

COLLANA DI MONOGRAFIE BIOLOGICHE

6

Direttore

Giovanni PARISI

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Comitato scientifico

Antonio ARIANI

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Karl J. WITTMANN

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

COLLANA DI MONOGRAFIE BIOLOGICHE

Negli ultimi decenni la Biologia ha compiuto, a seguito della scoperta della struttura e della funzione genetica del DNA, un decisivo balzo in avanti, che può ben richiamare quel movimento innovatore che si produsse nelle scienze fisiche dopo la scoperta, agli inizi dello scorso secolo, dei quanti di energia.

La moderna teoria del gene che rapidamente si è composta come un corpo di dottrina a sé, ha permesso di chiarire numerosi meccanismi molecolari che sono alla base di fondamentali processi biologici.

L'analisi dei fatti fondamentali che caratterizzano il fenomeno della vita non si esaurisce, però, nella sola indagine intorno allo studio dei meccanismi molecolari che discendono dall'attività dei geni. La prodigiosa diversità delle forme viventi, peculiare carattere del fenomeno vita, ha indotto a cogliere di volta in volta, ai vari livelli dell'organizzazione nella *gerarchia* dei sistemi biologici, fatti essenziali di portata generale comuni a tutto ciò che vive.

Questa Collana di monografie biologiche offre saggi sui temi dominanti della biologia generale, cellulare e molecolare, nonché della genetica nelle sue varie articolazioni comprendente l'ingegneria genetica e le biotecnologie. Arricchiscono la collana in oggetto particolari monografie che illustrano il dibattito scientifico e l'evoluzione delle tecnologie che hanno consentito nel tempo il progresso delle scienze biologiche. Tematiche di fondamentale importanza, uniche nella editoria italiana, che consentono al lettore di rendersi meglio conto di come sia stato possibile pervenire agli attuali livelli di conoscenze in ambito biologico.

La sezione Scientifica persegue l'obiettivo di presentare, in modo scientificamente rigoroso, le più importanti trattazioni e i maggiori risultati ottenuti in ambito biologico.

La sezione Divulgativa predilige volumi di più ampio respiro che illustrano la Biologia in maniera adeguata a qualsiasi lettore o curioso della materia restando fedele a quei pilastri scientifici che pongono le basi della collana. La sezione rappresenta quindi un arricchimento per la collana stessa.

Il Consiglio scientifico, del quale hanno accettato di far parte illustri Studiosi di varie Istituzioni accademiche nazionali e internazionali, e la procedura predisposta per la valutazione dei contributi costituiscono una garanzia di qualità e di rigore scientifico.

Giovanni Parisi

Le basi molecolari dell'informazione genetica





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXIX
Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it
info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-2342-3

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: giugno 2019

Indice

- 11 *Presentazione*
- 13 **Capitolo I**
Introduzione allo studio degli acidi nucleici
1. Una breve nota storica, 13 – 2. Il *dogma centrale* della biologia, 17.
- 23 **Capitolo II**
Costituenti chimici degli acidi nucleici
1. Basi eterocicliche azotate dei nucleotidi, 23 – 1.a. Adolf Pinner, 24 – 1.b. Hermann Emil Fischer, 26 – 1.1. Basi pirimidiniche, 32 – 1.c. Treat Baldwin Johnson, 35 – 1.2. Basi puriniche, 37 – 2. Principali caratteristiche chimiche e fisiche delle basi pirimidiniche e puriniche degli acidi nucleici, 38 – 2.1. Proprietà basiche, 38 – 2.a. Robert Sanderson Mulliken, 42 – 2.2. Determinazione della struttura mediante diffrazione dei raggi X, 47 – 2.3. Solubilità, 50 – 2.4. Capacità di formazione di legami idrogeno, 51 – 2.5. Tautomeria, 52 – 2.b. Jerry Donohue, 57 – 2.6. Spettrofotometria ultravioletta, 59 – 2.7. Ionizzazione, 60 – 2.8. Basi rare, 63 – 3. Ribosio e deossiribosio, 66 – 4. Nucleosidi e nucleotidi, 69 – 5. Reazioni chimiche dei costituenti molecolari degli acidi nucleici, 78 – 5.1. Reazioni del ribosio e del deossiribosio, 78 – 5.1.a. Acilazione e alchilazione, 78 – 5.1.b. Ossidazione, 80 – 5.2. Reazioni delle basi, 81 – 5.2.a. Acido nitroso, 81 – 5.2.b. Formaldeide, 83 – 5.2.c. Sodio bisolfito, 84 – 5.2.d. Bromo e Iodio, 85 – 5.2.e. Mercurio, 85 – 5.2.f. Agenti alchilanti, 85 – 5.3. Agenti nucleofili, 86 – 5.3.a. Idrazina, 87 – 5.3.b. Idrossilammina, 89 – 5.4. Reazione del gruppo fosfato, 91 – 5.5. Scissione del legame N-glicosidico, 92 – 5.6. Idrolisi del legame fosfodiesterico, 93.
- 95 **Capitolo III**
Biosintesi dei precursori purinici e pirimidinici degli acidi nucleici
1. Introduzione, 95 – 2. Biosintesi *ex novo* dei nucleotidi purinici, 96 – 2.a. John Machlin Buchanan, 102 – 3. Biosintesi *ex novo* dei nucleotidi pirimidinici, 108 – 3.a. David Wright Wilson, 113 – 4. Biosintesi dei

deossiribonucleotidi, 116 – 4.a. Peter Reichard, 120 – 5. Conversione di nucleosidi in nucleosidi mono-, di- e trifosfati, 124.

125 Capitolo IV *Acidi nucleici*

1. Introduzione, 125 – 2. Struttura degli acidi nucleici, 126 – 2.1. Struttura primaria del DNA, 127 – 2.2. Struttura secondaria del DNA (modello di Watson e Crick), 131 – 2.2.1. Aggiuntivi dati strutturali della doppia elica del DNA, 138 – 2.2.2. Ulteriori strutture secondarie del DNA, 142 – 2.2.3. Configurazioni alternative del DNA, 146 – 2.2.4. Triplici eliche polinucleotidiche, 147 – 2.2.5. G-quadruplex, 154 – 2.2.6. Z-DNA, 155 – 2.2.7. DNA palindromico, 158 – 2.2.8. DNA circolare, 160 – 2.2.9. Superavvolgimento del DNA, 164 – 2.2.10. Curvatura del DNA, 173 – 2.a. Karst Hoogsteen, 180 – 2.b. Alexander Rich, 181 – 2.c. Richard Earl Dickerson, 188 – 2.d. James Chuo Wang, 189 – 2.3. Denaturazione e rinaturazione del DNA, 192 – 2.3.1. Denaturazione termica del DNA, 192 – 2.3.2. Denaturazione alcalina del DNA, 199 – 2.3.3. Denaturazione biologica del DNA, 200 – 2.3.4. Rinaturazione del DNA, 205 – 2.4. Struttura primaria dell'RNA, 207 – 2.5. Struttura secondaria dell'RNA, 208 – 2.5.1. Tetraloops, 213 – 2.6. Struttura terziaria dell'RNA, 214 – 2.6.1. Pseudonodi, 215 – 2.7. Struttura quaternaria di RNA, 216 – 2.7.1. Ribozimi, 216 – 2.7.2. Riboswitch, 222.

235 Capitolo V *Analisi spettrofotometrica degli acidi nucleici*

1. Dosaggio del DNA totale, 235 – 1.1. Determinazione spettrofotometrica nell'ultravioletto del DNA, 235 – 1.2. Determinazione del DNA mediante spettrofotometria di fluorescenza, 240 – 1.2.1. Dosaggio tramite impiego del bromuro di etidio, 240 – 1.2.2. Dosaggio tramite impiego della mitramicina, 242 – 1.2.3. Dosaggio tramite impiego del bisbenzimidazolo (o Hoechst 33258), 243 – 1.2.4. Dosaggio tramite impiego dell'acido 3,5-diamminobenzoico.2HC (o DABA), 245 – 1.2.5. Dosaggio tramite impiego del 4',6-diammidino-2-fenilindolo.2HCl (o DAPI), 247 – 1.2.6. Dosaggio tramite impiego di cianine dimeriche asimmetriche, 248 – 1.3. Determinazione del DNA mediante tecniche colorimetriche, 250 – 1.3.1. Saggio con la difenilammina (DPA), 250 – 1.4. Determinazione dell'RNA mediante tecniche colorimetriche, 254 – 1.4.1. Saggio con l'orcino, 254 – 1.5. Colorazioni istochimiche per evidenziare acidi nucleici nei tessuti e la loro posizione, 255 – 1.5.1. Reazione di Feulgen, 255 – 1.5.2. Colorazione di Pappenheim, 259.

263 Capitolo VI
Il codice genetico

1. I principali contributi che consentirono l'affermarsi del concetto dell'esistenza di un codice genetico, 263 – 2. I primi tentativi di decifrazione del codice genetico, 296 – 3. Natura del codice genetico, 304 – 3.a. Alexander Latham Dounce, 311 – 3.b. George Gamow, 313 – 4. Decifrazione del codice genetico, 323 – 4.1. Sintesi proteica in sistemi acellulari, 323 – 4.2. La polinucleotide fosforilasi, 325 – 4.2.a. Marianne Grunberg-Manago, 327 – 4.2.b. Severo Ochoa, 329 – 4.3. Attribuzione dei codoni mediante l'uso di messaggeri sintetici, 333 – 4.3.a. Marshall Warren Nirenberg, 343 – 4.3.b. Johann Heinrich Matthaei, 351 – 4.4. Determinazione della sequenza delle basi all'interno delle triplette nucleotidiche, 352 – 4.4.1. Metodo di Nirenberg e Leder, 352 – 4.4.2. Metodo di Khorana, 355 – 4.4.2.a. Har Gobind Khorana, 358 – 4.4.3. Metodo di Sanger, 361 – 5. Il codice genetico, 361 – 6. Eccezioni alla universalità del codice genetico, 368 – 7. La selenocisteina, 371 – 8. Origine ed evoluzione del codice genetico, 378 – 9. Espansione del codice genetico, 382 – 10. Inserzione di coppie di basi non naturali nel DNA, 392.

403 *Indice dei nomi*

411 *Indice analitico*

Presentazione

L'informazione genetica è senza dubbio la caratteristica più generale e significativa del fenomeno della vita.

Il concetto cibernetico di un flusso informazionale, che si estrinseca fenotipicamente di generazione in generazione e tende a conservare (entro convenienti limiti di tempo) i tipi specifici dei viventi, cominciò a farsi strada quando, intorno agli anni Quaranta dello scorso secolo, alcuni eminenti fisici si interessarono al problema del gene.

Ancora negli anni Cinquanta si sollevava qualche dubbio sulla identificazione del materiale genetico nel DNA, e non piuttosto in una frazione proteica in qualche modo stabilmente legata allo stesso DNA.

Fu soltanto a seguito della scoperta della struttura tridimensionale a doppia elica del DNA — una struttura che di per sé suggeriva un meccanismo biologicamente significativo di replica della molecola — che d'un tratto si aprì la via ad una nuova comprensione a scala molecolare dei fatti fondamentali dell'eredità.

Si affermava in tal modo il significato dell'informazione genetica come tema centrale della biologia, nel senso — in tesi generale — di replica e trasmissione di un'informazione codificata ad ogni generazione cellulare.

Grazie alla feconda collaborazione di studiosi di varia estrazione, ci troviamo ora in un periodo di rapidissima crescita delle conoscenze biologiche accompagnata dall'intenso interesse e dal fermento propri delle nuove scoperte.

Nella prodigiosa diversità delle forme viventi, peculiare carattere del fenomeno della vita, si possono cogliere di volta in volta, ai vari livelli della organizzazione nella gerarchia dei sistemi biologici, fatti essenziali di portata generale comuni a tutto ciò che vive.

I successivi notevoli progressi delle conoscenze in campo biologico, hanno fatto sì che la biologia decisamente entrasse in una fase teorica su base sperimentale, tenendente a spiegare la logica rigorosa dei

fenomeni biologici attraverso la formulazione di modelli conoscitivi sempre più generali.

Non avendo alcuna limitazione di sorta né di ordine sistematico, né morfologico, né tanto meno fisiologico, la biologia è una scienza che, differenziandosi dalle discipline a carattere strettamente descrittivo, è oggi capace di muoversi liberamente tra le diverse discipline biologiche alla ricerca dei fatti unitari della vita; per questo motivo si è aperto ad essa un enorme campo di indagine, e non v'è chi non ne comprenda il valore sintetico ed al tempo stesso di guida fra tante discipline a carattere specialistico, necessariamente, ma artificiosamente, separate.

Come tutti i miei precedenti lavori, anche questo non sarebbe potuto giungere a compimento senza il sostegno e la pazienza di mia moglie Alina. Tutto quello che posso offrire in cambio è ringraziarla pubblicamente con gratitudine per il suo inestimabile contributo.

Introduzione allo studio degli acidi nucleici

1. Una breve nota storica*

Le fondamentali ricerche che hanno portato alla scoperta degli acidi nucleici sono state compiute da Friedrich Miescher (1844–1895) che, per primo, ha dato inizio alla chimica del nucleo cellulare. Nelle sue iniziali ricerche condotte nel 1868 nel laboratorio di Felix Hoppe–Seyler (1825–1895) in Tubinga, isolò il nucleo da cellule del pus e mostrò che in esse vi era un insolito composto organico contenente fosforo che denominò *nucleina*. Un composto che oggi sappiamo essere una nucleoproteina. Successive ricerche mostrarono che gli acidi nucleici sono normali costituenti di tutte le cellule e tessuti. Nel 1889, Richard Altman (1852–1900) descrisse un metodo per la preparazione di acidi nucleici, esenti da proteine, estratti da tessuto animale e da lievito. Alcuni anni più tardi, a seguito di idrolisi dell'acido nucleico estratto dalle ghiandole del timo, furono isolate le basi puriniche adenina e guanina, le basi pirimidiniche citosina e timina, un deossipentosio e acido fosforico. Si notò, inoltre, che dall'idrolisi dell'acido nucleico estratto dal lievito si otteneva adenina, guanina, citosina, uracile, un pentosio e acido fosforico. Si concludeva, pertanto, che l'acido nucleico estratto dal lievito differiva da quello estratto dal timo in quanto conteneva uracile al posto della timina ed un pentosio al posto di un deossipentosio. Conseguentemente fu avanzata l'ipotesi che il deossipentosio acido nucleico fosse un

* Un'ampia trattazione delle ricerche che hanno portato, dalla scoperta degli acidi nucleici ad opera di Friedrich Miescher, alla presentazione nel 1953 del celebre modello a doppia elica del DNA di Watson e Crick è riportata nel volume: Giovanni Parisi — *Dalla scoperta della struttura delle proteine a quella del DNA. I padri della Biologia molecolare*, ed. Aracne. La trattazione è anche corredata dalle note biografiche dei seguenti studiosi: Friedrich Miescher, Albrecht Kossel, Phoebus Levene, Archibald Garrod, Thomas Morgan, George Beadle, Edward Tatum, Niels Bohr, Erwin Schrödinger, Max Delbrück, Salvador Luria, Alfred Hershey, Oswald Avery, Erwin Chargaff, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins, Francis Crick, James Watson.

componente dei tessuti animali e che il pentosio acido nucleico fosse un componente dei tessuti vegetali. Soltanto nei primi anni Quaranta dello scorso secolo, a seguito degli studi di spettrofotometria ultravioletta di Torbjörn Caspersson (1910–1997), le osservazioni istochimiche di Jean Brachet (1909–1988) e le analisi chimiche di James Davidson (1911–1972) si stabilì che l'acido ribonucleico è un generale costituente delle cellule animali, vegetali e batteriche. Un tempo sorprendentemente lungo fu necessario per stabilire la natura del carboidrato nel deossipentosio e nel pentosio negli acidi nucleici, una decifrazione che fornì la base dei nomi deossiribonucleico acido (DNA) e ribonucleico acido (RNA). L'elucidazione della dettagliata struttura dei nucleosidi e dei nucleotidi può essere largamente attribuita ad Alexander Todd (1907–1997) e ai suoi collaboratori che stabilirono la natura del legame glicosidico tra i residui glucidici e le basi puriniche e pirimidiniche nonché la natura degli esteri fosforici dei nucleosidi. Un lavoro proseguito da Waldo Cohn (1910–1999) che formò la finale conferma della natura del legame 2',5'-internucleotidico sia nel DNA sia nell'RNA. I risultati di queste fondamentali ricerche consentirono che la biologia degli acidi nucleici cominciasse a svilupparsi su solide basi. L'impiego di nuove tecniche in citochimica e i progressi ottenuti nel frazionamento cellulare ben presto mostrarono in maniera definitiva che il DNA e l'RNA sono principali costituenti di tutte le cellule animali e vegetali. Il DNA essenzialmente confinato nei nuclei, l'RNA trovato anche nel citoplasma. Successivamente lo sviluppo di tecniche di frazionamento subcellulare rese poi possibile non soltanto di misurare la distribuzione del DNA e dell'RNA tra le frazioni subcellulari di vari tipi di cellule, ma anche consentì di trovare RNA nel nucleo, nel ribosoma e nelle frazioni solubili delle cellule. Fu, inoltre, dimostrato nei nuclei delle cellule somatiche la costanza dell'ammontare del DNA, una condizione tipica per ciascuna specie.

La presenza di basi in proporzioni approssimativamente equimolari portò allo sviluppo della *ipotesi tetranucleotidica*, sia per il DNA sia per l'RNA, nella quale ambedue gli acidi nucleici furono considerati strutture polimeriche costituite da tetranucleotidi, tenuti insieme in maniera ripetitiva, ciascuno formato da due mononucleotidi purinici e due pirimidinici.

L'ipotesi tetranucleotidica finì però per essere abbandonata quando fu dimostrato che i vari nucleotidi non necessariamente si trovano in proporzioni equimolari.

Agli inizi degli anni Cinquanta, Erwin Chargaff (1905–2002) notò alcune regolarità nella composizione del DNA:

- a) la somma delle purine era uguale alla somma delle pirimidine;
- b) la somma delle ammino-basi (adenina e citosina) era uguale alla somma delle cheto-basi (guanina e timina);
- c) l'adenina e la timina così come la guanina e la citosina erano presenti in quantità equivalenti.

Queste importanti osservazioni furono di cruciale importanza nella successiva interpretazione delle analisi cristallografiche condotte con i raggi X eseguite da William Astbury (1898–1961), Linus Pauling (1901–1994) e Robert Corey (1897–1971), Maurice Wilkins (1916–2004) e collaboratori, Rosalind Franklin (1920–1945) e Raymond Gosling (1926–2015).

Queste due serie di dati furono brillantemente combinati da Watson e Crick nell'ormai famosa struttura del DNA in doppia elica, costituita da coppie di basi specificamente tenute insieme da legami idrogeno, la quale suggeriva un possibile meccanismo di copia del materiale genetico.

Poco dopo l'elucidazione della struttura primaria del DNA si ipotizzò che una sorta di RNA (RNA ribosomale) trasferisse il *messaggio* genetico dal nucleo nel citoplasma cellulare nel sito deputato alla biosintesi proteica.

Nei primi anni Sessanta, però, François Jacob (1920–2013; Nobel per la medicina nel 1965) e Jacques Monod (1910–1976; Nobel per la medicina nel 1965), avendo constatato che l'RNA ribosomale era troppo stabile e troppo costante nella sua composizione in basi per assolvere la funzione in precedenza proposta, ipotizzarono che questo compito fosse assegnato ad una fugace molecola di RNA che denominarono RNA messaggero (mRNA).

Una ipotesi che trovò ben presto conferma in quanto dimostrarono non soltanto che all'infezione fagica dei batteri seguiva la sintesi di un RNA complementare al DNA, ma che questo RNA, associandosi con i ribosomi batterici, fungeva da *stampo* per la sintesi delle proteine del fago.

Consequentemente si affermava il concetto che un flusso di informazione dal DNA si trasferiva alle proteine:

