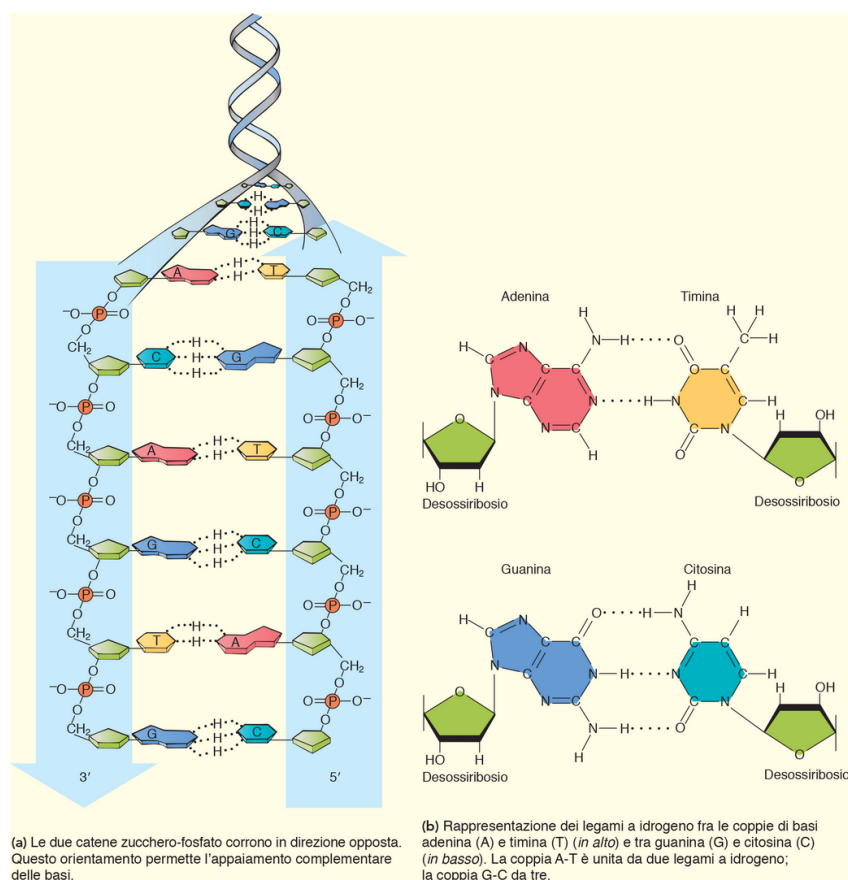


Nel DNA a doppia elica si formano legami a idrogeno fra adenina e timina e fra guanina e citosina

Altre caratteristiche del modello di Watson e Crick erano in grado di integrare le informazioni sulla composizione chimica del DNA con i dati di diffrazione dei raggi X. Gli studi di diffrazione dei raggi X indicavano che la doppia elica del DNA ha una larghezza precisa e costante di 2,0 nm. Ciò era in accordo con le osservazioni di Chargaff. Nella Figura 12-4 abbiamo visto che le pirimidine (citosina e timina) sono costituite da un unico anello di atomi e sono quindi più piccole delle purine (guanina e adenina) che invece possiedono un secondo anello a cinque atomi. Lo studio di modelli molecolari rese chiaro a Watson e Crick che solamente con l'accoppiamento di una purina con una pirimidina ad ogni piolo della scala l'ampiezza dell'elica poteva essere esattamente 2,0 nm. Infatti, la combinazione di due purine (1,2 nm ciascuna) avrebbe dato una larghezza maggiore, mentre, combinando due pirimidine, l'ampiezza sarebbe stata inferiore cosicché il diametro della doppia elica non sarebbe stato costante. Studi ulteriori del modello dimostrarono che l'adenina può appaiarsi con la timina (e la guanina con la citosina) mediante legami a idrogeno, mentre le combinazioni opposte, citosina con adenina e guanina con timina, non permettono la formazione di legami a idrogeno favorevoli.



PUNTO CHIAVE L'appaiamento delle basi e la loro sequenza nel DNA forniscono le basi per la comprensione sia della replicazione del DNA sia dell'ereditarietà del materiale genetico.

FIGURA 12-9

Appaiamento delle basi e legami a idrogeno

I due filamenti di una doppia elica di DNA sono tenuti insieme da legami a idrogeno tra le basi.

La costituzione di legami a idrogeno tra adenina e timina e tra guanina e citosina è mostrata nella FIGURA 12-9b. Fra adenina e timina si formano due legami a idrogeno e tra guanina e citosina se ne formano tre. Questo concetto di appaiamento specifico delle basi si accorda pienamente con i dati di Chargaff; la quantità di citosina risulta uguale alla quantità di guanina perché ciascuna citosina di una catena si appaia necessariamente alla guanina della catena opposta, e lo stesso avviene per ogni

adenina presente su un'elica che deve appaiarsi alla timina dell'altra elica. Perciò, la sequenza delle basi nelle due catene di DNA mostra un appaiamento di basi complementari – in altre parole, la sequenza di nucleotidi in un'elica impone una sequenza complementare di nucleotidi nell'altra. Per esempio, se in un filamento troviamo questa sequenza: **5'—TCGATG—3'** nell'altro avremo la sequenza complementare: **3'—AGCTAC—5'**

Il modello a doppia elica ci suggerisce che la sequenza delle basi nel DNA rappresenti il sistema di archiviazione delle informazioni genetiche e che tale sequenza sia in ultima analisi correlata alla sequenza di aminoacidi nelle proteine. Sebbene ci siano dei vincoli nelle modalità di appaiamento delle basi dei filamenti complementari, il numero delle sequenze lineari possibili lungo un filamento è virtualmente illimitato. Poiché le molecole di DNA presenti in una cellula possono contenere milioni di nucleotidi, esse sono in grado di immagazzinare una quantità enorme di informazioni, che consistono in centinaia di geni.

Verifica

- Quali tipi di subunità costituiscono un singolo filamento di DNA? In che modo tali subunità sono legate tra loro?
- Qual è la struttura del DNA a doppia elica, così come è stata determinata da Watson e Crick?
- In che modo le regole di Chargaff si correlano alla struttura del DNA?

12.2 LA REPLICAZIONE DEL DNA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

6. Citare le prove prodotte dall'esperimento di Meselson e Stahl che hanno portato gli studiosi a distinguere tra la replicazione semiconservativa del DNA e i modelli alternativi.
7. Riassumere come si replica il DNA ed identificare alcuni aspetti peculiari del processo.
8. Spiegare le complessità della replicazione del DNA che la rendono (a) bidirezionale e (b) continua su un filamento e discontinua sull'altro.
9. Spiegare in che modo gli enzimi effettuano la correzione delle bozze e la riparazione degli errori nel DNA.
10. Definire il termine telomero ; descrivere le possibili correlazioni tra telomerasi e invecchiamento cellulare e tra telomerasi e cancro.

Due aspetti del modello di Watson e Crick sono in accordo in maniera chiara ed evidente con il ruolo del DNA come materiale ereditario. Abbiamo detto in precedenza che il DNA codifica le informazioni attraverso la sua sequenza di basi. Il modello proposto suggerisce anche le modalità con cui le informazioni del DNA possono essere fedelmente copiate, un processo noto come replicazione del DNA.

A Watson e Crick era ovvia la connessione con il comportamento dei cromosomi in mitosi; quando un cromosoma si duplica risulta costituito da due cromatidi fratelli identici, che più tardi all'anafase si separeranno: per questa ragione il materiale genetico deve essere duplicato fedelmente e distribuito equamente alle cellule figlie. Infatti, nella loro prima pubblicazione si legge una classica e ormai famosa affermazione: "Non è sfuggito alla nostra attenzione che la specificità dell'appaiamento tra le basi da noi proposto suggerisce immediatamente un possibile meccanismo di fedele copiatura del materiale genetico".

Il modello suggerisce che, poiché le coppie di nucleotidi si appaiano in modo complementare, ciascun filamento di DNA possa servire da stampo per la sintesi del filamento opposto. Infatti, è sufficiente rompere i legami a idrogeno (ricordate dal Capitolo 2 che i legami a idrogeno sono relativamente deboli) per separare le due emieliche; successivamente, ciascuna emielica potrebbe appaiarsi per complementarità con nuovi nucleotidi e così ricostruire due nuove molecole a doppia elica, ciascuna identica alla molecola originaria, costituite da un filamento parentale e da uno complementare di nuova sintesi. Questo sistema di ricopiatura è chiamato meccanismo di replicazione semiconservativa (FIG. 12-10a).

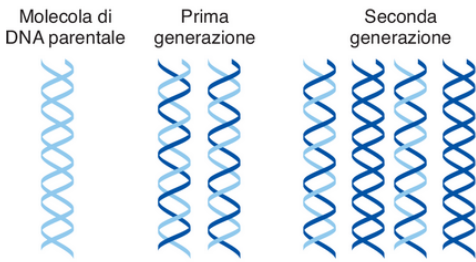
Meselson e Stahl verificarono il meccanismo della replicazione semiconservativa

Il meccanismo di replicazione semiconservativa proposto da Watson e Crick è certamente semplice e molto suggestivo; tuttavia, erano indispensabili prove sperimentali per affermare che effettivamente il DNA si replicasse in questo modo e, per prima cosa, era necessario escludere altre possibilità. Per esempio, con un meccanismo di replicazione conservativa , entrambi i filamenti parentali (o vecchi) potrebbero rimanere insieme e le due catene neosintetizzate potrebbero formare una seconda molecola a doppia elica completamente nuova (FIG. 12-10b). Con una replicazione dispersiva , una volta avvenuta la replicazione, la nuova molecola di DNA dovrebbe contenere dei tratti di molecola parentale alternati casualmente a tratti neosintetizzati (FIG. 12-10c). Per stabilire quale delle ipotesi fosse attendibile, era necessario poter distinguere i filamenti vecchi di DNA da quelli di nuova sintesi.

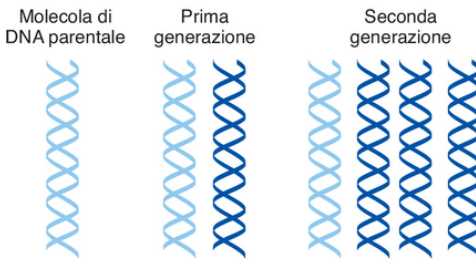
A tale scopo si può usare azoto pesante, ^{15}N (l'azoto normale è ^{14}N) per marcare le catene di DNA, rendendole più dense. Grosse molecole come il DNA possono essere separate in base alla diversa densità ottenuta con la marcatura, utilizzando una tecnica nota come centrifugazione in gradiente di densità (vedi Fig. 4-5). Quando il DNA viene messo in una soluzione di cloruro di cesio (CsCl) e centrifugato ad alta velocità, la soluzione forma un gradiente di densità che va da una zona a bassa densità nella parte superiore della provetta ad una ad alta densità sul fondo. Durante la centrifugazione, le molecole di DNA migrano nella regione del gradiente corrispondente alla loro densità.

Nel 1958, Matthew Meselson e Franklin Stahl fecero crescere delle cellule del batterio *Escherichia coli* in un terreno di coltura contenente ^{15}N sotto forma di cloruro di ammonio (NH_4Cl). Le cellule utilizzavano ^{15}N per sintetizzare le basi azotate, che poi venivano incorporate nel DNA (FIG. 12-11). Da alcune di queste cellule vennero estratte molecole di DNA contenenti azoto pesante che, poste su gradiente di densità, si accumularono nella regione ad alta densità. Le rimanenti cellule batteriche (che contenevano anch'esse molecole di DNA marcate con ^{15}N) vennero trasferite in un terreno di coltura in cui il cloruro di ammonio conteneva atomi di ^{14}N , e lasciate replicare per alcuni cicli.

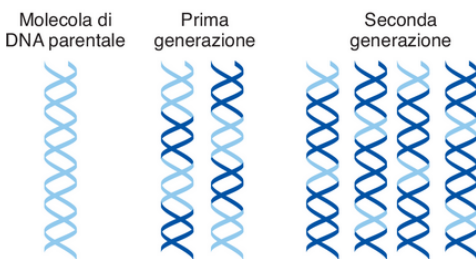
(a) Ipotesi 1: Replicazione semiconservativa



(b) Ipotesi 2: Replicazione conservativa



(c) Ipotesi 3: Replicazione dispersiva



← FIGURA 12-10 Modelli alternativi per la replicazione del DNA

L'organizzazione attesa dei filamenti di DNA vecchi (in azzurro) e neosintetizzati (in blu) dopo una e due generazioni, secondo (a) il modello semiconservativo, (b) il modello conservativo e (c) il modello dispersivo.

Ci si aspettava che le molecole di DNA neosintetizzate fossero meno dense, in quanto le basi azotate incorporate durante la fase di sintesi contenevano l'isotopo ^{14}N . Infatti, le molecole di DNA isolate dalle cellule dopo una sola generazione mostravano tutte una densità intermedia, cioè contenevano metà degli atomi di azoto pesante rispetto al DNA "parentale". Questo risultato sosteneva il modello semiconservativo, per il quale ogni doppia elica avrebbe dovuto contenere un filamento preesistente (pesante in questo caso) ed uno neosintetizzato (leggero). Il risultato era anche in accordo con il modello dispersivo, che prevedeva anch'esso la presenza di un'unica classe di molecole, tutte di densità intermedia. Allo stesso tempo, era in disaccordo con il modello conservativo, secondo il quale dovevano essere ritrovate due classi di molecole a doppio filamento, quelle con due filamenti pesanti e quelle con due filamenti leggeri.

ESPERIMENTO CHIAVE

PORSI DOMANDE

CRITICHE: Qual è il meccanismo di replicazione del DNA?

SVILUPPARE UN'IPOTESI:

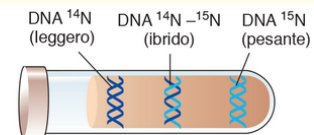
La Figura 12-10 illustra tre ipotesi relative alla

replicazione del DNA e prevede la disposizione dei filamenti di DNA vecchi e neosintetizzati dopo una e due generazioni in base alle corrispondenti ipotesi.

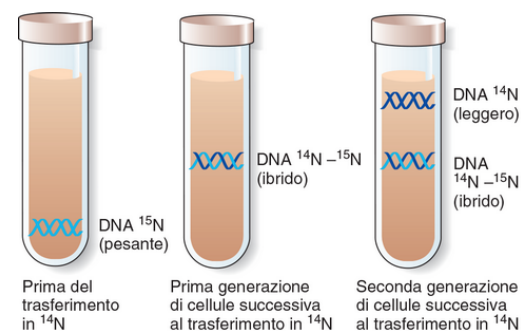
EFFETTUARE ESPERIMENTI: Meselson e Stahl fecero crescere per molte generazioni il batterio *Escherichia coli* in un mezzo contenente azoto pesante (^{15}N), in modo che tutti i filamenti di DNA diventassero "pesanti". Quindi, trasferirono alcune cellule in un mezzo contenente azoto leggero (^{14}N), in modo che i filamenti neosintetizzati fossero "leggeri". Isolarono il DNA dalle cellule batteriche dopo 20 minuti (una generazione) e 40 minuti (due generazioni) e lo centrifugarono per separare le bande di DNA di diversa densità.

RISULTATI E CONCLUSIONI: Sulla base delle densità delle molecole di DNA osservate in ciascuna generazione, Meselson e Stahl conclusero che il modello di replicazione semiconservativa rispecchiava accuratamente il meccanismo di replicazione del DNA.

La posizione delle molecole di DNA all'interno della provetta da centrifuga può essere determinata mediante un sistema ottico a raggi UV. Infatti, le soluzioni di DNA assorbono fortemente la lunghezza d'onda di 260 nm.



Nel gradiente di densità in centrifugazione, la concentrazione di CsCl è massima nella parte inferiore del tubo e minima in alto. Le molecole di DNA si posizionano dove la loro densità è uguale a quella della soluzione in CsCl nella quale sono state centrifugate.



La posizione delle molecole di DNA all'interno della provetta da centrifuga può essere determinata mediante un sistema ottico a raggi UV. Infatti, le soluzioni di DNA assorbono fortemente la lunghezza d'onda di 260 nm.

FIGURA 12-11 L'esperimento di Meselson-Stahl

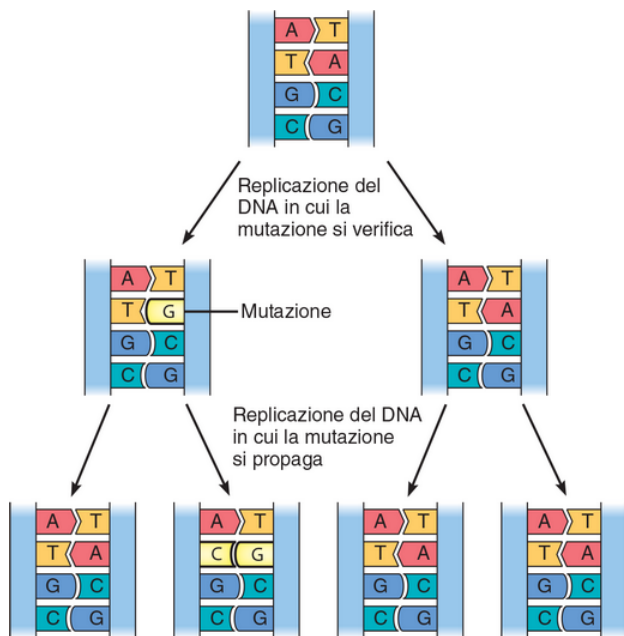
Dopo un altro ciclo di replicazione in terreno di coltura con ^{14}N , erano presenti due tipi di DNA nel gradiente, corrispondenti a due diversi livelli di densità: uno indicava l'esistenza di eliche di DNA "ibride" (DNA marcato in egual misura con ^{14}N e ^{15}N) e l'altro di DNA costituito interamente dall'isotopo leggero. Questo risultato era in accordo col modello di replicazione semiconservativa ed escludeva il modello dispersivo, per il quale tutti i filamenti avrebbero dovuto avere una densità intermedia.

La replicazione semiconservativa spiega la trasmissione delle mutazioni

La scoperta che il DNA poteva essere replicato con un meccanismo semiconservativo suggerì come la molecola potesse soddisfare la terza caratteristica del materiale genetico: la capacità di mutare. Era noto da

molto tempo che le mutazioni, o cambiamenti genetici, potevano insorgere nei geni e quindi essere trasmesse fedelmente alle generazioni successive. Ad esempio, una particolare mutazione nel moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) determina la formazione di ali vestigiali.

Quando fu proposto il modello della doppia elica, sembrò plausibile che le mutazioni potessero rappresentare un cambiamento nella sequenza delle basi del DNA. Se il DNA viene copiato secondo le regole della complementarietà, ogni cambiamento nella sequenza delle basi di un filamento ha come conseguenza una nuova sequenza di basi complementari nel successivo ciclo di replicazione. La nuova sequenza viene tramandata alle molecole figlie con lo stesso meccanismo utilizzato per copiare il materiale genetico originale, come se nessun cambiamento fosse avvenuto.



Nell'esempio riportato nella FIGURA 12-12, una adenina presente su un filamento di DNA è stata sostituita con una guanina; ciò può avvenire per un errore raro di replicazione del DNA oppure attraverso altri meccanismi oggi noti. Esistono sistemi enzimatici che riparano gli errori, ma non tutte le mutazioni sono corrette opportunamente. La frequenza degli errori non corretti che avvengono nel corso della replicazione del DNA è di circa un nucleotide su un miliardo. Quando il DNA che contiene un errore si duplica di nuovo (Fig. 12-12, sinistra), uno dei filamenti dà origine ad una molecola uguale al DNA parentale; l'altro filamento, mutato, dà origine ad una molecola di DNA con una nuova combinazione di basi che si manterrà di generazione in generazione.

FIGURA 12-12 *Perpetuazione di una mutazione*

La replicazione del DNA può stabilizzare una mutazione (giallo brillante), che sarà così trasmessa alle generazioni successive.

La replicazione del DNA richiede un “macchinario” proteico

I principi generali della replicazione del DNA sono semplici e strettamente correlati al modello proposto da Watson e Crick, ma il processo richiede l'impiego di un complesso molecolare costituito da proteine ed enzimi, che lavorino insieme come una vera e propria “macchina replicativa”. Molti degli aspetti essenziali della replicazione sono universali, tuttavia esistono numerose differenze tra i procarioti e gli eucarioti a causa della diversa organizzazione del DNA in queste cellule. Infatti, nelle cellule batteriche, come per esempio *E. coli*, il DNA si trova come un'unica molecola a doppia elica *circolare*, mentre ogni cromosoma eucariotico non duplicato è costituito da una singola molecola a doppia elica *lineare* associata con proteine. Presentiamo adesso la replicazione del DNA, basata sulla comprensione attuale del processo. Benché si sappia molto della replicazione del DNA, molti aspetti del processo sono ancora oscuri. Ad esempio, nel lievito unicellulare *Saccharomyces cerevisiae*, che è considerato un eucariote relativamente “semplice”, 88 geni sono implicati nella replicazione del DNA! La determinazione dei ruoli di tutti questi geni e delle loro interazioni nel processo di replicazione richiederà gli sforzi protratti nel tempo di numerosi ricercatori.

I due filamenti del DNA devono essere separati durante la replicazione

La replicazione del DNA inizia a livello di siti specifici sulla molecola di DNA, detti origini di replicazione, dove piccoli segmenti della doppia elica si svolgono. Le DNA elicasi sono enzimi che destabilizzano l'elica (ne sono state identificate varie) che si legano al DNA in corrispondenza dell'origine di replicazione e rompono i legami a idrogeno, separando in tal modo i due filamenti (TABELLA 12-3). I due filamenti di DNA si replicano contemporaneamente a livello della giunzione tra i filamenti separati, che è una struttura a forma di Y detta forca di replicazione (vedi fotografia in apertura del capitolo). L'elicasi si muove lungo l'elica aprendo la doppia elica come una chiusura lampo durante il movimento della forca di replicazione. Una volta che i due filamenti sono stati separati, le proteine che legano il singolo filamento (SSB) si legano ai singoli filamenti di DNA e li stabilizzano, evitando in tal modo che si riformi la doppia elica finché non è avvenuta la copiatura. Le proteine SSB impediscono anche l'idrolisi delle regioni a singolo filamento ad opera di altri enzimi (le nucleasi; come sarà discusso più avanti, le *nucleasi* sono coinvolte nella riparazione del DNA).

Watson e Crick affermano che nel loro modello a doppia elica le due catene di DNA sono avvolte fra loro come i fili di una corda e quindi, se si tenta di separare i due fili, la corda potrebbe anch'essa ruotare oppure avvolgersi in spire più strette. Possiamo pensare che eventi simili accadano anche quando i due filamenti

complementari del DNA si separano per la replicazione. Nel momento in cui i filamenti di DNA si separano per la replicazione, in un'altra regione della molecola di DNA si genera un superavvolgimento. Speciali enzimi, chiamati topoisomerasi, operano dei tagli nel DNA e poi saldano i filamenti in modo che siano liberi da superavvolgimenti e da "nodi" che impedirebbero la replicazione. Esistono due modalità con cui le topoisomerasi riducono i superavvolgimenti. Alcune topoisomerasi producono una rottura temporanea nello scheletro polinucleotidico di un singolo filamento di DNA, fanno passare quel filamento attraverso la regione eccessivamente avvolta e quindi risaldano la rottura. Altre topoisomerasi tagliano entrambi i filamenti del DNA, fanno passare una parte dell'elica tra le estremità recise e quindi risaldano la rottura.

Indipendentemente dalle loro modalità di azione, le topoisomerasi conferiscono al DNA in replicazione una configurazione più rilassata.

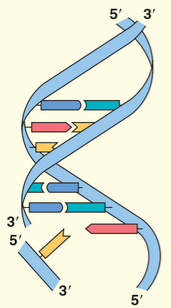
	Enzima	Funzione
	Elicasi	Svolge la doppia elica in corrispondenza delle forche di replicazione rompendo i legami a idrogeno che tengono insieme i due filamenti
	Proteina che lega il singolo filamento (SSB)	Si lega ai singoli filamenti di DNA ed impedisce la riformazione della doppia elica prima che i singoli filamenti siano stati utilizzati come stampo per la replicazione
	Topoisomerasi	Taglia uno o entrambi i filamenti di DNA, evitando l'eccessivo avvolgimento durante la replicazione, e li risalda in una configurazione più rilassata
	DNA polimerasi	Legge le subunità nucleotidiche tra loro per formare un nuovo filamento di DNA a partire da un filamento di DNA stampo
	DNA primasi	Sintetizza tratti di RNA (primer) sul filamento in ritardo. Avvia la replicazione del filamento guida
	DNA ligasi	Legge tra loro i frammenti di Okazaki unendo l'estremità 3' del nuovo frammento di DNA all'estremità 5' del tratto di DNA adiacente

TABELLA 12-3 Le proteine coinvolte nella replicazione del DNA

La sintesi del DNA procede sempre in direzione 5' → 3'

Gli enzimi che catalizzano il legame fra i vari nucleotidi sono chiamati DNA polimerasi; essi sono in grado di aggiungere nucleotidi solamente al terminale 3' di una catena polinucleotidica in corso di sintesi, che deve essere perfettamente appaiata al filamento che viene copiato (FIG. 12-13). Come substrato per la reazione di polimerizzazione vengono utilizzati nucleotidi, o meglio nucleosidi trifosfato. Quando i nucleotidi vengono legati assieme, due gruppi fosfato vengono eliminati; queste reazioni sono fortemente esoergoniche e quindi non richiedono ulteriore energia. Poiché la nuova catena polinucleotidica si allunga attraverso il legame tra il gruppo fosfato in posizione 5' dello zucchero del nucleotide aggiunto e il gruppo ossidrilico in posizione 3' dello zucchero presente all'estremità della catena, il nuovo filamento di DNA cresce sempre in direzione 5' → 3'. Alcune DNA polimerasi sono altamente efficienti nell'aggiunta di nucleotidi alla catena polinucleotidica in crescita. La DNA Pol III, una delle cinque DNA polimerasi che sono state identificate nel batterio *E. coli*, può aggiungere 1.200 nucleotidi al minuto.

La sintesi del DNA necessita di un innesco di RNA

Le DNA polimerasi possono aggiungere nucleotidi solamente all'estremità 3 di una catena polinucleotidica preesistente. Come può allora iniziare la sintesi del DNA una volta che sono stati separati i due filamenti? La risposta è che viene inizialmente sintetizzato, a livello del punto di inizio della replicazione, un piccolo tratto di RNA (in genere costituito da 5-14 nucleotidi) che funziona da innesco (RNA primer) (FIG. 12-14). L'RNA, o acido ribonucleico (vedi Capitoli 3 e 13), è un polimero formato da subunità nucleotidiche che possono appaiarsi per complementarità con il DNA stampo a singolo filamento. L'RNA primer è sintetizzato ad opera di un enzima che prende il nome di DNA primasi, capace di iniziare un nuovo filamento di RNA su un filamento di DNA. Dopo pochi nucleotidi aggiunti, la primasi è spiazzata dalla DNA polimerasi, che può quindi aggiungere le subunità all'estremità 3' del primer di RNA. Successivamente, il primer verrà degradato da enzimi specifici e sostituito da DNA.

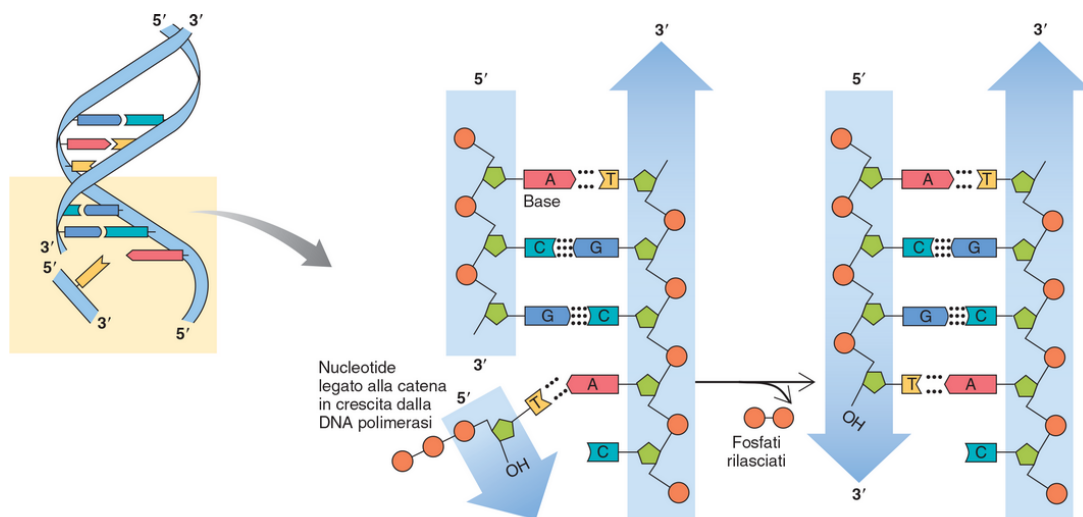


FIGURA 12-13
Una visione semplificata della replicazione del DNA
Un nucleotide alla volta viene aggiunto all'estremità 3' della catena nascente.

PUNTO CHIAVE

La replicazione del DNA richiede diverse fasi che coinvolgono vari enzimi, proteine e inneschi di RNA.

FIGURA 12.14
Due modelli della struttura della membrana

La replicazione del DNA avviene in modo discontinuo su un lamento e continuo sull'altro

L'ostacolo maggiore nel comprendere la duplicazione del DNA sta nel fatto che i due filamenti sono antiparalleli. La sintesi del DNA può procedere solamente in direzione $5' \rightarrow 3'$ (il filamento che viene copiato deve perciò essere letto in direzione $3' \rightarrow 5'$). Si potrebbe quindi pensare che un filamento venga copiato partendo da un'estremità della doppia elica e l'altro partendo dall'estremità opposta. Alcuni virus replicano il loro DNA in questo modo, ma un tale sistema di replicazione risulta essere poco efficiente per le lunghissime molecole di DNA che costituiscono i cromosomi eucariotici.

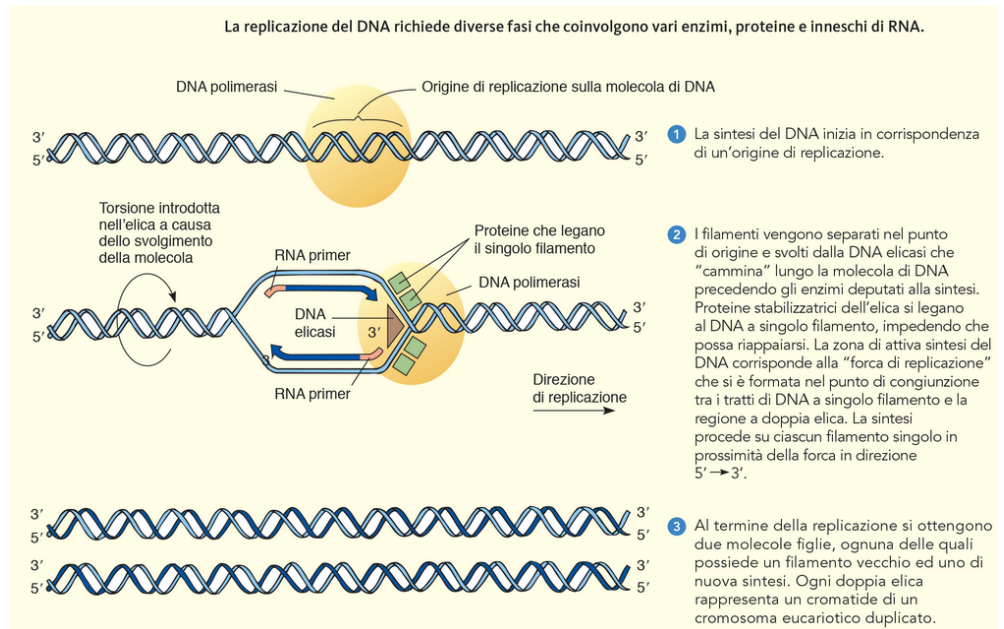
La replicazione inizia a livello delle origini di replicazione, ed entrambi i filamenti vengono replicati contemporaneamente alla forca di replicazione (FIG. 12-15). La posizione della forca di replicazione cambia costantemente al procedere della replicazione. Due molecole identiche di DNA polimerasi sono responsabili della replicazione. L'estremità $3'$ di uno dei nuovi filamenti si allunga sempre verso la forca di replicazione e la sua sintesi procede in maniera continua e senza interruzioni, per cui esso viene chiamato filamento guida o "leading".

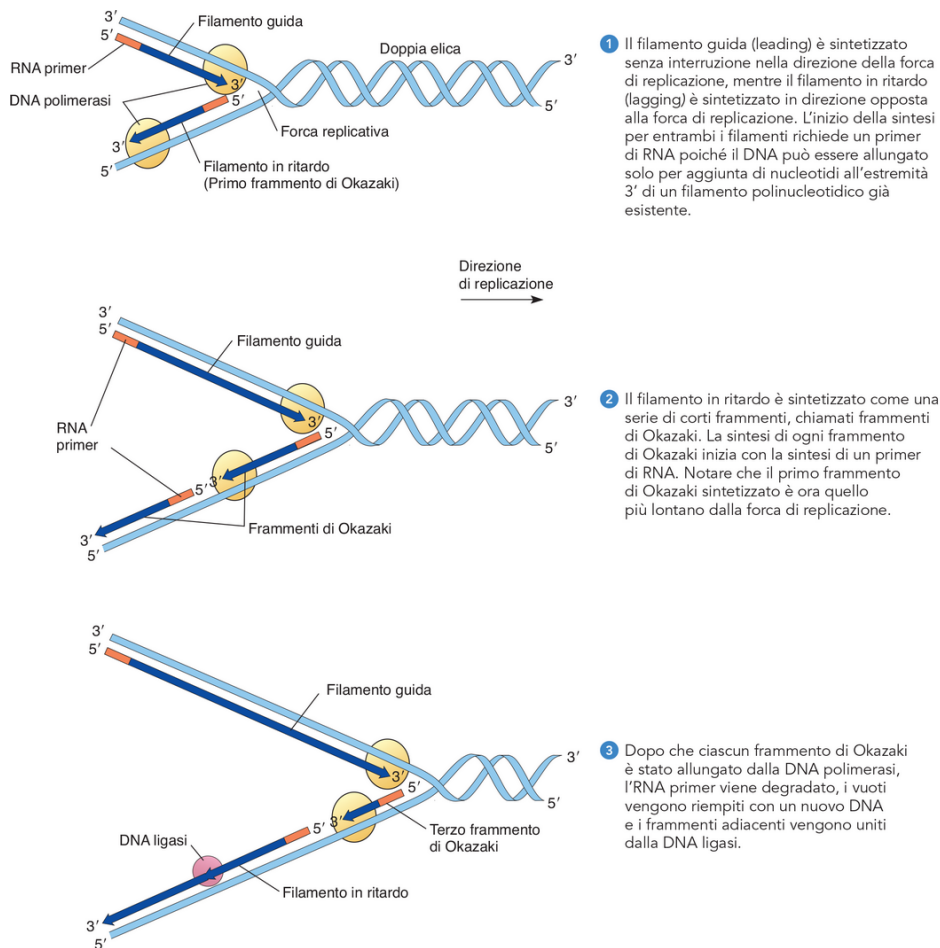
Un'altra molecola di DNA polimerasi (identica alla prima) aggiunge nucleotidi all'estremità $3'$ dell'altro filamento di nuova sintesi, chiamato filamento in ritardo o "lagging", il quale si allunga sempre nella direzione opposta all'avanzamento della forca di replicazione. Possono così essere sintetizzati soltanto dei corti frammenti perché, se la DNA polimerasi aggiungesse continuamente nucleotidi all'estremità $3'$ di tale filamento, dovrebbe allontanarsi di molto dalla forca di replicazione. Questi frammenti di 100-2000 nucleotidi sono chiamati frammenti di Okazaki, dal nome del loro scopritore, il biologo molecolare giapponese Reiji Okazaki.

La DNA primasi catalizza periodicamente la sintesi di un RNA primer sul filamento in ritardo. La sintesi di ogni frammento di Okazaki viene iniziata da un RNA primer e procede verso l'estremità $5'$ del frammento sintetizzato precedentemente dalla DNA polimerasi. Nel momento in cui un frammento di Okazaki neosintetizzato raggiunge quello sintetizzato precedentemente, il primer di quest'ultimo è degradato e rimpiazzato con DNA da parte della DNA polimerasi. Infine, una DNA ligasi riunisce i vari frammenti ricostruendo il legame fosfodiesterico tra l'estremità $3'$ di uno e l'estremità $5'$ dell'altro. (Come si vedrà più avanti, la DNA ligasi risalda anche i legami fosfodiesterici rotti durante la riparazione del DNA).

La sintesi del DNA è bidirezionale

Quando i due filamenti del DNA si separano, si formano due strutture a forcella, per cui la molecola, dal punto di origine, viene replicata in entrambe le direzioni. Le cellule procariotiche, in genere, mostrano nel loro cromosoma circolare un'unica origine di replicazione, così che le due forche di replicazione procedono lungo il cerchio e si incontrano dalla parte opposta, completando la sintesi delle due nuove molecole di DNA. La FIGURA 12-16a mostra un plasmide batterico che si sta replicando. I plasmidi sono piccole molecole di DNA circolare che contengono geni separati da quelli che si trovano sul cromosoma batterico. Poiché i plasmidi sono così più piccoli rispetto al cromosoma batterico, essi possono essere chiaramente fotografati durante la replicazione.





← FIGURA 12-15
I filamenti guida e in ritardo del DNA

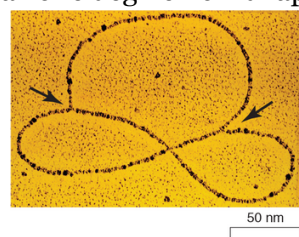
Un cromosoma eucariotico è costituito da una molecola di DNA lineare molto lunga, ma il processo di replicazione è reso più veloce dalla presenza di più origini (FIG. 12-16b). Le due forche che si formano da ciascuna origine di replicazione si muovono in direzione opposta fino ad incontrare le forche originate da siti di replicazione contigui; si ottiene così un cromosoma costituito da due molecole di DNA a doppia elica, ognuna corrispondente ad un cromatidio.

Alcuni enzimi effettuano la correzione di bozze e la riparazione degli errori nel DNA

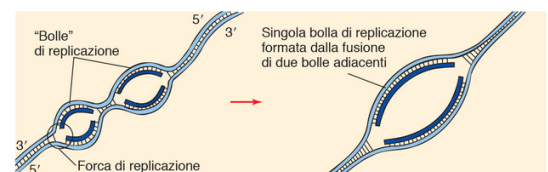
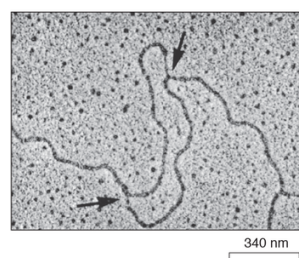
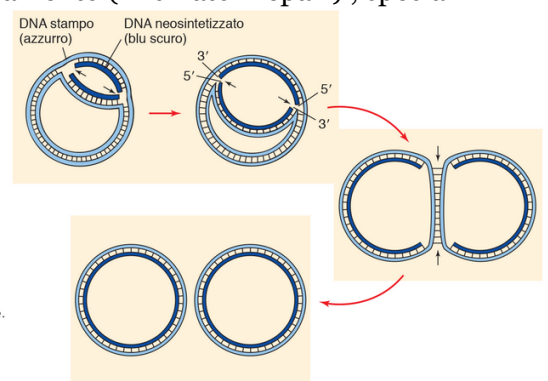
La replicazione del DNA si verifica soltanto una volta in ogni generazione cellulare, ed è importante che tale processo sia il più preciso possibile per evitare la

comparsa di mutazioni dannose, o addirittura letali. Benché l'appaiamento delle basi durante la replicazione del DNA sia molto preciso, si verificano comunque degli errori. Per fortuna, si sono evoluti dei meccanismi che assicurano la correzione degli errori di replicazione. Nel corso della replicazione, le DNA polimerasi effettuano una correzione di bozze per ogni nucleotide aggiunto rispetto al suo nucleotide stampo. Se trova un errore di appaiamento tra le basi, la DNA polimerasi rimuove immediatamente il nucleotide errato ed inserisce quello corretto. Alcune mutazioni restano non corrette, ma sono molto infrequenti, nell'ordine di un errore ogni 10⁹ -10¹⁰ coppie di basi.

Quando restano degli errori non corretti dalle normali attività di riparazione della DNA polimerasi durante la replicazione, le cellule fanno uso di altri meccanismi di riparazione (sebbene non sia chiaro come gli enzimi di riparazione del DNA riescano ad identificare questi rari e spesso subdoli errori nella enorme quantità di DNA normale). Nella riparazione degli errori di appaiamento (mismatch repair) , speciali enzimi riconoscono i nucleotidi appaiati in modo errato e li rimuovono; quindi, le DNA polimerasi inseriscono i nucleotidi mancanti. L'osservazione che gli individui con un difetto ereditario in un enzima del mismatch repair sono suscettibili allo sviluppo di un tipo di cancro del colon dimostra il ruolo cruciale di tali enzimi nell'assicurare la fedeltà della replicazione del DNA da una generazione all'altra.



(a) A sinistra, immagine al microscopio elettronico a trasmissione di un plasmide batterico in corso di replicazione. La maggior parte dei plasmidi e dei cromosomi batterici ha una sola origine di replicazione. La sintesi del DNA inizia in quel punto e procede in entrambe le direzioni, con la formazione di due forche di replicazione (freccie nere) che percorrono il cerchio ed infine si incontrano.



(b) Questa fotografia al microscopio elettronico a trasmissione (MET) mostra due forche di replicazione (freccie nere) in un segmento di un cromosoma eucariotico che è stato parzialmente replicato. I cromosomi eucariotici presentano origini di replicazione multiple. La sintesi del DNA procede in entrambe le direzioni a partire da ciascuna

FIGURA 12-16
La replicazione del DNA è bidirezionale nei procarioti e negli eucarioti
I filamenti guida e i filamenti in ritardo non sono rappresentati in figura.

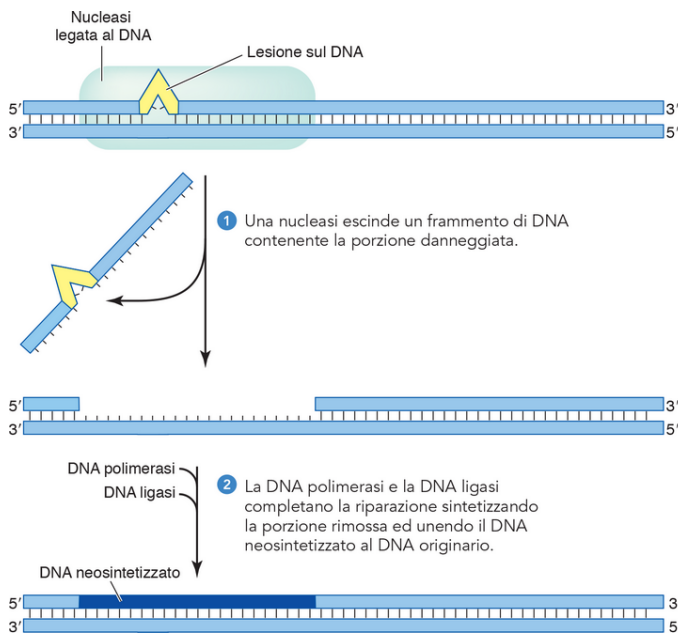
Nel Capitolo 13, scoprirete che alcuni tipi di radiazioni e sostanze chimiche, presenti sia nell'ambiente che all'interno delle cellule stesse, causano mutazioni nel DNA. Tali mutazioni sono quasi sempre deleterie e le cellule solitamente le correggono utilizzando uno o più enzimi di riparazione. Sono stati scoperti circa 100 tipi diversi di enzimi di riparazione nel batterio *E. coli* e circa 130 nelle cellule umane.

Un tipo di riparazione del DNA, "la riparazione per escissione nucleotidica", è comunemente utilizzato per riparare le lesioni nel DNA (DNA deformato) causate dalle radiazioni ultraviolette del sole o da sostanze chimiche dannose (FIG. 12-17). Tre enzimi sono coinvolti nella riparazione per escissione nucleotidica: una nucleasi che escinde il DNA danneggiato, una DNA polimerasi che aggiunge i nucleotidi corretti ed una DNA ligasi che salda le rotture nello scheletro zucchero-fosfato. Gli individui affetti da xeroderma pigmentosum hanno un difetto ereditario in un enzima del sistema di riparazione per escissione nucleotidica. Questi individui sviluppano numerosi tumori della pelle in età precoce, perché le lesioni al DNA causate dalle radiazioni ultraviolette non vengono riparate.

I telomeri "incappucciano" le estremità dei cromosomi eucariotici

A differenza del DNA procariotico, che è circolare, i cromosomi eucariotici hanno estremità libere. Dato il modo discontinuo in cui le DNA polimerasi lavorano sul filamento in ritardo, esse sono incapaci di completare la replicazione accuratamente quando raggiungono l'estremità del DNA e quindi lasciano una piccola porzione non replicata, provocando la perdita di un piccolo segmento di DNA ad ogni ciclo cellulare (FIG. 12-18a).

La situazione è meno pericolosa di quanto si possa pensare, perché i cromosomi hanno "cappucci" terminali, o telomeri, che non contengono geni che codificano per proteine. I telomeri consistono di brevi e semplici sequenze di DNA non codificante, ricche in guanina, ripetute per molte volte (FIG. 12-18b). Ad esempio, negli spermatozoi e nelle cellule uovo umane, la sequenza 5'-TTAGGG-3' è ripetuta più di 1000 volte alle estremità di ogni cromosoma. Per cui, sebbene una piccola quantità di DNA telomerico non si replichi ad ogni divisione cellulare, una cellula può dividersi molte volte prima che cominci a perdere informazioni genetiche essenziali.



← FIGURA 12-17

Riparazione per escissione nucleotidica del DNA danneggiato

Il DNA telomerico può essere allungato da uno speciale enzima della replicazione del DNA, noto come telomerasi. Questo enzima, che è stato scoperto nel 1984 da Carol W. Greider ed Elizabeth H. Blackburn, è in grado di allungare i cromosomi eucariotici aggiungendo sequenze nucleotidiche alle estremità. La telomerasi è tipicamente presente nelle cellule che possono dividersi un numero illimitato di volte, inclusi i protozoi ed altri eucarioti unicellulari e molti tipi di cellule cancerose. Nell'uomo e negli altri mammiferi, la telomerasi attiva è di solito presente nelle cellule della linea germinale (le cellule da cui originano le cellule uovo e gli spermatozoi) e nelle cellule che si dividono rapidamente (come le cellule del sangue, le cellule del rivestimento interno dell'intestino e le cellule della

pelle), ma non nella maggior parte delle cellule somatiche dei tessuti adulti.

Quando la maggior parte delle cellule si divide per attività di riparazione o sostituzione, le estremità dei loro cromosomi si accorciano. È stato dimostrato che nelle cellule cancerose della prostata e del pancreas i telomeri sono insolitamente corti: essi si accorciano fino ad un punto critico, e quindi la telomerasi viene riattivata, e ciò potrebbe spiegare la capacità delle cellule cancerose di proliferare in modo rapido ed incontrollato. L'accorciamento dei telomeri è stato mostrato anche nelle lesioni precancerose di vescica urinaria, mammella, colon, esofago, cavo orale e cervice uterina.

È stato suggerito che la progressiva perdita di DNA ai telomeri possa contribuire all'invecchiamento cellulare e all'apoptosi, cioè la morte programmata della cellula. L'invecchiamento cellulare è stato analizzato fin dagli anni '60, seguendo gli studi pionieristici del biologo americano Leonard Hayflick, il quale mostrò che le normali cellule somatiche umane, cresciute in coltura, perdono la loro capacità di dividersi dopo un certo numero di divisioni cellulari. Inoltre, il numero di divisioni cellulari è determinato dall'età dell'individuo da cui provengono le cellule. Le cellule di un uomo di 70 anni possono dividersi solo da 20 a 30 volte, mentre quelle di un neonato, da 80 a 90 volte.

Le correlazioni tra la capacità delle cellule di andare incontro a divisioni illimitate senza mostrare segni di

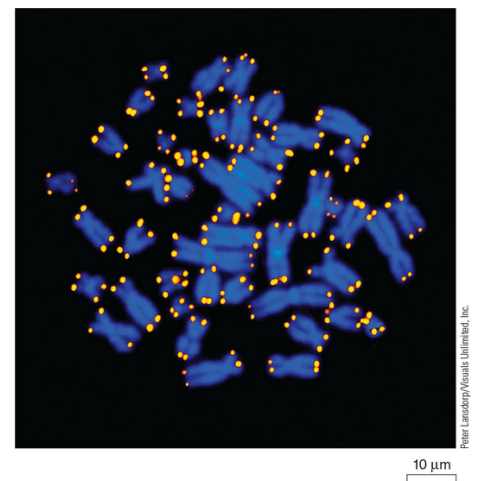
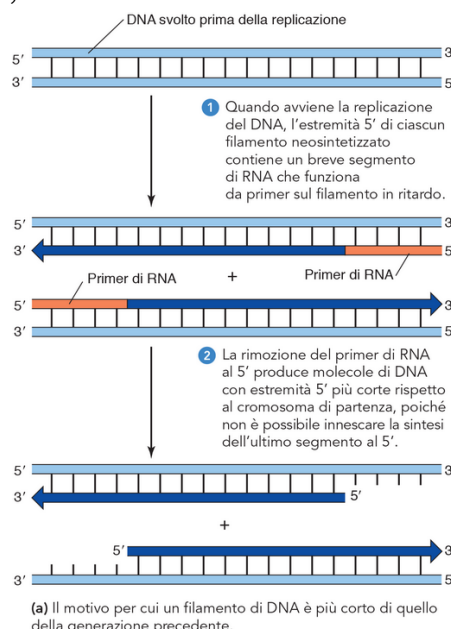
invecchiamento e la presenza dell'attività telomerasica erano state ripetutamente osservate. La prova di una relazione causale, però, non si è resa disponibile finché, nel 2000, Andrea G. Bodnar e i suoi collaboratori alla Geron Corporation si associarono con i ricercatori del Southwestern Medical Center dell'Università del Texas per condurre un test diretto. Utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante (vedi Capitolo 15), essi infettarono cellule umane normali con un virus che portava l'informazione genetica codificante per la subunità catalitica della telomerasi. Non solo le cellule produssero la telomerasi attiva che allungò significativamente i telomeri, ma le cellule continuarono a dividersi anche dopo il momento in cui le divisioni cellulari sarebbero dovute necessariamente cessare.

Questi risultati hanno ravvivato l'interesse per i telomeri e la telomerasi per ragioni teoriche e pratiche. La possibilità di fornire alle cellule la capacità di dividersi molte più volte di quanto non farebbero normalmente presenta molteplici applicazioni terapeutiche, particolarmente nel caso in cui si debbano rimpiazzare cellule perse o danneggiate. Tuttavia, dare alle cellule la possibilità di dividersi in maniera illimitata potrebbe avere anche delle serie conseguenze. Ad esempio, se trapiantate in un organismo umano, le cellule contenenti una telomerasi attiva potrebbero comportarsi come cellule tumorali.

Le cellule tumorali hanno la capacità di dividersi centinaia di volte in coltura; infatti, esse sono virtualmente immortali. La maggior parte delle cellule tumorali, incluse quelle umane del cancro alla mammella, al polmone, al colon, alla prostata e al pancreas, possiede telomerasi per mantenere invariata la lunghezza dei telomeri e probabilmente per resistere all'apoptosi. I ricercatori stanno cercando di sviluppare dei farmaci antitumorali che inibiscano l'attività della telomerasi. Si sta studiando anche un trattamento alternativo per il cancro, che consiste nel riuscire a fare in modo che il sistema immunitario riconosca ed attacchi le cellule tumorali in base al fatto che contengono le telomerasi.

Verifica

- In che modo Meselson e Stahl verificarono che la replicazione del DNA è semiconservativa?
- Perché la replicazione del DNA è continua su un filamento e discontinua sull'altro?
- Fate un confronto tra la riparazione degli errori di appaiamento (mismatch repair) e la riparazione per escissione nucleotidica.



(b) Immagine al microscopio ottico di cromosomi umani con i telomeri marcati con traccianti fluorescenti (gialli).

FIGURA 12-18 I telomeri

SOMMARIO: CONCENTRARSI SUGLI OBIETTIVI DI APPRENDIMENTO

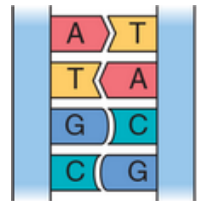
12.1

1. Riassumere le prove accumulate nel periodo tra gli anni '40 e i primi anni '50 a dimostrazione che il DNA è il materiale genetico.
 - Molti tra i primi genetisti pensavano che i geni fossero costituiti da proteine; se da un lato era noto che le proteine erano molecole complesse e molto variabili, si riteneva dall'altro che gli acidi nucleici fossero molecole semplici e con una scarsa capacità di immagazzinare le informazioni.
 - Molte prove sperimentali sostennero l'idea che il DNA (acido desossiribonucleico) fosse il materiale genetico. Negli esperimenti di trasformazione, il DNA di un ceppo batterico può conferire ad un ceppo batterico correlato nuove caratteristiche genetiche.
 - Quando una cellula batterica viene infettata da un batteriofago (virus), solamente il DNA del virus entra nella cellula; questo DNA è sufficiente per consentire al virus di riprodursi e dare origine a nuove particelle virali.
2. Enunciare gli interrogativi a cui i seguenti esperimenti classici hanno fornito una risposta: l'esperimento di trasformazione di Griffith, il contributo di Avery al lavoro di Griffith, gli esperimenti di Hershey-Chase.
 - L'esperimento di trasformazione di Griffith ha fornito una risposta al seguente interrogativo:

- può un tratto genetico essere trasmesso da un ceppo batterico ad un altro? (La risposta è sì).
- Gli esperimenti di Avery hanno fornito una risposta al seguente interrogativo: quale molecola è responsabile della trasformazione batterica? (La risposta è il DNA).
- Gli esperimenti di Hershey-Chase hanno fornito una risposta al seguente interrogativo: il materiale genetico dei batteriofagi (fagi) è costituito da DNA o da proteine? (La risposta è DNA).

12.2

3. Schematizzare come i nucleotidi si legano tra loro per formare un singolo filamento di DNA.
 - Il modello di Watson e Crick della struttura del DNA dimostrò come le informazioni possono essere immagazzinate nella struttura stessa della molecola di DNA e come i filamenti di DNA possono essere utilizzati come stampo per la loro stessa replicazione.
 - Il DNA è un polimero di nucleotidi. Ciascuna subunità nucleotidica contiene una base azotata, che può essere una purina (adenina o guanina) oppure una pirimidina (timina o citosina). Ciascuna base è legata covalentemente ad uno zucchero pentoso, il desossiribosio, che a sua volta è legato covalentemente ad un gruppo fosfato.
 - Lo scheletro di ogni singola catena di DNA è formato dall'alternanza di zuccheri e gruppi fosfato legati mediante legami fosfodiesterici covalenti. Ciascun gruppo fosfato è legato al carbonio 5' di un desossiribosio e al carbonio 3' del desossiribosio contiguo.
4. Illustrare come i due filamenti di DNA sono orientati l'uno rispetto all'altro.
 - Ciascuna molecola di DNA è composta da due catene polinucleotidiche che si associano a costituire una doppia elica. Le due catene sono antiparallele (cioè hanno orientamento opposto); a ciascuna estremità della molecola di DNA, un filamento presenta un gruppo fosfato legato al carbonio 5' del desossiribosio (estremità 5') e l'altro filamento presenta un gruppo ossidrilico legato al carbonio 3' del desossiribosio (estremità 3').
5. Esporre le regole dell'appaiamento delle basi nel DNA e descrivere come si legano tra loro le basi complementari.
 - Le due catene dell'elica sono tenute insieme da legami a idrogeno che si formano tra specifiche coppie di basi. L'adenina (A) forma due legami a idrogeno con la timina (T), mentre la guanina (G) forma tre legami a idrogeno con la citosina (C).
 - L'appaiamento complementare tra le basi A e T e tra le basi C e G è alla base delle regole di Chargaff, che stabiliscono che $A = T$ e $C = G$.
 - Dal momento che i due filamenti di DNA sono tenuti insieme dall'appaiamento complementare tra le basi, è possibile prevedere la sequenza di basi di un filamento se si conosce la sequenza dell'altro.



12.3

6. Citare le prove prodotte dall'esperimento di Meselson e Stahl che hanno portato gli studiosi a distinguere tra la replicazione semiconservativa del DNA e i modelli alternativi.
 - Quando cellule di *E. coli* sono fatte crescere per molte generazioni in un mezzo contenente azoto pesante (^{15}N), esse lo incorporano nel proprio DNA. Quando le cellule sono trasferite dal mezzo ^{15}N ad un mezzo ^{14}N ed isolate dopo una o due generazioni, la densità del DNA di ciascun gruppo è quella che ci si aspetta nel caso in cui la replicazione sia semiconservativa. Nella replicazione semiconservativa, ciascuna doppia elica figlia contiene un filamento che deriva dalla molecola parentale ed uno di nuova sintesi.
7. Riassumere come si replica il DNA ed identificare alcuni aspetti peculiari del processo.
 - Durante la replicazione del DNA, i due filamenti della doppia elica si svolgono e ciascun filamento serve da stampo per la sintesi del nuovo filamento complementare. La replicazione ha inizio quando la DNA primasi sintetizza un corto RNA primer. Quindi, la DNA polimerasi aggiunge nuove subunità nucleotidiche alla catena di DNA in allungamento.
 - Altri enzimi e proteine sono necessari per svolgere l'elica e stabilizzare i due filamenti separati. Le DNA elicasi svolgono la doppia elica e le topoisomerasi impediscono la formazione di grovigli e nodi.
8. Spiegare le complessità della replicazione del DNA che la rendono (a) bidirezionale e (b) continua su un filamento e discontinua sull'altro.
 - La replicazione del DNA è bidirezionale; inizia in un punto che prende il nome di origine di replicazione e da lì procede nelle due direzioni opposte. Un cromosoma eucariotico può avere più origini di replicazione; quindi, la sintesi del DNA può avvenire in più punti contemporaneamente.
 - La sintesi del DNA procede sempre in direzione $5' \rightarrow 3'$. Ciò richiede che un filamento (filamento in ritardo) sia sintetizzato in modo discontinuo, cioè in piccoli tratti chiamati frammenti di Okazaki. La DNA primasi sintetizza corti RNA primer sul filamento in ritardo.

e la DNA ligasi lega insieme i frammenti di Okazaki del DNA neosintetizzato. Il filamento antiparallelo (filamento guida) viene invece sintetizzato in maniera continua.

9. Spiegare in che modo gli enzimi effettuano la correzione delle bozze e la riparazione degli errori nel DNA.

- Durante la replicazione, le DNA polimerasi effettuano una correzione di bozze ad ogni nucleotide aggiunto rispetto al suo nucleotide stampo. Quando trova un errore nell'appaiamento delle basi, la DNA polimerasi rimuove immediatamente il nucleotide errato ed inserisce quello corretto.
- Nella riparazione degli errori di appaiamento (mismatch repair), degli enzimi riconoscono i nucleotidi appaiati in modo errato e li rimuovono; le DNA polimerasi quindi inseriscono i nucleotidi mancanti.
- La riparazione per escissione nucleotidica è comunemente utilizzata per riparare le lesioni al DNA causate dalle radiazioni ultraviolette del sole o da sostanze chimiche dannose. Tre sono gli enzimi coinvolti: una nucleasi che escinde il DNA danneggiato, una DNA polimerasi che aggiunge i nucleotidi corretti ed una DNA ligasi che salda le rotture nello scheletro zuccherofosfato.

10. Definire il termine telomero; descrivere le possibili correlazioni tra telomerasi e invecchiamento cellulare e tra telomerasi e cancro.

- Le estremità dei cromosomi eucariotici, chiamate telomeri, sono brevi sequenze ripetute di DNA non codificante. I telomeri si accorciano un po' ad ogni divisione cellulare, ma possono essere allungati dall'enzima telomerasi.
- In alcune cellule, la mancanza di attività telomerasica può essere la causa dell'invecchiamento cellulare, per cui le cellule perdono la capacità di dividersi dopo un certo numero di divisioni.
- La maggior parte delle cellule tumorali, incluse quelle umane del cancro alla mammella, al polmone, al colon, alla prostata e al pancreas, posseggono telomerasi per mantenere intatta la lunghezza dei telomeri e probabilmente per resistere all'apoptosi.

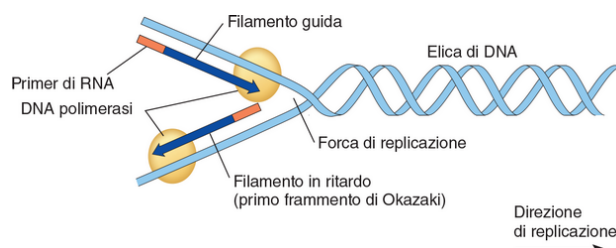
AUTOVERIFICHE

1. Quando Griffith iniettò in un topo una miscela di pneumococchi vivi di un ceppo rugoso e di pneumococchi uccisi al calore di un ceppo liscio, scoprì che: (a) il topo non subiva alcun danno; (b) il topo morto conteneva batteri vivi del ceppo rugoso; (c) il topo morto conteneva batteri vivi del ceppo liscio; (d) i batteri del ceppo liscio avevano trasferito il loro DNA al topo; (e) i batteri del ceppo rugoso avevano trasferito il loro DNA ai batteri del ceppo liscio.
2. Quale delle seguenti considerazioni hanno spinto Avery e i suoi collaboratori a fare gli esperimenti che hanno dimostrato che il fattore trasformante nei batteri è il DNA? (a) Il fatto che $A = T$ e $G = C$; (b) il modello della struttura del DNA di Watson e Crick; (c) gli studi di Meselson e Stahl sulla replicazione del DNA in *E. coli*; (d) gli esperimenti di Griffith sui ceppi di pneumococchi lisci e rugosi; (e) gli esperimenti di Hershey e Chase sulla riproduzione dei batteriofagi.
3. Nell'esperimento di Hershey e Chase con i batteriofagi: (a) i batteri si trasformano in cellule virulente; (b) si dimostra che il DNA è il fattore trasformante visto in precedenti esperimenti di trasformazione batterica; (c) si dimostra che la replicazione è semiconservativa; (d) si dimostra che il DNA virale entra nelle cellule batteriche ed è responsabile della produzione di nuove particelle virali; (e) i virus iniettano, nelle cellule batteriche, le proteine ma non il DNA.
4. I due filamenti complementari della doppia elica di DNA sono tenuti insieme da: (a) legami ionici tra le molecole di desossiribosio; (b) legami ionici tra i gruppi fosfato; (c) legami covalenti tra le basi dei nucleotidi; (d) legami covalenti tra le molecole di desossiribosio; (e) legami a idrogeno tra le basi dei nucleotidi.
5. Se un segmento di DNA ha la sequenza, il segmento complementare di DNA ha la sequenza:
6. Ciascun filamento di DNA ha uno scheletro che consiste in un'alternanza di: (a) purine e pirimidine; (b) basi nucleotidiche; (c) legami a idrogeno e legami fosfodiesterici; (d) desossiribosio e fosfato; (e) fosfato e legami fosfodiesterici.
7. Gli esperimenti in cui Meselson e Stahl hanno fatto crescere i batteri in presenza di azoto pesante hanno definitivamente dimostrato che il DNA: (a) è una doppia elica; (b) si replica in modo semiconservativo; (c) è costituito da subunità nucleotidiche; (d) presenta un appaiamento complementare delle basi; (e) è sempre sintetizzato in direzione $5' \rightarrow 3'$.
8. L'affermazione "il DNA si replica con un meccanismo semiconservativo" significa che: (a) solo un filamento di DNA è copiato; (b) prima è copiato un filamento e poi è copiato l'altro filamento; (c) i due filamenti di una doppia elica hanno un'identica sequenza di basi; (d) alcune parti di un singolo filamento di DNA sono vecchie mentre altre parti sono di nuova sintesi; (e) ciascuna doppia elica è costituita da un filamento vecchio e da uno di nuova sintesi.

9. Le topoisomerasi: (a) sintetizzano il DNA; (b) sintetizzano i primer di RNA; (c) uniscono i frammenti di Okazaki; (d) tagliano e riuniscono il DNA per ridurre la tensione torsionale; (e) impediscono che i singoli filamenti di DNA si riassocino per formare una doppia elica.
10. Un filamento in ritardo è formato: (a) unendo i primer; (b) unendo i frammenti di Okazaki; (c) unendo i filamenti guida; (d) rompendo un filamento guida; (e) unendo i primer, i frammenti di Okazaki e i filamenti guida.
11. La fonte immediata di energia per la replicazione del DNA è: (a) l'idrolisi dei nucleotidi con tre gruppi fosfato; (b) l'ossidazione del NADPH; (c) l'idrolisi di ATP; (d) il trasporto di elettroni; (e) la rottura di legami a idrogeno.
12. Quale delle seguenti affermazioni relative ai cromosomi eucariotici è falsa ? (a) I cromosomi eucariotici hanno estremità libere; (b) i telomeri contengono geni codificanti per proteine; (c) la telomerasi allunga il DNA telomerico; (d) l'accorciamento dei telomeri può contribuire all'invecchiamento cellulare; (e) le cellule con telomerasi attive possono andare incontro a numerose divisioni cellulari. $5' - \text{CATTAC} - 3'$

PENSIERO CRITICO

1. Quali caratteristiche deve avere una molecola per poter essere depositaria dell'informazione genetica?
2. Quali importanti caratteristiche della struttura del DNA sono congrue con il suo ruolo di base chimica dell'ereditarietà?
3. Da che cosa i telomeri proteggono le estremità dei cromosomi?
4. ANALISI DEI DATI . Nell'esperimento di Hershey-Chase, l'isotopo radioattivo ^{32}P era presente nelle cellule batteriche (nel pellet), mentre l'isotopo radioattivo ^{35}S veniva ritrovato all'esterno delle cellule batteriche (nel soprannatante). Cosa avrebbero dovuto concludere i ricercatori nel caso fosse stato vero il contrario — ovvero se l'isotopo radioattivo ^{35}S fosse stato all'interno delle cellule e l'isotopo radioattivo ^{32}P fosse rimasto all'esterno?
5. ANALISI DEI DATI . Nello schema seguente della replicazione del DNA, evidenziate le estremità $3'$ e $5'$ del filamento guida, del filamento in ritardo e dei due filamenti della doppia elica di DNA.
6. CONNESSIONE EVOLUTIVA . In che modo il fatto che il DNA è la molecola universale dell'ereditarietà in tutte le cellule supporta la teoria evuzionistica?



DNA: il depositario dell'informazione genetica

Articolo I. Espressione genica

13

Nel capitolo precedente, abbiamo detto che le informazioni sono immagazzinate nelle molecole di DNA ed abbiamo anche visto come le cellule replichino in modo accurato le sequenze nucleotidiche così che possano essere accuratamente trasmesse alle generazioni successive. È noto ormai che le caratteristiche fondamentali della doppia elica del DNA, descritte in origine da Watson e Crick, sono praticamente le stesse in tutte le cellule, dai batteri all'uomo.

Alla metà degli anni '50, divenne evidente che le informazioni genetiche contenute nella sequenza di basi del DNA rappresentano il punto di partenza per la sintesi di tutte le proteine necessarie alla cellula; tuttavia, trascorse più di un decennio dalla pubblicazione del famoso articolo di Watson e Crick prima che i ricercatori capissero come le cellule fossero capaci di convertire l'informazione del DNA nella sequenza di aminoacidi delle proteine. Molte scoperte derivarono da studi sul funzionamento dei geni batterici. Dopo la scoperta della struttura del DNA, le cellule procariotiche furono considerate le più adatte per effettuare queste ricerche, in quanto era possibile farle crescere velocemente e facilmente, nonché per la loro caratteristica di contenere minime quantità di DNA necessarie per la crescita e la riproduzione cellulare. La validità e l'utilità di questo approccio sono state ripetutamente confermate, dal momento che i ricercatori hanno compreso che tutti gli organismi condividono somiglianze genetiche fondamentali. In questo capitolo esamineremo inizialmente le prove sperimentali, accumulate nella prima metà del

ventesimo secolo, che la maggior parte dei geni specifica la struttura delle proteine. Poi considereremo come il DNA a livello molecolare sia in grado di influenzare il fenotipo degli organismi, con un processo noto come espressione genica. L'espressione genica è una complessa serie di eventi attraverso cui l'informazione contenuta nella sequenza di basi del DNA è decodificata ed utilizzata per specificare la costruzione delle proteine di una cellula. Le proteine prodotte influiscono sul fenotipo in modi diversi; questi effetti possono andare da un tratto fisico prontamente visibile, al più fine cambiamento rilevabile soltanto a livello biochimico. La prima tappa dell'espressione genica è la trascrizione, ovvero la sintesi delle molecole di RNA complementari al DNA (vedi fotografia). La seconda tappa importante dell'espressione genica è la traduzione, durante la quale l'RNA è utilizzato come stampo per la sintesi del polipeptide.

13.1 LA SCOPERTA DELLA RELAZIONE GENE-PROTEINA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

1. Riassumere le prove iniziali riguardo al fatto che la maggior parte dei geni specifica la struttura delle proteine.
2. Descrivere gli esperimenti di Beadle e Tatum su *Neurospora*.

L'idea che esistesse un legame fra proteine e geni nasce agli inizi del ventesimo secolo, subito dopo la riscoperta delle leggi di Mendel da parte di nuovi ricercatori. Nella prima edizione del suo libro *Errori congeniti del metabolismo* (1908), il fisico e biochimico Archibald Garrod descrisse una malattia genetica chiamata alcaptonuria, che presentava un modello di ereditarietà autosomica recessiva semplice. Tale condizione coinvolge la via metabolica che degrada l'aminoacido tirosina, convertendolo alla fine in anidride carbonica ed acqua. Le urine degli individui affetti accumulano un intermedio di questa via, l'acido omogentisico, che le rende scure quando esposte all'aria (FIG. 13-1). Altri sintomi dell'alcaptonuria sono lo sviluppo di artrite e, negli uomini, calcoli alla prostata.

In quel periodo gli enzimi erano noti ma la loro natura proteica non era ancora stata stabilita. Garrod ipotizzò che le persone affette da alcaptonuria fossero prive dell'enzima in grado di ossidare l'acido omogentisico. Prima che fosse pubblicata la seconda edizione del suo libro, nel 1923, si scoprì in effetti che le persone affette da questa patologia erano davvero prive dell'enzima che ossida l'acido omogentisico.

L'ipotesi di Garrod era corretta: la mutazione di un gene poteva essere associata all'assenza di uno specifico enzima. Poco dopo, nel 1926, il biochimico statunitense James Sumner purificò un enzima diverso, l'ureasi, e dimostrò che era una proteina; questa scoperta fu la prima chiara dimostrazione che gli enzimi sono proteine. Nel 1946 Sumner fu insignito del premio Nobel per la Chimica, essendo stato il primo a cristallizzare un enzima.

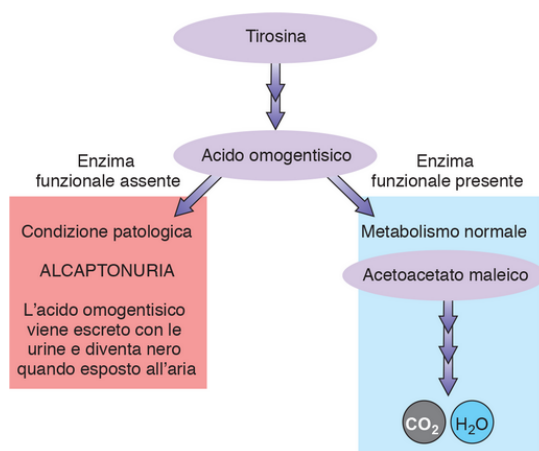


FIGURA 13-1 Un "errore congenito del metabolismo"

Garrod ipotizzò che l'alcaptonuria fosse una malattia genetica causata dall'assenza dell'enzima acido omogentisico ossidasi, che normalmente converte l'acido omogentisico in acetoacetato maleico. L'acido omogentisico si accumula così nel sangue e successivamente viene escreto attraverso le urine, che diventano nere a contatto con l'aria.

Beadle e Tatum proposero l'ipotesi un gene-un enzima

Un ulteriore progresso nella comprensione delle relazioni fra geni ed enzimi si ebbe nei primi anni '40, quando i genetisti americani George Beadle ed Edward Tatum affrontarono il problema da un altro punto di vista. Fino ad allora la maggior parte degli sforzi si era concentrata sullo studio di loci correlati a fenotipi conosciuti nel tentativo di determinare quali reazioni biochimiche essi governassero. I ricercatori studiavano geni già identificati, come quelli che determinano il colore degli occhi in *Drosophila* oppure i pigmenti nelle piante, scoprendo così che tali caratteri sono controllati da una serie di reazioni biosintetiche. Quello che i ricercatori non erano ancora riusciti a chiarire era se i geni stessi agivano da enzimi o se, tramite un meccanismo più complesso, erano in grado di controllarne il funzionamento in via indiretta.

Beadle e Tatum capovolsero il problema. Anziché tentare di identificare gli enzimi controllati da singoli geni, decisero di cercare mutazioni che interferivano con reazioni metaboliche note per la sintesi di componenti essenziali, come aminoacidi e vitamine. Essi utilizzarono per i loro studi la muffa del pane *Neurospora*, sulla base di alcune importanti caratteristiche di questo organismo. Prima di tutto, il ceppo selvatico (wild-type) di *Neurospora* è facilmente coltivato in laboratorio in coltura cellulare; l'aggettivo wild-type (selvatico) si riferisce ad un individuo con fenotipo normale. *Neurospora*, quando viene fatta

crescere in un mezzo di coltura minimo contenente zucchero, sali e la vitamina biotina, è in grado di fabbricare tutte le molecole biologiche fondamentali per la sua sopravvivenza. Un ceppo mutante che non sia in grado di sintetizzare una sostanza, come per esempio un aminoacido, può ugualmente crescere se tale sostanza viene aggiunta semplicemente al terreno minimo.

In secondo luogo, *Neurospora* è un organismo ideale a livello sperimentale in quanto cresce principalmente come organismo aploide; perciò, una mutazione recessiva in un gene può essere immediatamente identificata in quanto la sua espressione non viene mascherata dall'allele normale presente nel cromosoma omologo.

Beadle e Tatum iniziarono esponendo migliaia di spore aploidi asessuate di *Neurospora* selvatica (wild-type) ai raggi X o alle radiazioni ultraviolette per ottenere ceppi mutanti. Ogni ceppo irradiato venne inizialmente cresciuto in terreno completo, che conteneva tutti gli aminoacidi e le vitamine che la *Neurospora* normalmente produce. Successivamente ogni ceppo venne coltivato sul terreno minimo descritto in precedenza. Circa l'1-2% dei ceppi che crescevano sul terreno completo non crescevano se trasferiti sul terreno minimo. Beadle e Tatum ipotizzarono che questi ceppi portassero una mutazione che li rendeva incapaci di produrre uno dei componenti necessari per la crescita. Un'ulteriore analisi dei ceppi mutanti fatti crescere su terreni contenenti varie combinazioni di aminoacidi, vitamine e altri nutrienti permise ai ricercatori di determinare quale composto fosse richiesto per la crescita (FIG. 13-2).

Il lavoro su *Neurospora* rivelò che ciascun ceppo mutante presentava una mutazione in un solo locus genico e che ciascun gene influenzava solo un enzima. Questa corrispondenza univoca fra geni ed enzimi fu schematizzata nell'ipotesi: **un gene un enzima**. Nel 1958 Beadle e Tatum furono insigniti del premio Nobel per la Medicina grazie alla scoperta che i geni regolano specifici eventi chimici. Le scoperte di Beadle e Tatum e di altri scienziati aumentarono le conoscenze sulle caratteristiche dei geni e la loro natura chimica. L'idea che un gene codificasse l'informazione richiesta per produrre un singolo enzima rimase in voga circa un decennio, fino a quando ulteriori scoperte scientifiche costrinsero a modificare la definizione appena descritta.

Alla fine degli anni '40, era divenuto evidente che i geni controllavano non solo gli enzimi, ma anche altre proteine. Nel 1949 il chimico statunitense Linus Pauling e i suoi collaboratori riuscirono a dimostrare che la struttura dell'emoglobina può essere alterata da una mutazione in un singolo gene. Questa particolare forma mutante di emoglobina è associata ad una malattia genetica, l'anemia falciforme (discussa nel Capitolo 16). Nel 1957, il biochimico britannico Vernon Ingram estese la ricerca di Pauling dimostrando che le differenze tra emoglobina normale ed emoglobina falcemica erano dovute alla sostituzione di un singolo aminoacido.

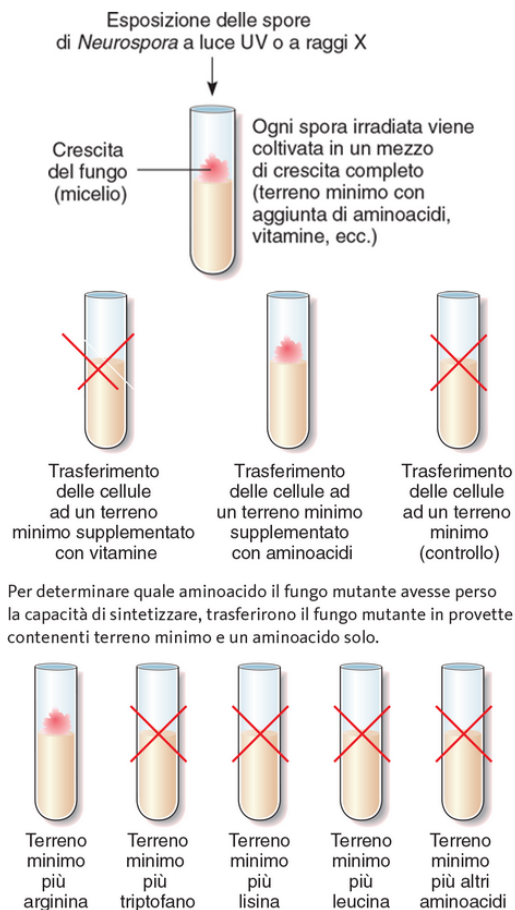
Inoltre, vari studi mostrarono che molte proteine sono costituite da 2 o più catene polipeptidiche, ognuna delle quali può essere controllata da un locus differso. Per esempio, l'emoglobina contiene 2 tipi di catene polipeptidiche, le subunità alfa e le beta (vedi la struttura dell'emoglobina in Fig. 3-22a). L'anemia falciforme è dovuta ad una mutazione che altera le subunità beta.

La definizione di gene è stata quindi estesa per affermare che un gene codifica una catena polipeptidica; anche questa definizione è solo parzialmente corretta, benché ancora oggi, come vedremo meglio nel prosieguo del capitolo, continuiamo a definire un gene in termini del suo prodotto.

Sebbene l'elegante lavoro di Beadle, Tatum ed altri avesse dimostrato che i geni sono espressi in forma di proteine, il meccanismo dell'espressione genica restava completamente sconosciuto. In seguito alla scoperta da parte di Watson e Crick della struttura del DNA, numerosi ricercatori cominciarono a dedicarsi alla comprensione dell'esatta modalità con cui si verifica l'espressione genica. Cominceremo con una visione generale dell'espressione genica e in seguito ne considereremo in dettaglio i vari passaggi.

Verifica

- In cosa consiste l'ipotesi un gene-un enzima?
- Quali sono stati i contributi di ciascuno degli scienziati A. Garrod, G. Beadle ed E. Tatum, L. Pauling, alla comprensione della relazione tra geni e proteine?



In questo esempio, soltanto il terreno contenente l'aminoacido arginina acidica permette la crescita, indicando che la mutazione ha colpito una parte del percorso di biosintesi dell'arginina. Beadle e Tatum quindi identificarono l'enzima che catalizza il passaggio che era bloccato nella sintesi di arginina. Sulla base di molti esperimenti simili, conclusero che ogni gene controlla la produzione di un singolo enzima.

ESPERIMENTO CHIAVE

PORSI DOMANDE CRITICHE

I geni possono codificare per enzimi?

SVILUPPARE UN'IPOTESI:

Le mutazioni indotte nella muffa del pane corrispondono all'assenza di enzimi funzionali.

EFFETTUARE ESPERIMENTI: Beadle e Tatum irradiarono spore di *Neurospora* per ottenere mutazioni. Le singole spore furono poste in coltura in un mezzo completo contenente tutti gli aminoacidi, le vitamine e gli altri nutrienti che sono in genere sintetizzati da *Neurospora*. Essi identificarono le esigenze nutrizionali dei ceppi mutanti in base alla loro capacità di crescita in terreno minimo a cui venivano aggiunti singoli aminoacidi o vitamine.

FIGURA 13-2

Gli esperimenti di Beadle-Tatum

13.2 L'INFORMAZIONE FLUISCE DAL DNA ALLE PROTEINE: una visione d'insieme

OBBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

3. Descrivere il flusso dell'informazione genetica nelle cellule, dal DNA all'RNA ai polipeptidi.
4. Confrontare le strutture del DNA e dell'RNA.
5. Spiegare perché il codice genetico viene definito ridondante e praticamente universale e discutere come queste caratteristiche possano rifletterne la storia evolutiva.

Anche se la sequenza di basi del DNA determina la sequenza degli aminoacidi nelle proteine, l'informazione contenuta nel DNA non è usata direttamente dalla cellula; infatti, un altro acido nucleico, l'RNA o acido ribonucleico, funge da intermediario tra il DNA e le proteine. Quando un gene codificante una proteina è espresso, si forma prima RNA come copia dell'informazione contenuta nel DNA. È questo RNA che fornisce l'informazione per dirigere la sintesi proteica.

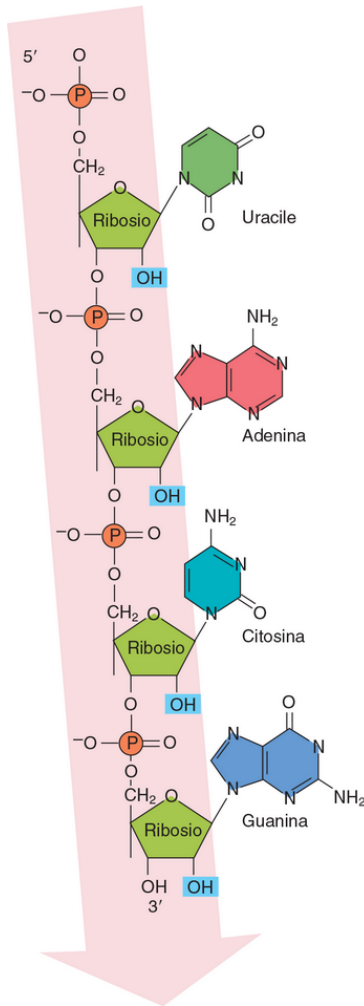
Come il DNA, anche l'RNA è un polimero di nucleotidi, ma presenta alcune importanti differenze (FIG. 13-3). L'RNA è di solito a singolo filamento, anche se a volte regioni interne di alcuni RNA possono contenere sequenze complementari che si ripiegano e si appaiano dando origine a brevi tratti a doppio filamento. Come mostra la Figura 13-3, nell'RNA lo zucchero è il ribosio, che è simile al desossiribosio del DNA ma con un gruppo ossidrilico in più in posizione 2'. (Si paragoni il ribosio con il desossiribosio del DNA, mostrato in Fig. 12-3; quest'ultimo in posizione 2' presenta soltanto un atomo di idrogeno). La base uracile sostituisce la timina. L'uracile, come la timina, è una pirimidina e può formare due legami a idrogeno con l'adenina; quindi, uracile e adenina sono una coppia di basi complementari.

Il DNA è trascritto per sintetizzare l'RNA

Il processo con il quale avviene la sintesi dell'RNA assomiglia alla replicazione del DNA, in quanto la sequenza delle basi nel filamento di RNA è determinata dall'appaiamento di basi complementari con uno

dei due filamenti del DNA, definito filamento stampo o filamento trascritto (FIG. 13-4). Poiché la sintesi di RNA consiste nel copiare l'informazione contenuta in un tipo di acido nucleico (DNA) in un altro acido nucleico (RNA), definiamo questo processo trascrizione.

Sono trascritti tre tipi specifici di molecole di RNA: RNA messaggero, RNA di trasferimento ed RNA ribosomale. L' RNA messaggero (mRNA) consiste in un singolo filamento che porta l'informazione per la sintesi di una proteina. Ciascuno dei circa 45 RNA di trasferimento (tRNA), anche detti RNA transfer, consiste in un singolo filamento che si ripiega su se stesso per assumere una forma specifica. Ogni tRNA si lega esclusivamente ad uno specifico aminoacido e lo trasporta al **ribosoma**. (Dal momento che esistono più tipi di molecole di tRNA di quanti siano gli aminoacidi, molti aminoacidi sono trasportati da due o più tipi di tRNA). L' RNA ribosomale (rRNA), che si trova in forma globulare, rappresenta una porzione importante della struttura dei ribosomi e presenta funzioni catalitiche essenziali nel corso della sintesi proteica.



← FIGURA 13-3 La struttura nucleotidica dell'RNA

Le subunità nucleotidiche dell'RNA sono unite da legami fosfodiesterici 5' → 3', come nel DNA. Sono presenti l'adenina, la guanina e la citosina, come nel DNA, mentre l'uracile rimpiazza la timina. Tutti e quattro i nucleotidi contengono lo zucchero ribosio a cinque atomi di carbonio, che ha un gruppo ossidrilico (in blu) sul carbonio in posizione 2'.

L'RNA è tradotto per sintetizzare un polipeptide

La Figura 13-4 mostra anche il secondo passaggio dell'espressione genica, con cui l'informazione trascritta nell'mRNA è utilizzata per specificare la sequenza degli aminoacidi di un polipeptide. Questo processo è chiamato traduzione in quanto è la trasformazione del "linguaggio a nucleotidi" presente nell'mRNA nel "linguaggio ad aminoacidi" della proteina.

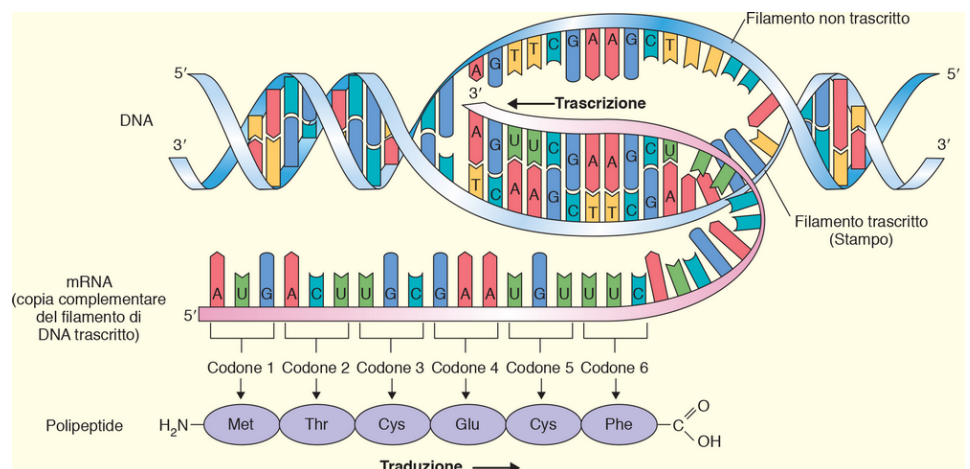
Una sequenza di tre basi consecutive nell'mRNA, chiamata codone, specifica per un aminoacido. Per esempio, un codone che corrisponde all'aminoacido fenilalanina è 5'—UUC—3'. Dal momento che ciascun codone richiede tre nucleotidi, il codice è chiamato codice a triplette. L'insieme dei codoni per gli aminoacidi e per i segnali di inizio e di terminazione della sintesi costituisce il codice genetico (FIG. 13-5).

PUNTO CHIAVE La sintesi proteica richiede due passaggi fondamentali:

DNA $\xrightarrow{\text{trascrizione}}$ RNA $\xrightarrow{\text{trascrizione}}$ proteina

FIGURA 13-4 Una visione d'insieme della trascrizione e della traduzione

Nella trascrizione, viene sintetizzato un RNA messaggero che è la specificare la sequenza lineare degli aminoacidi nella catena polipeptidica complementare di uno dei due filamenti del DNA, il filamento dica. La traduzione richiede tRNA e ribosomi (non mostrati). La figura stampo. L'mRNA porta l'informazione genetica sotto forma di gruppi rappresenta la trascrizione e la traduzione nei batteri. Negli eucarioti, di tre basi, chiamati codoni, ognuno dei quali specifica un aminoacido. La



trascrizione avviene nel nucleo, mentre la traduzione si verifica nel I codoni dell'RNA messaggero sono tradotti uno dopo l'altro, così da citoplasma.

Gli RNA di trasferimento (tRNA) sono componenti critici del macchinario decodificante; ciascun tRNA è un "adattatore" molecolare che connette gli aminoacidi e gli acidi nucleici, in quanto può: (1) legarsi con un aminoacido specifico e (2) riconoscere sull'mRNA il codone corrispondente a quel determinato aminoacido

(FIG. 13-6). Il riconoscimento del codone è possibile perché ciascun tRNA ha una sequenza di tre basi, chiamata anticodone , che si associa mediante legami a idrogeno al codone corrispondente sull'mRNA con un meccanismo di complementarità. Nel nostro esempio, l'esatto anticodone per la fenilalanina è 3'—AAG—5'.

La traduzione richiede che: (1) gli anticodoni del tRNA siano legati mediante legami a idrogeno al codone complementare presente sull'mRNA e (2) gli aminoacidi portati dai tRNA siano uniti insieme nell'ordine specificato dall'mRNA. A ciò provvedono i ribosomi , organuli complessi costituiti da due differenti subunità, contenenti ciascuna varie proteine ed rRNA (vedi Capitolo 4 per la descrizione della struttura e funzione dei ribosomi). I ribosomi si attaccano all'estremità 5' dell'mRNA e, scorrendo lungo il messaggero, permettono ai tRNA di legarsi in sequenza ai codoni dell'mRNA. In tal modo, gli aminoacidi vengono posizionati correttamente e legati tra loro nella giusta sequenza, tramite **legami peptidici**, per formare un polipeptide.

		Seconda lettera					
		U	C	A	G		
Prima lettera (estremità 5')	U	UUU Phe UUC — UUA Leu UUG —	UCU — UCC Ser UCA — UCG —	UAU Tyr UAC — UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC — UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU — CUC Leu CUA — CUG —	CCU — CCC Pro CCA — CCG —	CAU His CAC — CAA Gln CAG —	CGU — CGC Arg CGA — CGG —	U C A G	
	A	AUU Ile AUC — AUA — AUG Met o start	ACU — ACC Thr ACA — ACG —	AAU Asn AAC — AAA Lys AAG —	AGU Ser AGC — AGA Arg AGG —	U C A G	
	G	GUU Val GUC — GUA — GUG —	GCU Ala GCC — GCA — GCG —	GAU Asp GAC — GAA Glu GAG —	GGU Gly GGC — GGA — GGG —	U C A G	

= Codone di stop (di terminazione)

= Codone di start (di inizio)

■ = Codone di stop (di terminazione)
■ = Codone di start (di inizio)

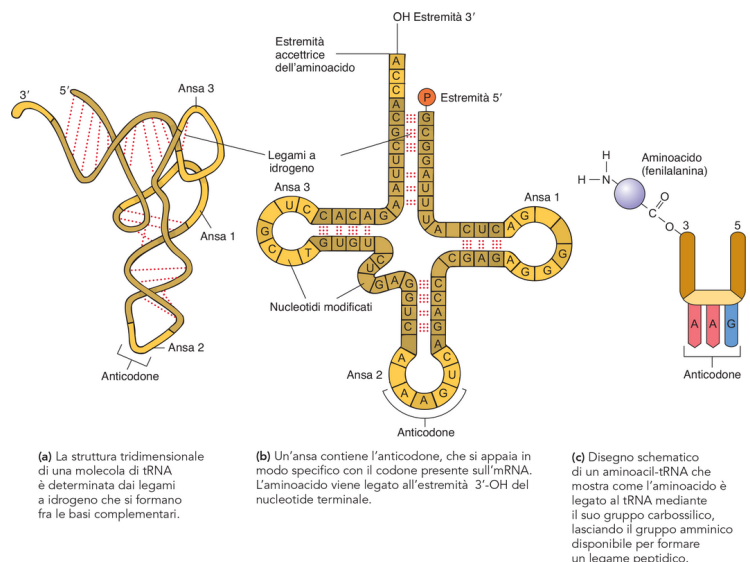
← FIGURA 13-5 Il codice genetico

Il codice genetico specifica tutte le possibili combinazioni di tre basi che costituiscono i codoni dell'mRNA. Dei 64 codoni possibili, 61 specificano aminoacidi (vedi Fig. 3-17 per la spiegazione delle abbreviazioni). Il codone AUG specifica l'aminoacido metionina, ma è anche un segnale di inizio della traduzione per il ribosoma ("start"). Tre codoni (UAA, UGA e UAG) non specificano alcun aminoacido, ma sono invece dei segnali per la terminazione della sintesi proteica ("stop").

FIGURA 13-6→

Tre rappresentazioni di una molecola di tRNA

La struttura tridimensionale della molecola di tRNA è determinata dai legami idrogeno che si formano tra basi complementari. Un'ansa del tRNA contiene l'anticodone in grado di appaiarsi con il codone complementare presente sull'mRNA. L'aminoacido è legato al gruppo idrossile presente in posizione 3' del nucleotide terminale. Il diagramma stilizzato dell'aminoacil-tRNA mostra l'aminoacido legato al trasportatore attraverso il suo gruppo carbossilico, con esposizione dell'aminogruppo per la formazione del legame peptidico.



Negli anni 1960 i biologi decifrarono il codice genetico

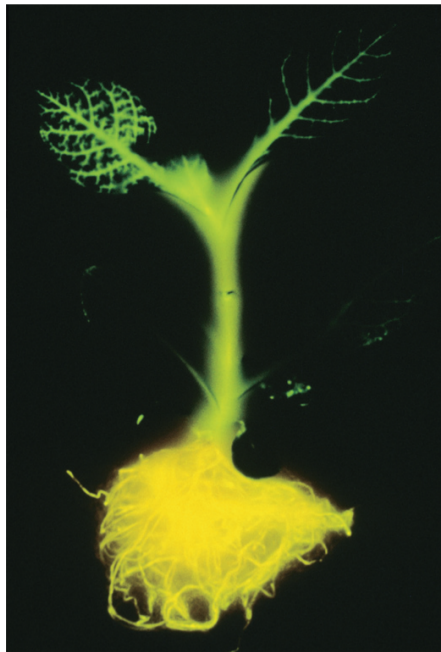
Prima che il codice genetico fosse decifrato, i ricercatori erano interessati a comprendere come potesse funzionare. Il modello del DNA di Watson e Crick considerava la molecola come una sequenza lineare di quattro nucleotidi. Se ogni nucleotide avesse codificato per un singolo aminoacido, sarebbe stato possibile specificare solo quattro aminoacidi, e non tutti i 20 ritrovati nella maggior parte delle proteine.

I ricercatori ipotizzarono che le quattro basi funzionassero come un alfabeto a quattro lettere, e che la combinazione a tre lettere delle quattro basi (4^3) permettesse la formazione di 64 "parole", più che sufficienti per specificare tutti gli aminoacidi. Nel 1961, Crick e lo scienziato britannico S. Brenner dedussero, da osservazioni sperimentali, che il codice era basato su triplette di basi non sovrapposte. Ipotizzarono, quindi, che il codice genetico venisse letto una tripletta alla volta, partendo da un preciso punto d'inizio che imposta la sequenza di lettura, il cosiddetto "reading frame" del messaggio genetico. Come sarà discusso più avanti, un'alterazione specifica nella sequenza di lettura dovuta ad una mutazione per delezione o inserzione porterebbe all'incorporazione di aminoacidi sbagliati nella catena polipeptidica. La prova sperimentale che triplette specifiche codificano determinati aminoacidi venne fornita dal biochimico statunitense Marshall Nirenberg e dal suo collaboratore Heinrich Matthaei; sintetizzando artificialmente molecole di mRNA con sequenze di basi note, riuscirono a determinare, in **sistemi acellulari** derivati da **Escherichia coli**, quali aminoacidi sarebbero stati incorporati nella proteina. Ad esempio, quando l'mRNA sintetico di acido poliuridilico (UUUUUUUU...) era aggiunto ad una miscela contenente ribosomi purificati, aminoacil-tRNA (aminoacidi legati ai rispettivi tRNA) e cofattori essenziali alla sintesi

proteica, solo l'aminoacido fenilalanina veniva incorporato nella catena polipeptidica; quindi, è ovvio che UUU è la tripletta che codifica la fenilalanina. Esperimenti simili dimostrarono che l'acido poliadenilico (AAAAAAAAA) codifica un polipeptide di lisina e l'acido policitidilico (CCCCCCCCC) un polipeptide di prolina.

Utilizzando polimeri di nucleotidi misti (come un polimero casuale di adenine e citosine) quali messaggeri artificiali, alcuni ricercatori, tra cui H. Gobind Khorana dell'Università del Wisconsin, riuscirono ad assegnare ad altre triplette i rispettivi aminoacidi. Tuttavia, si vide che tre codoni — UAA, UGA, UAG — non codificavano alcun aminoacido; questi codoni sono ora noti come segnali che determinano la fine della sequenza codificante la catena polipeptidica (codoni di stop o di terminazione). Questi esperimenti permisero entro il 1967 di decifrare tutti i 64 possibili codoni elencati nella Figura 13-5. Nel 1968, Nirenberg e Khorana furono insigniti del premio Nobel per la Medicina per il loro lavoro di decifrazione del codice genetico.

È importante ricordare che il codice genetico è un codice riferito all'mRNA; le sequenze degli anticodoni sui tRNA, come pure la sequenza di DNA da cui viene trascritto il messaggio, sono complementari alle sequenze mostrate nella Figura 13-5. Ad esempio, il codone sull'mRNA per l'aminoacido metionina è 5'—AUG—3'; esso è trascritto dalla sequenza di basi del DNA 3'—TAC—5' e l'anticodone corrispondente sul tRNA è 3'—UAC—5'.



Keith V. Wood/Vision Unlimited

Il codice genetico è virtualmente universale

La caratteristica più sorprendente del codice genetico è che esso è praticamente universale. In tutti questi anni, il codice genetico è stato studiato in una miriade di specie ed è risultato lo stesso in organismi tanto diversi tra loro come batteri, piante, invertebrati ed uomo (FIG. 13-7). Queste scoperte dimostrano che il codice si è evoluto molto precocemente nella storia della vita (vedi Capitolo 21).

← FIGURA 13-7

Pianta di tabacco modificata geneticamente.

Questa pianta diventa luminescente in quanto esprime il gene luciferasi delle lucciole. La luciferasi è un enzima che catalizza una reazione chimica in grado di generare un'emissione di luce. Questo esperimento dimostra che geni animali possono esprimere i loro prodotti una volta inseriti all'interno di piante.

Recentemente, sono state scoperte alcune piccole eccezioni all'universalità del codice genetico; in alcuni protozoi unicellulari, due dei codoni di stop, UAA e UGA, codificano l'aminoacido glutammina invece di segnali di terminazione. Altre eccezioni sono state identificate nei mitocondri, che hanno un DNA proprio e un proprio apparato per la

sintesi proteica utilizzato per un piccolo numero di geni. Queste piccole differenze variano con gli organismi, ma è comunque importante ricordare che in ogni caso tutte le altre caratteristiche del codice sono identiche al codice genetico standard.

Il codice genetico è ridondante

Considerato che ci sono 64 possibili codoni e solo 20 aminoacidi comuni, non è sorprendente che alcuni aminoacidi siano specificati da più di un codone. Questa ridondanza, o degenerazione del codice, presenta alcuni aspetti particolari. I codoni CCU, CCC, CCA e CCG sono "sinonimi", codificano cioè tutti l'aminoacido prolina. L'unica differenza fra i quattro codoni riguarda il nucleotide posto all'estremità 3' della tripletta. Anche se il codice si legge tre nucleotidi per volta, solamente i primi due sembrano avere l'informazione per la prolina. Lo stesso modello di degenerazione si può osservare per molti altri aminoacidi. Solo la metionina e il triptofano sono codificati da una singola tripletta; tutti gli altri sono codificati da un minimo di due a un massimo di sei differenti codoni.

Questo apparente contrasto con la regola dell'appaiamento complementare fu giustificato, per la prima volta, da Francis Crick con l'ipotesi del vacillamento (wobble hypothesis). Crick pensò che il terzo nucleotide dell'anticodone del tRNA (posto all'estremità 5' della sequenza dell'anticodone) potesse talvolta formare legami a idrogeno con più di un tipo di base azotata nella terza posizione della tripletta sull'mRNA (in posizione 3' del codone). Successivamente, i ricercatori verificarono sperimentalmente questa insolita possibilità di appaiamento e riuscirono a determinare la specificità delle varie sequenze degli anticodoni sui tRNA, dimostrando che alcune molecole di tRNA si legano esclusivamente ad un unico codone mentre altre possono riconoscere fino a tre diversi codoni che codificano lo stesso aminoacido pur differendo per il terzo nucleotide. Pertanto, l'ipotesi del vacillamento rende conto della potenziale variabilità di appaiamento tra la terza base di un codone e la base corrispondente dell'anticodone. Il vacillamento fa sì che vi siano varie

possibilità di appaiamento di basi tra l'mRNA e il tRNA.

Verifica

- Schematizzate un semplice diagramma di flusso che mostri le relazioni tra: RNA, traduzione, DNA, trascrizione e polipeptide.
- Quali sono le analogie strutturali tra DNA ed RNA? E le differenze?

13.3 LA TRASCRIZIONE

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

6. Confrontare i processi di trascrizione e di replicazione del DNA, identificando somiglianze e differenze.
7. Confrontare gli RNA messaggeri batterico ed eucariotico, nonché comprendere il significato funzionale delle loro differenze strutturali.

Dopo aver presentato una visione generale del flusso d'informazione dal DNA all'RNA al polipeptide, esaminiamo ora l'intero processo in maniera più dettagliata. Il primo passaggio del flusso di informazione dal DNA al polipeptide è la trascrizione di una sequenza nucleotidica di DNA in una sequenza nucleotidica di RNA. Il biologo molecolare Roger Kornberg ci ha chiarito i dettagli del processo di trascrizione genica attraverso approfondite ricerche, svolte presso la Stanford University, che gli hanno permesso di vincere il premio Nobel per la Chimica nel 2006.

Nella trascrizione eucariotica, la maggior parte degli RNA è sintetizzata da una delle tre RNA polimerasi, enzimi presenti in tutte le cellule. Le tre RNA polimerasi differiscono per i tipi di RNA che sintetizzano. La **RNA polimerasi I** catalizza la sintesi di vari tipi di molecole di rRNA, che sono componenti dei ribosomi; la **RNA polimerasi II** catalizza la produzione degli mRNA che codificano le proteine; la **RNA polimerasi III** catalizza la sintesi dei tRNA e di una delle molecole di rRNA.

Le RNA polimerasi richiedono il DNA come stampo e presentano molte somiglianze con le DNA polimerasi, discusse nel Capitolo 12. Come le DNA polimerasi, le RNA polimerasi effettuano la sintesi in direzione $5' \rightarrow 3'$, cioè partono dall'estremità $5'$ della molecola di RNA da sintetizzare e proseguono aggiungendo nucleotidi all'estremità $3'$ finché la molecola non è completa (FIG. 13-8). Le RNA polimerasi usano, come substrati, nucleotidi con tre gruppi fosfato (come ATP e GTP) e, rimuovendo due dei fosfati, legano covalentemente le subunità nucleotidiche all'estremità $3'$ dell'RNA. Tali reazioni sono fortemente esoergoniche e non richiedono un apporto energetico aggiuntivo.

Si ricordi dal Capitolo 12 che ogniquale volta molecole di acido nucleico si associano appaiando le basi complementari, i due filamenti sono antiparalleli. Proprio come i due filamenti appaiati del DNA, anche il filamento del DNA trascritto e il filamento dell'RNA complementare sono antiparalleli. Quindi, durante la trascrizione l'RNA è sintetizzato in direzione $5' \rightarrow 3'$ e lo stampo di DNA è letto in direzione $3' \rightarrow 5'$.

Generalmente, noi ci riferiamo ad una sequenza di basi in un gene o alla sequenza trascritta sull'mRNA utilizzando i termini "a monte" (upstream) e "a valle" (downstream) di uno specifico punto di riferimento. **A monte** significa "verso l'estremità $5'$ della sequenza di mRNA" oppure "verso l'estremità $3'$ del filamento stampo del DNA". **A valle** significa "verso l'estremità $3'$ dell'RNA" oppure "verso l'estremità $5'$ del filamento stampo del DNA".

