CAPITOLO

13

Il DNA: struttura e duplicazione

Una molecola che sa fare due cose: conservare un messaggio per miliardi di anni e copiarlo, a ogni divisione, quasi senza errori.

OBIETTIVI

1. Ricostruire gli esperimenti di Griffith, di Avery, MacLeod e McCarty e di Hershey e Chase che hanno identificato nel DNA il materiale genetico.
2. Descrivere il modello a doppia elica e usare le regole di Chargaff e l'appaiamento complementare delle basi.
3. Interpretare l'esperimento di Meselson e Stahl e spiegare perché la duplicazione è semiconservativa.
4. Descrivere la duplicazione alla forcella: enzimi, filamento guida e filamento lento, frammenti di Okazaki, correzione e riparazione.
5. Spiegare il problema delle estremità e il ruolo di telomeri e telomerasi.
6. Descrivere l'organizzazione del DNA nei procarioti e negli eucarioti e le dimensioni del genoma umano.

INDICE DEL CAPITOLO

13.1 Alla ricerca del materiale genetico 2
13.2 La struttura del DNA 5
13.3 La duplicazione del DNA 9
13.4 Il problema delle estremità: telomeri e telomerasi 15
13.5 L'organizzazione del DNA nella cellula 16

Scienze naturali 3 · Parte IV · Le basi molecolari della vita e il corpo umano · versione 1.0
Capitolo 13: Il DNA: struttura e duplicazione · pagine 333–358 del volume completo · estratto per lo studio

Ogni volta che una cellula del tuo corpo si divide, prima copia il proprio DNA: circa sei miliardi di coppie di basi, in poche ore, sbagliando in media circa una volta ogni miliardo di basi copiate. Lo stesso DNA, srotolato, sarebbe lungo circa due metri, eppure sta in un nucleo di pochi micrometri. In questo capitolo vedremo come si scoprì che il materiale ereditario è proprio il DNA, com'è fatta la sua molecola, come viene copiata e come è ripiegata nella cellula. Sono le basi molecolari di tutta la genetica che hai studiato lo scorso anno: i geni di Mendel, i cromosomi della mitosi e della meiosi, le mutazioni.

DA RICORDARE

Richiamo. In *Scienze naturali 2*, cap. 2, hai visto che gli acidi nucleici sono polimeri di nucleotidi. Ogni nucleotide è formato da uno zucchero a cinque atomi di carbonio (desossiribosio nel DNA, ribosio nell'RNA), da un gruppo fosfato legato al carbonio 5′ e da una base azotata legata al carbonio 1′. Le basi del DNA sono adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T); nell'RNA l'uracile (U) sostituisce la timina. Un filamento ha una direzione: un'estremità 5′, con il fosfato libero, e un'estremità 3′, con un gruppo –OH libero sul carbonio 3′.

Le basi appartengono a due famiglie chimiche. Le **purine**, adenina e guanina, hanno due anelli condensati; le **pirimidine**, citosina, timina e uracile, hanno un solo anello. Questa differenza di dimensioni, come vedremo, è decisiva per la forma della doppia elica.

13.1 Alla ricerca del materiale genetico

13.1.1 Proteine o DNA?

All'inizio del Novecento si sapeva che i geni stanno sui cromosomi (*Scienze naturali 2*, cap. 7) e che i cromosomi contengono due tipi di molecole: proteine e DNA. Quale delle due porta l'informazione ereditaria? La maggior parte dei biologi puntava sulle proteine. Sono costruite con venti amminoacidi diversi e hanno forme e funzioni variatissime, mentre il DNA, con soli quattro nucleotidi, sembrava una molecola troppo monotona per «scrivere» le istruzioni di un organismo. Per rispondere servivano esperimenti capaci di separare le due ipotesi: tre di questi, condotti fra il 1928 e il 1952, sono diventati classici.

13.1.2 L'esperimento di Griffith: il principio trasformante

Nel 1928 il medico inglese Frederick Griffith studiava lo pneumococco, *Streptococcus pneumoniae*, un batterio che causa la polmonite. Ne usava due ceppi. I batteri del ceppo **S** (dall'inglese *smooth*, «liscio», per l'aspetto delle loro colonie) sono avvolti da una capsula di polisaccaridi che

li protegge dalle difese dell'ospite: iniettati in un topo, lo uccidono. I batteri del ceppo **R** (*rough*, «rugoso») non hanno la capsula e sono innocui (Figura 13.1).

Griffith osservò che anche i batteri S uccisi con il calore erano innocui. Ma quando iniettò nei topi una miscela di batteri S uccisi e batteri R vivi, i topi morirono, e dal loro sangue si isolarono batteri S *vivi*, capaci di trasmettere la capsula alle generazioni successive. Qualcosa, passato dai batteri morti a quelli vivi, ne aveva cambiato in modo ereditario le caratteristiche. Griffith parlò di **trasformazione** dei batteri; la sostanza responsabile, di natura ancora sconosciuta, fu chiamata **principio trasformante**. La trasformazione è uno dei modi in cui i batteri si scambiano geni: la ritroverai nel cap. 15.

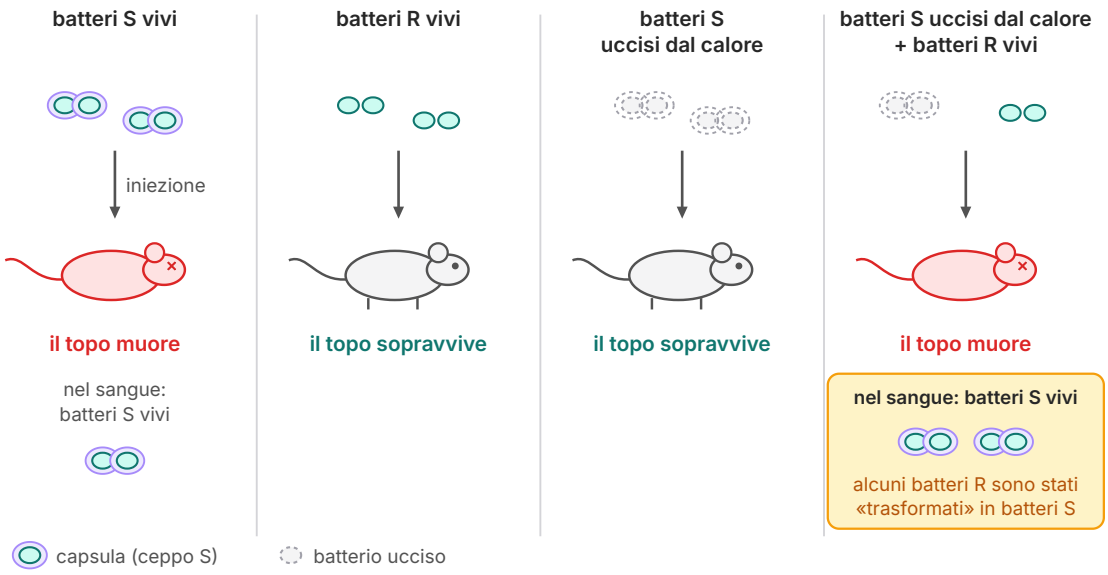

Figura 13.1 L'esperimento di Griffith (1928). I batteri S, con la capsula, sono letali; i batteri R, senza capsula, e i batteri S uccisi dal calore sono innocui. La miscela di S uccisi e R vivi uccide il topo, e dal suo sangue si isolano batteri S vivi: una sostanza dei batteri morti ha trasformato alcuni batteri R. Schema non in scala.

13.1.3 Avery, MacLeod e McCarty: il principio trasformante è il DNA

Che cos'era il principio trasformante? Al Rockefeller Institute di New York Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty lavorarono per anni per purificarlo da estratti di batteri S uccisi, e nel 1944 pubblicarono il risultato. L'estratto attivo aveva la composizione chimica del DNA. Soprattutto, la sua capacità di trasformare i batteri R non cambiava se lo si trattava con enzimi che distruggono le proteine (proteasi) o l'RNA (ribonucleasi), mentre spariva se lo si trattava con un enzima che distrugge il DNA (desossiribonucleasi). È il ragionamento del controllo che conosci dal laboratorio: si toglie un componente alla volta e si guarda quando l'effetto scompare.

Molti biologi però non si convinsero: nell'estratto poteva restare una traccia di proteine. Serviva una prova indipendente.

13.1.4 Hershey e Chase: che cosa entra nella cellula

La prova arrivò nel 1952 da Alfred Hershey e Martha Chase, che lavoravano con un **batteriofago** (o semplicemente fago), un virus che infetta i batteri. Il fago T2 è fatto solo di un involucro di proteine che racchiude una molecola di DNA (*Scienze naturali 2*, cap. 12). Quando infetta un batterio di *Escherichia coli*, si attacca alla superficie e fa entrare qualcosa nella cellula; dopo meno di mezz'ora il batterio si rompe e libera un centinaio o più di nuovi fagi. Quel «qualcosa» che entra è dunque l'informazione per costruire nuovi fagi: è proteina o DNA?

Hershey e Chase sfruttarono una differenza chimica fra le due molecole. Le proteine contengono zolfo (negli amminoacidi cisteina e metionina) e quasi niente fosforo; il DNA contiene fosforo nei gruppi fosfato e niente zolfo. Prepararono quindi due lotti di fagi: uno prodotto in batteri cresciuti con zolfo radioattivo, ^{35}S, che marca le proteine; l'altro con fosforo radioattivo, ^{32}P, che marca il DNA (gli isotopi radioattivi li hai studiati nel cap. 3). Con ciascun lotto infettarono i batteri; dopo pochi minuti agitarono la coltura in un frullatore per staccare i fagi dalla superficie delle cellule e la centrifugarono. I batteri, più pesanti, si raccolsero sul fondo della provetta (il sedimento), mentre gli involucri dei fagi, più leggeri, restarono nel liquido (Figura 13.2).

Con lo ^{35}S la radioattività restava per la maggior parte nel liquido, insieme agli involucri vuoti; con il ^{32}P finiva per la maggior parte nel sedimento, cioè dentro i batteri. Inoltre una parte del ^{32}P, e non dello ^{35}S, si ritrovava nei nuovi fagi prodotti dall'infezione. Era il DNA, non la proteina, a entrare nella cellula e a passare alla generazione successiva. Insieme al lavoro di Avery, l'esperimento convinse quasi tutti: il materiale genetico è il DNA. (In alcuni virus, come quello dell'influenza, il materiale genetico è invece l'RNA: lo vedrai nel cap. 15.)

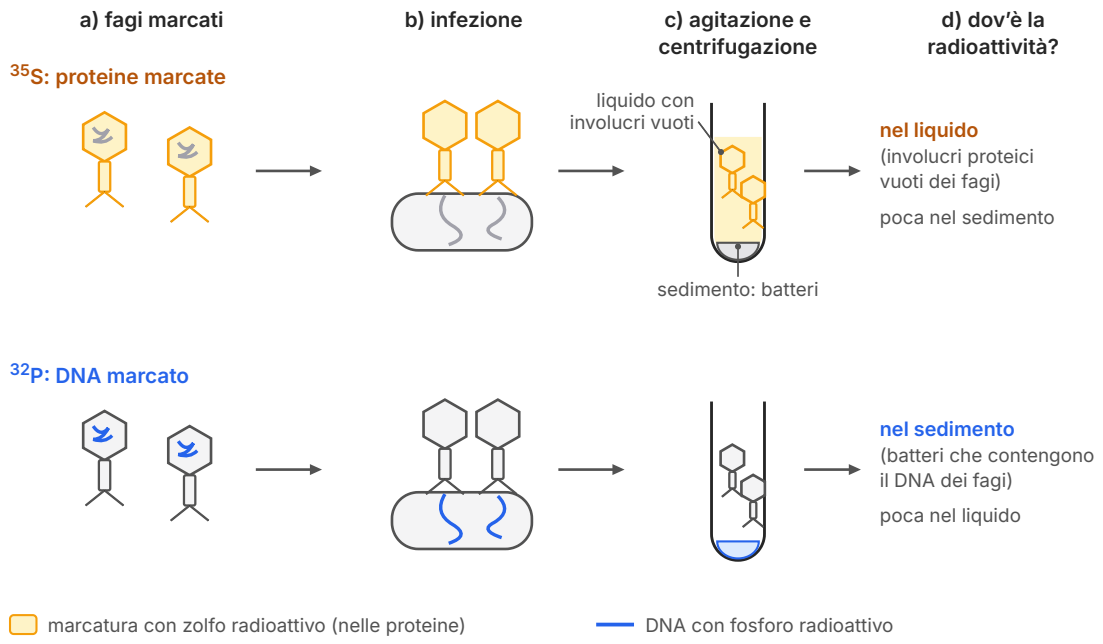

Figura 13.2 L'esperimento di Hershey e Chase (1952). In alto, fagi con le proteine marcate con zolfo radioattivo; in basso, fagi con il DNA marcato con fosforo radioattivo. Dopo l'infezione, l'agitazione stacca gli involucri dai batteri e la centrifugazione raccoglie i batteri sul fondo. La radioattività segue il DNA dentro i batteri, mentre le proteine restano fuori. Schema non in scala.

13.2 La struttura del DNA

13.2.1 Le regole di Chargaff

Sapere che i geni sono fatti di DNA non bastava: bisognava capire come una molecola possa conservare un'informazione e copiarla. Il primo indizio venne dalla chimica. Il biochimico austriaco Erwin Chargaff, alla Columbia University, misurò con la cromatografia su carta le quantità delle quattro basi nel DNA di molte specie e nel 1950 ne riassunse i risultati. Le proporzioni delle basi cambiano da una specie all'altra, ma sono le stesse in tessuti diversi dello stesso organismo; e in ogni DNA la quantità di adenina è uguale a quella di timina, e la quantità di guanina è uguale a quella di citosina. Sono le **regole di Chargaff**: espresse in moli, o in percentuale sul totale delle basi, A = T e G = C.

Ne segue che le purine sono quante le pirimidine (A + G = T + C = 50 %) e che basta conoscere la percentuale di una base per ricavare tutte le altre. Il dato che distingue le specie è invece il **contenuto in G + C**: nel genoma umano è in media del 41 % (dato del Progetto Genoma Umano, 2001); nel parassita della malaria *Plasmodium falciparum* scende a circa il 19 %, perché A e T in-

sieme sono l'80,6 % (Gardner e colleghi, 2002). Chargaff non seppe spiegare il perché di queste uguaglianze; la spiegazione arrivò tre anni dopo, con la doppia elica.

ESEMPIO SVOLTO

Dalle percentuali di Chargaff alla composizione completa

Problema. Nel DNA umano il contenuto medio in G + C è il 41 %. Calcola la percentuale di ciascuna delle quattro basi. Fai lo stesso per il DNA di *Plasmodium falciparum*, in cui A + T = 80,6 %.

Soluzione. Poiché G = C, ciascuna delle due basi è la metà di G + C; le altre due si dividono il resto. DNA umano: G = C = 41 % / 2 = 20,5 %; A + T = 100 % − 41 % = 59 %, quindi A = T = 29,5 %. *Plasmodium*: A = T = 80,6 % / 2 = 40,3 %; G + C = 19,4 %, quindi G = C = 9,7 %.

Risultato. Uomo: A = T = 29,5 %, G = C = 20,5 %. *Plasmodium*: A = T = 40,3 %, G = C = 9,7 %. Controllo: in entrambi i casi la somma è 100 % e le purine (A + G) sono il 50 %.

Attenzione. Le regole non dicono che le quattro basi sono al 25 %, né che A = G: sono uguali le basi *complementari*. E valgono solo per il DNA a doppio filamento: in un singolo filamento, o nell'RNA, le basi non sono appaiate (5′-AAAGA-3′ ha quattro A e nessuna T).

13.2.2 I raggi X e la foto 51

Il secondo indizio venne dalla fisica. Quando un fascio di raggi X attraversa un materiale ordinato, come un cristallo o una fibra di molecole allineate, viene deviato e forma su una lastra fotografica una figura di macchie, detta figura di diffrazione. Dalla posizione delle macchie si ricavano le distanze che si ripetono nella struttura. Al King's College di Londra due gruppi studiavano così le fibre di DNA: quello di Maurice Wilkins e quello di Rosalind Franklin, una chimica-fisica esperta di cristallografia, con il suo dottorando Raymond Gosling.

Franklin capì che il DNA esiste in due forme, secondo l'umidità delle fibre, e ottenne immagini molto nitide della forma idratata, detta forma B, quella che si trova nelle cellule. Una di queste, scattata nel maggio 1952 e nota come «foto 51», mostra una caratteristica croce di macchie, il segno di una struttura elicoidale; dalle sue misure risultava che l'elica ha un diametro di circa 2 nm, che una distanza di 3,4 nm si ripete lungo l'asse e che i gruppi fosfato stanno all'esterno della molecola.

13.2.3 Il modello di Watson e Crick

A Cambridge l'americano James Watson e l'inglese Francis Crick cercavano di costruire un modello del DNA che fosse compatibile con tutti i dati, usando sagome di cartone e di metallo delle basi e dello scheletro. Il 25 aprile 1953 la rivista *Nature* pubblicò il loro articolo, di poco più di una pagina, insieme a due articoli con i dati sperimentali di Wilkins e dei suoi colleghi e di Franklin e Gosling. Il modello è quello che conosci dal volume dello scorso anno e che la Figura 13.3 mostra nei particolari:

- la molecola è una **doppia elica**: due filamenti avvolti l'uno sull'altro attorno a un asse comune, con un avvolgimento destrorso (gira come una normale vite);
- i due filamenti sono **antiparalleli**: uno corre in direzione 5′→3′, l'altro, accanto, in direzione 3′→5′;
- lo **scheletro zucchero–fosfato** sta all'esterno, a contatto con l'acqua; in ogni filamento i nucleotidi sono uniti da **legami fosfodiesterici**, legami covalenti in cui un gruppo fosfato collega il carbonio 3′ di uno zucchero al carbonio 5′ dello zucchero successivo;
- le basi stanno all'interno, impilate come i gradini di una scala a chiocciola, e si appaiano sempre allo stesso modo: A con T, con due **legami a idrogeno**, e G con C, con tre;
- il diametro è di circa 2 nm; ogni coppia di basi dista dalla successiva 0,34 nm e un giro completo dell'elica, lungo 3,4 nm, contiene circa 10 coppie di basi.

L'**appaiamento complementare** spiega le regole di Chargaff: se ogni A di un filamento sta di fronte a una T dell'altro, nel doppio filamento A e T sono per forza in numero uguale, e così G e C. Spiega anche il diametro costante: ogni coppia è formata da una purina (due anelli) e da una pirimidina (un anello), e occupa sempre lo stesso spazio fra i due scheletri. Una coppia A–G sarebbe troppo larga, una coppia C–T troppo stretta. Gli appaiamenti A–T e G–C sono gli unici in cui i gruppi delle due basi si trovano nella posizione giusta per formare legami a idrogeno.

I legami a idrogeno li hai studiati nel cap. 7: sono interazioni fra un atomo di idrogeno legato a un atomo molto elettronegativo (azoto od ossigeno, nelle basi) e una coppia solitaria di un altro atomo di azoto o di ossigeno. Ciascuno è molto più debole di un legame covalente: per questo i due filamenti possono separarsi senza che si rompano i filamenti stessi, come accade quando il DNA viene copiato. Ma nel DNA sono milioni, e insieme alle interazioni fra le basi impilate rendono la doppia elica stabile a temperatura corporea. Un DNA ricco di G + C, con tre legami a idrogeno per coppia, richiede una temperatura più alta per separare i filamenti.

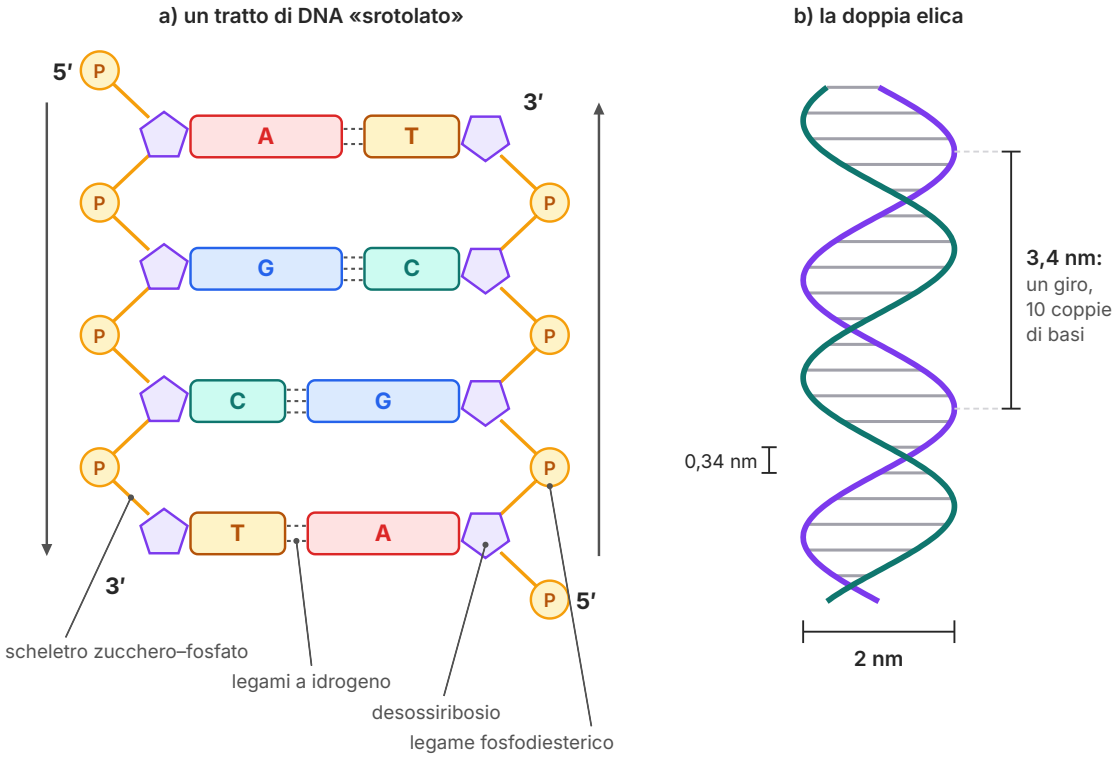

Figura 13.3 La struttura del DNA. a) Quattro coppie di basi «srotolate»: i due filamenti sono antiparalleli (frecce, da 5′ a 3′); le purine (A, G) sono più lunghe delle pirimidine (T, C); A–T è unita da due legami a idrogeno, G–C da tre (tratteggi). b) La doppia elica, disegnata in proporzione: diametro 2 nm, 0,34 nm fra due coppie di basi, un giro ogni 3,4 nm. Le dimensioni sono quelle della forma B, la più comune nella cellula.

Nel loro articolo Watson e Crick osservarono, con una frase rimasta famosa, che l'appaiamento specifico «suggerisce immediatamente» un possibile meccanismo di copia del materiale genetico. Se ogni filamento determina la sequenza dell'altro, i due filamenti possono separarsi e ciascuno può servire da stampo per costruirne uno nuovo. È quello che vedremo nel prossimo paragrafo.

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · Rosalind Franklin e la doppia elica

Rosalind Franklin (1920–1958) aveva imparato la diffrazione dei raggi X a Parigi, studiando il carbone e la grafite, e arrivò al King's College nel 1951. I rapporti con Wilkins furono difficili fin dall'inizio, anche per un equivoco su chi dovesse guidare la ricerca sul DNA, e i due gruppi lavorarono separati.

I dati di Franklin furono essenziali per il modello di Watson e Crick: la foto 51, che Wilkins mostrò a Watson all'inizio del 1953, e le misure riportate in una relazione interna al Medical Research Council, l'ente che finanziava le ricerche, che Crick e Watson poterono leggere. Entrambe le cose avvennero senza che Franklin ne fosse informata. Nel loro articolo Watson e Crick scrissero di essere stati stimolati dalla conoscenza, «in termini generali», dei risultati non pubblicati di Wilkins, di Franklin e dei loro collaboratori (traduzione della redazione).

Franklin passò poi al Birkbeck College di Londra, dove studiò la struttura dei virus, e morì di tumore nel 1958, a 37 anni. Nel 1962 il premio Nobel per la fisiologia o la medicina fu assegnato a Watson, Crick e Wilkins; il Nobel non viene conferito a persone decedute. Oggi il contributo di Franklin è riconosciuto come decisivo.

IN SINTESI

Regole di Chargaff (DNA a doppio filamento, in moli o in %): A = T G = C A + G = T + C = 50 %

Doppia elica (forma B): diametro ≈ 2 nm; 0,34 nm per coppia di basi; ≈ 10 coppie di basi e 3,4 nm per giro; A–T: 2 legami a idrogeno, G–C: 3.

Lunghezza di un DNA: L = numero di coppie di basi × 0,34 nm.

13.3 La duplicazione del DNA

13.3.1 Tre ipotesi e un esperimento

Che i due filamenti facciano da stampo era un'ipotesi; ma ne erano possibili altre. Secondo l'ipotesi **semiconservativa**, quella suggerita da Watson e Crick, ciascuna delle due molecole figlie conserva un filamento della molecola madre e ne ha uno nuovo. Secondo l'ipotesi **conservativa**, la molecola madre resta intatta e la copia è fatta di due filamenti nuovi. Secondo l'ipotesi **dispersiva**, ogni filamento delle molecole figlie è un mosaico di pezzi vecchi e nuovi.

Nel 1958 Matthew Meselson e Franklin Stahl, al California Institute of Technology, misero alla prova le tre ipotesi con un esperimento che è considerato uno dei più eleganti della biologia. Fecero crescere per molte generazioni batteri di *E. coli* in un terreno in cui l'unica fonte di azoto era cloruro di ammonio con l'isotopo pesante ^{15}N, finché tutto il loro DNA conteneva ^{15}N.

Poi trasferirono i batteri in un terreno con il normale isotopo leggero ^{14}N e ne prelevarono campioni a intervalli pari al tempo di generazione, circa 50 minuti.

Per distinguere il DNA pesante da quello leggero usarono la **centrifugazione in gradiente di densità**. Il DNA estratto viene sciolto in una soluzione concentrata di cloruro di cesio e centrifugato per una ventina di ore ad alta velocità (nel loro esperimento circa 140 000 volte l'accelerazione di gravità). Il cloruro di cesio forma lentamente un gradiente, più denso verso il fondo della provetta, e ogni molecola di DNA si ferma nel punto in cui la densità della soluzione è uguale alla propria, formando una banda sottile. Il DNA con ^{14}N ha una densità di circa 1,710 g/cm³; quello con ^{15}N è più denso di circa 0,014 g/cm³. Una differenza di meno dell'1 %, ma sufficiente a separare le bande.

I risultati sono nella Figura 13.4. All'inizio c'era una sola banda, pesante. Dopo una generazione c'era ancora una sola banda, a metà strada fra la posizione pesante e quella leggera: DNA *ibrido*, con un filamento ^{15}N e uno ^{14}N. Questo bastava a escludere l'ipotesi conservativa, che avrebbe dato una banda pesante e una leggera. Dopo due generazioni c'erano due bande di uguale intensità, una ibrida e una leggera: l'ipotesi dispersiva, che prevede una sola banda via via più leggera, era esclusa anche lei. Restava l'ipotesi semiconservativa, che prevedeva esattamente quei risultati.

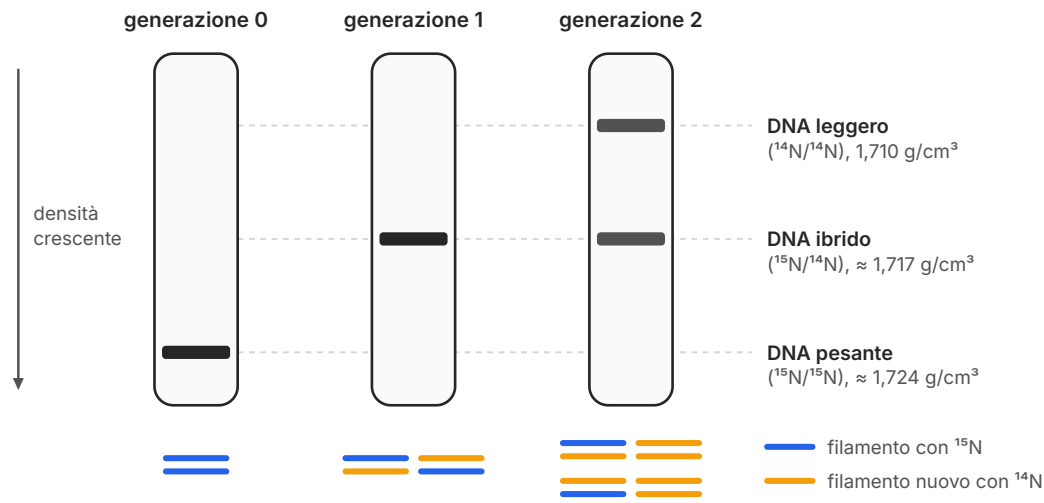

Figura 13.4 L'esperimento di Meselson e Stahl (1958). In alto, la posizione delle bande di DNA nella provetta dopo la centrifugazione in gradiente di cloruro di cesio, a 0, 1 e 2 generazioni dal passaggio dal terreno con ^{15}N a quello con ^{14}N; la densità cresce verso il fondo. In basso, le molecole che spiegano le bande secondo il modello semiconservativo. Densità del DNA leggero e differenza fra pesante e leggero da Meselson e Stahl, *PNAS*, 1958; la densità dell'ibrido è stimata come valore medio.

ESEMPIO SVOLTO

Le bande dopo tre generazioni

Problema. Nell'esperimento di Meselson e Stahl, quali bande si osservano dopo tre generazioni nel terreno con ^{14}N, e in quali proporzioni? Che cosa si sarebbe osservato se la duplicazione fosse conservativa?

Soluzione. Modello semiconservativo: si parte da 1 molecola pesante. Dopo 1 generazione: 2 molecole, entrambe ibride. Dopo 2: 4 molecole, 2 ibride e 2 leggere. Dopo 3: 8 molecole. I due filamenti ^{15}N originali non si perdono mai e restano in due molecole ibride; le altre 6 sono leggere. In generale, dopo n generazioni ($n \geq 1$) la frazione di DNA ibrido è $2/2^n$. Modello conservativo: la molecola pesante originale resta intatta e tutte le copie sono leggere; dopo 3 generazioni, 1 molecola pesante su 8.

Risultato. Semiconservativo: banda ibrida 2/8 = 25 % e banda leggera 75 %. Conservativo: banda pesante 1/8 (12,5 %) e banda leggera 87,5 %, e mai una banda ibrida.

Così il DNA si duplica in modo semiconservativo: la **duplicazione semiconservativa** (o replicazione) produce due molecole identiche, ciascuna formata da un filamento parentale, che fa da **stampo**, e da un filamento nuovo, complementare allo stampo. Vediamo ora come la cellula esegue questa copia.

13.3.2 Origini, bolle e forcelle

La duplicazione comincia in punti precisi della molecola, le **origini di replicazione**, sequenze riconosciute da proteine che separano localmente i due filamenti. Il cromosoma circolare di *E. coli* ha una sola origine; ogni cromosoma eucariotico, molto più lungo, ne ha molte, e nel genoma umano sono decine di migliaia. A partire da ogni origine si apre una **bolla di replicazione**, che si allarga nelle due direzioni: ai suoi due bordi, dove la doppia elica si apre a Y, ci sono due **forcelle di replicazione**, che avanzano in versi opposti finché incontrano le forcelle delle bolle vicine e le bolle si fondono.

Alla forcella lavora un gruppo di proteine (Figura 13.5). L'**elicasi** separa i due filamenti rompendo i legami a idrogeno fra le basi, e consuma ATP. Davanti alla forcella, lo srotolamento farebbe attorcigliare sempre di più la doppia elica, come una corda di cui si separano i capi: la **topoisomerasi** scioglie questa tensione tagliando e richiudendo i filamenti. Dietro l'elicasi, le **proteine SSB** (dall'inglese *single-strand binding*, «che legano il filamento singolo») si legano ai tratti a filamento singolo e impediscono che si riappaino o si ripieghino su sé stessi.

13.3.3 Le regole della DNA polimerasi

I nuovi filamenti sono costruiti dalla **DNA polimerasi**, un enzima che legge lo stampo e aggiunge, uno alla volta, i nucleotidi complementari. I nucleotidi arrivano come desossiribonucleosidi

trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), parenti dell'ATP: quando uno di essi si lega alla catena perde due dei suoi tre fosfati, e questa reazione fornisce l'energia per formare il legame fosfodiesterico. La DNA polimerasi ha però due limiti, che spiegano tutta l'organizzazione della forcella.

1. **Aggiunge nucleotidi solo all'estremità 3′** di una catena già esistente, legandoli al gruppo –OH del carbonio 3′. Perciò un filamento nuovo cresce sempre in direzione 5′→3′, e lo stampo viene letto in direzione 3′→5′.
2. **Non sa cominciare un filamento da zero.** Ha bisogno di un breve tratto già appaiato allo stampo, con un'estremità 3′ libera da cui partire. Questo innesco, il **primer**, è un corto segmento di RNA, di una decina di nucleotidi, sintetizzato da un enzima apposito, la **primasi**.

> **ERRORE FREQUENTE**
> **«La DNA polimerasi può costruire il nuovo filamento in tutte e due le direzioni» o «comincia da sola, dove serve».** La sintesi avviene sempre e solo in direzione 5′→3′, perché il nucleotide nuovo si lega all'–OH del carbonio 3′ dell'ultimo nucleotide; e ogni nuovo tratto di DNA parte da un primer di RNA. Attenzione anche a non confondere le due direzioni: il filamento *nuovo* cresce 5′→3′, lo *stampo*, antiparallelo, viene letto 3′→5′.

13.3.4 Il filamento guida e il filamento lento

I due filamenti dello stampo sono antiparalleli, ma la forcella avanza in una sola direzione. Lungo uno dei due stampi, il nuovo filamento può crescere 5′→3′ proprio nella direzione in cui la forcella si apre: la DNA polimerasi lo allunga in modo continuo, seguendo l'elicasi, a partire da un unico primer. È il **filamento guida** (o filamento veloce).

Lungo l'altro stampo, crescere 5′→3′ significa andare nella direzione *opposta* a quella della forcella. Qui la sintesi è discontinua: ogni volta che la forcella ha scoperto un nuovo tratto di stampo, la primasi vi deposita un primer e la DNA polimerasi costruisce un pezzo di DNA allontanandosi dalla forcella, finché non raggiunge il pezzo fatto in precedenza. Il filamento che si forma così, a pezzi, è il **filamento lento**, e i pezzi si chiamano **frammenti di Okazaki**, dal nome del biologo giapponese Reiji Okazaki che nel 1968, con la moglie Tsuneko e i loro collaboratori, li osservò per primo. Sono lunghi da circa un migliaio a un paio di migliaia di nucleotidi nei batteri e da cento a duecento circa negli eucarioti.

Per completare il filamento lento restano due operazioni. I primer di RNA vengono rimossi e sostituiti con DNA (nei batteri lo fa un'altra DNA polimerasi, detta DNA polimerasi I); poi la **DNA ligasi** chiude l'ultima interruzione fra due frammenti vicini, formando il legame fosfodiesterico mancante.

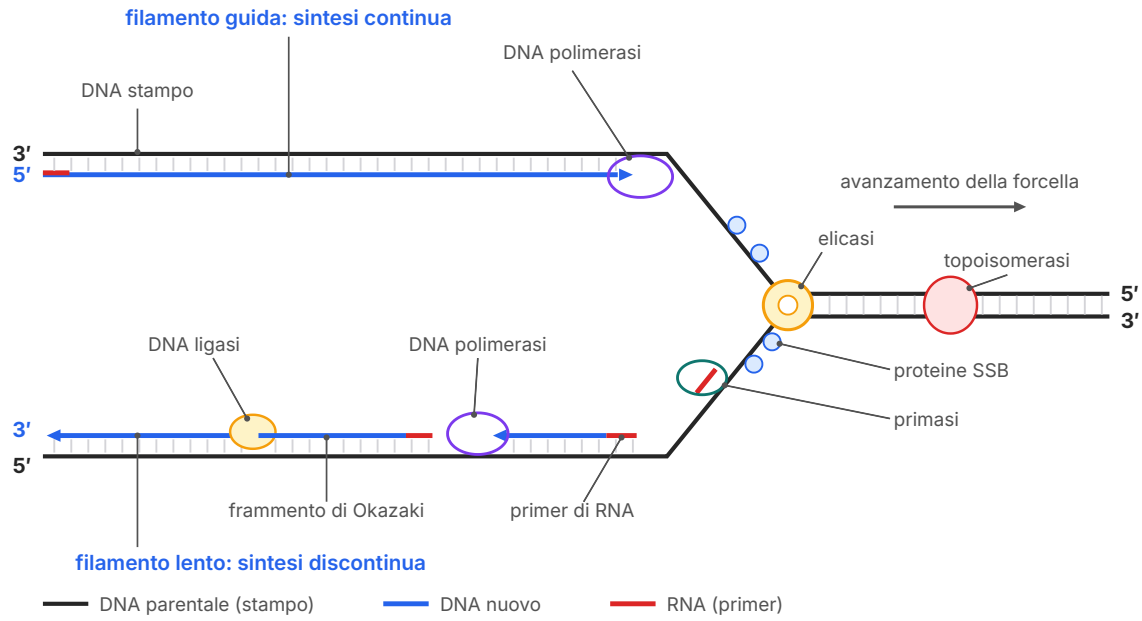

Figura 13.5 La forcella di replicazione (schema non in scala). La forcella avanza verso destra. Il filamento guida (in alto) cresce in modo continuo verso la forcella, a partire da un solo primer all'origine; il filamento lento (in basso) è costruito a frammenti di Okazaki, ciascuno con il suo primer di RNA, sintetizzati in direzione opposta alla forcella e poi saldati dalla DNA ligasi. In ogni filamento nuovo la crescita avviene in direzione 5′→3′ (punte di freccia).

13.3.5 Veloce e quasi senza errori

La duplicazione è veloce. In *E. coli* ogni forcella aggiunge circa 1000 nucleotidi al secondo, e il cromosoma di circa 4,6 milioni di coppie di basi viene copiato in una quarantina di minuti; negli eucarioti le forcelle sono più lente (circa 50–100 nucleotidi al secondo), ma le origini numerose permettono di copiare in poche ore l'intero genoma (valori da OpenStax, *Biology*, 2ª ed., § 14.4–14.5).

ESEMPIO SVOLTO

Quanto dura la duplicazione di un cromosoma batterico?

Problema. Il cromosoma di *E. coli* K-12 ha 4 639 221 coppie di basi e una sola origine, da cui partono due forcelle. Se ogni forcella procede a circa 1000 nucleotidi al secondo, quanto tempo serve per duplicarlo?

Soluzione. Le due forcelle si dividono il lavoro: ognuna copia metà del cromosoma, prima di incontrare l'altra dalla parte opposta del cerchio. Tempo = 4 639 221 / (2 × 1000 s^{-1}) = 2320 s = 2320 s / (60 s/min) ≈ 38,7 min.

Risultato. Circa 40 minuti (la velocità è nota solo come ordine di grandezza, quindi il risultato va arrotondato). In condizioni ottimali *E. coli* può dividersi ogni 20 minuti circa: ci riesce perché comincia un nuovo ciclo di duplicazione prima che il precedente sia finito.

La duplicazione è anche straordinariamente fedele, grazie a tre controlli successivi. La DNA polimerasi sceglie il nucleotide giusto per complementarità e sbaglia di rado, circa una volta ogni 10^5 nucleotidi. Inoltre molte DNA polimerasi fanno la **correzione di bozze**: se l'ultimo nucleotide aggiunto non è appaiato bene, l'enzima torna indietro di un passo, lo rimuove e lo sostituisce; gli errori scendono di circa cento volte. Infine, dopo la duplicazione, il **sistema di riparazione degli appaiamenti errati** (*mismatch repair*) riconosce le basi appaiate male sfuggite ai controlli e le corregge sul filamento nuovo. Alla fine, in *E. coli*, resta circa un errore ogni 10^9–10^{10} nucleotidi copiati (stima riportata da BioNumbers, Harvard Medical School). Gli errori che sfuggono a tutti i controlli diventano mutazioni, che studierai nel cap. 14.

Il DNA si danneggia anche fuori dalla duplicazione: lo alterano ogni giorno il calore, le reazioni chimiche della cellula, i raggi ultravioletti e le sostanze tossiche. Nella **riparazione per escissione di nucleotidi** un gruppo di enzimi riconosce la distorsione della doppia elica, taglia il filamento danneggiato ai due lati del danno e lo elimina; DNA polimerasi e ligasi ricostruiscono il tratto usando come stampo il filamento sano. È il sistema che rimuove i danni dei raggi UV nel DNA della pelle.

COLLEGAMENTI

Educazione alla salute · Lo xeroderma pigmentoso e il sole. Nelle persone affette da xeroderma pigmentoso, una malattia ereditaria rara a trasmissione autosomica recessiva, nella maggior parte delle forme la riparazione per escissione non funziona. I danni prodotti dai raggi UV nel DNA delle cellule della pelle non vengono riparati: la pelle è estremamente sensibile alla luce solare, e il rischio di tumori cutanei è molto più alto che nel resto della popolazione già in giovane età. Le persone malate devono proteggersi dalla luce solare in modo rigoroso, secondo le indicazioni dei medici che le seguono.

In piccolo succede a tutti: la riparazione è efficace ma non perfetta, e più danni subisce il DNA più è probabile che qualcuno sfugga. Per questo evitare le scottature e le lampade abbronzanti è una buona abitudine per chiunque (cap. 16).

13.4 Il problema delle estremità: telomeri e telomerasi

I cromosomi eucariotici sono lineari, e alle loro estremità la duplicazione incontra un problema che i cromosomi circolari dei batteri non hanno. Il filamento guida arriva fino alla fine dello stampo. Il filamento lento, invece, è costruito a frammenti, ognuno a partire da un primer di RNA: quando il primer dell'ultimo frammento, all'estremità del cromosoma, viene rimosso, non c'è più un'estremità 3′ a monte da cui una DNA polimerasi possa riempire il vuoto. A ogni duplicazione, quindi, il nuovo filamento resta un po' più corto del suo stampo, e i cromosomi si accorciano un poco a ogni divisione.

Le estremità dei cromosomi eucariotici sono i **telomeri**, ripetizioni di una sequenza breve che non contiene geni (nell'uomo TTAGGG, ripetuta centinaia o migliaia di volte): l'accorciamento consuma prima queste sequenze «sacrificabili». Legati a proteine apposite, i telomeri impediscono anche che la cellula scambi l'estremità del cromosoma per una rottura da riparare.

Nelle cellule che devono dividersi moltissime volte, come le cellule della linea germinale e molte cellule staminali, un enzima allunga di nuovo i telomeri: la **telomerasi**. È un enzima insolito, perché contiene una breve molecola di RNA che usa come stampo per aggiungere ripetizioni di DNA all'estremità 3′ del cromosoma; il filamento complementare viene poi completato dalla normale macchina di duplicazione. Nella maggior parte delle cellule somatiche dell'adulto la telomerasi è poco attiva, e dopo un certo numero di divisioni i telomeri diventano così corti che la cellula smette di dividersi.

Per la scoperta di come i telomeri e la telomerasi proteggono i cromosomi, Elizabeth Blackburn, Carol Greider e Jack Szostak hanno ricevuto nel 2009 il premio Nobel per la fisiologia o la medicina. Le loro ricerche toccano due grandi temi. L'**invecchiamento**: l'accorciamento dei telomeri limita il numero di divisioni delle cellule ed è uno dei fattori, non l'unico, dell'invecchiamento dei tessuti. Il **cancro**: nella grande maggioranza delle cellule tumorali la telomerasi è

riattivata, e questo permette loro di dividersi senza limite; bloccarla è studiato da anni come possibile terapia.

13.5 L'organizzazione del DNA nella cellula

13.5.1 Il DNA dei procarioti

Come hai visto lo scorso anno (*Scienze naturali 2*, cap. 3 e 12), il DNA di un batterio è di solito un unico cromosoma circolare, che occupa il nucleoide, e spesso sono presenti anche piccoli anelli di DNA in più, i plasmidi, che si duplicano per conto proprio. Il cromosoma di *E. coli*, disteso, sarebbe lungo circa 1,6 mm, quasi mille volte la lunghezza della cellula: sta nel nucleoide perché è superavvolto (attorcigliato su sé stesso, come un elastico ritorto) e ripiegato in anse con l'aiuto di proteine.

13.5.2 Cromatina, istoni e nucleosomi

Negli eucarioti il problema è molto più grande. Il DNA è diviso in più cromosomi lineari e, come sai, è associato a proteine a formare la cromatina. Le proteine più abbondanti della cromatina sono gli **istoni**, piccole proteine ricche di amminoacidi con carica positiva, che attraggono i gruppi fosfato del DNA, carichi negativamente. Otto istoni (due copie di ciascuno di quattro tipi) formano un rocchetto attorno a cui il DNA si avvolge per poco meno di due giri, circa 150 coppie di basi: questa unità è il **nucleosoma**. I nucleosomi si susseguono lungo il DNA, separati da brevi tratti di DNA di collegamento, e al microscopio elettronico la cromatina distesa appare come un «filo di perle» spesso circa 11 nm (Figura 13.6).

In provetta i nucleosomi si impaccano in una fibra spessa circa 30 nm, con l'aiuto di un quinto istone; ma se questa fibra esista nelle cellule viventi è oggi discusso. È invece certo che la cromatina forma grandi anse, ancorate a strutture proteiche, e che durante la mitosi si condensa al massimo fino a formare il cromosoma metafasico, con i suoi due cromatidi fratelli uniti al centromero (*Scienze naturali 2*, cap. 6). Il grado di compattazione non è solo una questione di spazio: un tratto di cromatina molto condensato è difficile da leggere per gli enzimi, e la cellula lo usa per regolare quali geni sono attivi (cap. 15).

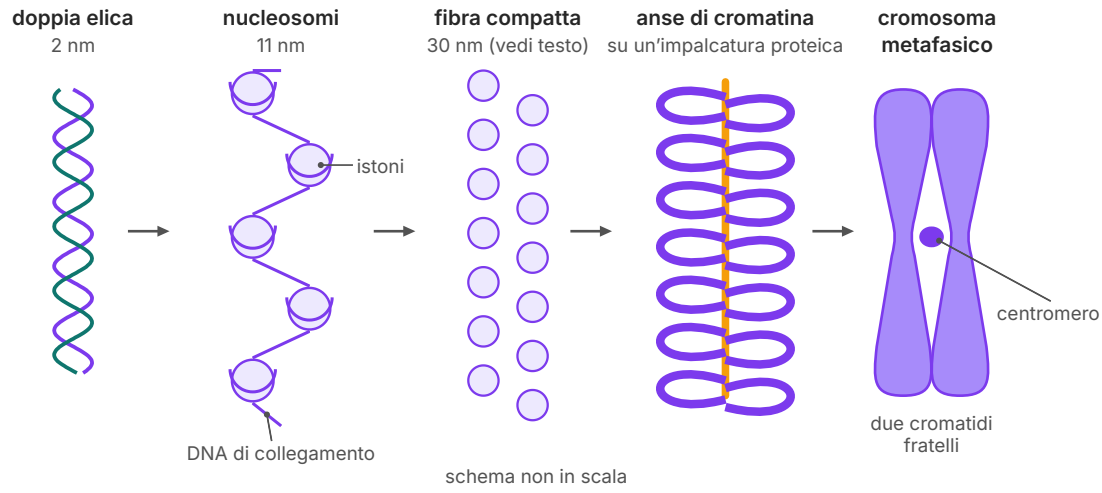

Figura 13.6 I livelli di organizzazione del DNA eucariotico, dal più disteso al più condensato (schema non in scala). La doppia elica si avvolge attorno ai rocchetti di istoni formando i nucleosomi; la fibra compatta di 30 nm è osservata in provetta, ma la sua presenza nelle cellule è discussa; le anse di cromatina sono ancorate a un'impalcatura proteica; il cromosoma metafasico è la forma più condensata, visibile durante la divisione cellulare.

13.5.3 Il genoma umano

L'insieme del DNA di un organismo è il suo **genoma**. Il genoma nucleare umano è formato, in un corredo aploide, da circa $3{,}1 \times 10^9$ coppie di basi, divise in 23 cromosomi; le cellule somatiche, diploidi, ne contengono il doppio. Lungo questo DNA ci sono circa 20 000 geni che contengono le istruzioni per costruire proteine. Ma le sequenze che codificano direttamente le proteine sono meno del 2 % del totale. Il resto comprende sequenze che regolano i geni, geni per RNA, introni (cap. 14), sequenze ripetute, telomeri e centromeri, e tratti di funzione ancora sconosciuta. Anche i mitocondri hanno un proprio piccolo genoma: il **DNA mitocondriale** umano è una molecola circolare di 16 569 coppie di basi, con 37 geni, ereditata di solito solo dalla madre perché i mitocondri dello spermatozoo vengono eliminati dopo la fecondazione.

Tabella 13.1 Le dimensioni di alcuni genomi e il numero stimato di geni che codificano proteine. Fonti: *E. coli* K-12, Blattner e colleghi, *Science*, 1997; lievito *Saccharomyces cerevisiae*, Goffeau e colleghi, *Science*, 1996; *P. falciparum*, Gardner e colleghi, *Nature*, 2002; uomo, stime correnti dopo il Progetto Genoma Umano (genoma nucleare aploide); DNA mitocondriale umano, sequenza di riferimento.

Genoma	Coppie di basi	Geni per proteine	Cromosomi
Escherichia coli (batterio)	$4{,}64 \times 10^{6}$	4288	1 circolare
Saccharomyces cerevisiae (lievito)	$1{,}21 \times 10^{7}$	≈ 5900	16 lineari
Plasmodium falciparum (protista)	$2{,}28 \times 10^{7}$	≈ 5300	14 lineari
Homo sapiens, nucleo	$\approx 3{,}1 \times 10^{9}$	≈ 20 000	23 lineari
Homo sapiens, mitocondrio	16 569	13	1 circolare

Il confronto della Tabella 13.1 mostra che la dimensione del genoma non è proporzionale al numero di geni: il genoma umano è circa 670 volte più grande di quello di *E. coli*, ma contiene solo cinque volte più geni per proteine. Nei batteri i geni sono fitti e quasi senza spazi; negli eucarioti sono separati da lunghi tratti non codificanti.

ERRORE FREQUENTE

«Il DNA non codificante è DNA spazzatura, inutile». L'espressione *junk DNA* nacque quando si sapeva poco di queste sequenze; oggi sappiamo che una parte di esse regola i geni, produce RNA utili, forma telomeri e centromeri, mentre per un'altra parte la funzione è ancora discussa. «Non codificante» significa «che non contiene istruzioni per una proteina», non «inutile». Attenzione anche a non confondere il *genoma*, cioè tutto il DNA di un organismo, con il *codice genetico*, la regola con cui le basi vengono tradotte in amminoacidi (cap. 14).

ESEMPIO SVOLTO

Quanto è lungo il DNA di una cellula?

Problema. Calcola la lunghezza del DNA nucleare contenuto in una cellula somatica umana, sapendo che un corredo aploide è di circa $3{,}1 \times 10^{9}$ coppie di basi. Quanti giri d'elica contiene un corredo aploide?

Soluzione. Una coppia di basi occupa 0,34 nm = $0{,}34 \times 10^{-9}$ m. Corredo aploide: $L = 3{,}1 \times 10^{9} \times 0{,}34 \times 10^{-9}$ m = 1,05 m. Una cellula somatica è diploide: $2 \times 1{,}05$ m = 2,1 m. Giri d'elica: $3{,}1 \times 10^{9}$ coppie / 10 coppie per giro = $3{,}1 \times 10^{8}$ giri.

Risultato. Circa 2 m di DNA per cellula (il valore «circa 2 metri» che conosci dal volume dello scorso anno), con $3{,}1 \times 10^{8}$ giri d'elica per corredo aploide. Il nucleo ha un diametro di pochi micrometri: il DNA è lungo centinaia di migliaia di volte di più.

ESPERIENZA DI LABORATORIO

Estrarre il DNA dalla frutta

Obiettivo. Separare il DNA dalle cellule di un frutto e osservarlo a occhio nudo.

Materiale. Due fragole mature (o un kiwi sbucciato); un sacchetto di plastica con chiusura a zip; 100 mL di acqua di rubinetto; 1 cucchiaino di sale da cucina (circa 5 g); 1 cucchiaio di detersivo liquido per piatti (circa 10 mL); un colino o una garza; un bicchiere trasparente; una provetta; alcol etilico denaturato (o alcol isopropilico) tenuto in congelatore per almeno un'ora; un bastoncino di legno o una bacchetta di vetro.

1. Prepara la soluzione di estrazione: sciogli il sale nell'acqua e aggiungi il detersivo mescolando piano, senza fare schiuma.
2. Metti la frutta nel sacchetto, aggiungi 10 mL circa di soluzione di estrazione, chiudi il sacchetto e schiaccia la frutta con le dita per un paio di minuti, finché non è una poltiglia uniforme.
3. Filtra la poltiglia con il colino o la garza nel bicchiere e versa il liquido filtrato nella provetta, fino a riempirne circa un terzo.
4. Inclina la provetta e fai scendere lentamente lungo la parete un volume di alcol freddo uguale a quello del filtrato, in modo che formi uno strato sopra il liquido senza mescolarsi.
5. Aspetta due o tre minuti, senza agitare, e osserva la zona di contatto fra i due strati. Raccogli ciò che si forma avvolgendolo attorno al bastoncino.

Che cosa fanno i reagenti. Schiacciare la frutta rompe le pareti cellulari; il detersivo scioglie i lipidi delle membrane e libera il contenuto delle cellule; gli ioni positivi del sale neutralizzano le cariche dei fosfati e aiutano il DNA a staccarsi dalle proteine. Il DNA è solubile in acqua ma non nell'alcol, e nell'alcol precipita.

Sicurezza. Occhiali di protezione. L'alcol è infiammabile: lavora lontano da fiamme e fonti di calore, in un ambiente aerato, e richiudi subito la bottiglia. Non assaggiare nulla. Smaltimento: i residui di frutta vanno nell'organico; il liquido con piccole quantità di alcol si può scaricare nel lavandino con molta acqua.

Risultato atteso. Nello strato di alcol si forma una massa bianca e filamentosa, un po' gelatinosa, che si può avvolgere sul bastoncino. Non è una singola molecola, invisibile anche al microscopio ottico, ma milioni di molecole di DNA aggrovigliate, con RNA e polisaccaridi. Le fragole ne danno molto perché sono ottoploidi: otto copie di ogni cromosoma per cellula.

Domande. Perché i filamenti si vedono a occhio nudo, se la doppia elica ha un diametro di 2 nm? Che cosa succederebbe omettendo il detersivo? Come potresti verificare, con un controllo, che la massa bianca non sia solo amido o pectina?

APPROFONDIMENTO

Approfondimento · La PCR: copiare il DNA in provetta

Nel 1983 il biochimico statunitense Kary Mullis ebbe un'idea per copiare un tratto scelto di DNA milioni di volte in poche ore, senza cellule: la reazione a catena della polimerasi, o **PCR** (*polymerase chain reaction*). Per questo ricevette nel 1993 il premio Nobel per la chimica. La PCR usa gli stessi principi della duplicazione che hai studiato in questo capitolo, sostituendo gli enzimi della forcella con variazioni di temperatura.

In una provetta si mettono il DNA da copiare, i quattro nucleotidi trifosfato, una DNA polimerasi e due **primer** di DNA sintetico, corti filamenti complementari alle due estremità del tratto scelto, uno per ciascun filamento. Ogni ciclo ha tre fasi: a circa 95 °C i due filamenti si separano (il calore fa il lavoro dell'elicasi); a circa 50–65 °C i primer si appaiano agli stampi; a circa 72 °C la polimerasi allunga i primer in direzione 5′→3′. Poiché la temperatura sale ogni volta a 95 °C, serve una DNA polimerasi che resista al calore: si usa quella di *Thermus aquaticus*, un batterio che vive nelle sorgenti calde, detta *Taq* polimerasi.

A ogni ciclo il numero di copie raddoppia: dopo n cicli, da una molecola se ne ottengono al massimo 2^n; dopo 30 cicli, $2^{30} \approx 1{,}07 \times 10^9$. Così si analizzano quantità minuscole di DNA, per esempio nella diagnosi di un'infezione. Le biotecnologie le studierai al quinto anno.

SINTESI

- Griffith (1928) scoprì che una sostanza dei pneumococchi S uccisi può trasformare in modo ereditario i batteri R: il **principio trasformante**. Avery, MacLeod e McCarty (1944) mostrarono che è il DNA.
- Hershey e Chase (1952) marcarono le proteine dei fagi con ^{35}S e il DNA con ^{32}P: nei batteri entra il DNA, che è dunque il materiale genetico.
- **Regole di Chargaff** (1950): nel DNA a doppio filamento A = T e G = C; le purine sono il 50 %; il contenuto in G + C varia fra le specie (41 % nell'uomo).
- Le immagini di diffrazione dei raggi X di Rosalind Franklin (foto 51, 1952) e i dati di Wilkins furono essenziali per il modello di Watson e Crick (1953).
- Il DNA è una **doppia elica** destrorsa di due filamenti **antiparalleli**: scheletro zucchero–fosfato all'esterno (legami fosfodiesterici), basi all'interno appaiate A–T (2 legami a idrogeno) e G–C (3). Diametro 2 nm, 0,34 nm per coppia, 10 coppie e 3,4 nm per giro.
- Meselson e Stahl (1958), con $^{15}N/^{14}N$ e la centrifugazione in gradiente di densità, dimostrarono che la duplicazione è **semiconservativa**: dopo una generazione tutto il DNA è ibrido, dopo due metà ibrido e metà leggero.
- La duplicazione parte dalle **origini di replicazione** (una nei batteri, molte negli eucarioti) e procede in due forcelle. Elicasi, topoisomerasi e proteine SSB aprono e stabilizzano lo stampo.
- La **DNA polimerasi** aggiunge nucleotidi solo all'estremità 3′ (sintesi 5′→3′) e ha bisogno di un **primer** di RNA, fatto dalla primasi. Il filamento guida cresce in modo continuo, il filamento lento in **frammenti di Okazaki**, saldati dalla **DNA ligasi**.
- Selezione dei nucleotidi, correzione di bozze e riparazione degli appaiamenti errati riducono gli errori a circa uno ogni 10^9–10^{10} nucleotidi; la riparazione per escissione rimuove i danni da UV (xeroderma pigmentoso).
- Le estremità dei cromosomi lineari si accorciano a ogni duplicazione; i **telomeri** (TTAGGG nell'uomo) le proteggono e la **telomerasi**, con il suo stampo di RNA, li allunga.
- Negli eucarioti il DNA si avvolge attorno agli **istoni** nei **nucleosomi**, si ripiega in anse e si condensa al massimo nel cromosoma metafasico.
- Il **genoma** umano aploide ha circa $3{,}1 \times 10^9$ coppie di basi e circa 20 000 geni per proteine; le sequenze codificanti sono meno del 2 %. Il DNA mitocondriale ha 16 569 coppie di basi.

ESERCIZI

Comprendere e ricordare

1. ● Nell'esperimento di Griffith, quale iniezione uccise il topo e permise di isolare dal suo sangue batteri S vivi, pur non contenendo batteri S vivi?
   - **A.** Batteri R vivi da soli
   - **B.** Batteri S uccisi dal calore da soli
   - **C.** Batteri S uccisi dal calore insieme a batteri R vivi
   - **D.** Batteri R uccisi dal calore insieme a batteri S uccisi

2. ● Nell'esperimento di Hershey e Chase il fosforo radioattivo, ^{32}P, serviva a marcare:
   - **A.** le proteine dell'involucro del fago
   - **B.** il DNA del fago
   - **C.** la parete del batterio
   - **D.** l'RNA del batterio

3. ● Sono purine:
   - **A.** adenina e guanina
   - **B.** citosina e timina
   - **C.** adenina e timina
   - **D.** citosina e uracile

4. ●● Avery, MacLeod e McCarty osservarono che l'estratto di batteri S perdeva la capacità di trasformare i batteri R quando veniva trattato con:
   - **A.** un enzima che distrugge le proteine
   - **B.** un enzima che distrugge l'RNA
   - **C.** il calore, che uccide i batteri
   - **D.** un enzima che distrugge il DNA

5. ● Che cosa significa che i due filamenti del DNA sono antiparalleli?
   - **A.** Che hanno la stessa sequenza di basi
   - **B.** Che corrono in direzioni opposte, uno 5′→3′ e l'altro 3′→5′
   - **C.** Che non sono uniti da legami
   - **D.** Che si avvolgono in versi opposti

6. ●● Dopo una generazione nel terreno con ^{14}N, Meselson e Stahl osservarono una sola banda di densità intermedia. Quale ipotesi fu esclusa già da questo risultato?
   - **A.** La semiconservativa
   - **B.** La dispersiva
   - **C.** La conservativa
   - **D.** Nessuna delle tre

7. ● L'enzima che separa i due filamenti alla forcella di replicazione, rompendo i legami a idrogeno fra le basi, è:
   A. l'elicasi
   B. la ligasi
   C. la primasi
   D. la telomerasi

8. ●● Il filamento lento è costruito a frammenti perché:
   A. la primasi lavora solo su quel filamento
   B. lo stampo del filamento lento è fatto di RNA
   C. i legami a idrogeno su quello stampo sono più forti
   D. la DNA polimerasi sintetizza solo in direzione 5′→3′, opposta all'avanzamento della forcella su quello stampo

9. ●● La telomerasi è un enzima che:
   A. rimuove i primer di RNA dai frammenti di Okazaki
   B. accorcia i telomeri a ogni divisione
   C. allunga i telomeri usando come stampo un RNA che fa parte dell'enzima
   D. salda i frammenti di Okazaki

Vero o falso

10. ● Nel DNA a doppio filamento di qualsiasi specie la percentuale di adenina è uguale a quella di guanina.

11. ● La DNA polimerasi può iniziare un nuovo filamento senza bisogno di un primer.

12. ●● Separare una coppia G–C richiede di rompere un legame a idrogeno in più rispetto a una coppia A–T.

13. ● La maggior parte del genoma umano è formata da sequenze che codificano proteine.

14. ●● La massa bianca che si ottiene nell'estrazione del DNA dalla frutta è una singola molecola di DNA.

15. ●●● Su ciascuna delle due forcelle che partono da un'origine, il filamento guida ha bisogno di un solo primer, mentre il filamento lento ne richiede molti.

Applicare

16. ● Scrivi la sequenza del filamento complementare a 5′-ATGACCGT-3′, indicando le estremità 5′ e 3′. Poi riscrivila nella direzione 5′→3′.

17. ● In un campione di DNA a doppio filamento il 22 % delle basi è timina. Calcola le percentuali di adenina, guanina e citosina.

18. ●● Un tratto di DNA a doppio filamento ha su un filamento la sequenza 5′-GGATCCAT-3′. Quanti legami a idrogeno tengono uniti i due filamenti in questo tratto?

19. ●● Il DNA di un batterio del suolo contiene il 72 % di G + C. Calcola la percentuale di ciascuna base. Il suo DNA richiederà, per separare i filamenti, una temperatura più alta o più bassa di quello umano? Perché?

20. ●●● Il cromosoma di *E. coli* ha 4 639 221 coppie di basi. Quanto sarebbe lungo, in millimetri, se fosse disteso? Quante volte è più lungo della cellula, che misura circa 2 µm?

21. ●● Il DNA avvolto attorno a un nucleosoma è di circa 147 coppie di basi. Quanto sarebbe lungo questo tratto, disteso, in nanometri? A quanti giri d'elica corrisponde?

22. ●●● Nell'esperimento di Meselson e Stahl, quali bande e in quali proporzioni si osserverebbero dopo 4 generazioni in ^{14}N? Calcola anche la densità prevista dall'ipotesi dispersiva dopo 3 generazioni, supponendo che la densità vari in proporzione alla frazione di ^{15}N (DNA leggero 1,710 g/cm^3, pesante 1,724 g/cm^3).

23. ●●● Un cromosoma umano ha circa $2{,}5 \times 10^8$ coppie di basi. Se le forcelle avanzano di circa 50 nucleotidi al secondo, quanto tempo servirebbe a duplicarlo partendo da una sola origine (due forcelle)? Se la fase S dura circa 8 ore, almeno quante origini, attive tutte insieme, sono necessarie?

Leggere dati e figure

24. ● Osserva la Figura 13.1. Perché il topo che riceve i batteri S uccisi dal calore sopravvive? Che cosa dimostra il risultato del quarto topo, confrontato con quelli del secondo e del terzo?

25. ●● Nella Figura 13.2, dove si trova la maggior parte della radioattività nelle due prove? Spiega perché, se il materiale genetico fosse stato la proteina, i risultati avrebbero dovuto essere opposti.

26. ●●● Usa la Tabella 13.1. Calcola il numero di geni per proteine per milione di coppie di basi (Mb) in *E. coli* e nell'uomo. Che cosa indica la differenza sull'organizzazione dei due genomi?

Indagare e argomentare

27. ●● Hershey e Chase usarono lo zolfo e il fosforo radioattivi. Perché non avrebbero potuto usare il carbonio-14 o l'idrogeno-3 (trizio)? Spiega quale proprietà deve avere un marcatore per distinguere due molecole.

28. ●●● «Watson e Crick hanno scoperto la struttura del DNA». Discuti questa frase alla luce della storia raccontata nel capitolo: quali contributi furono necessari, e perché la vicenda di Rosalind Franklin è oggi considerata un esempio di riconoscimento mancato? Usa un linguaggio preciso e basato sui fatti.

29. ●●● Nelle persone con xeroderma pigmentoso la riparazione per escissione non funziona. Spiega perché questo aumenta il rischio di tumori della pelle, collegando i raggi UV, il danno al DNA, la duplicazione e le mutazioni. Perché la protezione dal sole è utile anche a chi ha sistemi di riparazione normali?

Approfondimento

30. ●● Una PCR parte da 10 molecole di DNA e compie 25 cicli, con un'efficienza del 100 %. Quante copie del tratto scelto si ottengono al massimo?

31. ●●● Nella PCR la fase di separazione dei filamenti avviene a circa 95 °C. Perché non si può usare la DNA polimerasi di *E. coli*? E perché, come nella cellula, servono i primer? Spiega che cosa sostituisce, nella PCR, l'elicasi e la primasi.

PER APPROFONDIRE

- [WAT] J. D. Watson, F. H. C. Crick, «Molecular Structure of Nucleic Acids», *Nature*, 1953: l'articolo originale della doppia elica, poco più di una pagina, leggibile con le conoscenze di questo capitolo.
- [CAM] L. A. Urry et al., *Campbell Biology*: il capitolo sulle basi molecolari dell'ereditarietà, con gli esperimenti classici e la forcella di replicazione illustrati passo per passo.
- [ALB] B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*: i capitoli sulla struttura del DNA, sulla cromatina e sulla duplicazione e riparazione del DNA, per chi vuole vedere come se ne parla all'università.

Glossario del capitolo

Batteriofago
Virus che infetta i batteri (detto anche fago); il fago T2 è formato da un involucro di proteine che racchiude una molecola di DNA.

Correzione di bozze
Capacità della DNA polimerasi di riconoscere un nucleotide appaiato male appena aggiunto, rimuoverlo e sostituirlo.

DNA ligasi
Enzima che salda due tratti di DNA adiacenti formando il legame fosfodiesterico mancante; unisce i frammenti di Okazaki.

DNA polimerasi
Enzima che sintetizza un filamento di DNA complementare a uno stampo, aggiungendo nucleotidi solo all'estremità 3′ di una catena già esistente.

Duplicazione semiconservativa
Modo in cui il DNA si copia: ognuna delle due molecole figlie è formata da un filamento della molecola madre e da un filamento nuovo.

Filamento guida
Filamento nuovo che, alla forcella, viene sintetizzato in modo continuo nella stessa direzione in cui la forcella avanza.

Filamento lento
Filamento nuovo che, alla forcella, viene sintetizzato in modo discontinuo, a frammenti, in direzione opposta all'avanzamento della forcella.

Frammenti di Okazaki
Brevi tratti di DNA, ciascuno con il suo primer di RNA, di cui è formato il filamento lento prima di essere saldato dalla DNA ligasi.

Genoma
L'insieme di tutto il DNA di un organismo (o di un corredo aploide), con tutti i suoi geni e le sequenze non codificanti.

Legame fosfodiesterico
Legame covalente con cui un gruppo fosfato unisce il carbonio 3′ di uno zucchero al carbonio 5′ dello zucchero del nucleotide successivo, formando lo scheletro di un acido nucleico.

Nucleosoma
Unità della cromatina: un tratto di DNA di circa 150 coppie di basi avvolto attorno a un nucleo di otto istoni.

Origine di replicazione
Sequenza del DNA da cui comincia la duplicazione; una nel cromosoma batterico, molte in ogni cromosoma eucariotico.

Pirimidina
Base azotata con un solo anello: citosina (C) e timina (T) nel DNA, citosina e uracile (U) nell'RNA.

Primer
Breve tratto di acido nucleico appaiato allo stampo, con un'estremità 3′ libera da cui la DNA polimerasi comincia la sintesi; nella cellula è di RNA.

Principio trasformante
Nome dato alla sostanza dei batteri morti, scoperta da Griffith, capace di cambiare in modo ereditario i caratteri di altri batteri; Avery, MacLeod e McCarty mostrarono che è il DNA.

Purina
Base azotata con due anelli condensati: nel DNA e nell'RNA sono l'adenina (A) e la guanina (G).

Regole di Chargaff
Nel DNA a doppio filamento la quantità di adenina è uguale a quella di timina e la quantità di guanina è uguale a quella di citosina.

Telomerasi
Enzima che allunga i telomeri usando come stampo una molecola di RNA che fa parte dell'enzima stesso.

Telomero
Estremità di un cromosoma eucariotico, formata da molte ripetizioni di una breve sequenza (TTAGGG nell'uomo) che protegge i geni dall'accorciamento.

Trasformazione
Passaggio ereditario di caratteri da un batterio a un altro attraverso DNA libero assorbito dall'ambiente; fu scoperta da Griffith nel 1928.

Soluzioni

1. C. Né i batteri S morti né i batteri R vivi, da soli, sono letali: insieme lo diventano perché alcuni batteri R vengono trasformati in batteri S.

2. B. Il fosforo è nei gruppi fosfato del DNA; le proteine non ne contengono quasi.

3. A. Adenina e guanina hanno due anelli; citosina, timina e uracile sono pirimidine.

4. D. Solo la desossiribonucleasi, che distrugge il DNA, eliminava la trasformazione; proteasi e ribonucleasi non avevano effetto.

5. B. Uno corre 5′→3′, l'altro, accanto, 3′→5′.

6. C. L'ipotesi conservativa prevede una banda pesante e una leggera, mai una banda ibrida.

7. A. L'elicasi apre la doppia elica consumando ATP.

8. D. Sullo stampo del filamento lento la sintesi 5′→3′ procede in direzione opposta all'apertura della forcella: si fa a pezzi, a partire da primer sempre nuovi.

9. C. La telomerasi contiene un RNA che fa da stampo per aggiungere ripetizioni (TTAGGG nell'uomo) all'estremità 3′.

10. F. Le regole di Chargaff dicono A = T e G = C; nel DNA umano A = 29,5 % e G = 20,5 %.

11. F. Ha bisogno di un primer con un'estremità 3′ libera; nella cellula è un corto RNA sintetizzato dalla primasi.

12. V. G–C è unita da tre legami a idrogeno, A–T da due.

13. F. Le sequenze che codificano proteine sono meno del 2 % del genoma umano.

14. F. È un groviglio di milioni di molecole di DNA (con RNA e altre sostanze); una singola molecola, larga 2 nm, non si vedrebbe.

15. V. Su ogni forcella il filamento guida cresce in modo continuo da un unico primer posto all'origine; il filamento lento ha bisogno di un primer per ogni frammento di Okazaki.

16. Il filamento complementare, scritto sotto lo stampo, è 3′-TACTGGCA-5′; nella direzione 5′→3′ si scrive 5′-ACGGTCAT-3′ (la sequenza va letta al contrario, perché i filamenti sono antiparalleli).

17. A = T = 22 %; A + T = 44 %; G + C = 56 %, quindi G = C = 28 %.

18. Le coppie sono G–C, G–C, A–T, T–A, C–G, C–G, A–T, T–A: 4 coppie G–C × 3 = 12 e 4 coppie A–T × 2 = 8; in tutto 20 legami a idrogeno. (Il filamento complementare è 5′-ATGGATCC-3′.)

19. G = C = 72 % / 2 = 36 %; A = T = (100 % − 72 %) / 2 = 14 %. Più alta: il DNA umano ha solo il 41 % di G + C, e le coppie G–C, con tre legami a idrogeno, sono più difficili da separare.

20. $L = 4\,639\,221 \times 0{,}34\ \text{nm} = 1{,}58 \times 10^{6}\ \text{nm} = 1{,}58\ \text{mm}$ (circa 1,6 mm). Rapporto: $1{,}58 \times 10^{-3}\ \text{m} / 2 \times 10^{-6}\ \text{m} \approx 790$: il DNA è circa 800 volte più lungo della cellula.

21. $L = 147 \times 0{,}34\ \text{nm} \approx 50\ \text{nm}$; giri = 147 / 10 ≈ 15 (14,7).

22. Dopo 4 generazioni: 16 molecole, di cui 2 ibride e 14 leggere, cioè banda ibrida 2/16 = 12,5 % e banda leggera 87,5 %. Ipotesi dispersiva dopo 3 generazioni: frazione di $^{15}\text{N} = 1/2^{3} = 1/8$; densità = $1{,}710 + 0{,}014 \times 1/8 \approx 1{,}712\ \text{g/cm}^{3}$, una sola banda poco più pesante del DNA leggero.

23. Tempo con una sola origine: $2{,}5 \times 10^{8} / (2 \times 50\ \text{s}^{-1}) = 2{,}5 \times 10^{6}$ s, cioè circa 29 giorni. Fase S: 8 h = 28 800 s. Origini necessarie: $2{,}5 \times 10^{6}\ \text{s} / 28\,800\ \text{s} \approx 87$: servono almeno 87 origini, circa un centinaio (nella realtà sono molte di più, perché non si attivano tutte insieme).

24. Il calore uccide i batteri S, che quindi non possono moltiplicarsi nel topo. Il quarto topo muore, mentre il secondo (solo R vivi) e il terzo (solo S morti) sopravvivono: una sostanza dei batteri S

morti ha trasformato in modo ereditario alcuni batteri R vivi in batteri S, che poi si sono moltiplicati.

25. Con lo ^{35}S (proteine) la radioattività resta per la maggior parte nel liquido, con gli involucri vuoti; con il ^{32}P (DNA) finisce per la maggior parte nel sedimento, dentro i batteri. Se il materiale genetico fosse stato la proteina, sarebbe stata la proteina a entrare nei batteri: lo ^{35}S si sarebbe trovato nel sedimento e nei nuovi fagi, il ^{32}P no.

26. *E. coli*: 4288 / 4,64 Mb ≈ 920 geni per Mb. Uomo: 20 000 / 3100 Mb ≈ 6,5 geni per Mb. Nel genoma batterico i geni sono fittissimi, quasi senza spazi; nel genoma umano sono separati da lunghi tratti non codificanti (regolazione, introni, sequenze ripetute): il genoma umano è più grande di quanto il numero di geni farebbe pensare.

27. *Traccia di risposta.* Carbonio e idrogeno sono presenti sia nelle proteine sia nel DNA: la radioattività avrebbe marcato entrambe le molecole, e non si sarebbe potuto dire quale entra nel batterio. Un buon marcatore deve trovarsi in una sola delle molecole da distinguere: lo zolfo è (quasi) solo nelle proteine, il fosforo (quasi) solo nel DNA. È lo stesso principio del controllo: si cambia una sola variabile alla volta.

28. *Traccia di risposta.* Watson e Crick costruirono il modello, ma usarono dati altrui: le regole di Chargaff (A = T, G = C), le immagini di diffrazione e le misure di Franklin (foto 51: elica, diametro 2 nm, ripetizione di 3,4 nm, fosfati all'esterno), i dati di Wilkins. Franklin non fu informata che i suoi dati erano stati visti; nell'articolo del 1953 il suo contributo fu riconosciuto solo in termini generali; morì nel 1958 e il Nobel del 1962 andò a Watson, Crick e Wilkins. Una frase più corretta: «Watson e Crick proposero il modello della doppia elica sulla base dei dati di Franklin, Wilkins e Chargaff». La scienza è un'impresa collettiva e il riconoscimento dei dati è una questione di correttezza.

29. *Traccia di risposta.* I raggi UV uniscono basi vicine (dimeri di timina, cap. 14) e deformano la doppia elica. Se il danno non viene riparato, durante la duplicazione la DNA polimerasi può inserire basi sbagliate di fronte al danno: nascono mutazioni. Mutazioni in geni che controllano la divisione cellulare possono portare a un tumore (cap. 14). Senza la riparazione per escissione i danni si accumulano molto più rapidamente. Anche nelle persone sane la riparazione non è perfetta e più danni subisce il DNA più è probabile che qualcuno sfugga: proteggersi riduce il numero di danni.

30. $10 \times 2^{25} = 10 \times 33\,554\,432 \approx 3{,}36 \times 10^8$ copie.

31. *Traccia di risposta.* A 95 °C le proteine di *E. coli*, come la sua DNA polimerasi, si denaturano: a ogni ciclo bisognerebbe aggiungere enzima nuovo. La *Taq* polimerasi, di un batterio delle sorgenti calde, resiste al calore. I primer servono perché, come nella cellula, la DNA polimerasi può solo allungare un'estremità 3′ già appaiata allo stampo; inoltre scelgono il tratto da copiare. Nella PCR la separazione dei filamenti è fatta dal calore (al posto dell'elicasi), e i primer sono sintetizzati in laboratorio e aggiunti nella provetta (al posto della primasi, che nella cellula fa primer di RNA).