

Basi chimiche dell'ereditarietà

All'inizio degli anni Quaranta del secolo scorso non rimanevano più dubbi riguardo all'esistenza dei geni e al fatto che essi fossero localizzati nei cromosomi. Una svolta decisiva nel campo della genetica si ebbe quando gli scienziati cominciarono a comprendere in che modo i cromosomi potessero essere i portatori di una quantità enorme di informazioni estremamente complesse.

I cromosomi, come tutte le altre componenti di una cellula, sono formati da atomi disposti in molecole. Alcuni

scienziati, tra cui personalità eminenti nel campo della genetica, pensavano che sarebbe stato impossibile, in base solo alla struttura di sostanze chimiche «inanimate», capire la complessità dei meccanismi ereditari; altri invece ritenevano che, una volta chiarita la struttura chimica dei cromosomi, sarebbe stato possibile comprendere il loro ruolo come portatori delle informazioni genetiche. Questa intuizione segnò l'inizio di un fruttuoso campo di ricerche, la *genetica molecolare*.



14.1 Sulle tracce del DNA

Le prime analisi chimiche del materiale ereditario rivelarono che il cromosoma eucariote è costituito da **acido deossiribonucleico (DNA)** e da proteine, sostanze presenti più o meno in uguale quantità; perciò, entrambi questi tipi di molecole avrebbero potuto avere il ruolo di materiale genetico. Le proteine sembravano rappresentare la soluzione più probabile a causa della loro maggiore complessità chimica; le proteine, infatti, sono polimeri di amminoacidi di cui, nelle cellule, si conoscono 20 diversi tipi. Il DNA, invece, è un polimero formato solamente da quattro differenti tipi di nucleotidi.

Gli studiosi di biologia fecero subito notare che gli amminoacidi, il cui numero è così straordinariamente simile al numero delle lettere dell'alfabeto, potevano disporsi in moltissimi modi diversi. Sembrava che gli amminoacidi potessero costituire una specie di linguaggio, il «linguaggio della vita», capace di fornire le istruzioni per tutte le numerose attività cellulari. Molti ricercatori famosi, in particolare quelli che erano impegnati nello studio delle proteine, ritenevano che anche i geni fossero di natura proteica e che i cromosomi contenessero gli «stampi» di tutte le proteine necessarie per la cellula; secondo questi scienziati gli enzimi, e le altre

proteine coinvolte nei processi metabolici delle cellule, venivano copiati da questi stampi.

Questa ipotesi, per quanto logica, si dimostrò in seguito errata.

La natura del DNA

Il DNA era stato isolato per la prima volta dal medico tedesco Friedrich Miescher nel 1869, nello stesso decennio in cui Darwin pubblicava *Sull'origine delle specie* e Mendel comunicava i suoi risultati alla Società di Storia Naturale di Brünn. La sostanza isolata da Miescher era bianca, zuccherina, leggermente acida e conteneva fosforo; poiché era stata trovata soltanto nei nuclei delle cellule, venne chiamata *acido nucleico*. Tale nome fu in seguito modificato in *acido deossiribonucleico* per distinguere questa sostanza da una simile, l'*acido ribonucleico (RNA)*.

Grazie a diversi e interessanti esperimenti condotti agli inizi del secolo scorso, negli anni Quaranta era ormai noto che il DNA è costituito da nucleotidi. Ogni nucleotide è composto da una base azotata, dallo zucchero a cinque atomi di carbonio chiamato *deossiribosio* e da un gruppo fosfato (figura 14.1A). Vi sono due tipi di basi azotate: le *purine* (figura 14.1B), che presentano una struttu-

ra a due anelli, e le **pirimidine** (figura 14.1C), che hanno un solo anello. Nel DNA vi sono due tipi di purine, l'**adenina** (A) e la **guanina** (G), e due tipi di pirimidine, la **citrosina** (C) e la **timina** (T). Pertanto, il DNA è costituito da quattro tipi di nucleotidi che differiscono soltanto per la purina o la pirimidina in essi presente.

Nel 1943, dopo quasi dieci anni di lunghe analisi chimiche e numerosi esperimenti condotti sui batteri, T.O. Avery e i suoi collaboratori erano arrivati a stabilire che fosse il DNA, e non le proteine, il materiale genetico della cellula, ma tali conclusioni richiesero molto tempo prima di avere un pieno riconoscimento. Questo ritardo fu dovuto in parte al fatto che i batteri, in quanto procarioti, erano considerati organismi «inferiori» e un po' speciali, e in parte al fatto che la molecola del DNA, costituita solamente da quattro diversi nucleotidi, sembrava essere troppo semplice per assolvere il compito enormemente complesso di portare l'informazione ereditaria.

Gli esperimenti con i batteriofagi

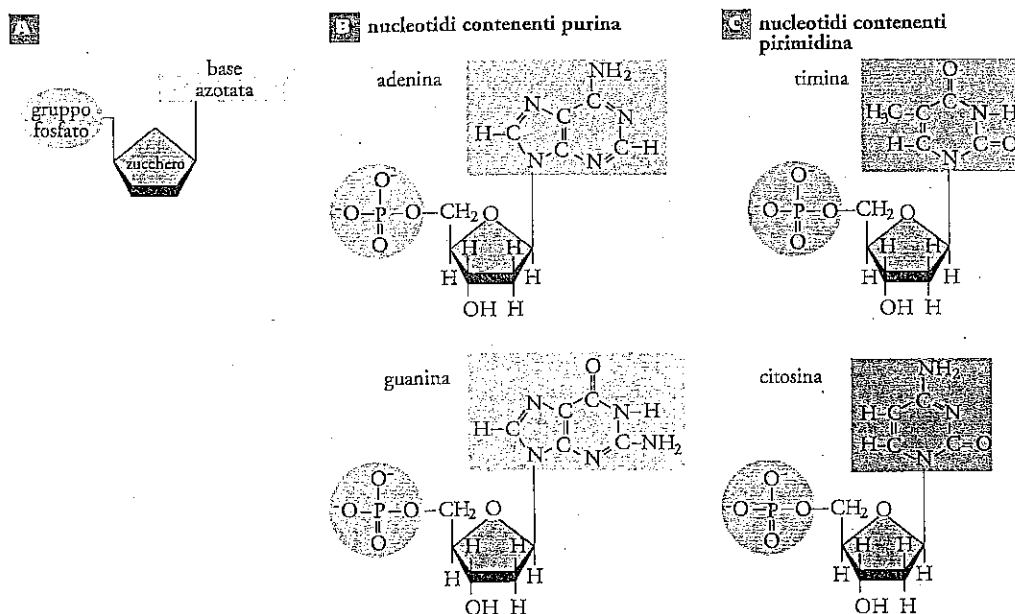
Intorno al 1940 ebbe inizio una serie di esperimenti fondamentali che utilizzavano un altro tipo di organismi destinato a diventare tanto importante nella ricerca quanto la pianta di pisello o il moscerino della frutta. Tali organismi, particolarmente adatti per la sperimentazione, erano speciali virus che attaccano i batteri e sono pertanto detti **batteriofagi** («mangiatori di batteri»). I batteriofagi scelti inizialmente per questi studi furono quelli che attaccano *Escherichia coli*, uno tra i

più comuni batteri dell'intestino umano.

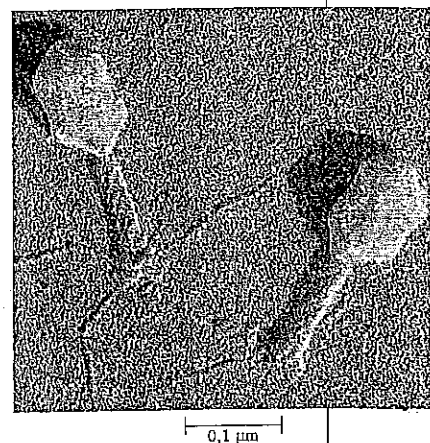
Questi virus, comunemente chiamati **fagi**, sono poco costosi, possono essere facilmente coltivati in laboratorio e richiedono poco spazio e modeste attrezzature; inoltre, si riproducono in tempi brevissimi: dopo solo 25 minuti dall'attacco del virus, una cellula batterica si disgrega liberando centinaia di nuovi virus, ciascuno copia esatta della particella infettante. Un altro vantaggio interessante di questi fagi è la loro forma molto particolare (figura 14.2) che rende semplice la loro identificazione al microscopio elettronico.

L'analisi chimica dei batteriofagi rivelò che essi sono costituiti quasi esclusivamente da DNA e proteine, le due sostanze che negli anni Quaranta erano i principali concorrenti al ruolo di materiale genetico. La questione su quale dei due tipi di molecola contenga i geni virali, cioè il materiale ereditario che dirige la sintesi di nuovi virus all'interno della cellula batterica, fu risolta nel 1952 da Alfred D. Hershey e da Martha Chase. Il loro semplice ma geniale esperimento è riassunto nella figura 14.3 (p. seguente); prima di osservare la figura tenete presente che, mentre le proteine contengono zolfo (negli amminoacidi metionina e cisteina), ma non fosforo, il DNA contiene fosforo, ma non zolfo.

Hershey e Chase prepararono due campioni separati di fagi: in uno il DNA era marcato con l'isotopo radioattivo del fosforo ^{32}P , mentre nell'altro le proteine erano marcate con l'isotopo radioattivo dello zolfo ^{35}S . (A) Una coltura di batteri (a sinistra, nella figura) fu infettata con il fago marcato con ^{32}P , e l'altra coltura (a destra) con il fago marcato con ^{35}S . Dopo che ebbe ini-

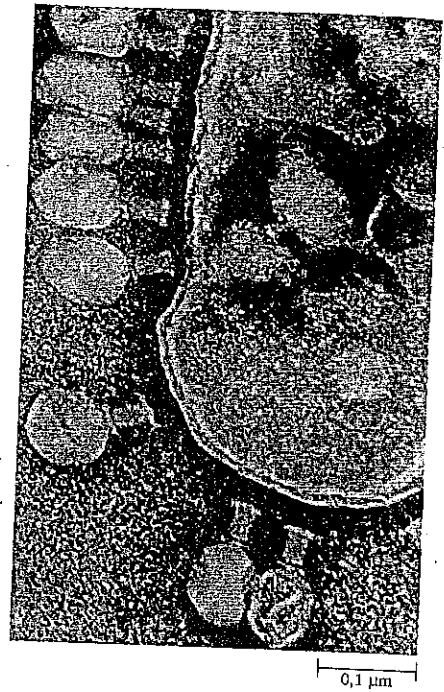
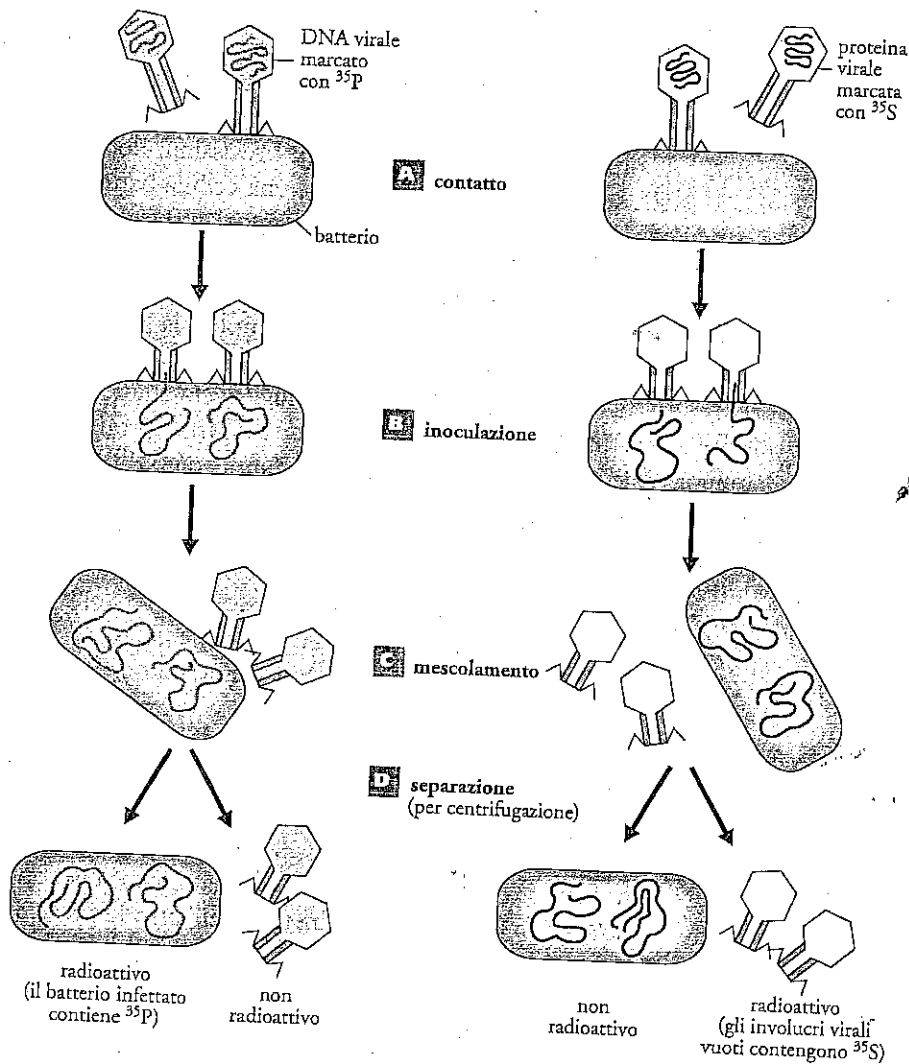


14.1 (A) Un nucleotide è formato da una base azotata, uno zucchero a cinque atomi di carbonio e un gruppo fosfato. (B) I due nucleotidi contenenti purine e (C) i due nucleotidi contenenti pirimidine presenti nel DNA.



14.2 Batteriofagi. Notate la loro forma molto particolare: sono costituiti da una testa che, al microscopio elettronico, appare esagonale e da una coda cilindrica. Sono visibili i filamenti che permettono l'adesione alle cellule di *E. coli*.

Un batterio
E. coli,
«alla deriva»
in una immi-
nazione in falsi colori



14.4 ▲ Fotografia al microscopio elettronico di batteriofagi attaccati a una cellula di *E. coli*. Le teste di quasi tutti i virus sono vuote, e ciò indica che il DNA virale è già stato «iniettato» nel batterio.

14.3 ◀ Schema riassuntivo dell'esperimento di Hershey e Chase; grazie a esso fu possibile dimostrare che il materiale genetico del batteriofago è costituito da DNA e non da proteine.

zio il ciclo infettivo (B), le cellule batteriche vennero mescolate (C) e poi centrifugate (D) per separarle da ogni materiale virale rimasto fuori dalle cellule.

Campioni di materiale extracellulare e intracellulare di ogni coltura vennero esaminati per la ricerca della radioattività. Hershey e Chase scoprirono che l'isotopo radioattivo ^{35}S era rimasto fuori dalle cellule batteriche, insieme all'involucro virale vuoto, mentre l'isotopo radioattivo ^{32}P era entrato nelle cellule ed era presente anche nelle nuove particelle virali.

Grazie a questo esperimento si riuscì a dimostrare che solamente il DNA dei batteriofagi era coinvolto nel processo di duplicazione e che le proteine non potevano costituire il materiale ereditario. Hershey, insieme a Max Delbrück e allo scienziato di origine italiana Salvador Luria, vinse il premio Nobel per la medicina nel 1969.

Successivamente, le fotografie eseguite al microscopio elettronico confermarono che questo tipo di batteriofagi si attacca alla parete della cellula batterica per mezzo delle fibre della sua coda e inietta nella cellula il DNA contenuto nella testa dei virus. Il rivestimento proteico vuoto è abbandonato al di fuori della cellula

(figura 14.4). In breve, le proteine sono soltanto un contenitore del DNA del batteriofago; è il DNA che entra nella cellula portando il messaggio ereditario completo del virus ed è quindi in grado di dirigere la formazione di nuovo DNA virale e di nuove proteine virali.

Ulteriori conferme sul ruolo del DNA

Il ruolo del DNA nella duplicazione virale fornì prove molto convincenti all'ipotesi che il DNA fosse il materiale genetico. Ad avvalorare ulteriormente questo concetto contribuirono i risultati di due altre ricerche sperimentali. Nella prima Alfred Mirsky, in una lunga serie di accurati studi, dimostrò che, in genere, le cellule somatiche di qualsiasi specie contengono uguali quantità di DNA, mentre i gameti contengono esattamente la metà del DNA presente nelle cellule somatiche.

Una seconda importante serie di risultati fu fornita da Erwin Chargaff. Chargaff analizzò il contenuto in purine e pirimidine del DNA di molte specie di esseri viventi e giunse alla conclusione che le basi azotate non

sono sempre presenti in proporzioni uguali. La proporzione delle quattro basi azotate è la stessa in tutte le cellule di tutti gli individui di una determinata specie, ma varia da una specie a un'altra.

Queste variazioni suggerirono che le quattro basi azotate possono benissimo costituire un «linguaggio» in grado di dare le istruzioni necessarie al controllo della

crescita delle cellule. Alcuni dei risultati di Chargaff sono riportati nella tabella 14.1. Riuscite, esaminando questa tabella, a trarre qualche interessante conclusione riguardo alle proporzioni delle quattro basi azotate? Questi dati fornirono degli utili indizi alla comprensione della struttura molecolare del DNA.

TABELLA 14.1 Composizione percentuale del DNA in alcune specie

Sorgente	purina (%)		pirimidina (%)	
	adenina	guanina	citosina	timina
essere umano	30,4	19,6	19,9	30,1
bue domestico	29,0	21,2	21,2	28,7
spermatozoo di salmone	29,7	20,8	20,4	29,1
germe di grano	28,1	21,8	22,7	27,4
<i>E. coli</i>	24,7	26,0	25,7	23,6
riccio di mare	32,8	17,7	17,3	32,1

PER FISSARE I CONCETTI

- A** Per quali caratteristiche le proteine venivano ritenute probabili portatrici del materiale genetico?
- B** Quali sono le componenti dei nucleotidi?
- C** Come sono fatti i batteriofagi?
- D** Quale conclusione si poté trarre grazie all'esperimento di Hershey e Chase?
- E** Quali scienziati vengono ricordati per aver condotto le prime ricerche sul DNA?

14.2 Il modello di Watson e Crick

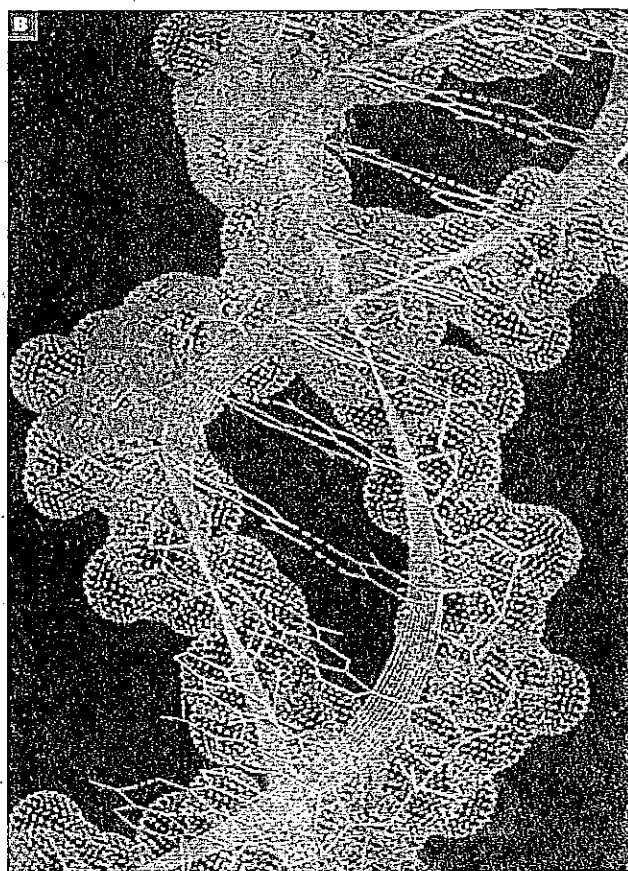
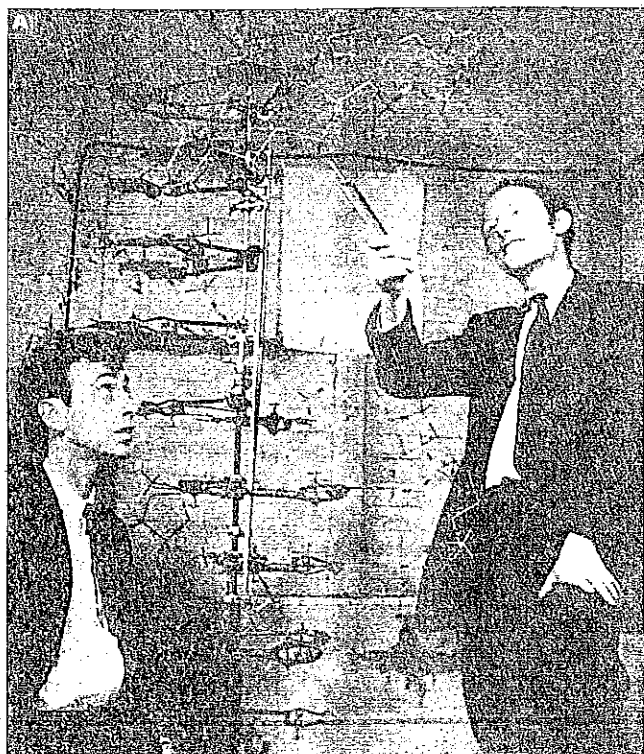
Agli inizi degli anni Cinquanta, un giovane scienziato americano, James Watson, si recò a Cambridge, in Inghilterra, con una borsa di studio per una ricerca sulle strutture proteiche e, al Cavendish Laboratory, incontrò il fisico Francis Crick. A quei tempi entrambi erano interessati anche al DNA e ben presto cominciarono a lavorare insieme per cercare di risolvere il pro-

blema della sua struttura molecolare; essi non eseguirono veri e propri esperimenti, ma condussero, piuttosto, un esame razionale di tutti i dati allora noti sul DNA, cercando di organizzarli in modo logico.

Dati già disponibili

Ai tempi in cui Watson e Crick (figura 14.5A) iniziarono i loro studi erano già disponibili parecchie informa-

14.5 (A) Struttura elicoidale a doppio filamento del DNA, proposta per la prima volta nel 1953 da James Watson e Francis Crick. (B) Un breve tratto di DNA modellato in computer grafica.



zioni: si sapeva, per esempio, che la molecola di DNA era di grandi dimensioni, lunga e filiforme, ed era formata da nucleotidi, ognuno contenente una purina o una pirimidina, una molecola di zucchero deossiribosio e un gruppo fosfato.

Linus Pauling aveva dimostrato nel 1950 che le proteine sono spesso disposte in modo elicoidale e vengono mantenute in questa disposizione da legami idrogeno che si formano tra gli avvolgimenti adiacenti dell'elica. Pauling aveva anche avanzato l'ipotesi che la struttura del DNA potesse essere simile a quella delle proteine, ipotesi confermata in seguito dagli studi ai raggi X condotti da Maurice Wilkins e Rosalind Franklin presso il King's College di Londra.

Infine, vi erano i dati di Chargaff che indicavano che la proporzione dei nucleotidi di DNA contenenti timina e di quelli contenenti adenina è di circa 1:1, e lo stesso vale per guanina e citosina.

Costruzione del modello

Partendo da questi dati Watson e Crick cercarono di costruire un modello di DNA che fosse in accordo con i fatti già noti e spiegasse il suo ruolo biologico. Per poter essere portatrici di una quantità così vasta di informazioni genetiche, le molecole di DNA dovevano essere eterogenee e varie; inoltre, doveva esistere un qualche meccanismo di duplicazione rapido e preciso, capace di produrre copie fedeli del patrimonio ereditario da trasmettere da cellula a cellula e di generazione in generazione.

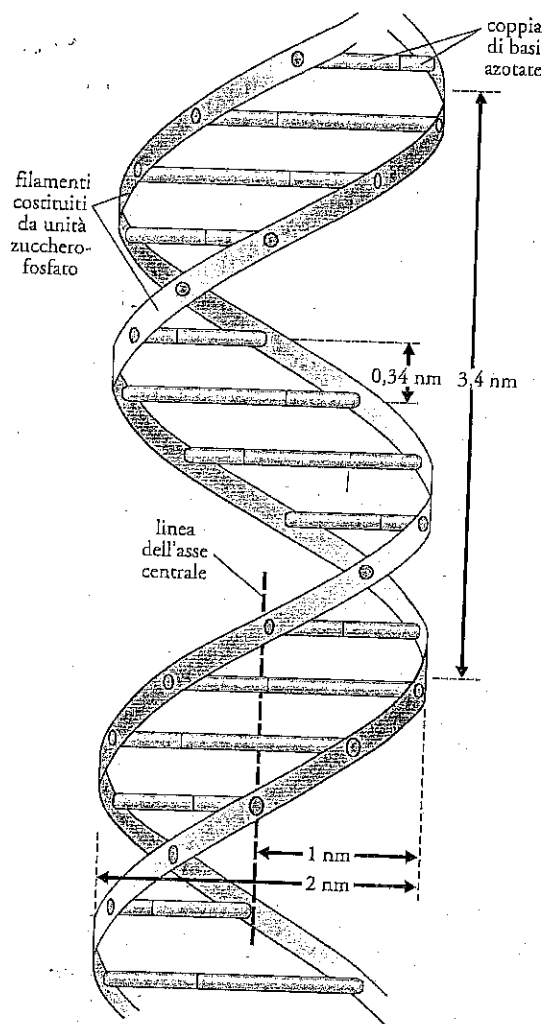
Mettendo insieme tutti i dati conosciuti, Watson e Crick furono in grado di dedurre che il DNA è una doppia elica molto lunga e spiralizzata. Se poteste prendere una scala a pioli e ruotarla in modo da formare una spirale mantenendo i pioli perpendicolari all'asse di rotazione, avreste un rozzo modello della molecola (figura 14.6). I due montanti della scala sono formati da molecole di zucchero alternate a gruppi fosfato, mentre i pioli perpendicolari ai montanti sono costituiti dalle basi azotate adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Ogni base forma un legame covalente con la subunità glucidica posta nel tratto di montante adiacente a essa. Le basi appaiate si incontrano sull'asse centrale dell'elica e sono unite da legami idrogeno, legami relativamente deboli che Pauling aveva già individuato nei suoi studi sulla struttura delle proteine.

La distanza tra i due montanti, calcolata in base a immagini ottenute da Rosalind Franklin con la tecnica della cristallografia a raggi X, è di 2 nanometri. La combinazione di due purine misurerebbe più di 2 nanometri, mentre due pirimidine appaiate occuperebbero meno di 2 nanometri; ma se una purina risultasse sempre appaiata a una pirimidina, ci sarebbe una perfetta

corrispondenza e, in ogni suo punto, la molecola di DNA presenterebbe sempre la stessa larghezza. Quindi, le basi appaiate, cioè i «pioli» della scala, devono sempre essere combinazioni di una purina con una pirimidina.

Procedendo su questa strada, Watson e Crick arrivarono a costruire un modello della molecola in stagno e ferro, collocando al posto giusto ogni pezzo di questo puzzle tridimensionale. Lavorando coi loro modelli scoprirono che i nucleotidi, lungo un singolo filamento della doppia elica, potevano essere disposti in qualunque ordine. Dal momento che una molecola di DNA può essere lunga migliaia di nucleotidi, è possibile una enorme varietà nella sequenza delle basi, e questo è uno dei requisiti fondamentali del materiale genetico.

La scoperta più emozionante, tuttavia, si ebbe quando Watson e Crick si misero a costruire il filamento corrispondente. Essi si trovarono di fronte a un altro importante vincolo: non solo le purine non potevano appaiarsi con altre purine, e le pirimidine con altre piri-

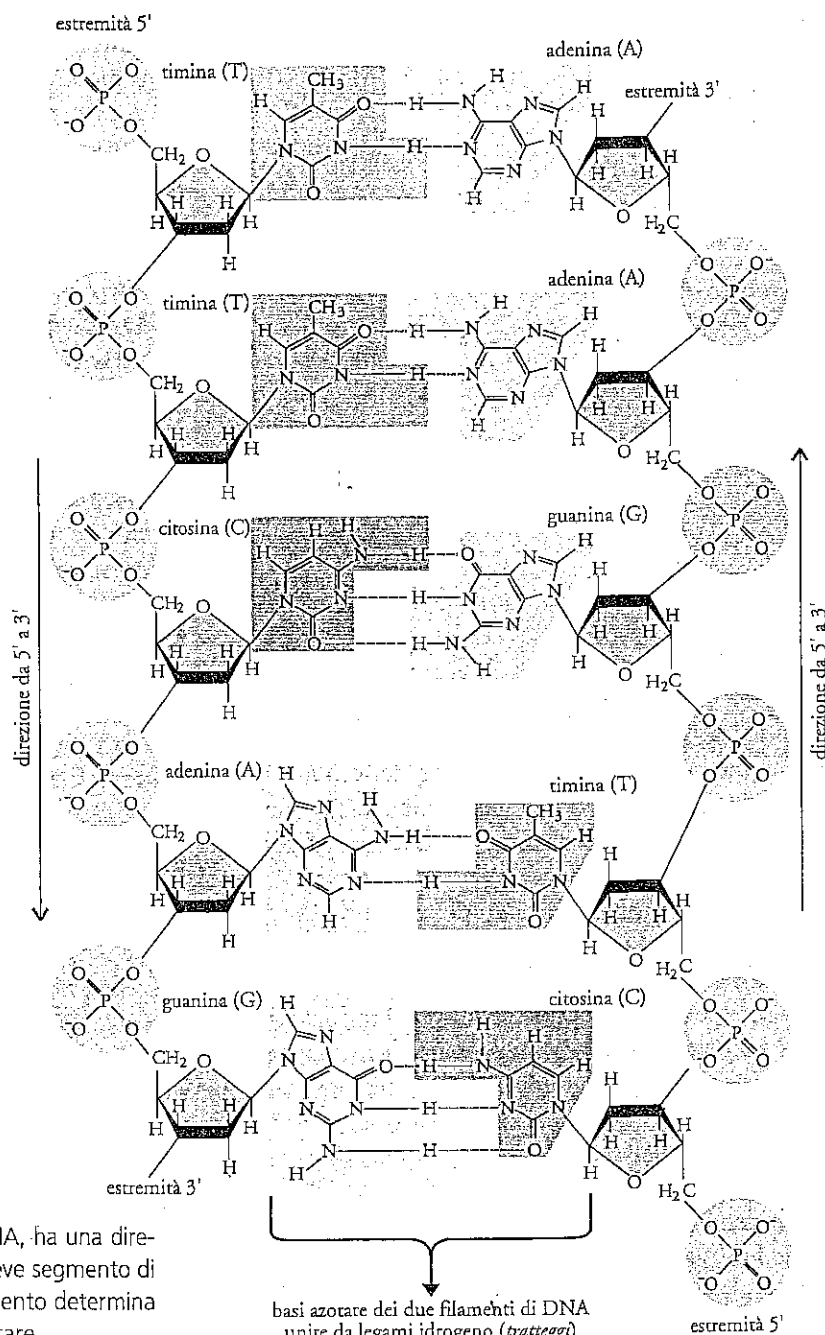
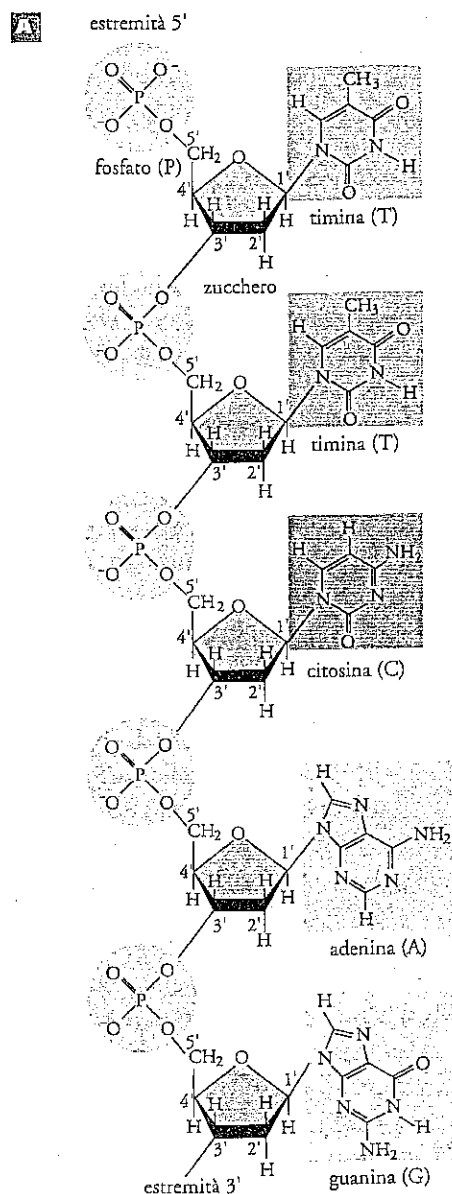
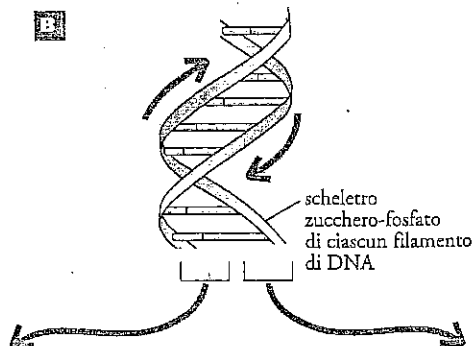


14.6 Struttura a doppio filamento di un breve segmento di una molecola di DNA. Ogni «piolo» è formato da una coppia di basi azotate complementari.

midine, ma, a causa della struttura delle basi azotate, l'adenina poteva appaiarsi soltanto con la timina mediante due legami idrogeno ($A \equiv T$) e la guanina soltanto con la citosina, formando tre legami idrogeno ($G \equiv C$). Le basi appaiate erano dunque *complementari*. Riprendendo in esame la tabella [14.1], è possibile osservare come queste informazioni chimiche spieghino i dati di Chargaff.

La struttura a doppio filamento di un piccolo segmento della molecola del DNA è illustrata nella figura [14.7B]. Come si può notare i filamenti hanno una direzione: in ogni filamento ciascun gruppo fosfato è attaccato a una molecola di zucchero in posizione 5' (il quin-

to atomo di carbonio dell'anello dello zucchero) e a un'altra molecola di zucchero in posizione 3' (il terzo atomo di carbonio dello zucchero). Perciò ogni filamento ha un'estremità 5' (che termina con un gruppo fosfa-



14.7 (A) Ogni filamento, nella molecola di DNA, ha una direzione. (B) Struttura a doppio filamento di un breve segmento di DNA. L'ordine delle basi azotate lungo un filamento determina l'ordine delle basi lungo il filamento complementare.

to) e un'estremità 3' (che termina, invece, con un gruppo ossidrilico —OH). All'interno della doppia elica i due filamenti corrono in senso opposto; cioè, la direzione dall'estremità 5' alla 3' di ogni filamento è invertita rispetto all'altra. I filamenti vengono perciò definiti *anti-paralleli*. Comunemente si usa scrivere la sequenza di un filamento in direzione da 5' a 3'; nella figura 14.7, per il filamento a sinistra, la sequenza è TTCAG.

Lungo un filamento della doppia elica i nucleotidi possono essere disposti in un ordine qualunque, ma la loro sequenza determina l'ordine dei nucleotidi nell'altro filamento, in quanto le basi azotate sono complementari (l'appaiamento avrà luogo solamente tra G e C e tra A e T).

PER FISSARE I CONCETTI

- A** Quali erano i dati già disponibili su cui Watson e Crick si basarono per costruire il primo modello di DNA?
- B** Qual è la struttura molecolare del DNA nelle sue linee generali?
- C** Perché sullo stesso montante a una purina deve corrispondere sempre una pirimidina?
- D** Quale caratteristica fa sì che ogni molecola di DNA possa essere diversa da tutte le altre?
- E** In che modo si appaiano le basi azotate?

14.3 Duplicazione del DNA

Una caratteristica fondamentale del materiale genetico è la capacità di fornire copie esatte di se stesso; nella struttura doppia e complementare dell'elica del DNA è contenuto il meccanismo che permette questa autoreplicazione.

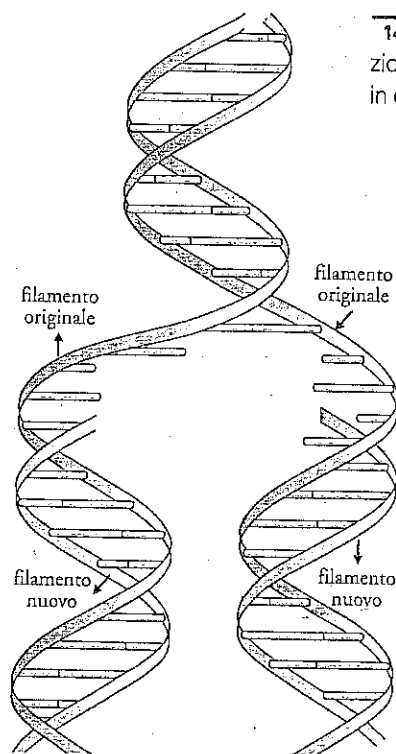
Nel momento della duplicazione dei cromosomi, la molecola si apre lungo la linea mediana come una cerniera-lampo e le basi appaiate si separano a livello dei legami idrogeno. A mano a mano che i due filamenti si separano, essi fungono da stampo; ciascuno dirige, per tutta la sua lunghezza, la sintesi di un nuovo filamento complementare utilizzando i nucleotidi già presenti nella cellula (figura 14.8). Se sul vecchio filamento (lo stampo) è presente T, soltanto A potrà prendere il suo posto sul nuovo filamento; G si appaierà soltanto con C, e via di seguito. In questo modo ogni filamento forma una copia di quello a cui era appaiato originariamente e vengono prodotte alla fine due copie identiche della molecola iniziale. L'annosa questione di come l'informazione ereditaria poteva essere duplicata e trasmessa, generazione dopo generazione, era stata risolta.

Meccanismo di duplicazione del DNA

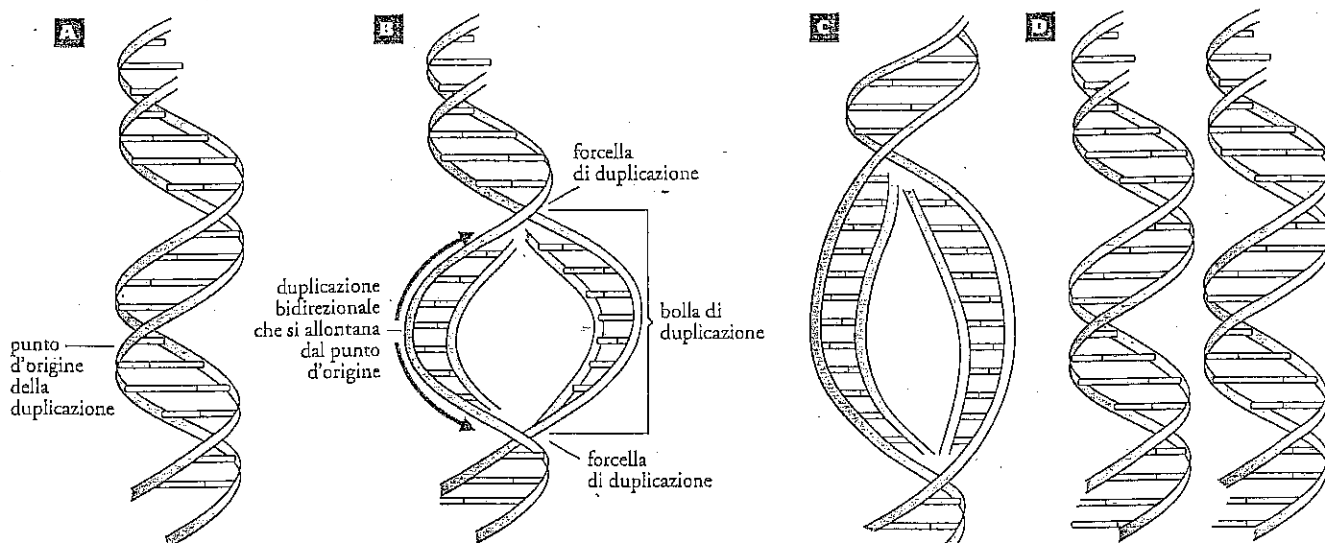
La duplicazione del DNA è un processo che si verifica durante la fase S del ciclo cellulare ed è l'evento portante della duplicazione dei cromosomi. Nella maggior parte delle cellule eucariote la duplicazione del DNA è seguita dalla mitosi, mentre nelle cellule che danno origine ai gameti viene seguita dalla meiosi. È un processo assai rapido: per esempio, nell'uomo e nei mammiferi vengono posizionati circa 50 nucleotidi al secondo, mentre nei procarioti si arriva anche a più di 500 nucleotidi al secondo.

Lo schema generale della duplicazione del DNA, secondo cui ogni filamento della doppia elica serve da stampo per la costruzione di un nuovo filamento, è piuttosto semplice e facilmente comprensibile; invece, il meccanismo mediante il quale la cellula realizza la duplicazione è assai più complesso. Allo stesso modo di altre reazioni biochimiche cellulari, la duplicazione del DNA necessita di un gran numero di enzimi differenti, ognuno specifico nel catalizzare una particolare fase del processo. L'identificazione dei principali enzimi, delle loro funzioni specifiche e delle fasi della duplicazione ha richiesto un certo numero di anni e molti sforzi da parte dei numerosi scienziati che lavoravano nei vari laboratori. Benché le nostre conoscenze non siano ancora del tutto complete, le linee generali di questo processo sono ora chiare.

La duplicazione del DNA inizia sempre da una specifica sequenza di nucleotidi, detta **punto di origine**



14.8 Rappresentazione grafica del DNA in duplicazione.

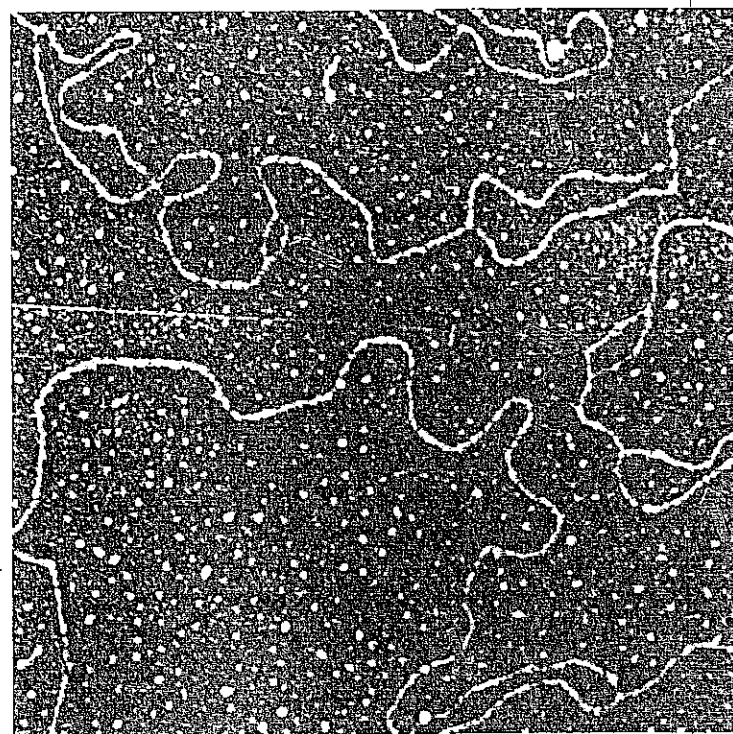


14.9 Durante la duplicazione del DNA, i due filamenti si separano (A) nel punto di origine del processo; a mano a mano che le due forcelle si allontanano l'una dall'altra, la bolla di duplicazione si propaga nelle due direzioni (B, C); alla fine del processo si formano due eliche seminuove (D).

della duplicazione, che richiede particolari proteine di attivazione ed enzimi (per esempio, le **elicasi**) che spezzano nel punto di origine della duplicazione i legami idrogeno che tengono unite le basi azotate complementari, aprendo così la doppia elica in modo che possa realizzarsi la duplicazione. Una volta che si sono separati i due filamenti della doppia elica, altre proteine si attaccano ai singoli filamenti per tenerli separati. In questo modo si rende possibile la fase successiva, ossia l'effettiva sintesi del nuovo filamento, che è catalizzata da un gruppo di enzimi noti come **DNA-polimerasi**.

Se si osserva il DNA in duplicazione con un microscopio elettronico, la regione di sintesi sembra quasi un «occhio» (**bolla di duplicazione**). A 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 duplicazione**. La duplicazione avviene in due direzioni opposte rispetto al punto di origine (figura 14.9), perciò la duplicazione viene definita **bidirezionale**. Quando si è completata la sintesi dei nuovi filamenti di DNA, le due catene a doppio filamento si separano in due nuove doppie eliche costituite ciascuna da un filamento vecchio e da un filamento nuovo.

Nei procarioti vi è un unico punto di origine della duplicazione, mentre negli eucarioti ve ne sono molti in ogni cromosoma. La duplicazione si verifica lungo i cromosomi lineari a mano a mano che la bolla si propaga nelle due direzioni (figura 14.10) fino a incontrare una bolla adiacente. Tutto il cromosoma sarà duplicato nel momento in cui tutte queste bolle si saranno fuse tra loro.



14.10 Fotografia al microscopio elettronico di una cellula embrionale di *Drosophila melanogaster*; le frecce indicano le numerose bolle di duplicazione.

Proofreading. Un aspetto significativo della duplicazione del DNA è che le DNA-polimerasi hanno una funzione di **proofreading** (correzione della lettura). Durante la sintesi possono avvenire alcuni errori quale l'aggiunta di un nucleotide sbagliato al filamento in costruzione; in tal caso, il nucleotide aggiunto al filamento non è complementare al nucleotide del filamento stampo. Le DNA-polimerasi, però, sono in grado di aggiungere nucleotidi al filamento solo se i nucleotidi già inseriti sono appaiati esattamente ai loro nucleotidi complementari sul filamento stampo. Se si verifica un errore, questi enzimi invertono la propria direzione di marcia, rimuovendo i