

interagire con i *fattori di trascrizione* (discussi più avanti nel capitolo) e con altre proteine di regolazione.

Le cellule mostrano diverse modalità di conversione della struttura della cromatina da eterocromatina ad eucromatina. Una di esse consiste nella modificazione chimica degli istoni, le proteine che si associano al DNA per formare i nucleosomi. Ogni molecola di istone possiede una cosiddetta “coda”, una sequenza di aminoacidi che si estende dal nucleosoma avvolto dal DNA (vedi Fig. 10-2). Alle code degli istoni vengono attaccati chimicamente gruppi metilici, gruppi acetilici, zuccheri e perfino proteine, che possono esporre o nascondere i geni, attivandoli o reprimendoli, rispettivamente. Tali modificazioni chimiche degli istoni sono oggetto di attiva ricerca, dal momento che sembrano influenzare l'espressione genica e quindi lasciano sperare in nuovi approcci per la cura del cancro e di altre patologie che hanno una componente genetica. I biologi hanno scoperto una correlazione generale tra l'attività genica e la presenza o l'assenza di determinati gruppi legati alle code degli istoni. Ad esempio, i geni presenti all'interno di nucleosomi le cui code istoniche sono legate a gruppi acetilici, generalmente tendono ad essere espressi. Attualmente, i biologi stanno cercando di determinare se ci sia un'associazione tra specifiche modificazioni degli istoni e l'attività o l'inattività di specifici geni all'interno di una cellula.

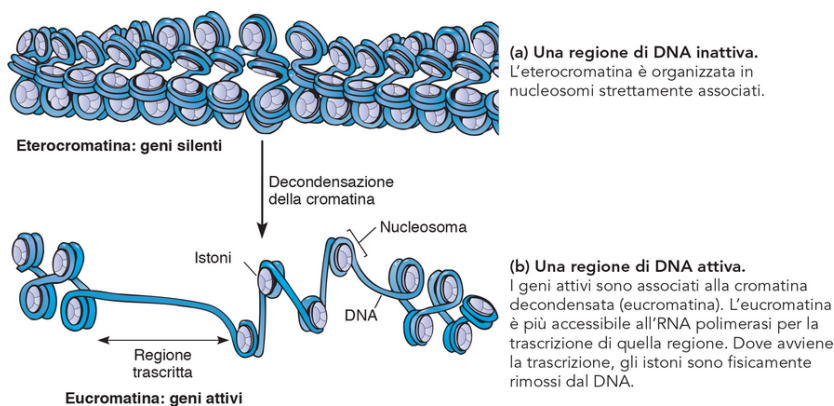


FIGURA 14-8

La struttura della cromatina regola la trascrizione genica

L'inattivazione genica mediante metilazione del DNA è un esempio di eredità epigenetica

I geni inattivi dei vertebrati e di alcuni altri organismi mostrano tipicamente un quadro di metilazione del DNA, in cui l'acido nucleico è stato chimicamente modificato da enzimi che aggiungono gruppi metilici a

determinate citosine. (La 5-metilcitosina che ne deriva è ancora capace di appaiarsi con la guanina senza nessuna limitazione). Ci sono prove che certe proteine si legano selettivamente al DNA metilato, rendendolo inaccessibile all'RNA polimerasi e ad altre proteine coinvolte nella trascrizione. Si pensa che la metilazione del DNA renda più forte l'inattivazione genica piuttosto che esserne il meccanismo iniziale di silenziamento genico. Sembra che, una volta che un gene sia stato spento in qualche altro modo, la metilazione del DNA faccia sì che esso rimanga inattivo. Per esempio, il DNA del cromosoma X inattivo di una femmina di mammifero viene metilato dopo che il cromosoma è stato condensato nel corpo di Barr (vedi Capitolo 11). Quando il DNA si replica in una cellula che procede verso la divisione mitotica, ogni doppia elica di DNA presenta un filamento metilato e l'altro non metilato. Gli enzimi responsabili della metilazione aggiungono gruppi metilici al filamento neosintetizzato, ripristinando il quadro di metilazione preesistente; di conseguenza, il DNA continua ad essere trascrizionalmente inattivo nelle cellule figlie, spesso per più generazioni.

Nei mammiferi, questo tipo di mantenimento della metilazione del DNA è alla base dell'imprinting genomico (detto anche *imprinting parentale*), in cui l'espressione fenotipica di certi geni è determinata dal fatto che un certo allele sia stato ereditato dalla madre o dal padre. L'imprinting genomico è associato ad alcune malattie genetiche umane, come la *sindrome di Prader-Willi* e la *sindrome di Angelman* (discusse entrambe nel Capitolo 16).

L'imprinting genomico è un esempio di fenomeno epigenetico. L'eredità epigenetica coinvolge cambiamenti nelle modalità di espressione di un gene. Al contrario, l'*eredità genetica* coinvolge cambiamenti nella sequenza nucleotidica di un gene. Dal momento che gli schemi di metilazione del DNA tendono ad essere trasmessi alle generazioni cellulari successive, la metilazione fornisce un meccanismo di eredità epigenetica. Si stanno accumulando sempre più osservazioni a sostegno dell'idea che l'eredità epigenetica sia un importante meccanismo di regolazione genica durante la vita dell'individuo. Per esempio, la metilazione genica tende ad aumentare in alcuni individui col procedere dell'età, mentre diminuisce in altri, presumibilmente in risposta a stimoli ambientali. L'eredità epigenetica può generare nuovi tratti fenotipici nonostante la sequenza nucleotidica del gene resti invariata (FIG. 14-9). Modificazioni epigenetiche sono state associate ad alcune malattie dell'uomo, quali per esempio il cancro.

Geni soppressori dei tumori (*tumor suppressor genes*), in grado di inibire la divisione cellulare (e quindi anche il cancro), sono talvolta inattivati epigeneticamente, comportando come conseguenza lo sviluppo di malattie neoplastiche. Nel Capitolo 17 sono discusse le interazioni tra cancro e geni soppressori dei tumori. Pertanto, alcune caratteristiche ereditarie non dipendono esclusivamente dalla sequenza nucleotidica del DNA.

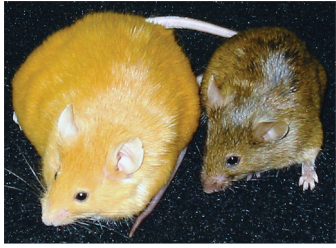


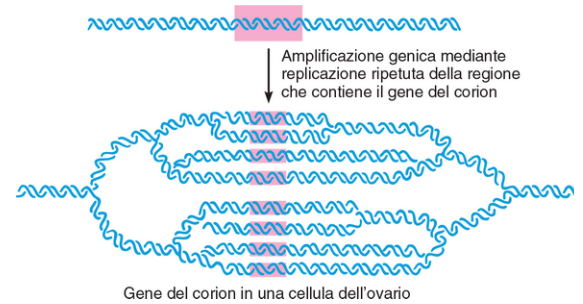
FIG. 14-9

Variabilità epigenetica nel gene agouti del topo

Il DNA di questi topolini da laboratorio è quasi identico, tuttavia il colore del mantello e la dimensione corporea variano in modo significativo. I due topi differiscono per la presenza o assenza di un marcatore epigenetico, corrispondente alla metilazione di una regione del DNA nel gene denominato *agouti*.

FIG. 14-10 *Amplificazione genica*

In *Drosophila*, repliche multiple di una piccola regione del cromosoma portano all'amplificazione dei geni che codificano la proteina del corion (guscio dell'uovo). La replicazione ha inizio a livello di un'origine di replicazione discreta sul cromosoma (riquadro rosa in alto) per ogni copia del gene prodotta. La replicazione termina a caso, determinando la formazione di una serie di strutture a forchetta nel cromosoma.



L'amplificazione genica aumenta il numero di copie di un gene

È possibile che un singolo gene non fornisca sufficienti copie del suo mRNA per soddisfare le esigenze della cellula. In questi casi, la richiesta di alti livelli di alcuni prodotti genici può essere facilmente soddisfatta se nel cromosoma sono presenti più copie dei geni che li codificano. Geni di questo tipo, i cui prodotti sono essenziali per la vita di tutte le cellule, possono essere presenti in copie multiple, organizzate l'una dopo l'altra all'interno del cromosoma in sequenze geniche ripetute in tandem . I geni degli istoni sono solitamente presenti in forma di copie multiple di 50-500 geni nelle cellule degli organismi pluricellulari. Analogamente, nelle cellule sono presenti copie multiple (da 150 a 450) dei geni degli rRNA e dei tRNA. Altri geni, i cui prodotti sono richiesti solo in poche cellule, possono venire replicati selettivamente attraverso un processo chiamato amplificazione genica. Per esempio, il prodotto genico costituente il corion (guscio dell'uovo) di *Drosophila* è una proteina sintetizzata specificamente dalle cellule del tratto riproduttivo femminile di questo insetto. Tali cellule producono grosse quantità della proteina che avvolge e protegge lo zigote. L'amplificazione del gene della proteina del corion mediante la replicazione del DNA soddisfa la richiesta degli mRNA corrispondenti. In altre parole, il DNA di quella piccola regione del cromosoma viene copiato numerose volte (FIG. 14-10). Nelle altre cellule del corpo dell'insetto, invece, il gene sembra essere presente in singola copia nel cromosoma.

Negli eucarioti, l'efficienza dei promotori varia in funzione degli elementi funzionali presenti a monte del promotore

Sia nelle cellule dei procarioti che in quelle degli eucarioti, la trascrizione di un qualsiasi gene necessita di una coppia di basi nel punto in cui inizia la trascrizione, nota come sito di inizio della trascrizione, e di un **promotore** al quale si legghino l'RNA polimerasi.

Il promotore è una sequenza di DNA relativamente breve adiacente al gene. In quasi tutti gli eucarioti pluricellulari, il promotore contiene un elemento, chiamato TATA box, caratterizzato dalla sequenza nucleotidica TATAAA e localizzato circa 25-30 paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione (FIG. 14-11). Mutazioni nel TATA box riducono l'efficienza di trascrizione nella cellula.

Altri elementi dei promotori eucariotici hanno funzioni di regolazione e controllano l'espressione dei geni. Molti promotori eucariotici contengono una o più sequenze di nucleotidi posizionate a breve distanza (circa 80 coppie di basi), a monte del sito di legame dell'RNA polimerasi. Mutazioni in questi elementi, così come mutazioni nel TATA box, riducono i livelli trascrizionali.

Gli enhancer aumentano l'efficienza di trascrizione mentre i silencer la diminuiscono

I geni eucariotici sottoposti a regolazione hanno comunemente sequenze di DNA, chiamate enhancer (intensificatori), che contribuiscono alla formazione di un complesso di inizio della trascrizione attivo. In tal modo, essi aumentano la velocità di sintesi degli RNA, spesso di parecchi ordini di grandezza.

Gli enhancer hanno caratteristiche peculiari; infatti, sebbene siano presenti in tutte le cellule, un determinato enhancer funziona solo in alcuni tipi cellulari. Inoltre, un enhancer può regolare un gene che si trova sulla stessa molecola di DNA ad una distanza notevole (fino a migliaia di coppie di basi di distanza dal promotore) e può essere situato sia a monte che a valle del promotore che controlla. Inoltre, se sperimentalmente un enhancer viene invertito nella sequenza, esso è ancora in grado di regolare il gene che controlla normalmente.

Molti geni eucariotici sono associati a silencer (silenzianti), sequenze di DNA che possono ridurre la trascrizione. In modo simile agli enhancer, anche i silencer sono posizionati ad una certa distanza dai geni che devono regolare. Enhancer e silencer collaborano quindi nel regolare l'efficienza trascrizionale della cellula.

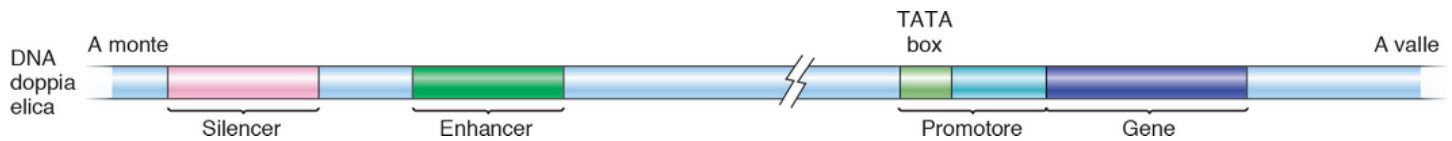


FIGURA 14-11 *Regolazione della trascrizione: gli elementi eucariotici*

Gli elementi regolatori eucariotici comprendono il promotore e vari enhancer (intensificatori) e silencer (silenzianti). Il promotore determina i livelli basali di trascrizione mentre enhancer (e silencer) hanno la capacità di incrementare notevolmente (o diminuire) l'efficienza di trascrizione. (Per semplicità, la doppia elica del DNA è rappresentata a bastoncino e gli elementi non sono disegnati in scala).

I fattori di trascrizione sono proteine regolatrici che hanno diversi domini funzionali

Abbiamo già parlato di alcune proteine che si legano al DNA e che regolano la trascrizione nei procarioti. Queste comprendono il repressore del lattosio, il repressore del triptofano e la proteina CAP. Negli eucarioti, sono stati identificati molti più regolatori della trascrizione che nei batteri; queste proteine eucariotiche sono conosciute come fattori di trascrizione. Nell'uomo, ad esempio, sono stati identificati più di 2000 fattori di trascrizione.

È utile fare un confronto fra i regolatori della trascrizione dei procarioti e quelli degli eucarioti. Molti sono molecole modulari, cioè hanno più di un dominio (regioni con una loro propria struttura terziaria e funzione). Ogni fattore di trascrizione eucariotico, come le proteine di regolazione procariotiche, possiede un dominio di legame al DNA, oltre ad almeno un altro dominio, che può essere un attivatore o un repressore della trascrizione per un dato gene.

Molti fattori di trascrizione eucariotici (e proteine di regolazione batteriche) presentano domini di legame al DNA simili. Un esempio è rappresentato dal motivo *helix-turn-helix* (elica-giroelica), costituito da due regioni ad α -elica. Una di queste, nota come elica di riconoscimento, si inserisce nel solco maggiore del DNA, senza svolgere la doppia elica. La seconda aiuta la prima a posizionarsi correttamente (FIG. 14-12a). Il "turn" è una sequenza di aminoacidi che permette una ripiegatura della molecola. Altri fattori di trascrizione hanno domini di attacco al DNA con motivi multipli a "dita di zinco" (zinc finger), anse di aminoacidi tenute insieme da ioni zinco. Ogni ansa contiene un' α -elica che interagisce con un solco del DNA (FIG. 14-12b). Alcuni gruppi funzionali degli aminoacidi presenti in ogni dito sono in grado di riconoscere specifiche sequenze del DNA.

Molti fattori trascrizionali hanno domini di legame al DNA che funzionano soltanto a coppie, o *dimeri*. Molti di essi sono conosciuti come proteine a cerniera di leucina (leucine zipper) perché sono tenuti insieme da catene laterali di leucina e altri aminoacidi idrofobici (FIG. 14-12). In alcuni casi, i due polipeptidi che formano il dimeri sono uguali e perciò si parla di *omodimero*; in altri sono differenti e l'*eterodimero* che ne risulta può presentare anche notevoli differenze nelle proprietà regolative. Per fare un semplice esempio, assumiamo per ipotesi che ci siano tre differenti proteine di regolazione — A, B e C — coinvolte nel controllo di un particolare gruppo di geni. Queste proteine possono associarsi in dimeri secondo sei diverse combinazioni: tre tipi di omodimeri (AA, BB e CC) e tre differenti eterodimeri (AB, AC e BC). Il fatto che alcune proteine di regolazione possano legarsi insieme in diverse possibili combinazioni così da assumere caratteristiche differenti nella regolazione, aumenta enormemente le possibili vie di controllo della trascrizione.

La trascrizione negli eucarioti richiede che molte proteine di regolazione si leghino a parti differenti del promotore. L'*apparato generale di trascrizione* è un complesso proteico che si lega al TATA box del promotore vicino al sito di inizio della trascrizione. Il complesso è richiesto affinché l'RNA polimerasi si leghi ed inizi la trascrizione.

Enhancer e silencer diventano funzionali quando vengono legati da specifici fattori di trascrizione. La FIGURA 14-13 illustra l'interazione fra un enhancer e un fattore di trascrizione che funziona da attivatore. Ciascun attivatore deve avere almeno due domini funzionali: un sito di riconoscimento del DNA, che di solito si lega ad un enhancer, ed un sito di attivazione del gene, che prende contatto con uno o più bersagli

nel complesso di trascrizione. In particolare, si pensa che il segmento di DNA che si trova tra la sequenza promotore e l'enhancer formi un'ansa che permette all'attivatore, legato all'enhancer, di entrare in contatto con uno o più proteine bersaglio associate con il complesso di trascrizione. Quando questo avviene, la velocità di trascrizione aumenta.

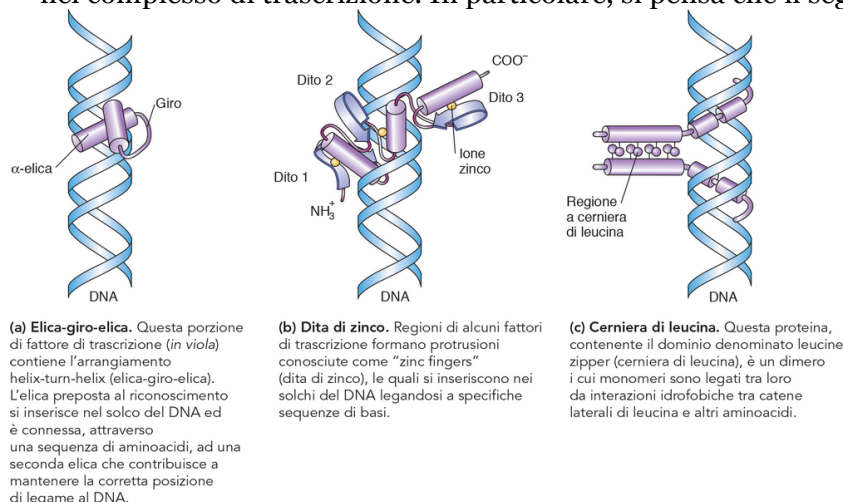


FIGURA 14-12

Regolazione della trascrizione: proteine di regolazione

In queste illustrazioni, le regioni ad α -elica sono rappresentate come cilindri, mentre quelle a foglietto β come nastri.

FIGURA 14-13
Regolazione della trascrizione: stimolazione della trascrizione da parte di un enhancer

Gli mRNA eucariotici forniscono molte opportunità per il controllo post-trascrizionale

L'mRNA dei procarioti ha di norma un'emivita di alcuni minuti; l'mRNA degli eucarioti, invece, è molto più stabile. L'mRNA dei procarioti viene trascritto in una forma immediatamente traducibile; viceversa, le molecole di mRNA eucariotico richiedono ulteriori modifiche e maturazioni prima di potere essere utilizzate nella sintesi proteica. Il messaggio, infatti, viene modificato dall'aggiunta di un cappuccio, dalla poliadenilazione, da tagli, e quindi trasportato dal nucleo al citoplasma per iniziare la traduzione (vedi Fig. 13-12). Tutti questi eventi rappresentano potenziali punti di controllo tramite i quali la traduzione del messaggio e la produzione della proteina codificata possono essere regolate.

Per esempio, l'aggiunta di una coda di poli-A agli mRNA eucariotici sembra essere necessaria per l'inizio della traduzione. È stato mostrato come gli mRNA dotati di una lunga coda di poli-A vengano tradotti efficientemente, mentre quelli con una coda di poli-A più corta siano essenzialmente quiescenti.

La **poliadenilazione**, che ha luogo normalmente nel nucleo, può avvenire anche nel citosol. Nel momento in cui la breve coda di poli-A di un mRNA viene allungata, la molecola viene attivata e può essere tradotta.

Alcuni pre-mRNA possono andare incontro a processi di maturazione diversi

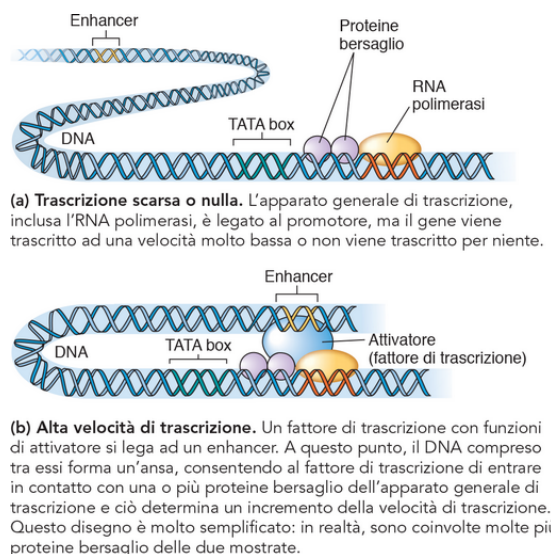
Sono state scoperte diverse forme di regolazione che coinvolgono il processo di maturazione dell'mRNA. In alcuni casi, per esempio, lo stesso gene può produrre un tipo di proteina in un certo tessuto ed un differente tipo di proteina, seppur correlata, in un altro tessuto. Questo è possibile perché alcuni geni producono molecole di pre-mRNA che hanno schemi multipli di splicing, i cosiddetti splicing alternativi: in altre parole, le molecole di pre-mRNA possono essere tagliate e ricomposte in combinazioni diverse che variano in funzione del tessuto.

Di solito, un gene di questo tipo contiene almeno un segmento che può comportarsi sia da introne che da esone (vedi Capitolo 13). Come introne la sequenza viene rimossa; come esone, viene invece mantenuta. Attraverso lo splicing alternativo, le cellule di ciascun tessuto producono la loro versione dell'mRNA corrispondente ad un particolare gene (FIG. 14-14). Per esempio, questo meccanismo permette la produzione di differenti forme di troponina, una proteina che regola la contrazione muscolare, in differenti tessuti muscolari.

La stabilità delle molecole di mRNA può variare

Controllando la vita media di una determinata molecola di mRNA, è possibile controllare il numero di molecole proteiche prodotte dalla sua traduzione. La stabilità dell'mRNA è, in alcuni casi, sotto controllo ormonale; è il caso, per esempio, dell'mRNA per la vitellogenina, proteina prodotta nel fegato delle femmine di alcuni animali, come le rane e le galline. Dopo essere stata sintetizzata, la vitellogenina viene trasportata nell'ovidotto, dove è utilizzata per la formazione di proteine del tuorlo dell'uovo.

La sintesi della vitellogenina è regolata dall'ormone estradiolo. Infatti, quando i livelli di questo ormone sono alti, l'emivita dell'mRNA per la vitellogenina nel fegato della rana è di circa 500 ore, mentre, quando il



tasso di estradiolo diminuisce, l'emivita del messaggero scende rapidamente a meno di 165 ore e, di conseguenza, si ha un rapido calo della sintesi della proteina. L'ormone, oltre ad interferire con la stabilità dell'mRNA, sembra controllare anche la velocità della trascrizione dell'mRNA.

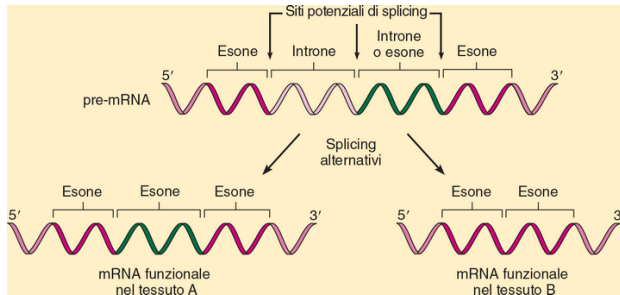


FIGURA 14-14 *Maturazione dell'mRNA: splicing alternativo*

In alcuni casi, una molecola di pre-mRNA è sottoposta ad un processo di maturazione che comporta la formazione di due o più mRNA maturi, ciascuno dei quali codifica una proteina correlata, ma differente. In questo esempio generale, il gene contiene un segmento che può essere un esone nel tessuto A (a sinistra), ma un introne nel tessuto B (a destra).

L'attività delle proteine eucariotiche può essere alterata da modificazioni chimiche post-traduzionali

Un'ulteriore modalità di controllo dell'espressione genica è basata sulla regolazione dell'attività del prodotto genico. Come avviene nei batteri, anche negli eucarioti molte vie metaboliche coinvolgono enzimi allosterici che sono regolati attraverso una inibizione a feedback. Inoltre, molte proteine possono essere modificate in modo sostanziale anche dopo la loro sintesi.

Attraverso la maturazione proteolitica, le proteine che sono sintetizzate come precursori inattivi vengono convertite in forma attiva mediante la rimozione di porzioni specifiche della catena polipeptidica. Per esempio, la proinsulina è costituita da 86 aminoacidi e la rimozione di 35 di essi genera l'ormone insulina, costituito da due polipeptidi uniti da ponti disolfuro e contenenti, rispettivamente, 30 e 21 aminoacidi.

Una **modificazione chimica**, come l'aggiunta o la rimozione di un gruppo funzionale, può alterare in modo reversibile l'attività di una molecola enzimatica. A questo proposito, un modo molto comune di alterare l'attività di un enzima o di altre proteine è l'aggiunta o la rimozione di gruppi fosfato. Gli enzimi che aggiungono gruppi fosfato sono definiti chinasi, mentre quelli che li rimuovono sono detti fosfatasi. Per esempio, le protein chinasi ciclina-dipendenti, discusse nel Capitolo 10, aiutano a controllare il ciclo cellulare mediante l'aggiunta di gruppi fosfato a certe proteine chiave, causando la loro attivazione o inattivazione. Modificazioni chimiche come la fosforilazione delle proteine permettono alla cellula di rispondere rapidamente a certi ormoni o a repentini cambiamenti ambientali o nutrizionali.

Il controllo post-traduzionale dell'espressione genica può anche coinvolgere la degradazione delle proteine. Il tipo di aminoacido presente all'estremità N-terminale di una proteina è correlato alla vita media della

proteina. Alcune proteine, ad esempio, hanno un turnover di sintesi e degradazione del 50% ogni 3 giorni. Altre proteine, come quelle del cristallino dell'occhio umano, possono permanere per tutta la vita dell'individuo.

Le proteine indirizzate alla distruzione sono legate covalentemente all'ubiquitina, un piccolo polipeptide di 76 aminoacidi. L'aggiunta di altre molecole di ubiquitina forma delle brevi catene attaccate alla proteina che deve essere degradata (FIG. 14-15). Una proteina marcata con l'ubiquitina viene indirizzata alla degradazione all'interno di un proteasoma. I proteasomi sono grosse strutture macromolecolari che riconoscono le catene di ubiquitina. Le proteasi (enzimi che degradano le proteine) associate ai proteasomi idrolizzano alcuni dei legami peptidici, scindendo la proteina in corti frammenti peptidici non funzionali. In seguito alla degradazione della proteina, le molecole di ubiquitina vengono rilasciate, in modo da poter essere riutilizzate.

FIGURA 14-15

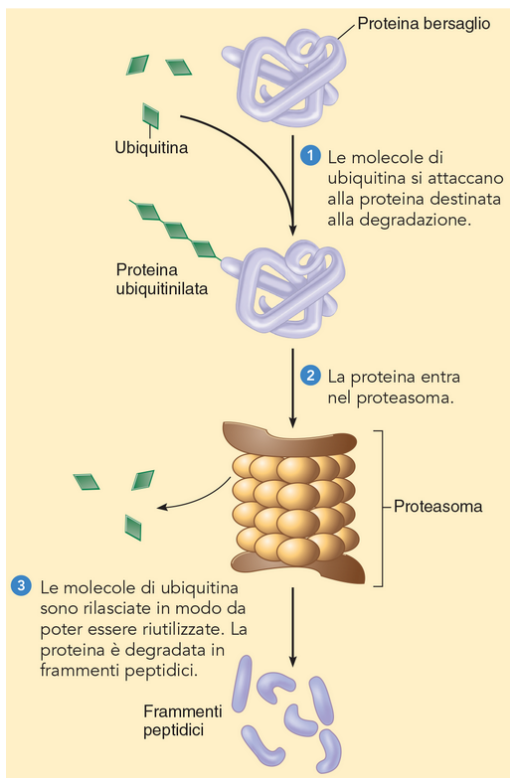
La degradazione delle proteine con il sistema ubiquitina-proteasoma

Verifica

- Quali sono le differenze tra la regolazione dei geni eucariotici e la regolazione dei geni procariotici?
- Perché nelle cellule eucariotiche alcuni geni devono essere

presenti in copie multiple?

- In che modo la struttura del cromosoma influenza l'attività di alcuni geni eucariotici?
- In che modo la maturazione differenziale dell'mRNA può dare origine a proteine differenti?



14.1

1. Spiegare perché le cellule procariotiche ed eucariotiche presentano differenti meccanismi di regolazione genica.
 - Le cellule procariotiche crescono rapidamente ed hanno una vita media relativamente breve. Il controllo a livello trascrizionale rappresenta il modo più comune con cui le cellule procariotiche regolano l'espressione genica.
 - Le cellule eucariotiche hanno di solito una vita media più lunga, nel corso della quale devono mantenere l'omeostasi rispondendo a molti stimoli differenti. Sebbene il controllo trascrizionale sia quello predominante, molto importanti sono anche le modalità di controllo ad altri livelli dell'espressione genica.

14.2

2. Definire il termine operone e spiegare le funzioni delle regioni promotore ed operatore.
 - Un operone è un complesso genico costituito da un gruppo di geni strutturali funzionalmente correlati e dalle vicine sequenze di DNA responsabili del loro controllo.
 - Ogni operone possiede un singolo promotore posto a monte delle regioni codificanti le proteine. Il promotore è il sito del DNA a cui si lega inizialmente l'RNA polimerasi prima che inizi la trascrizione.
 - L'operatore funge da interruttore regolativo per il controllo del livello trascrizionale dell'operone. Quando una proteina repressore si lega alla sequenza dell'operatore, impedisce la trascrizione; benché l'RNA polimerasi si leghi al promotore, essa è bloccata e non può trascrivere i geni strutturali. Quando il repressore non è legato all'operatore, la trascrizione può procedere.
3. Fare una distinzione tra geni inducibili, reprimibili e costitutivi.
 - Un operone inducibile, come l'operone lattosio, è normalmente spento. La proteina repressore viene sintetizzata in forma attiva e si lega all'operatore. Quando è presente il lattosio, esso viene convertito in allolattosio, l'induttore, il quale si lega ad un sito allosterico del repressore, modificandone la forma. Il repressore così modificato non può più legarsi all'operatore e l'operone viene trascritto.
 - Un operone reprimibile, come l'operone triptofano, è normalmente acceso. La proteina repressore viene sintetizzata in forma inattiva e non può legarsi all'operatore. Un metabolita (di solito il prodotto finale di una via metabolica) agisce come corepressore. Quando i livelli intracellulari di corepressore sono alti, una molecola di corepressore si lega al repressore modificandone la forma e permettendogli di legarsi all'operatore; in questo modo, si impedisce la trascrizione dell'operone.
 - I geni costitutivi non sono né inducibili né reprimibili, ma sono attivi in ogni momento. L'attività dei geni costitutivi è controllata dall'efficienza con cui l'RNA polimerasi si lega alle loro regioni promotrici.
4. Evidenziare le differenze tra il controllo positivo e il controllo negativo, mostrando come entrambi i sistemi regolino l'operone lattosio.
 - Gli operoni reprimibili ed inducibili sono sotto controllo negativo. Quando la proteina repressore si lega all'operatore, la trascrizione dell'operone si blocca.
 - Alcuni operoni inducibili sono anche sotto controllo positivo attraverso l'azione di una proteina attivatrice che si lega al DNA ed attiva la trascrizione del gene. L'operone lattosio viene attivato dalla proteina attivatrice del catabolita (CAP) che, unendosi al promotore, stimola la trascrizione legando stabilmente l'RNA polimerasi. Per legarsi all'operone lattosio, la proteina CAP richiede l'AMP ciclico (cAMP) i cui livelli intracellulari crescono quando i livelli di glucosio calano.
5. Descrivere i diversi tipi di controllo post-trascrizionale nei procarioti.
 - Nei procarioti esistono alcuni tipi di controllo post-trascrizionale. Un controllo traduzionale è un controllo post-trascrizionale che regola la velocità di traduzione di un particolare mRNA. I controlli post-traduzionali comprendono l'inibizione da feedback degli enzimi chiave di certe vie metaboliche.

14.3

6. Tracciare la struttura di un tipico gene eucariotico e le sequenze di DNA coinvolte nella sua regolazione.
 - In genere, i geni eucariotici non sono organizzati in operoni. La regolazione dei geni eucariotici può avvenire a livello della trascrizione, della maturazione dell'mRNA, della traduzione e della modificazione del prodotto proteico.
 - La trascrizione di un gene richiede un sito di inizio della trascrizione, dove ha inizio la

trascrizione, ed un promotore a cui si lega l'RNA polimerasi. Negli eucarioti pluricellulari, l'RNA polimerasi si lega ad un promotore detto TATA box che ha una funzione regolatrice e facilita l'espressione del gene.

- Alcuni geni eucariotici sono controllati da elementi enhancer (intensificatori) e silencer (silenzianti), che possono essere localizzati anche a migliaia di basi dal promotore. Questi elementi regolatori aumentano o diminuiscono l'efficienza di trascrizione.



- Fornire qualche esempio delle modalità con cui alcune proteine eucariotiche si legano al DNA.
 - I geni eucariotici sono controllati da proteine regolatrici che si legano al DNA, chiamate fattori di trascrizione. Molti di questi sono attivatori trascrizionali; altri sono repressori trascrizionali.
 - Ogni fattore di trascrizione possiede un dominio in grado di legarsi al DNA. Alcuni fattori di trascrizione presentano un'organizzazione helix-turn-helix e si inseriscono con una delle due eliche nel DNA. Altri fattori di trascrizione posseggono anse di aminoacidi tenute insieme da ioni zinco; ogni ansa include una α -elica che si inserisce nel DNA. Alcuni fattori di trascrizione sono proteine a cerniera di leucina, che formano dimeri in grado di inserirsi nel DNA.
- Illustrare come un cambiamento della struttura cromosomica possa modificare l'attività di un gene.
 - I geni possono essere resi inattivi da cambiamenti nella struttura del cromosoma. Regioni altamente condensate dei cromosomi, dette eterocromatina, contengono geni inattivi; i geni attivi sono invece associati con aree cromatiniche più lassamente organizzate, chiamate eucromatina. Gruppi metilici, gruppi acetilici, zuccheri e proteine possono essere attaccati chimicamente alla coda istonica, una sequenza di aminoacidi che si estende dal nucleosoma avvolto dal DNA, e possono esporre o nascondere i geni, attivandoli o reprimendoli.
 - La metilazione del DNA è un meccanismo che perpetua l'inattivazione genica. L'eredità epigenetica è un importante meccanismo di regolazione genica che coinvolge cambiamenti nelle modalità di espressione di un gene. Dal momento che gli schemi di metilazione del DNA tendono ad essere trasmessi alle generazioni cellulari successive, essi forniscono un meccanismo di eredità epigenetica.
 - Alcuni geni, i cui prodotti sono necessari in grandi quantità, sono presenti in copie multiple nel cromosoma. Nel processo di amplificazione genica, alcune cellule amplificano selettivamente i geni mediante la replicazione del DNA.
- Spiegare in che modo, in un organismo pluricellulare, uno stesso gene può dare origine a prodotti diversi in tipi cellulari diversi.
 - Come risultato della maturazione differenziale (splicing alternativo) dell'mRNA, un singolo gene può produrre forme differenti di una proteina in tessuti diversi, a seconda del tipo di splicing a cui è sottoposto il pre-mRNA. Tipicamente, un tale gene contiene un segmento che può essere sia un introne che un esone. Come introne, la sequenza è rimossa, mentre come esone è trattenuta.
- Identificare i principali tipi di regolazione che possono essere utilizzati negli eucarioti dopo la formazione dell'mRNA maturo.
 - Certi meccanismi di regolazione aumentano la stabilità dell'mRNA, permettendo la sintesi di un numero maggiore di proteine prima della degradazione dell'mRNA. In alcuni casi, la stabilità dell'mRNA è sotto controllo ormonale.
 - Il controllo post-traduzionale dei geni eucariotici può avvenire per inibizione retroattiva o per modificazione della struttura della proteina. La funzionalità di una proteina può cambiare con l'aggiunta di gruppi fosfato da parte delle chinasi o con la loro rimozione da parte delle fosfatasi.
 - Il controllo post-traduzionale dell'espressione genica può anche coinvolgere la degradazione delle proteine. Le proteine destinate alla distruzione sono legate covalentemente all'ubiquitina. Una proteina marcata con l'ubiquitina è indirizzata alla degradazione all'interno di un proteasoma, una grossa struttura macromolecolare che riconosce le catene di ubiquitina. Le proteasi (enzimi che degradano le proteine) associate ai proteasomi scindono le proteine in corti frammenti peptidici.

AUTOVERIFICHE

1. La regolazione della maggior parte dei geni procariotici avviene a livello: (a) della trascrizione; (b) della traduzione; (c) della replicazione; (d) post-traduzionale; (e) post-replicativo.
2. L'operatore di un operone: (a) codifica l'informazione per la proteina repressore; (b) è il sito di legame dell'induttore; (c) è il sito di legame per la proteina repressore; (d) è il sito di legame della RNA polimerasi; (e) codifica l'informazione per la proteina CAP.
3. Una mutazione che inattiva il gene del repressore dell'operone lattosio produrrà: (a) la trascrizione continua dei geni strutturali; (b) nessuna trascrizione dei geni strutturali; (c) il legame del repressore all'operatore; (d) nessuna produzione di RNA polimerasi; (e) nessuna differenza nella velocità di trascrizione.
4. Un operone reprimibile codifica gli enzimi della seguente via metabolica.



- Quale componente della via è più probabile che sia il corepressore per questo operone? (a) Il substrato A; (b) il substrato B o C; (c) il substrato D; (d) l'enzima 1; (e) l'enzima 3.
5. L'inibizione da feedback è un esempio di controllo a livello: (a) trascrizionale; (b) traduzionale; (c) post-traduzionale; (d) della replicazione; (e) tutte le risposte.
 6. Quali dei seguenti è un esempio di controllo positivo? (a) La trascrizione può avvenire quando un repressore lega un induttore; (b) la trascrizione non può avvenire quando un repressore lega un corepressore; (c) la trascrizione è stimolata quando un attivatore trascrizionale si lega al DNA; (d) a e b; (e) a e c.
 7. La "cerniera" delle proteine a cerniera di leucina lega: (a) specifici aminoacidi a specifiche coppie di basi del DNA; (b) due catene polipeptidiche tra loro; (c) una regione di DNA ad un'altra; (d) aminoacidi ad atomi di zinco; (e) l'RNA polimerasi all'operatore.
 8. I geni inattivi tendono ad essere associati con: (a) cromatina altamente condensata, nota come eucromatina; (b) cromatina decondensata, nota come eucromatina; (c) cromatina altamente condensata, nota come eterocromatina; (d) cromatina decondensata, nota come eterocromatina; (e) cromatina non organizzata in nucleosomi.
 9. Quale delle seguenti caratteristiche riguarda i geni e la regolazione genica dei procarioti, ma non degli eucarioti? (a) Presenza di enhancer; (b) aggiunta del cappuccio agli mRNA; (c) numerosi cromosomi per cellula; (d) legame del DNA a molti tipi di proteine regolatrici; (e) splicing degli esoni non richiesto.
 10. Quale delle seguenti caratteristiche riguarda i geni e la regolazione genica sia dei procarioti sia degli eucarioti? (a) Promotore; (b) DNA non codificante all'interno di sequenze codificanti; (c) enhancer; (d) operoni; (e) DNA localizzato nel nucleo.
 11. Attraverso lo splicing alternativo dell'mRNA, gli eucarioti: (a) rinforzano l'inattivazione genica; (b) impediscono la trascrizione dell'eterocromatina; (c) producono proteine correlate, ma differenti, in tessuti diversi; (d) amplificano i geni per far fronte alla richiesta di alti livelli del prodotto genico; (e) legano i fattori di trascrizione agli enhancer per attivare la trascrizione.

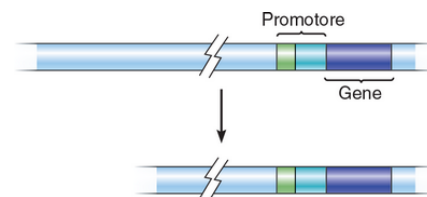
PENSIERO CRITICO

1. Confrontate i tipi di geni batterici associati ad operoni inducibili, quelli associati a operoni reprimibili e quelli che sono costitutivi. Trovate la categoria nella quale ognuno dei seguenti geni si adatterebbe meglio: (a) un gene che codifica l'RNA polimerasi; (b) un gene che codifica un enzima necessario per degradare il maltosio; (c) un gene che codifica un enzima usato nella sintesi dell'adenina.
2. Il gene regolatore che codifica per il repressore del triptofano non è vicino all'operone triptofano. Sarebbe vantaggioso se lo fosse? Spiegate la vostra risposta.
3. CONNESSIONE EVOLUTIVA . Fate un'ipotesi sul perché l'evoluzione abbia portato a livelli multipli di regolazione genica negli eucarioti pluricellulari.
4. CONNESSIONE EVOLUTIVA . Confrontando sequenze di DNA tra diverse specie appare evidente che la maggior parte delle regioni conservate (non modificate) è pertinente a segmenti di DNA che non codificano per proteine. Queste regioni non codificanti sono attribuibili ad elementi di regolazione dell'espressione genica. Fate un'ipotesi sul perché gli elementi regolatori dei geni non hanno subito cambiamenti nel corso dell'evoluzione.
5. ANALISI DEI DATI . Formulate un'ipotesi semplice per spiegare il comportamento di ognuno dei seguenti tipi di mutanti in E. coli :
Mutante a : la mutazione mappa nell'operone triptofano. Le cellule mutanti producono costitutivamente tutti gli enzimi codificati dall'operone triptofano, anche se grandi quantità di triptofano sono presenti nel terreno di crescita.
Mutante b : la mutazione mappa nell'operone triptofano. Le cellule mutanti non producono

nessun enzima codificato dall'operone triptofano in qualsiasi condizione di crescita.

Mutante c : la mutazione mappa ad una certa distanza dall'operone triptofano. Le cellule mutanti producono costitutivamente tutti gli enzimi codificati dall'operone triptofano, anche se il terreno di crescita contiene grandi quantità di triptofano.

6. ANALISI DEI DATI . State studiando l'efficienza di trascrizione di un particolare gene eucariotico. La rimozione di una sequenza di DNA, localizzata diverse migliaia di nucleotidi a monte del gene, provoca una diminuzione consistente dell'efficienza di trascrizione genica. Come interpretereste questi risultati?



Articolo III. Le tecnologie del DNA e la genomica

15

A partire dalla metà degli anni '70, lo sviluppo di nuove metodologie per lo studio del DNA ha reso possibile approcci di ricerca nuovi e radicalmente diversi, basati sulla tecnologia del DNA ricombinante, mediante la quale si può unire in laboratorio il DNA di organismi diversi. Uno degli obiettivi principali di questa tecnologia è quello di consentire agli studiosi di ottenere più copie di un frammento di DNA, così da poterlo studiare in dettaglio. Poiché nuove metodiche di analisi del DNA stanno evolvendo in modo rapido, non ne approfondiremo tutte in questo capitolo. Ci soffermeremo, invece, sui principali approcci che hanno fornito la base di questa rivoluzione tecnologica, oggi ampiamente sfruttata dai genetisti molecolari. Vedremo come lo studio delle sequenze di DNA abbia avuto un ruolo fondamentale nella comprensione dell'organizzazione strutturale dei geni e della loro relazione con i corrispondenti prodotti. Infatti, molte delle nostre conoscenze sulla complessità della struttura e del controllo dei geni eucariotici e sul ruolo dei geni nello sviluppo sono derivate dall'uso di queste metodologie. Il sequenziamento del DNA ha inoltre rivoluzionato la sistematica aiutando a comprendere le relazioni evolutive esistenti tra organismi diversi. Questo capitolo analizza anche le numerose applicazioni pratiche della tecnologia del DNA ricombinante. Oggi, l'area di studio che si è maggiormente sviluppata è l'ingegneria genetica, cioè la manipolazione del DNA di un organismo allo scopo di produrre nuovi geni con nuove caratteristiche. L'ingegneria genetica può essere utilizzata per diversi scopi che vanno dalla ricerca di base, fino alla creazione di ceppi batterici che sintetizzano un utile prodotto proteico o alla generazione di piante ed animali superiori che esprimono geni a loro originariamente estranei (vedi fotografia).

La grande applicabilità delle nuove scoperte sul clonaggio del DNA e le modificazioni molecolari sta radicalmente cambiando la nostra idea di biotecnologia, cioè dell'utilizzo commerciale o industriale di cellule ed organismi a beneficio dell'umanità. Oggigiorno le applicazioni biotecnologiche più frequentemente citate riguardano campi differenti, come la medicina, la farmaceutica, la produzione di cibo, l'agricoltura e le scienze forensi.

15.1 IL CLONAGGIO DEL DNA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

1. Spiegare come un tipico enzima di restrizione taglia le molecole di DNA e fornire alcuni esempi dell'utilizzo di questo tipo di enzimi nella tecnologia del DNA ricombinante.
2. Distinguere i concetti di libreria genomica, libreria cromosomica e libreria di DNA complementare (cDNA); spiegare perché si può clonare lo stesso gene eucariotico sia da una libreria genomica che da una di cDNA.
3. Descrivere gli utilizzi di una sonda genetica.
4. Descrivere il modo in cui la reazione a catena della polimerasi amplifica il DNA in vitro.

La tecnologia del DNA ricombinante non si è sviluppata velocemente: infatti, iniziò negli anni '40 da studi sulla genetica dei batteri e dei virus che li infettano, i batteriofagi (letteralmente "mangiatori di batteri") (vedi Fig. 12-2 che mostra batteriofagi adesi al batterio *Escherichia coli*). Il biologo molecolare Paul Berg fu il primo ricercatore a sintetizzare una molecola di DNA ricombinante; nel 1980 egli condivise il premio Nobel per la chimica per il suo contributo allo sviluppo delle tecnologie del DNA ricombinante. Solo dopo decenni di ricerca di base e con l'acquisizione di ampie conoscenze, le attuali tecnologie sono divenute accessibili ai molti ricercatori che oggi le utilizzano.

Nella tecnologia del DNA ricombinante, particolari enzimi batterici, noti come enzimi di restrizione, sono

utilizzati per tagliare il DNA a livello di specifiche sequenze, o siti. Gli enzimi di restrizione permettono di tagliare il DNA in frammenti maneggiabili. Ogni frammento può quindi essere introdotto in una molecola vettore, capace di trasportarlo in una cellula.

I batteriofagi e particolari molecole di DNA chiamate plasmidi, sono due esempi di vettori. Il DNA del cromosoma batterico è circolare; un plasmide è una molecola circolare più piccola di quella del cromosoma batterico, separata da esso, che può essere presente nella cellula batterica e può replicarsi autonomamente. I plasmidi possono essere introdotti in una cellula batterica, normalmente *E. coli*, con un metodo chiamato trasformazione, che consiste nell'assunzione di DNA estraneo da parte delle cellule (vedi Capitolo 12). Affinché la trasformazione sia efficiente, i ricercatori alterano le cellule con metodi chimici o con l'**elettroporazione** (sottoponendole ad uno shock elettrico) per rendere la membrana plasmatica permeabile alle molecole di DNA plasmidico. Una volta che il plasmide è all'interno della cellula, esso si replica e viene distribuito alle cellule figlie durante la divisione cellulare. Quando un **plasmide ricombinante**, che contiene al suo interno del DNA estraneo, si replica, si producono molte copie anche del DNA estraneo. In altre parole, il DNA estraneo viene clonato.

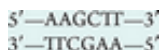
I trasposoni sono vettori estremamente efficienti per trasferire geni all'interno di topi o in altri organismi da laboratorio. Ricordando ciò che è stato spiegato nel Capitolo 13, i trasposoni sono elementi genetici mobili che possono autotrasferirsi da una regione del genoma ad un'altra.

Gli enzimi di restrizione sono “forbici molecolari”

Il maggiore progresso nello sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante è stato la scoperta di enzimi batterici detti enzimi di restrizione. Oggigiorno, i ricercatori hanno a disposizione un enorme numero di enzimi di restrizione, ognuno con le proprie caratteristiche. Per esempio, un enzima di restrizione noto come Hind III può riconoscere e tagliare una molecola di DNA in corrispondenza del sito di restrizione 5'—AAGCTT—3'. (Un **sito di restrizione** è una sequenza di DNA che contiene il sito di taglio riconosciuto da un determinato enzima di restrizione). Un altro enzima di restrizione, noto come **Eco** RI, taglia solo il sito 5'—GAATTC—3'. Il nome dell'enzima di restrizione deriva generalmente dal nome del batterio dal quale è stato originariamente isolato. Così, **Hind** III ed **Eco** RI derivano rispettivamente da *Haemophilus influenzae* e da *Escherichia coli*.

Perché i batteri producono tali enzimi? Durante l'infezione, un batteriofago inietta il suo DNA nella cellula batterica. Il batterio può difendersi se possiede gli enzimi di restrizione capaci di attaccare il DNA del batteriofago. La cellula batterica protegge il proprio DNA dall'azione di tali enzimi modificandolo dopo averlo sintetizzato. Un enzima aggiunge un gruppo metilico a una o più basi in ogni sito di restrizione, così che l'enzima di restrizione non è in grado di riconoscere e tagliare il DNA batterico.

Gli enzimi di restrizione permettono ai ricercatori di tagliare, in maniera controllata, il DNA dei cromosomi in frammenti più piccoli. Molti degli enzimi di restrizione usati negli studi sul DNA ricombinante tagliano sequenze palindromiche, termine che significa che la sequenza di basi su un filamento è uguale a quella del filamento complementare se entrambe sono lette in direzione 5' → 3'. Così, nel nostro esempio su Hind III, entrambi i filamenti portano la sequenza 5'—AAGCTT—3'. La molecola a doppia elica può essere così rappresentata:



Con il taglio di entrambi i filamenti di DNA in modo asimmetrico, questi enzimi producono frammenti con terminazioni identiche, complementari, a singolo filamento:



Queste terminazioni vengono chiamate **estremità coesive** (“**sticky ends**”) proprio perché tendono ad appaiarsi (attraverso legami a idrogeno) con le terminazioni complementari a singolo filamento di altre molecole di DNA ottenute con lo stesso enzima di restrizione (FIG. 15-1). Una volta che le due molecole si sono unite in questo modo, possono essere trattate con la DNA ligasi, che lega covalentemente i due frammenti, formando una molecola di DNA ricombinante stabile. (La DNA ligasi è già stata menzionata nel paragrafo sulla replicazione del DNA nel Capitolo 12).

Il DNA ricombinante si forma quando il DNA è inserito in un vettore

Nella tecnologia del DNA ricombinante, i genetisti tagliano sia il DNA da sottoporre a clonaggio, sia quello plasmidico, con lo stesso enzima di restrizione. I due DNA sono quindi mescolati in condizioni che facilitano la formazione di legami a idrogeno fra le basi complementari delle estremità adesive; la risultante molecola di DNA ricombinante è quindi saldata dalla DNA ligasi (FIG. 15-2).

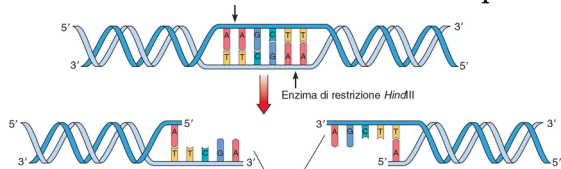


FIGURA 15-1 Taglio del DNA con un enzima di restrizione

Molti enzimi di restrizione, come Hind III, tagliano il DNA a livello di sequenze di basi palindromiche, producendo due estremità complementari, dette “sticky ends” o “estremità coesive”. Le frecce nere indicano i siti di taglio dell'enzima.

METODO DI RICERCA

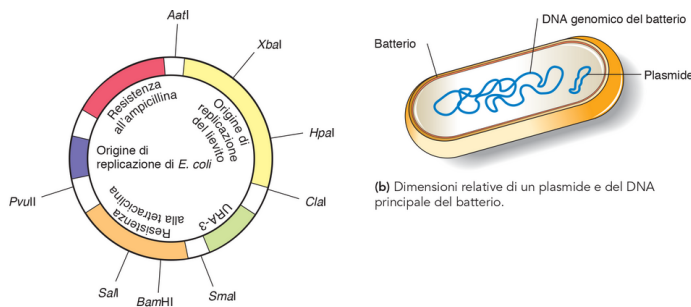
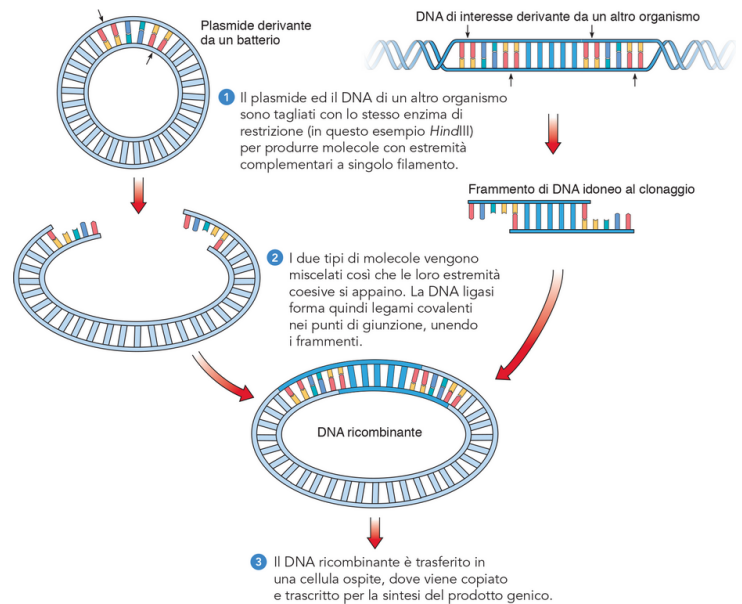
Perché si usa?

Un plasmide trasporta DNA estraneo in una cellula ospite batterica, dove sono fatte molte copie del gene di interesse, quando la cellula batterica divide. Queste copie vengono utilizzate in molti tipi di ricerca, per esempio, per ottenere il prodotto genico codificato dal DNA estraneo.

Come funziona?

FIGURA 15-2 →

Inserimento di DNA estraneo (gene di interesse) in un vettore di clonaggio (in questo esempio, un plasmide batterico) per generare DNA ricombinante



(a) Questo vettore plasmidico ingegnerizzato geneticamente presenta molte caratteristiche utili. È stato costruito combinando frammenti di DNA isolati da plasmidi, geni di *E. coli* e geni di lievito. Le due origini di replicazione, una per *E. coli* e una per il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, gli permettono di replicarsi indipendentemente nei due tipi di cellule. Le sigle nella circonferenza esterna indicano i siti per enzimi di restrizione che tagliano il plasmide solo ed esclusivamente in quella posizione. Sono mostrati anche i geni per la resistenza agli antibiotici ampicillina e tetraciclina ed il gene *URA-3* di lievito. Il gene *URA-3* è utile quando si trasformano le cellule di lievito che sono prive di un enzima necessario per la sintesi dell'uracile perché permette di identificare quelle che hanno ricevuto il plasmide. Le cellule che incorporano il plasmide, diversamente dalle cellule di partenza, divengono capaci di crescere in un mezzo deficitario di uracile.

← FIGURA 15-3
I plasmidi

I plasmidi oggi utilizzati negli studi sul DNA ricombinante sono stati “ingegnerizzati”, ovvero modificati geneticamente, in modo da inserire caratteristiche utili per meglio isolare ed analizzare il DNA clonato (FIG. 15-3). Fra queste, un’origine di replicazione (vedi Capitolo 12), uno o più siti di restrizione e geni che permettono ai ricercatori di selezionare le cellule che sono state trasformate da plasmidi ricombinanti. Questi sono geni che permettono

alle cellule trasformate di crescere in condizioni specifiche che, viceversa, non permettono la crescita delle cellule non trasformate. In questo modo, i ricercatori utilizzano caratteristiche che sono anche comunemente presenti nei plasmidi naturali. Normalmente, i plasmidi non contengono geni che in condizioni normali sono essenziali per le cellule batteriche, ma spesso contengono geni che sono utili solo in particolari condizioni, come i geni che conferiscono la resistenza ad un particolare antibiotico o che permettono alla cellula di utilizzare un particolare nutriente. Per esempio, le cellule trasformate con un plasmide che porta un gene per la resistenza all’antibiotico tetraciclina possono crescere in un terreno che contiene la tetraciclina, mentre le cellule non trasformate non lo possono fare.

Un limite all’utilizzo del plasmide come vettore è dato dalla taglia del frammento di DNA che questo può effettivamente trasportare. La lunghezza del frammento di DNA è spesso espressa in chilobasi (kb; 1 kb equivale a 1000 paia di basi). Di norma, frammenti inferiori a 10 kb possono essere inseriti in plasmidi per trasformare batteri quali *E. coli* . Frammenti più grandi, invece, richiedono come vettori l’uso di batteriofagi, che possono incorporare fino a 23 kb di DNA. Altri tipi di vettori includono i vettori di clonaggio cosmidici , che derivano dalla combinazione di caratteristiche dei batteriofagi e dei plasmidi, ed i cromosomi batterici artificiali (BAC), che possono incorporare frammenti di DNA molto più grandi. Ad esempio, un singolo BAC può incorporare fino a 200 kb di DNA esogeno, caratteristica questa che ha reso i BAC particolarmente utili nel **Progetto Genoma Umano**, che sarà discusso più avanti in questo capitolo. Il DNA ricombinante può anche essere introdotto in cellule di organismi superiori; per esempio, virus ingegnerizzati possono essere utilizzati come vettori in cellule di mammifero. Questi virus vengono modificati in modo da renderli incapaci di uccidere le cellule che infettano; tuttavia, il loro DNA, e ogni DNA estraneo che questi trasportano, viene incorporato nei cromosomi delle cellule durante l’infezione. Come verrà discusso più avanti, sono stati sviluppati altri metodi che non richiedono l’utilizzo di vettori biologici.

Il DNA può essere clonato nelle cellule

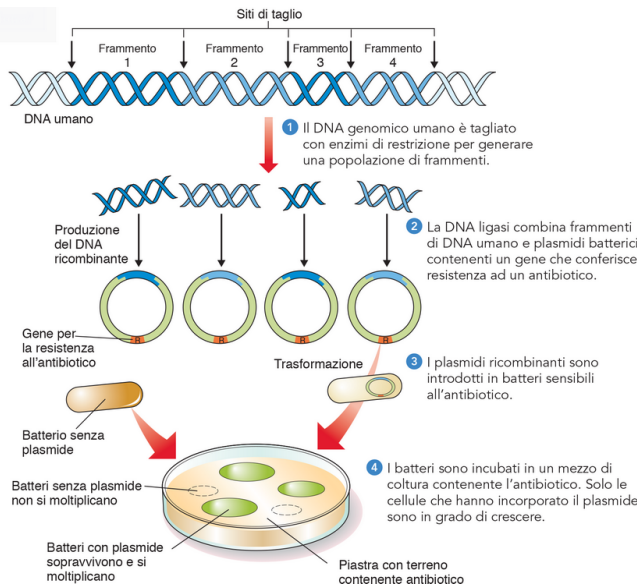
Poiché un singolo gene è solo una piccola parte del DNA totale di un organismo, isolare un frammento di DNA contenente un gene particolare è come trovare un ago in un pagliaio. È necessario perciò un potente rivelatore. Oggi ci sono molti metodi che permettono di isolare una specifica sequenza nucleotidica da un

organismo. Inizieremo con metodi per il clonaggio del DNA all'interno di cellule batteriche; come esempio, utilizzeremo il clonaggio di DNA umano, benché la procedura possa essere applicata a qualsiasi organismo.

Una libreria genomica contiene frammenti di DNA di tutto il genoma

Il DNA totale di una cellula costituisce il suo genoma. Per esempio, se si estrae il DNA da cellule umane, ci riferiamo ad esso come al DNA genomico umano. Una libreria genomica (genoteca) è una raccolta di migliaia di frammenti di DNA che rappresentano tutto il DNA del genoma. Ogni frammento è inserito in un plasmide, che normalmente viene incorporato in un batterio. Così, la libreria genomica umana è conservata come collezione di batteri ricombinanti, ciascuno dei quali contiene un diverso frammento di DNA umano. Le librerie genomiche vengono utilizzate per l'isolamento e lo studio di geni specifici. Inoltre, le genoteche contengono un numero elevato di sequenze che non codificano proteine.

Anche i singoli cromosomi possono essere isolati per costruire una libreria cromosomica che contenga tutti i frammenti di DNA che appartengono ad uno specifico cromosoma. Se è noto che un gene di interesse è associato ad un particolare cromosoma, più semplice isolare il gene da una libreria cromosomica piuttosto che da una libreria genomica.



METODO DI RICERCA

Perché si usa?

Una libreria genomica è una raccolta di tutti i frammenti di DNA del genoma di un organismo; una libreria cromosomica è una raccolta di tutti i frammenti di DNA di un cromosoma specifico. Ciascun frammento di DNA viene “conservato” in un clone di cellule batteriche ricombinanti. Gli scienziati usano librerie genomiche e cromosomiche per isolare e studiare geni.

Come funziona?

FIGURA 15-4

Costruzione di una libreria genomica o di una cromosomica

Per la realizzazione delle librerie genomiche o cromosomiche si utilizzano le metodiche di clonaggio appena descritte. La prima tappa è il taglio del DNA con un enzima di restrizione, per generare una popolazione di frammenti di DNA (FIG. 15-4). Questi frammenti varieranno per dimensione e per tipo di informazioni trasportate, ma avranno tutti terminazioni coesive identiche. Il DNA del vettore plasmidico viene trattato con lo stesso enzima di restrizione, il quale converte il plasmide circolare in una molecola lineare con terminazioni coesive complementari a quelle dei frammenti di DNA umano. I plasmidi ricombinanti si ottengono mescolando i due tipi di DNA (umano e plasmidico) in opportune condizioni che promuovono la formazione di legami a idrogeno fra le basi complementari; infine, le terminazioni appaiate del plasmide e del DNA umano sono riunite enzimaticamente dalla DNA ligasi. Durante questo procedimento, si formano anche plasmidi non ricombinanti (non mostrati in figura), in quanto alcuni riformano la loro struttura circolare senza incorporare DNA esogeno.

I plasmidi ricombinanti devono essere inseriti in cellule batteriche antibiotico-sensibili attraverso un meccanismo di trasformazione. Questa fase è realizzata stabilendo un basso rapporto tra plasmidi e cellule, così che sia un evento raro per una cellula ricevere più di un plasmide, e non tutte le cellule lo ricevano. Le cellule sono poi incubate in un terreno di coltura che contiene anche antibiotici, così che crescano solo quelle che hanno incorporato il plasmide (contenente il gene per la resistenza all'antibiotico). Inoltre, i vettori in genere sono ingegnerizzati in modo da permettere ai ricercatori di selezionare le cellule che contengono il vettore con inserito il DNA esogeno.

Le librerie genomiche e cromosomiche contengono ridondanze, cioè certe sequenze di DNA umano sono state inserite nei plasmidi più di una volta. Tuttavia, ogni plasmide ricombinante (in analogia con un libro di una biblioteca) contiene un singolo frammento del genoma umano totale.

Per permettere l'identificazione di un plasmide contenente una sequenza di interesse, ogni plasmide deve essere amplificato mediante clonaggio, finché si ottengono milioni di sue copie con cui lavorare. Questo processo avviene quando le cellule batteriche crescono e si dividono. Un campione diluito di una coltura batterica è distribuito su un mezzo di crescita solido (piastre con agar) in modo che le cellule siano ben separate. Ogni cellula si divide ripetutamente, dando origine a una colonia visibile, che è un clone di cellule geneticamente identiche in quanto originate da una singola cellula. Tutte le cellule di una certa colonia

contengono lo stesso plasmide ricombinante; così, durante questo processo, una specifica sequenza di DNA umano può essere clonata. Il compito più importante è determinare quale colonia (su migliaia di colonie formate) contenga il frammento di interesse clonato; ci sono molti modi per raggiungere tale obiettivo.

Una specifica sequenza di DNA può essere rivelata da una sonda genetica complementare

Supponiamo che un ricercatore voglia analizzare le migliaia di molecole di DNA ricombinante presenti nelle cellule batteriche, allo scopo di identificare quella che contiene il gene che codifica per una specifica proteina. Un approccio comune è quello di utilizzare una sonda genetica, anche detta sonda a DNA, che è un segmento di DNA omologo a parte della sequenza di interesse. La sonda a DNA è solitamente un singolo filamento di DNA che può ibridare (si attacca cioè per complementarietà di basi) con una sequenza di DNA complementare del gene bersaglio e che è identificabile in quanto marcata con traccianti radioattivi. Per capire quale colonia porti la sequenza di DNA di interesse, le cellule delle colonie batteriche contenenti i plasmidi ricombinanti possono essere trasferite su un filtro di nitrocellulosa o su una membrana di nylon (

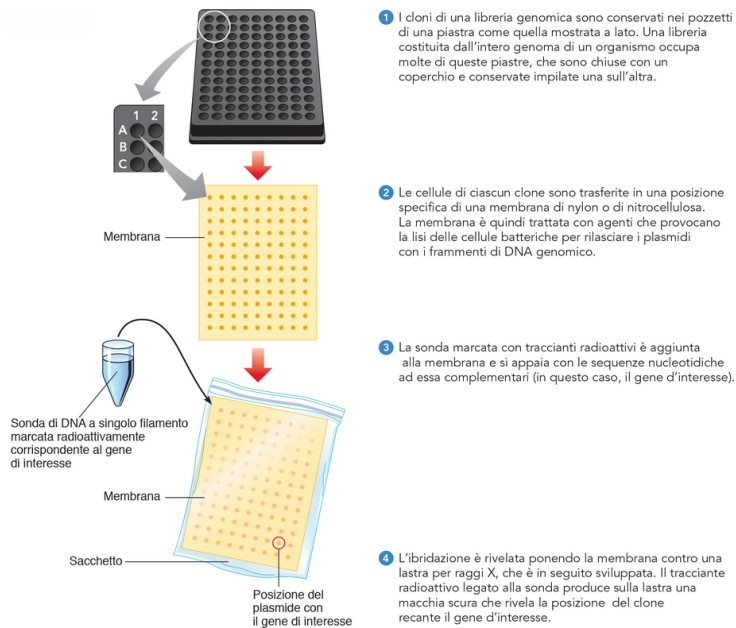


FIG. 15-5). Le cellule sul filtro vengono trattate chimicamente per lisarle e per denaturare il DNA, renderlo cioè a singolo filamento. (Il DNA a singolo filamento si lega alla membrana). Il filtro è poi incubato con la miscela di sonde radioattive in modo che possano ibridare con qualsiasi DNA complementare presente.

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

Una sonda radioattiva di acido nucleico rivela la presenza di sequenze complementari di DNA in una libreria genomica.

Come funziona?

FIGURA 15-5

Uso di una sonda di acido nucleico per identificare una specifica sequenza di DNA in una libreria genomica

Ogni colonia sul filtro contenente DNA complementare a quella particolare sonda diventa radioattiva e può essere rilevata per autoradiografia (vedi Capitolo 2), usando una lastra per raggi X. Ogni macchia sulla lastra identifica, quindi, una colonia che contiene un plasmide che include il DNA di interesse. Le cellule delle colonie di interesse sono quindi prelevate dalla piastra originaria e poste in coltura, in modo da produrre milioni di nuovi batteri, tutti contenenti il DNA ricombinante specifico.

Una libreria di cDNA è complementare all'mRNA e non contiene introni

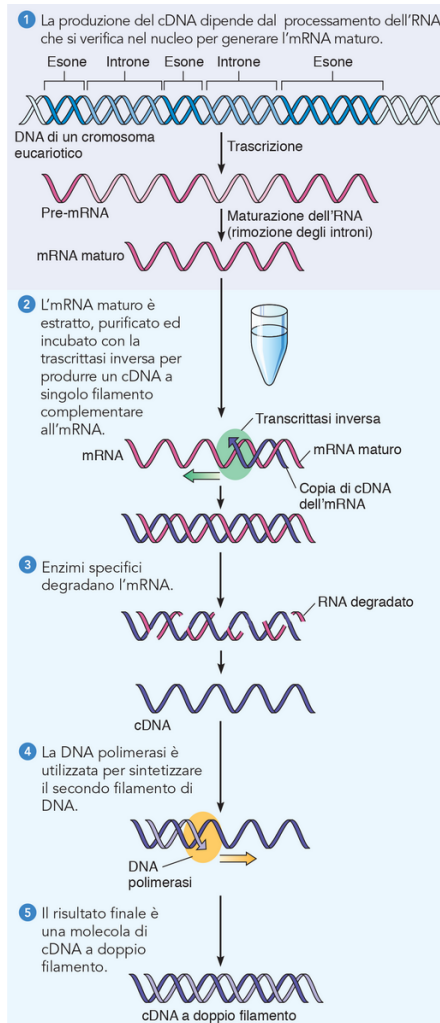
I ricercatori frequentemente vogliono clonare intere sequenze geniche, evitando però di clonare gli introni , cioè le porzioni dei geni eucariotici che non codificano le proteine. Inoltre, spesso vogliono clonare soltanto i geni che vengono espressi in un particolare tipo cellulare. In questi casi, vengono costruite librerie contenenti molecole di DNA, che sono la copia degli mRNA maturi, dai quali quindi sono stati rimossi gli introni. Anche le copie, note come DNA complementare (cDNA) perché sono complementari all'mRNA, mancano degli introni. La trascrittasi inversa (vedi Capitolo 13) è usata per sintetizzare il cDNA a singolo filamento, che è poi reso a doppio filamento utilizzando la DNA polimerasi (FIG. 15-6). Le copie di DNA (cDNA) ottenute dalla popolazione di mRNA di una singola cellula, una volta rese a doppio filamento, possono essere inserite in vettori plasmidici o virali, che poi si moltiplicano nelle cellule batteriche per formare una libreria di cDNA .

L'analisi dei cloni di cDNA permette ai ricercatori di conoscere alcune caratteristiche della proteina codificata dal gene, compresa la sua esatta sequenza aminoacidica. Può anche essere studiata la struttura dell'mRNA maturo. Dato che il cDNA è la copia dell'mRNA e non contiene sequenze introniche, il confronto fra la sequenza di basi presenti nel cDNA e il DNA genomico (o una libreria cromosomica) rivela la collocazione di introni ed esoni nel gene.

Le sequenze di cDNA clonate sono anche molto utili nel caso si voglia ottenere una certa proteina eucariotica nei batteri. Quando si introduce in un batterio un gene umano contenente introni, come il gene per l'ormone della crescita, il batterio è incapace di rimuovere gli introni dal trascritto primario di RNA per ottenere l'mRNA funzionale necessario per la produzione del suo prodotto proteico. Se però si inserisce nel batterio un clone di cDNA del gene, il suo trascritto conterrà solo la regione codificante ininterrotta. Si può

tuttavia sintetizzare una proteina funzionale solo se il gene è inserito a valle di un promotore batterico appropriato e se vi si inserisce un appropriato segnale di inizio di traduzione batterico.

La reazione a catena della polimerasi è una tecnica per amplificare il DNA in vitro



I metodi di amplificazione di una specifica sequenza di DNA sopra descritti comportano tutti il clonaggio del DNA in cellule, generalmente utilizzando quelle di tipo batterico. Questi processi richiedono una discreta quantità di tempo ed una adeguata quantità di DNA di partenza. La reazione a catena della polimerasi (PCR), una tecnica sviluppata dal biochimico statunitense Kary Mullis nel 1985, permette di amplificare una minuscola quantità di DNA milioni di volte ed in poche ore **senza clonare all'interno di cellule**. Nel 1993, Mullis è stato insignito del premio Nobel per la Chimica.

FIGURA 15-6 Formazione del cDNA

Nella PCR la DNA polimerasi utilizza nucleotidi e primer per replicare in vitro la sequenza di DNA di interesse, producendo due molecole di DNA (FIG. 15-7). I due filamenti di ogni molecola sono separati col calore e duplicati di nuovo, così da produrre quattro molecole a doppio filamento. Dopo un successivo ciclo di riscaldamento e duplicazione, le molecole saranno otto, e così via; il numero di molecole di DNA raddoppierà ad ogni ciclo. Dopo 20 cicli successivi, questo processo esponenziale produrrà 2^{20} , ovvero più di un milione di copie della sequenza cercata! Poiché la reazione è efficiente solamente se la DNA polimerasi rimane stabile anche dopo numerosi cicli di riscaldamento, nel processo si usa una speciale DNA polimerasi termostabile, la Taq polimerasi. Il nome dell'enzima riflette la sua fonte, *Thermus aquaticus*, un batterio che vive in sorgenti termali calde nel Parco Nazionale di Yellowstone. Poiché la temperatura dell'acqua in questo ambiente è vicina al punto di ebollizione, tutti gli enzimi del *T. aquaticus* si sono evoluti in una forma che risulta stabile alle alte temperature (nel Capitolo 3 è stato spiegato che la maggior parte delle proteine si denatura irreversibilmente alle alte temperature, modificando la propria forma e perdendo l'attività biologica). Enzimi simili possono essere trovati in batteri che vivono nei soffioni termali dei mari profondi.

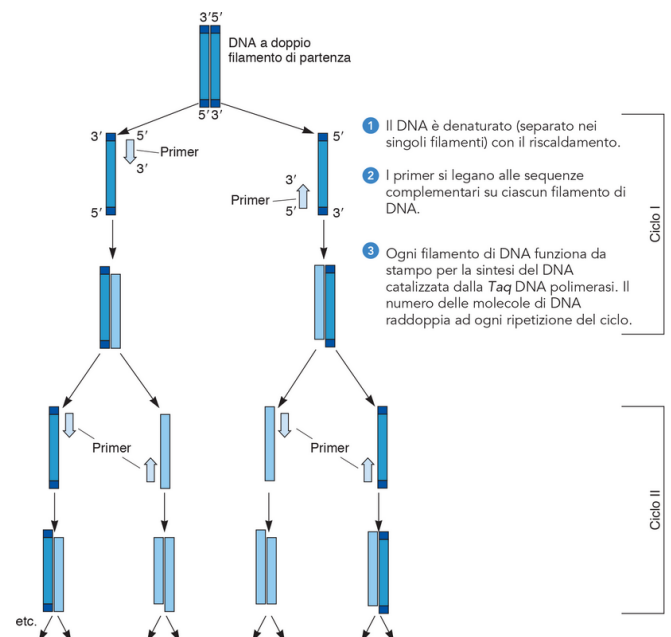
METODO DI RICERCA

In poche ore la PCR è in grado di amplificare quantità estremamente piccole di DNA generandone milioni di copie.

Perché si usa? Come funziona?

La miscela di reazione iniziale include una piccolissima quantità di DNA a doppio filamento, i precursori del DNA (deossiribonucleotidi), specifici primer di acido nucleico e la Taq DNA polimerasi termostabile. La reazione di PCR coinvolge ripetuti cicli di denaturazione, attacco dei primer ed estensione del filamento, eseguita da enzimi che sfruttano l'appaiamento di basi complementari.

FIGURA 15-7 Amplificazione del DNA tramite la reazione di polimerizzazione a catena (PCR)



La tecnica della PCR teoricamente ha applicazioni illimitate. Rende il clonaggio semplice; permette l'amplificazione e l'analisi di campioni molto esigui di DNA da sorgenti varie, quali scene di crimini o resti archeologici. Per esempio, la PCR ha permesso di effettuare la prima analisi di DNA mitocondriale ottenuto dalle ossa dell'uomo di Neandertal (vedi Capitolo 22). Parte del genoma di Neandertal è stato sequenziato nel 2006, consentendo confronti con le regioni equivalenti presenti nel genoma dell'uomo moderno.

Se la tecnica della PCR ha un limite, questo è imputabile alla eccessiva sensibilità della tecnica. Infatti, anche una minima quantità di DNA contaminante presente nel campione, può potenzialmente essere amplificata e portare ad una errata conclusione. I ricercatori, consapevoli di questo aspetto, migliorano costantemente i metodi per eliminare questo ed altri problemi tecnici.

Verifica

- Che cosa sono gli enzimi di restrizione? Come vengono usati nella ricerca basata sul DNA ricombinante?
- Quali sono i vantaggi relativi di librerie genomiche, librerie cromosomiche e librerie di cDNA?
- Come vengono utilizzate le sonde genetiche?
- Perché la PCR è una tecnica di grande valore?

15.2 L'ANALISI DEL DNA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

5. Fare una distinzione tra blotting del DNA, dell'RNA e delle proteine.
6. Descrivere il metodo di terminazione della catena per il sequenziamento del DNA.

Il clonaggio del DNA che utilizza cellule e la tecnica della PCR hanno avuto un grande impatto sull'analisi genetica, in quanto forniscono quantità di materiale genetico sufficienti per poter rispondere a quesiti fondamentali relativi a specifici geni ed ai loro RNA o prodotti proteici. Per esempio, in quale momento è espresso un gene, ed in che modo? Un determinato gene è identico nei diversi individui? È diverso in specie differenti? Dov'è localizzato il gene all'interno del genoma? In questo e nel successivo paragrafo, prenderemo in considerazione varie tecniche che ci aiuteranno a rispondere a questi interrogativi. Quindi, nell'ultimo paragrafo del capitolo, esamineremo alcune delle applicazioni pratiche della tecnologia del DNA.

L'elettroforesi su gel è utilizzata per separare le macromolecole

Miscele di certe macromolecole, come polipeptidi, frammenti di DNA o RNA, possono essere separate per elettroforesi su gel, un metodo che sfrutta il fatto che queste molecole hanno gruppi carichi che provocano la loro migrazione in un campo elettrico. La FIGURA 15-8 illustra l'elettroforesi di molecole di DNA. Gli acidi nucleici migrano attraverso il gel verso il polo positivo del campo elettrico, perché sono carichi negativamente a causa dei gruppi fosfato. Poiché il gel ritarda maggiormente il movimento delle molecole grandi rispetto a quelle piccole, la velocità a cui viaggiano nel gel è inversamente proporzionale alla loro dimensione (peso molecolare). Includendo nella corsa elettroforetica anche frammenti di DNA di dimensione nota come riferimento, è possibile misurare accuratamente il peso molecolare dei frammenti sconosciuti. Successivamente alla separazione in campo elettrico, il gel viene colorato per rilevare il numero e la posizione dei frammenti.

I blot di DNA, RNA e proteine permettono di individuare frammenti specifici

I frammenti di DNA possono essere identificati tramite ibridazione con una sonda complementare; tuttavia, è impossibile ibridare una sonda con frammenti di DNA contenuti in un gel. Per questo motivo, il DNA viene normalmente denaturato e trasferito su un filtro di nitrocellulosa, che trattiene il DNA come una carta assorbente trattiene l'inchiostro. Il blot che ne risulta, che è essenzialmente una replica del gel, viene incubato con una sonda di DNA, che ibrida con qualsiasi frammento di DNA ad essa complementare. Se si utilizza una sonda radioattiva, il blot viene poi sottoposto ad autoradiografia. Le macchie che risultano sulla lastra per raggi X corrispondono alla posizione nel gel dei frammenti complementari alla sonda. Oggigiorno, molte sonde vengono rivelate per chemiluminescenza, la quale viene analizzata da scanner computerizzati, eliminando così la necessità di effettuare l'autoradiografia.

Questo metodo di identificazione di frammenti di DNA, che si basa sulla loro separazione per elettroforesi su gel e sul successivo trasferimento su filtri di nitrocellulosa o di nylon, è detto Southern blot, dal nome del suo inventore, Edward M. Southern, dell'Università di Edimburgo in Scozia (FIG. 15-9). Questa procedura ha ampie applicazioni. È spesso usata per diagnosticare certi tipi di disordini genetici. Per esempio, in alcuni casi un gene mutato può essere rivelato in quanto nel gel migra in modo diverso rispetto alla sua controparte normale.

Tecniche simili di trasferimento sono usate per studiare l'RNA e le proteine. Quando le molecole di RNA separate per elettroforesi sono trasferite su una membrana, si parla di Northern blot. Nella stessa ottica, il

termine Western blot è applicato al trasferimento di proteine o di polipeptidi previamente separati per elettroforesi su gel. (Fino ad ora, nessuno ha inventato un tipo di trasferimento che possa essere denominato Eastern blot). Nel caso del Western blot, i polipeptidi di interesse sono riconosciuti da molecole di anticorpo marcate che si legano in modo specifico. Per esempio, il Western blot è utilizzato per diagnosticare la presenza di proteine del virus umano dell'immunodeficienza (HIV-1), che causa l'AIDS.

I polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione sono una misura delle correlazioni genetiche

La variabilità dei geni all'interno di una popolazione può essere studiata in diversi modi. Un approccio tradizionale si basa sul fatto che le mutazioni casuali nel DNA e la ricombinazione possono dare origine ad individui che differiscono per la lunghezza dei frammenti prodotti da un determinato enzima di restrizione. Tali polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione, noti più comunemente come RFLP, possono essere utilizzati per determinare il grado di correlazione tra i diversi membri di una popolazione. (Il termine **polimorfismo** significa "molte forme" e si riferisce alle differenze ereditarie presenti all'interno di una popolazione). Si dice che esiste un polimorfismo genetico se in una popolazione sono presenti individui di due o più tipi discreti, anche detti "morfe".

1 Il gel è preparato versando una soluzione di agarosio o poliacrilamide su un supporto di vetro o di Plexiglas in un modo da formare uno strato sottile. Quando il gel si è solidificato, i campioni, costituiti da una miscela di macromolecole (in questo caso, frammenti di DNA di diversa lunghezza) sono disposti nei pozzetti preparati ad un'estremità del gel.

2 Quando al gel è applicata una corrente elettrica, le molecole di DNA, che hanno carica negativa, si muovono dal polo negativo verso il polo positivo. I frammenti più piccoli avanzano più rapidamente e percorrono una distanza maggiore. Le bande di DNA a questo stadio non sono visibili.

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

L'elettroforesi su gel separa molecole, come gli acidi nucleici, sulla base della loro dimensione e carica mentre migrano attraverso un campo elettrico.

Come funziona?

FIGURA 15-8

L'elettroforesi su gel

Il DNA estratto da due o più individui viene tagliato con enzimi di restrizione ed i frammenti sono separati per elettroforesi su gel, ponendo il DNA di ciascun individuo in una corsia diversa; i frammenti di dimensioni inferiori migrano di più rispetto a quelli più lunghi. Per visualizzare i frammenti, si effettua un Southern blot del DNA presente sul gel, che viene quindi denaturato e fatto ibridare con una sonda di DNA. Gli schemi di bande risultanti possono poi essere confrontati.

L'analisi degli RFLP è stata usata per effettuare attribuzioni di paternità ed analisi di prove presenti

sulla scena di un crimine, ed anche per mappare l'esatta localizzazione di mutazioni geniche, come quella che causa la fibrosi cistica. Sebbene la tecnica degli RFLP abbia prodotto informazioni utili in varie aree della biologia, è stata rapidamente sostituita da metodiche più innovative, come il sequenziamento automatizzato del DNA (discusso nel paragrafo successivo).

METODO DI RICERCA

Perché si usa?

La tecnica del Southern blotting consiste nel trasferimento su un filtro dei frammenti di DNA separati per elettroforesi, con il mantenimento delle stesse posizioni che occupavano sul gel. I frammenti possono essere così ibridati con sonde radioattive complementari.

Come funziona?

FIGURA 15-9

La tecnica del Southern blotting

Metodi rapidi per il sequenziamento del DNA

Un modo per caratterizzare il DNA è determinare la sua sequenza nucleotidica. Un pezzo di DNA clonato può essere usato come mezzo di ricerca per un gran numero di applicazioni. Per esempio, il clonaggio di un gene può consentire di ottenere la corrispondente proteina utile per

