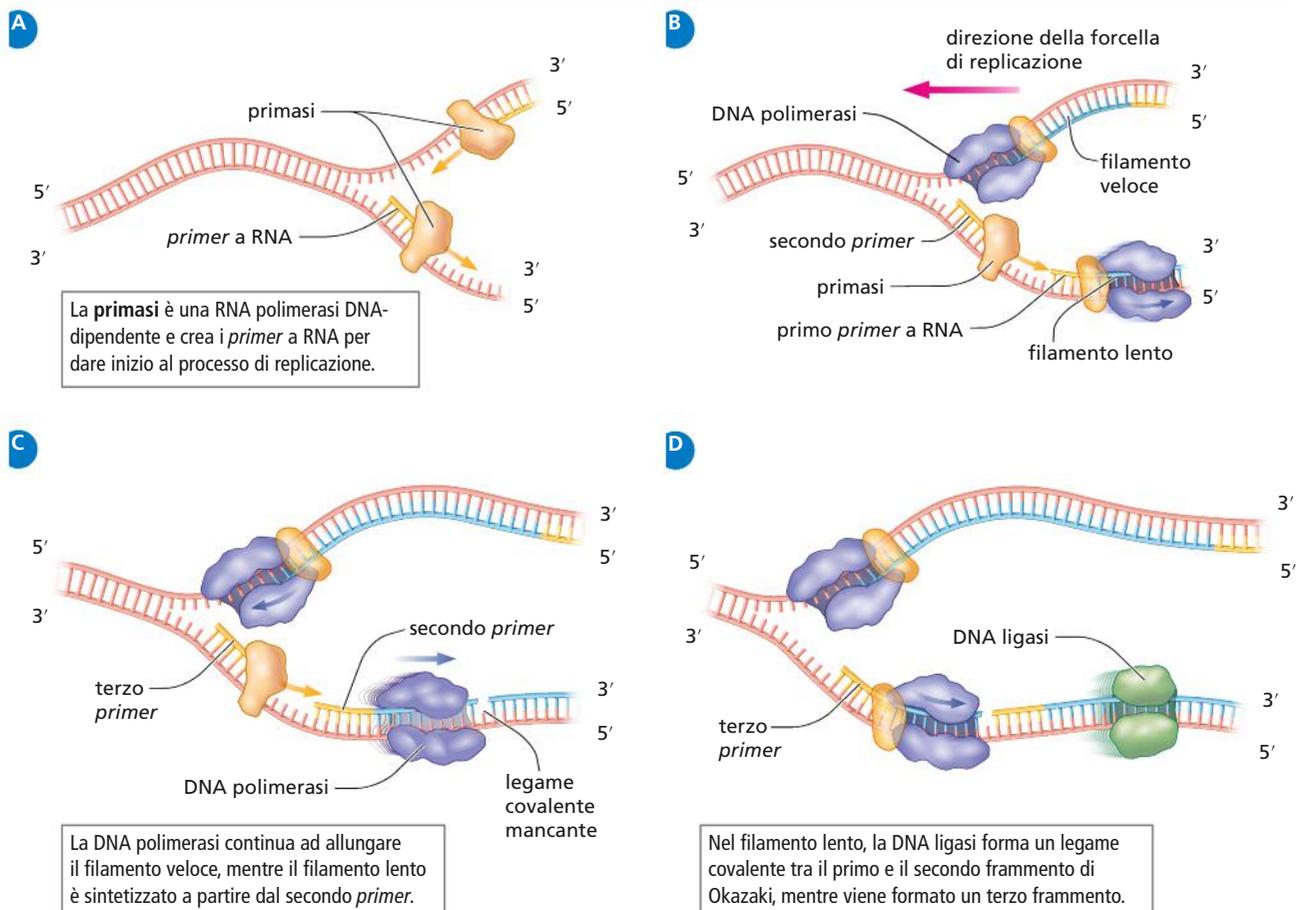


La DNA polimerasi sintetizza la catena complementare sempre in direzione 5'→3'.

La DNA polimerasi sintetizza i frammenti di Okazaki sempre in direzione 5'→3'.

Figura 18

Per il filamento veloce, la replicazione avviene con un solo *primer*, mentre per il filamento lento occorre la presenza di più *primer* e della DNA ligasi, che unirà i frammenti di Okazaki una volta che i *primer* di RNA vengono sostituiti da DNA.



La primasi è una RNA polimerasi DNA-dipendente e crea i primer a RNA per dare inizio al processo di replicazione.

La DNA polimerasi continua ad allungare il filamento veloce, mentre il filamento lento è sintetizzato a partire dal secondo primer.

Nel filamento lento, la DNA ligasi forma un legame covalente tra il primo e il secondo frammento di Okazaki, mentre viene formato un terzo frammento.

A colpo d'occhio

AGENTI MUTAGENI

CHIMICI

ACIDO NITROSO

BENZOPIRENE

FISICI

RAGGI X

RAGGI UV

IL PROCESSO DI REPLICAZIONE È CONTROLLATO DALLA SELEZIONE DELLE BASI E DAL *PROOFREADING*

La replicazione del DNA avviene con un grado di precisione molto elevato grazie alla presenza di diversi sistemi di controllo, che correggono eventuali errori di appaiamento durante la sintesi del nuovo filamento di DNA.

1. Il primo meccanismo di controllo è la **selezione delle basi**: le DNA polimerasi sono in grado di formare il legame fosfodiesterico tra due nucleotidi solo se questi sono già appaiati correttamente ai loro nucleotidi complementari del filamento stampo. La distinzione tra nucleotidi corretti ed errati avviene non solamente in base ai legami a idrogeno che determinano l'appaiamento tra basi complementari, ma anche in relazione alla geometria delle coppie di basi A=T e G≡C; infatti, solo le coppie di basi che presentano questa geometria riescono a entrare nel sito attivo dell'enzima. Un nucleotide sbagliato potrebbe essere in grado di formare legami a idrogeno con un'altra base presente nello stampo, ma non entrerebbe nel sito attivo della DNA polimerasi; di conseguenza, la maggior parte dei nucleotidi errati è scartata prima ancora che si formi il legame fosfodiesterico.
2. Il secondo meccanismo di controllo è basato sulla capacità delle DNA polimerasi di verificare la correttezza di ogni nucleotide dopo che questo è stato aggiunto durante la sintesi del nuovo filamento. Quando viene erroneamente inserito un nucleotide sbagliato, l'enzima lo rimuove e incorpora al suo posto il nucleotide giusto: questo processo è chiamato *proofreading* oppure **correzione di bozze** (Figura 19).

TI RICORDI?

Le molecole di substrato si legano all'enzima nel **sito attivo**, dove avviene la reazione; il legame di un substrato con il sito attivo di un enzima produce il complesso enzima-substrato, che dà origine al prodotto finale e libera l'enzima.

Grazie all'azione combinata dei processi di selezione delle basi e *proofreading*, la DNA polimerasi eucariotica commette un errore solo una volta ogni 10^6 - 10^8 coppie di basi aggiunte.

LE MUTAZIONI POSSONO ESSERE SPONTANEE OPPURE INDOTTE DA AGENTI ESTERNI

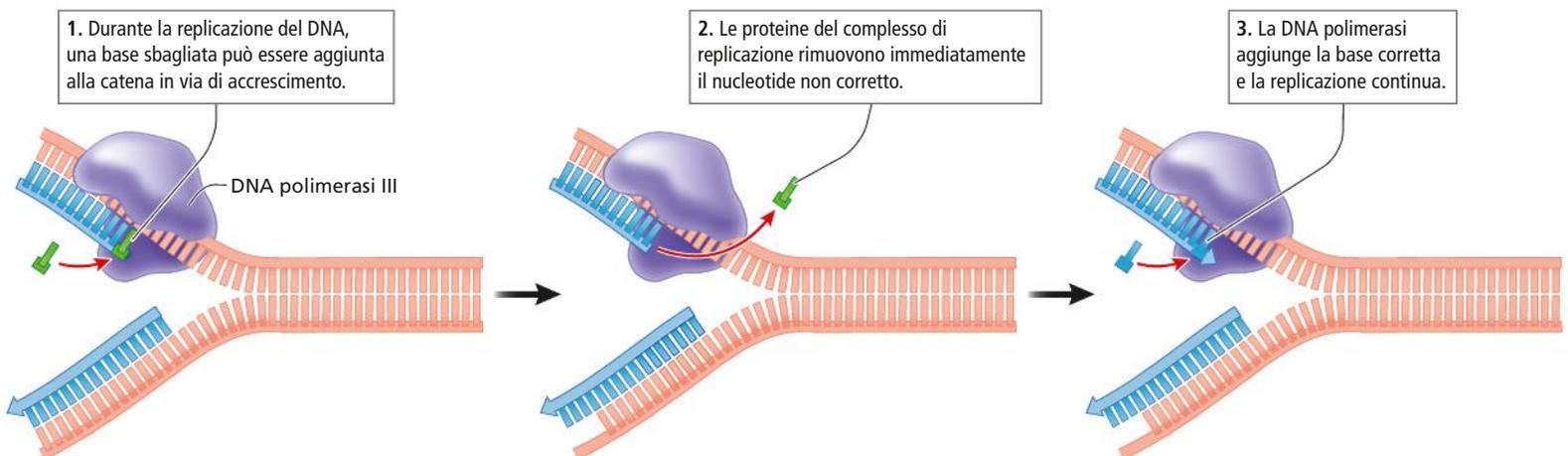
Preservare l'integrità dell'informazione contenuta nel DNA è essenziale per le cellule, tuttavia, la sequenza nucleotidica può essere modificata in seguito a cause *spontanee* oppure *indotte* (determinate da fattori ambientali). In generale, si definiscono **mutazioni** i cambiamenti permanenti nella sequenza di basi del DNA che possono essere trasmessi da una generazione alla successiva.

Le **mutazioni spontanee** insorgono, per esempio, in seguito a errori nella replicazione che sfuggono ai processi di controllo; le **mutazioni indotte**, invece, sono dovute ad *agenti mutageni* chimici o fisici. Tra i mutageni chimici ci sono, per esempio, l'acido nitroso (HNO_2) che converte la citosina in uracile, e il benzopirene presente nel fumo di tabacco, che modifica chimicamente la guanina e le impedisce di appaiarsi con la citosina. Esempi di mutageni fisici sono: i raggi X, capaci di produrre radicali liberi che alterano le basi nucleotidiche e danneggiano lo scheletro zucchero-fosfato, e i raggi ultravioletti che creano pericolosi legami tra timine adiacenti, generando i cosiddetti *dimeri di timina*. Questo ultimo tipo di mutazioni provoca gravi distorsioni nella struttura a doppia elica, che non riesce più a replicarsi e a svolgere le proprie funzioni.

Anche se le ricombinazioni genetiche prodotte dalla riproduzione sessuata e dalle mutazioni sono il materiale sul quale opera la selezione naturale, determinando i fenomeni evolutivi, nell'immediato gli effetti delle mutazioni hanno prevalente-

Figura 19

Le proteine del complesso di replicazione sono coinvolte nei meccanismi di controllo del DNA come il *proofreading*.



mente conseguenze negative, perché compromettono la sintesi proteica o interferiscono con il ciclo cellulare. Nei mammiferi, per esempio, esiste una forte correlazione tra l'accumulo di mutazioni e l'insorgenza del cancro. Per questo motivo, nelle cellule sono attivi diversi **sistemi di riparazione** che si affiancano ai meccanismi di controllo attivi durante la replicazione. La riparazione del DNA è possibile perché la doppia elica è formata da due filamenti complementari: il DNA danneggiato su un filamento può essere rimosso e sostituito utilizzando come stampo la catena complementare.

LA RIPARAZIONE DEL DNA AVVIENE GRAZIE AL SISTEMA *MISMATCH REPAIR* E ALL'ESCISSIONE

La riparazione degli errori di appaiamento tra le basi avviene grazie al **sistema *mismatch repair*** (Figura 20A), subito dopo che il DNA è stato replicato. Nei batteri, questo complesso è costituito da dodici proteine tra cui una DNA polimerasi e una DNA ligasi. Tale sistema ha il compito di trovare gli appaiamenti errati che sono sfuggiti al meccanismo di *proofreading*, quindi, identificare quale filamento è da riparare e sostituire il nucleotide sbagliato grazie all'azione della DNA polimerasi e della DNA ligasi.

Per far questo, il sistema deve poter distinguere tra il filamento stampo (che è la copia corretta) e il filamento neosintetizzato (che contiene il nucleotide errato). La distinzione è possibile perché, al termine della sintesi del nuovo filamento, la cellula «etichetta» il DNA aggiungendo dei gruppi metilici

($-CH_3$); appena dopo la replicazione, il filamento neoformato non è ancora stato metilato ed è, quindi, ben distinguibile da parte del sistema di riparazione dallo stampo metilato.

Le proteine del **sistema di riparazione per escissione** (Figura 20B) agiscono, invece, sulle basi anomale o sui dimeri di timina che si formano in seguito all'esposizione a sostanze chimiche dannose oppure a mutageni fisici. Il sistema è capace di rompere i legami fosfodiesterici ai due lati della mutazione e rilasciare i nucleotidi escissi; in seguito, la DNA polimerasi sintetizza il frammento mancante, che viene saldato al resto della catena dalla DNA ligasi.

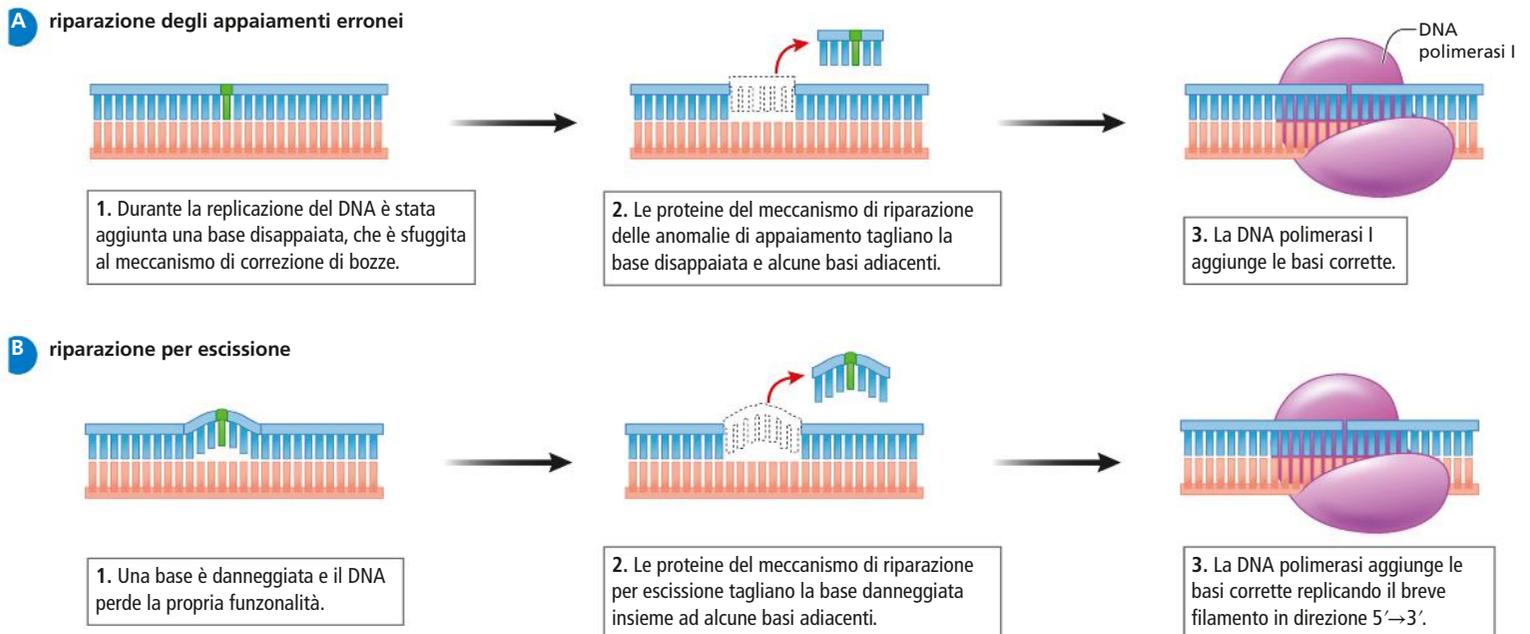
I TELOMERI PROTEGGONO LE ESTREMITÀ DEI CROMOSOMI EUCARIOTICI

Nei batteri, la replicazione del DNA si arresta quando le due forcelle di replicazione si incontrano e si fondono; nei cromosomi lineari eucariotici, invece, la situazione è diversa.

Come abbiamo visto, nelle cellule eucariotiche la replicazione del filamento lento avviene per aggiunta dei frammenti di Okazaki ai *primer* di RNA. Quando però il *primer* terminale è rimosso dall'estremità del cromosoma, non può più essere sostituito da DNA, perché non esiste un'ulteriore estremità 3' da prolungare. Di conseguenza, ciascuna estremità di ogni nuovo cromosoma presenta un breve tratto di DNA a filamento singolo. Tale situazione anomala attiva gli enzimi che rimuovono il tratto a singolo filamento insieme a una piccola porzione del DNA a doppio filamento adiacente.

Figura 20

Le proteine del complesso di replicazione agiscono anche nei meccanismi di riparazione del DNA, tra cui il *mismatch repair* (A) e il sistema per escissione (B).



CURIOSITÀ

Comprendere meglio il ruolo della **telomerasi** può sia aiutare a capire i meccanismi dell'invecchiamento (o senescenza) cellulare sia permettere di studiare nuove terapie contro il cancro. La scoperta dell'enzima telomerasi è valsa, nel 2009, il premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina a Elizabeth Blackburn, Carol Greider e Jack Szostak.

Come conseguenza, a ogni divisione cellulare il cromosoma eucariotico diventa leggermente più corto (**Figura 21**).

Un altro problema delle estremità cromosomiche è evitare che i sistemi di riparazione del DNA le congiungano, per errore, alle estremità di altri cromosomi. Infatti, quando il DNA è danneggiato da agenti esterni come le radiazioni, presenta rotture che vengono riparate dall'azione combinata della DNA polimerasi e della DNA ligasi. Gli stessi enzimi potrebbero scambiare per rotture le normali estremità cromosomiche, quindi unire due cromosomi diversi compromettendo così la struttura del corredo genomico.

Per impedire la saldatura dei cromosomi ed evitare che il loro accorciamento a ogni replicazione comporti una perdita di informazioni genetiche, le estremità dei cromosomi eucariotici presentano lunghi tratti di DNA costituiti da sequenze ripetute e chiamati **telomeri**. Nei vertebrati, i telomeri sono ripetizioni della sequenza **TTAGGG**, che nell'essere umano è presente anche 2500 volte. Speciali

proteine si legano a queste ripetizioni proteggendo la loro integrità, un po' come fanno le estremità plastificate dei lacci da scarpe che facilitano l'inserimento degli stessi nell'occhiello e li preservano nel tempo.

A ogni divisione cellulare, un cromosoma può perdere da 50 a 200 coppie di basi di DNA telomerico; quindi, dopo circa 20-30 divisioni, le estremità diventano troppo corte per mantenere la loro funzione protettiva, di conseguenza la cellula va incontro ad *apoptosi* (morte cellulare) e muore.

La perdita dei telomeri è uno dei motivi per cui le cellule non durano per tutta la vita dell'organismo. Tuttavia, le cellule che si dividono di continuo, come le cellule staminali, sono in grado di mantenere intatto il proprio DNA telomerico; in queste cellule, infatti, esiste un enzima, la **telomerasi**, capace di rigenerare i telomeri quando diventano troppo corti, utilizzando come stampo una sequenza di RNA contenuta all'interno dell'enzima stesso (**Figura 22**).

I TELOMERI SONO IMPLICATI NELL'INSORGENZA DEI TUMORI

Come abbiamo appena visto, a causa del continuo accorciamento dei telomeri, la vita della cellula non è eterna. Le cellule tumorali, però, sono in grado di acquisire una sorta di immortalità e proliferare senza controllo, danneggiando così l'intero organismo. Infatti, se per le cellule sane esiste un limite alla proliferazione, chiamato *limite di Hayflick* (alla base dell'invecchiamento dell'organismo), nel 90% delle cellule tumorali la telomerasi rimane attiva e continua a rinnovare costantemente i telomeri.

Grazie ai marcatori fluorescenti, è stato osservato come la telomerasi esegua una sorta di scansione delle estremità dei cromosomi per valutarne la lunghezza: quando i telomeri sono troppo corti, aggiunge nuove sequenze di basi azotate all'estremità cromosomica, inducendo così la cellula a continuare a dividersi. Poiché gran parte delle cellule non possiede questa capacità, la telomerasi è un potenziale bersaglio per i farmaci antitumorali.

Figura 21

La rimozione del *primer* di RNA dei filamenti di nuova sintesi lascia non replicate le regioni all'estremità dei cromosomi.

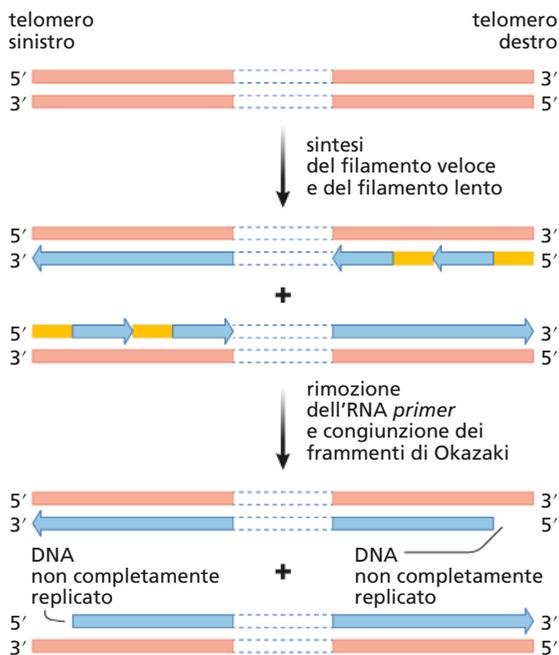


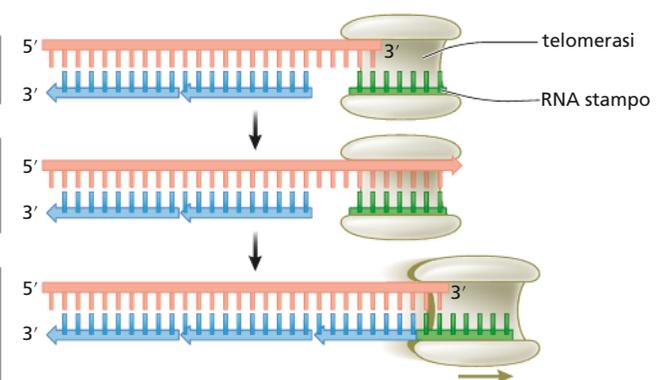
Figura 22

Nelle cellule staminali, la telomerasi si lega all'estremità 3' del filamento stampo estendendolo grazie a una sequenza di RNA integrata nell'enzima stesso.

1. Nelle cellule staminali l'enzima telomerasi utilizza uno stampo di RNA per estendere il telomero.

2. Questa breve sequenza a RNA fa da stampo perché la DNA polimerasi possa sintetizzare la parte di DNA mancante sul filamento lento e allungare il telomero.

3. La telomerasi si sposta verso la nuova estremità terminale e la DNA polimerasi riempie lo spazio vuoto. Questo processo può essere ripetuto molte volte per allungare il telomero.



FACCIAMO IL PUNTO

Scegli il completamento corretto.

1. Il primer è

- A un complesso di proteine che avvia la replicazione del DNA.
- B una breve sequenza di DNA a cui si aggancia la DNA polimerasi.
- C un breve innesco di RNA sintetizzato dall'enzima primasi.
- D l'enzima che apre la doppia elica del DNA permettendo la replicazione di entrambi i filamenti.

2. I frammenti di Okazaki

- A si formano in entrambi i filamenti che sono sintetizzati durante il processo di replicazione del DNA.
- B sono sequenze di DNA, ciascuna separata da primer di RNA.
- C sono brevi tratti di DNA uniti dall'enzima DNA elicasi.
- D si trovano solamente sul filamento veloce e sono uniti da un enzima.

3. Completa le frasi.

- a) La distinzione tra nucleotidi corretti ed errati avviene anche in relazione alla delle coppie di basi A=T e
- b) I telomeri sono ripetizioni della sequenza, che nell'essere umano è presente anche volte.
- c) La replicazione del DNA è un processo, quindi ogni bolla di replicazione è formata da forcelle che procedono in direzioni opposte.

4. Vero o falso?

- a) L'enzima DNA polimerasi procede solo aggiungendo nucleotidi all'estremità 5'. V F
- b) Il sistema di riparazione per escissione agisce durante la replicazione del DNA. V F
- c) Le *single strand binding proteins* si legano ai singoli filamenti per tenerli stabilmente uniti. V F
- d) Le mutazioni sono cambiamenti permanenti del DNA che possono essere trasmessi alle generazioni successive. V F

2

Storia della scienza

L'ESPERIMENTO DI MESELSON E STAHL

Alla fine degli anni Cinquanta del Novecento, era ormai accettato il modello a doppia elica del DNA proposto da Watson e Crick. Nel loro articolo del 1953, i due scienziati proponevano anche come ognuna delle due eliche contenesse l'informazione necessaria per costruire quella complementare, suggerendo un sistema di **replicazione semiconservativa**, secondo cui nelle nuove eliche uno dei due filamenti fosse quello originario, mentre l'altro fosse di nuova sintesi.

Tuttavia, oltre al modello semiconservativo erano state avanzate altre due ipotesi sul possibile meccanismo di replicazione: la **replicazione conservativa** e quella **dispersiva**.

Secondo il modello della **replicazione conservativa**, al termine della replicazione si ottengono due molecole: una contenente entrambi i filamenti originari e l'altra contenente due filamenti nuovi.

Secondo il modello della **replicazione dispersiva**, le eliche delle due molecole di DNA ottenute a ogni replicazione dovevano contenere tratti di DNA originario mescolati casualmente a tratti di DNA di nuova sintesi.

Per dimostrare quale fosse il meccanismo corretto, nel 1958, Matthew Meselson e Franklin Stahl svilupparono un ingegnoso esperimento (Figura). I ricercatori fecero crescere colonie di *Escherichia coli* in un terreno di coltura ricco dell'isotopo pesante dell'azoto (^{15}N). In questo modo, i batteri inglobavano ^{15}N nelle loro basi azotate e,

quindi, nelle molecole di DNA. Alcuni di questi batteri furono prelevati, lisati e venne estratto il loro DNA, che fu pesato attraverso una tecnica di centrifugazione che tiene conto della densità. Alcuni batteri furono poi trasferiti dal terreno di coltura contenente ^{15}N in un nuovo terreno, in cui era presente l'isotopo ^{14}N .

Dopo circa venti minuti, che corrispondono al tempo medio per la nascita di una nuova generazione di batteri (quindi, al tempo che occorre per la replicazione del DNA), alcuni batteri vennero prelevati, lisati e fu estratto il loro DNA. L'analisi per centrifugazione di questo nuovo DNA mostrava una sola banda posta più in alto rispetto a quella di partenza, a indicare che il nuovo DNA era più leggero. Dopo altri 20

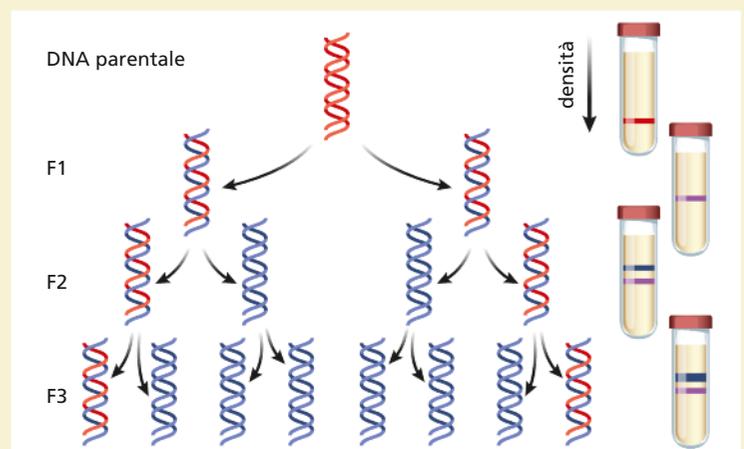
minuti, venne ripetuto l'esame e i ricercatori osservarono due bande: una in posizione superiore e un'altra nella stessa posizione di quella dell'esperimento precedente.

L'analisi di questi risultati sperimentali dimostra che le tre bande corrispondono rispettivamente a:

- un DNA più pesante, in cui erano presenti due filamenti contenenti ^{15}N ;
- un DNA con peso intermedio, in cui era presente un filamento con ^{15}N e uno con ^{14}N ;
- un DNA più leggero, in cui erano presenti due filamenti entrambi contenenti ^{14}N .

L'unico modello capace di spiegare i pesi delle molecole di DNA ottenuti sperimentalmente era quello della replicazione semiconservativa.

Figura
Schema che rappresenta i dati sperimentali dell'esperimento di Meselson e Stahl.



4. LA STRUTTURA DEI GENOMI

I PROCARIOTI CONTENGONO UN SINGOLO CROMOSOMA CIRCOLARE E PIÙ PLASMIDI

Il patrimonio genetico di una cellula procariotica è costituito da un **cromosoma circolare** formato da una sola molecola di DNA a doppio filamento. Il cromosoma di *E. coli* contiene circa 4,6 milioni di paia di basi e, se completamente svolto, misura circa 1 mm. La cellula batterica che lo contiene, però, è lunga meno di 2 μm , cioè circa 1/500 della lunghezza del cromosoma. Ciò è possibile soltanto perché, all'interno della cellula, il cromosoma è compattato a formare una struttura dall'aspetto irregolare detta **nucleoide**, in cui il DNA è associato a proteine. Il nucleoide non è delimitato da una membrana e si trova, quindi, a contatto diretto con il citoplasma.

Oltre al DNA cromosomico, però, molti batteri possiedono anche altre molecole circolari di DNA chiamate **plasmidi** (Figura 23), che possono contenere da poche decine a qualche centinaio di geni. Come il cromosoma batterico, anche i plasmidi possiedono un punto di origine della replicazione e si possono replicare autonomamente: alcuni plasmidi lo fanno contemporaneamente al cromosoma, mentre altri si replicano con una frequenza maggiore, perciò, in una cellula se ne possono trovare anche 50 copie.

Molti di questi plasmidi possono conferire particolari caratteristiche ai batteri: per esempio, la resistenza agli antibiotici, trasferire informazioni ad altri batteri, degradare gli idrocarburi.

GLI EUCARIOTI HANNO UN GENOMA PIÙ COMPLESSO DEI PROCARIOTI

Per molto tempo i procarioti sono stati gli unici organismi impiegati come modello per lo studio della genetica molecolare; in seguito all'avvento della genetica moderna, però, è stato possibile estendere le ricerche anche agli eucarioti, dalle specie unicellulari fino agli organismi pluricellulari.

Oggi sappiamo che il genoma eucariotico presenta notevoli differenze rispetto a quello dei procarioti.

In primo luogo, il genoma eucariotico è più grande di quello procariotico ed è suddiviso in numerosi **cromosomi lineari**. La maggior parte degli eucarioti è costituita da organismi pluricellulari formati da cellule altamente specializzate a svolgere diverse attività; tale complessità richiede un gran numero di proteine diverse, tutte codificate nei numerosi geni del DNA.

In secondo luogo, nel genoma eucariotico esistono *molte sequenze ripetute*, cioè sequenze di nucleotidi presenti in più di una copia. La maggior parte di tali sequenze non contiene informazioni per la sintesi delle proteine, ma può avere funzioni regolatrici oppure è possibile che svolga funzioni per noi ancora sconosciute. Il genoma eucariotico, infatti, è soggetto a una regolazione genica molto più articolata e fine rispetto a quella che caratterizza il genoma procariotico a causa della maggiore complessità generale degli eucarioti rispetto ai batteri.

Figura 23

Quando la cellula si divide, i plasmidi (in giallo e in verde) possono replicarsi in modo autonomo dal cromosoma batterico (in azzurro).

