

Lizabeth A. Allison

Fondamenti di biologia molecolare

Seconda edizione italiana condotta
sulla terza edizione americana

A cura di Daniela Taverna

BIOLOGIA **ZANICHELLI**



Lizabeth A. Allison

Fondamenti di biologia molecolare

Seconda edizione italiana condotta
sulla terza edizione americana

A cura di Daniela Taverna

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

1. Vai su **my.zanichelli.it**
2. Clicca su *Registrati*.
3. Scegli *Studente*.
4. Segui i passaggi richiesti per la registrazione.
5. Riceverai un'email: clicca sul link per completare la registrazione.
6. Cerca il tuo codice di attivazione stampato in verticale sul bollino argentato in questa pagina.
7. Inseriscilo nella tua area personale su **my.zanichelli.it**

Se sei già registrato, per accedere ai contenuti riservati ti serve solo il codice di attivazione.

PER LO SMARTPHONE




GUARDA! i video del libro
sul tuo smartphone

SCARICA LA APP  DA:



- 1 Sul libro, inquadra l'icona



- 2 Sullo smartphone, tocca le icone 

- 3 Guarda i video e le altre risorse digitali

Titolo originale: *Fundamental Molecular Biology*, 3rd Edition
Copyright © 2021 John Wiley & Sons, Inc.
All rights reserved. This translation published under licence with the original publisher John Wiley & Sons, Inc.

© 2023 Zanichelli editore S.p.A., via Imerio 34, 40126 Bologna [39976]
www.zanichelli.it

Traduzione: Cecilia Grimaldi
Revisione: Francesca Orso, Daniela Taverna

Diritto riservato

I diritti di pubblicazione, riproduzione, comunicazione, distribuzione, trascrizione, traduzione, noleggio, prestito, esecuzione, elaborazione in qualsiasi forma o opera, di memorizzazione anche digitale e di adattamento totale o parziale su supporti di qualsiasi tipo e con qualsiasi mezzo (comprese le copie digitali e fotostatiche), sono riservati per tutti i paesi. L'acquisto della presente copia dell'opera non implica il trasferimento dei suddetti diritti né li esaurisce.

Fotocopie e permessi di riproduzione

Le fotocopie per uso personale (cioè privato e individuale, con esclusione quindi di strumenti di uso collettivo) possono essere effettuate, nei limiti del 15% di ciascun volume, dietro pagamento alla S.I.A.E. del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633.
Tali fotocopie possono essere effettuate negli esercizi commerciali convenzionati S.I.A.E. o con altre modalità indicate da S.I.A.E.

Per le riproduzioni ad uso non personale (ad esempio: professionale, economico, commerciale, strumenti di studio collettivi, come dispense e simili) l'editore potrà concedere a pagamento l'autorizzazione a riprodurre un numero di pagine non superiore al 15% delle pagine del presente volume.

Le richieste vanno inoltrate a:
Centro Licenze e Autorizzazioni per le Riproduzioni Editoriali (CLEARedi),
Corso di Porta Romana 108, 20122 Milano
e-mail: autorizzazioni@clearedi.org e sito web: www.clearedi.org

L'autorizzazione non è concessa per un limitato numero di opere di carattere didattico riprodotte nell'elenco che si trova all'indirizzo
www.zanichelli.it/chi-siamo/fotocopie-e-permessi

L'editore, per quanto di propria spettanza, considera rare le opere fuori del proprio catalogo editoriale. La loro fotocopia per i soli esemplari esistenti nelle biblioteche è consentita, anche oltre il limite del 15%, non essendo concorrenziale all'opera. Non possono considerarsi rare le opere di cui esiste, nel catalogo dell'editore, una successiva edizione, né le opere presenti in cataloghi di altri editori o le opere antologiche. Nei contratti di cessione è esclusa, per biblioteche, istituti di istruzione, musei e archivi, la facoltà di cui all'art. 71-ter legge diritto d'autore. Per permessi di riproduzione, diversi dalle fotocopie, rivolgersi a ufficiocontratti@zanichelli.it

Licenze per riassunto, citazione e riproduzione parziale a uso didattico con mezzi digitali

La citazione, la riproduzione e il riassunto, se fatti con mezzi digitali, sono consentiti (art. 70 bis legge sul diritto d'autore), limitatamente a brani o parti di opera, a) esclusivamente per finalità illustrative a uso didattico, nei limiti di quanto giustificato dallo scopo non commerciale perseguito. (La finalità illustrativa si consegue con esempi, chiarimenti, commenti, spiegazioni, domande, nel corso di una lezione); b) sotto la responsabilità di un istituto di istruzione, nei suoi locali o in altro luogo o in un ambiente elettronico sicuro, accessibili solo al personale docente di tale istituto o agli alunni o studenti iscritti al corso di studi in cui le parti di opere sono utilizzate; c) a condizione che, per i materiali educativi, non siano disponibili sul mercato licenze volontarie che autorizzano tali usi. Zanichelli offre al mercato due tipi di licenze di durata limitata all'anno accademico in cui le licenze sono concesse:

A) licenze gratuite per la riproduzione, citazione o riassunto di una parte di opera non superiore al 5%. Non è consentito superare tale limite del 5% attraverso una pluralità di licenze gratuite,
B) licenze a pagamento per la riproduzione, citazione, riassunto parziale ma superiore al 5% e comunque inferiore al 40% dell'opera. Per usufruire di tali licenze occorre seguire le istruzioni su www.zanichelli.it/licenzeeducative

L'autorizzazione è strettamente riservata all'istituto educativo licenziatario e non è trasferibile in alcun modo e a qualsiasi titolo.

Garanzie relative alle risorse digitali

Le risorse digitali di questo volume sono riservate a chi acquista un volume nuovo: vedi anche al sito www.zanichelli.it/contatti/acquisti-e-recesso le voci *Informazioni generali su risorse collegate a libri cartacei e Risorse digitali e libri non nuovi*.

Zanichelli garantisce direttamente all'acquirente la piena funzionalità di tali risorse.

In caso di malfunzionamento rivolgersi a assistenza@zanichelli.it

La garanzia di aggiornamento è limitata alla correzione degli errori e all'eliminazione di malfunzionamenti presenti al momento della creazione dell'opera.

Zanichelli garantisce inoltre che le risorse digitali di questo volume sotto il suo controllo saranno accessibili, a partire dall'acquisto, per tutta la durata della normale utilizzazione didattica dell'opera. Passato questo periodo, alcune o tutte le risorse potrebbero non essere più accessibili o disponibili: per maggiori informazioni, leggi my.zanichelli.it/fuoricatalogo

Soluzioni degli esercizi e altri svolgimenti di compiti assegnati

Le soluzioni degli esercizi, compresi i passaggi che portano ai risultati e gli altri svolgimenti di compiti assegnati, sono tutelate dalla legge sul diritto d'autore in quanto elaborazioni di esercizi a loro volta considerati opere creative tutelate, e pertanto non possono essere diffuse, comunicate a terzi e/o utilizzate economicamente, se non a fini esclusivi di attività didattica.

Diritto di TDM

L'estrazione di dati da questa opera o da parti di essa e le attività connesse non sono consentite, salvi i casi di utilizzazioni libere ammessi dalla legge.

L'editore può concedere una licenza. La richiesta va indirizzata a tdm@zanichelli.it

Coordinamento editoriale: Marika De Acetis

Redazione: Neri Studio Editoriale, Bologna

Impaginazione: Garon, Cremona

Indice analitico: Silvia Cacciari

Copertina:

– *Progetto grafico:* Falcinelli & Co., Roma

– *Immagine di copertina:* © NI QIN/iStockphoto

Prima edizione italiana: maggio 2008

Seconda edizione italiana: febbraio 2023

Ristampa: **prima tiratura**

5 4 3 2 1 2023 2024 2025 2026 2027

Realizzare un libro è un'operazione complessa, che richiede numerosi controlli: sul testo, sulle immagini e sulle relazioni che si stabiliscono tra essi. L'esperienza suggerisce che è praticamente impossibile pubblicare un libro privo di errori. Saremo quindi grati ai lettori che vorranno segnalarceli.

Per segnalazioni o suggerimenti relativi a questo libro scrivere al seguente indirizzo:

Zanichelli editore S.p.A. - Via Imerio 34 - 40126 Bologna
fax 051293322 - e-mail: linea_universitaria@zanichelli.it - sito web: www.zanichelli.it

Prima di effettuare una segnalazione è possibile verificare se questa sia già stata inviata in precedenza, identificando il libro interessato all'interno del nostro catalogo online per l'Università.

Per comunicazioni di tipo commerciale: universita@zanichelli.it

Stampa

per conto di Zanichelli editore S.p.A.
Via Imerio 34, 40126 Bologna

INDICE SINTETICO

1	Gli inizi della biologia molecolare	1
2	La struttura del DNA	15
3	La versatilità dell'RNA	37
4	Struttura e ripiegamento delle proteine	62
5	L'organizzazione del genoma e l'evoluzione	94
6	La replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri	122
7	Le vie di riparazione del DNA	162
8	La trascrizione nei batteri	187
9	La trascrizione negli eucarioti	216
10	I meccanismi epigenetici della regolazione genica	270
11	Il processamento dell'RNA e la regolazione genica post-trascrizionale	313
12	Il meccanismo della traduzione	360
13	La tecnologia del DNA ricombinante e gli organismi geneticamente modificati	384
14	L'analisi di organizzazione, espressione e funzione dei geni	453
15	La biologia molecolare in medicina	513

INDICE GENERALE

PREFAZIONE	XIII
LE RISORSE DIGITALI	XIV
INDICE DEI VIDEO	XV

1	Gli inizi della biologia molecolare	1
1.1	Introduzione	1
1.2	Approfondimenti sulla natura del materiale ereditario	3
	Le leggi dell'ereditarietà di Mendel	4
	La teoria cromosomica dell'ereditarietà	5
	Il principio trasformante è il DNA	6
	Un approccio creativo porta all'ipotesi un gene-un enzima	7
	L'importanza del progresso tecnologico: l'esperimento di Hershey-Chase	9
1.3	Un modello per la struttura del DNA: la doppia elica	10
1.4	Il dogma centrale della biologia molecolare	11
1.5	Un quadro evolutivistico per l'ereditarietà	12
	La teoria selezionista (neodarwiniana)	12
	La teoria neutrale dell'evoluzione molecolare	12
	I CONCETTI IN SINTESI	13
	I CONCETTI IN PRATICA	14

2	La struttura del DNA	15
2.1	Introduzione	15
2.2	La struttura primaria: i componenti degli acidi nucleici	16
	Gli zuccheri a cinque atomi di carbonio	16
	Le basi azotate	16
	Il gruppo funzionale fosfato	17
	Nucleosidi e nucleotidi	17
	La nomenclatura dei nucleotidi	18
	La lunghezza del DNA e dell'RNA	19
	Il significato di 5' e di 3'	19
2.3	La struttura secondaria del DNA	19
	Tra le basi azotate si formano legami idrogeno	19
	L'impilamento delle basi conferisce stabilità chimica alla doppia elica del DNA	20

La struttura della doppia elica di Watson e Crick	22	4 Struttura e ripiegamento delle proteine	62
Solco maggiore e solco minore	22		
Le diverse caratteristiche delle forme alternative della doppia elica	23		
I filamenti di DNA possono separarsi in modo reversibile	25		
2.4 Le strutture secondarie insolite del DNA	28		
▶ FOCUS 2.1 Origami di DNA: costruire "nanomacchine" con le molecole	29	4.1 Introduzione	62
Le strutture scivolte	29	4.2 La struttura primaria: gli amminoacidi e il codice genetico	63
Le strutture cruciformi	30		
Il DNA a tripla elica	30		
Il DNA G-quadruplex o a quartetti di G	31		
▶ MEDICINA 2.1 L'atassia di Friedreich e il DNA a tripla elica	32		
2.5 La struttura terziaria del DNA	33	4.3 La struttura tridimensionale delle proteine	69
Il superavvolgimento del DNA	33	La struttura secondaria	69
Il significato del superavvolgimento <i>in vivo</i>	34	La struttura terziaria	71
I CONCETTI IN SINTESI	35	La struttura quaternaria	72
I CONCETTI IN PRATICA	35	Le proteine intrinsecamente disordinate	75
3 La versatilità dell'RNA	37	4.4 La funzione delle proteine e il controllo della loro attività	77
3.1 Introduzione	37	Gli enzimi sono catalizzatori biologici	78
3.2 L'RNA partecipa a una vasta gamma di processi cellulari	38	La regolazione dell'attività delle proteine mediante modifiche post-traduzionali	79
3.3 I motivi strutturali dell'RNA	40	La regolazione allosterica dell'attività delle proteine	81
La struttura secondaria dell'RNA	40	4.5 Il ripiegamento corretto e non corretto delle proteine	83
La struttura del tRNA: informazioni importanti sui motivi strutturali dell'RNA	42	Le chaperon molecolari	83
I motivi frequenti della struttura terziaria dell'RNA	44	Le vie di degradazione delle proteine nelle cellule eucariote	85
La cinetica del ripiegamento dell'RNA	47	La degradazione proteica nelle cellule procariote	86
3.4 La scoperta della catalisi da RNA	49	La separazione di fase	87
L'autosplicing dell'RNA di <i>Tetrahymena thermophila</i>	49	Le malattie da ripiegamento non corretto delle proteine	88
▶ FOCUS 3.1 Il mondo a RNA	51	▶ MEDICINA 4.1 I prioni	89
Il ribozima RNasi P	52	I CONCETTI IN SINTESI	91
I ribozimi catalizzano diverse reazioni chimiche	52	I CONCETTI IN PRATICA	92
3.5 I genomi a RNA	56	5 L'organizzazione del genoma e l'evoluzione	94
I virus eucarioti a RNA	56	5.1 Introduzione	94
▶ MEDICINA 3.1 I patogeni virali emergenti	58	5.2 L'organizzazione del genoma varia tra organismi diversi	95
I retrovirus	59		
I batteriofagi a RNA	59		
I viroidi e altri patogeni subvirali	59	Quanti sono i domini della vita, due o tre?	95
I CONCETTI IN SINTESI	60	Le due classi di dimensioni del genoma: piccolo e compatto o grande ed esteso	96
I CONCETTI IN PRATICA	61		

5.3	Il compattamento del genoma eucariote	97		
	Gli istoni sono piccole proteine cariche positivamente	98		
	I nucleosomi sono l'unità di base dell'impacchettamento della cromatina	100		
	Gli ordini superiori della struttura della cromatina	101		
	L'ulteriore compattamento del DNA richiede domini ad ansa	102		
	La cromatina interamente condensata: i cromosomi metafasici	103		
	L'organizzazione e l'espressione del materiale genetico	107		
5.4	La maggior parte del genoma eucariote non è codificante	109		
	Gli elementi interspersi sono soprattutto elementi trasponibili	110		
	Le sequenze ripetute in tandem si organizzano in serie con un numero variabile di ripetizioni	110		
5.5	Il trasferimento genico orizzontale contribuisce all'evoluzione del genoma	111		
	I genomi degli organuli rivelano un'origine endosimbiotica	111		
	► MEDICINA 5.1 Il DNA mitocondriale e le malattie	114		
	Il trasferimento di DNA tra compartimenti	114		
5.6	L'organizzazione del genoma procariote e virale	115		
	L'organizzazione del genoma batterico	116		
	Il DNA plasmidico	116		
	L'organizzazione del genoma degli archei	117		
	L'organizzazione del genoma virale	117		
I CONCETTI IN SINTESI		120		
I CONCETTI IN PRATICA		120		
6	La replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri	122		
6.1	Introduzione	122		
6.2	I primi indizi sul meccanismo di replicazione del DNA batterico	123		
	L'esperimento di Meselson-Stahl	123		
	La visualizzazione del DNA batterico che si replica	123		
6.3	Le DNA polimerasi catalizzano la sintesi del DNA da 5' a 3'	125		
	La replicazione semidiscontinua del DNA	126		
6.4	Il replisoma batterico	128		
	Le DNA polimerasi batteriche svolgono diverse funzioni	129		
	L'inizio della replicazione nei batteri	129		
	La replicazione nei batteri è mediata dal replisoma	130		
	Le topoisomerasi rilassano il DNA superavvolto	131		
	La sintesi del filamento guida è veramente continua?	133		
6.5	Il replisoma eucariote	134		
	La mappatura delle origini di replicazione	134		
	L'attivazione selettiva delle origini di replicazione negli eucarioti	135		
	Le fabbriche di replicazione	136		
	La rimozione degli istoni nelle origini di replicazione	136		
	La formazione del complesso di prereplicazione e l'abilitazione alla replicazione	137		
	► FOCUS 6.1 La nomenclatura dei geni coinvolti nella replicazione del DNA	138		
	Lo svolgimento della doppia elica a livello delle forcelle di replicazione	140		
	L'innesco mediato da RNA della sintesi del DNA del filamento guida e di quello discontinuo	141		
	Lo scambio delle polimerasi	141		
	L'allungamento dei filamenti guida e di quelli discontinui	141		
	La PCNA: una pinza scorrevole con molti partner proteici	143		
	Il proofreading a opera delle DNA polimerasi replicative	143		
	La maturazione dei filamenti nascenti di DNA	144		
	La deposizione degli istoni sul DNA di nuova sintesi	147		
	Le topoisomerasi districano il DNA appena sintetizzato	147		
6.6	Metodi alternativi di replicazione del DNA circolare	147		
	La replicazione a cerchio rotante	147		
	► MEDICINA 6.1 Farmaci antitumorali diretti contro le topoisomerasi	148		
	I modelli di replicazione degli organuli	148		
	► MEDICINA 6.2 La RNasi MRP e l'ipoplasia della cartilagine e dei peli	150		
6.7	Il mantenimento dei telomeri: il ruolo della telomerasi nella replicazione del DNA, nell'invecchiamento e nel cancro	150		
	I telomeri	150		
	La soluzione al problema della replicazione delle estremità	151		
	Il mantenimento dei telomeri da parte della telomerasi	153		
	Altri metodi di mantenimento dei telomeri	154		
	Il reclutamento della telomerasi sui telomeri	154		
	La regolazione dell'attività della telomerasi	154		
	Telomerasi, invecchiamento e cancro	156		
	► MEDICINA 6.3 La discheratosi congenita: perdita della funzione della telomerasi	158		
I CONCETTI IN SINTESI		160		
I CONCETTI IN PRATICA		161		

7	Le vie di riparazione del DNA	162		
7.1	Introduzione	162		
7.2	Le mutazioni e il danno al DNA	162		
	Le transizioni e le trasversioni possono portare a mutazioni silenti, missenso e nonsense	163		
	L'espansione delle ripetizioni trinucleotidiche causa instabilità genetica	165		
	Le classi generali del danno al DNA	165		
7.3	L'aggiornamento della lesione	168		
7.4	L'inversione diretta del danno al DNA	169		
	L'inversione dei dimeri di timina per azione della DNA fotoliasi	169		
	L'inversione del danno mediata dalla DNA metiltrasferasi	171		
	La rimozione dei legami incrociati DNA-proteina a opera della proteasi SPRTN	171		
7.5	La riparazione dei cambiamenti di singole basi e delle distorsioni strutturali mediante rimozione del danno al DNA	172		
	La riparazione per escissione delle basi	172		
	La riparazione delle basi male appaiate	172		
	► MEDICINA 7.1 Il cancro coloretale ereditario non associato a poliposi: un difetto della riparazione delle basi male appaiate	175		
	La riparazione per escissione dei nucleotidi	178		
	► MEDICINA 7.2 Lo xeroderma pigmentoso e le malattie correlate: i difetti della riparazione per escissione dei nucleotidi	178		
7.6	La riparazione delle rotture a doppio filamento mediante rimozione del danno al DNA	181		
	La ricombinazione omologa	181		
	► MEDICINA 7.3 Il cancro ereditario al seno: le mutazioni di <i>BRCA1</i> e di <i>BRCA2</i>	182		
	La giunzione di estremità non omologhe	183		
	I CONCETTI IN SINTESI	185		
	I CONCETTI IN PRATICA	186		
8	La trascrizione nei batteri	187		
8.1	Introduzione	187		
8.2	Il meccanismo della trascrizione	188		
	La struttura del promotore batterico	188		
	La struttura dell'RNA polimerasi batterica	189		
	Come fa l'RNA polimerasi a trovare un promotore?	192		
	L'inizio della trascrizione	193		
	L'allungamento	194		
	► FOCUS 8.1 L'RNA polimerasi: un motore molecolare	196		
	Il meccanismo di proofreading	197		
	La terminazione della trascrizione	197		
8.3	Indizi sulla regolazione genica forniti dall'operone del lattosio (<i>lac</i>)	199		
	Il modello dell'operone di Jacob e Monod per la regolazione genica	199		
	Gli operoni sono comuni nei procarioti	200		
	La caratterizzazione del repressore Lac	200		
	La regolazione dell'operone del lattosio (<i>lac</i>)	200		
	Il promotore <i>lac</i> e il gene strutturale <i>lacZ</i> sono molto usati in biologia molecolare	204		
8.4	Il meccanismo di azione dei regolatori trascrizionali	204		
	Il legame cooperativo delle proteine al DNA	204		
	I cambiamenti allosterici e il legame al DNA	204		
	La formazione di anse del DNA	206		
8.5	Il controllo dell'espressione genica da parte dell'RNA	208		
	Il ripiegamento differenziale dell'RNA: l'attenuazione trascrizionale dell'operone del triptofano	209		
	I ribointerruttori	209		
	I ribozimi ribointerruttori	211		
8.6	I circuiti di regolazione genica	212		
	I fattori σ alternativi	212		
	Il quorum sensing	213		
	I CONCETTI IN SINTESI	214		
	I CONCETTI IN PRATICA	215		
9	La trascrizione negli eucarioti	216		
9.1	Introduzione	216		
9.2	Uno sguardo d'insieme sulla regolazione trascrizionale	217		
	I territori cromosomici e le fabbriche di trascrizione	217		
	Gli eucarioti hanno tipi diversi di RNA polimerasi	218		
	► MEDICINA 9.1 L'architettura nucleare e le malattie da invecchiamento precoce	219		
9.3	Gli elementi regolatori dei geni che codificano per proteine	220		
	Struttura e funzione degli elementi del promotore	221		
	Struttura e funzione degli elementi regolatori a lungo raggio	222		

9.4	Il macchinario generale di trascrizione e il processo trascrizionale	225
	► MEDICINA 9.2 La talassemia ispanica e i siti di ipersensibilità alla DNasi I	226
	I componenti del macchinario generale di trascrizione	227
	La struttura dell'RNA polimerasi II	227
	I fattori generali di trascrizione e la formazione del complesso di preinizio	229
	Il Mediatore: un ponte levatoio molecolare	230
	L'inizio della trascrizione	232
	L'allungamento	235
	Proofreading e arretramento	236
9.5	Il ruolo di specifici fattori di trascrizione nella regolazione genica	237
	I fattori di trascrizione mediano l'attivazione o la repressione trascrizionale di geni specifici	238
	I fattori di trascrizione sono proteine modulari	238
	I motivi del dominio di legame al DNA	238
	► FOCUS 9.1 Homeobox e omeodomini	240
	► MEDICINA 9.3 La cefalopolisindattilia di Greig e la segnalazione da parte di Sonic hedgehog	243
	Il dominio di transattivazione	245
	Il dominio di dimerizzazione	246
	I fattori pionieri	246
9.6	I coattivatori e i corepressori trascrizionali	247
	I complessi di modifica della cromatina	247
	► FOCUS 9.2 Esiste un codice istonico?	249
	Le varianti dell'istone linker	250
	I complessi di rimodellamento della cromatina	251
9.7	L'assemblaggio del complesso di trascrizione: i modelli dell'enhanceosoma e del "colpisci e fuggi" a confronto	254
	Il modello dell'enhanceosoma	254
	Il modello "colpisci e fuggi"	254
	La fusione dei modelli	255
	L'allungamento della trascrizione attraverso la barriera dei nucleosomi	255
	La terminazione	257
9.8	Importazione ed esportazione nucleare delle proteine	257
	► MEDICINA 9.4 I difetti dell'Allungatore e la disautonomia familiare	258
	► FOCUS 9.3 Il complesso del poro nucleare	259
	Le carioferine mediano l'importazione e l'esportazione nucleare	260
	La via di importazione nucleare	261
	La via di esportazione nucleare	264
	L'importazione nucleare regolata e le vie di trasduzione del segnale	265
	I CONCETTI IN SINTESI	267
	I CONCETTI IN PRATICA	269
10	I meccanismi epigenetici della regolazione genica	270
10.1	Introduzione	270
10.2	I marcatori epigenetici	271
	La metilazione delle citosine del DNA segnala i geni per il silenziamento	271
	Le isole CpG si trovano vicino ai promotori dei geni	274
	Il mantenimento stabile delle modifiche degli istoni	275
	► MEDICINA 10.1 L'epigenetica e il cancro	275
	► MEDICINA 10.2 La sindrome dell'X fragile e la metilazione anomala del DNA	276
10.3	L'imprinting genomico	277
	► MEDICINA 10.3 L'imprinting genomico e le malattie dello sviluppo del sistema nervoso	278
	L'instaurazione e il mantenimento dell'imprinting	281
	I meccanismi di espressione monoallelica	282
	L'imprinting genomico è indispensabile per uno sviluppo normale	283
	Le origini dell'imprinting genomico	284
10.4	L'inattivazione del cromosoma X	284
	L'inattivazione casuale del cromosoma X nei mammiferi	285
	I meccanismi molecolari che stabilizzano l'inattivazione del cromosoma X	285
	I geni legati all'X hanno tutti un'espressione monoallelica?	286
10.5	Il controllo epigenetico degli elementi trasponibili	287
	La scoperta degli elementi mobili nel mais da parte di Barbara McClintock	287
	I trasposoni di DNA hanno una vasta gamma di ospiti	289
	► MEDICINA 10.4 Geni che saltano e malattie umane	290
	I trasposoni di DNA si spostano con un meccanismo "taglia e cuci"	291
	I retrotrasposoni si spostano con un meccanismo "copia e incolla"	292
	Alcuni retrotrasposoni LTR sono attivi nel genoma dei mammiferi	293
	I retrotrasposoni non LTR includono LINE e SINE	294
	La metilazione degli elementi trasponibili	295
	Il silenziamento degli elementi trasponibili mediante piccoli RNA regolatori	295
10.6	L'epigenetica e l'eredità nutrizionale	296
	Nel topo, una dieta priva di acido folico può attivare un retrotrasposone	296
	Gli effetti epigenetici paterni	298
	L'ereditarietà epigenetica transgenerazionale avviene nella specie umana?	298

10.7	L'esclusione allelica	298	11.6	L'editing dell'RNA	339
	Il cambio del tipo di accoppiamento del lievito e il silenziamento	298		L'editing dell'RNA nei tripanosomi	339
	Il cambio dell'antigene nei tripanosomi	301		L'editing dell'RNA nei mammiferi	342
	► MEDICINA 10.5 La tripanosomiasi: la "malattia del sonno" umana	301		► MEDICINA 11.4 Sclerosi laterale amiotrofica: un difetto dell'editing dell'RNA?	343
	La ricombinazione V(D)J e la risposta immunitaria adattativa	306	11.7	La regolazione genica post-trascrizionale mediante RNAi	345
	► FOCUS 10.1 L'addomesticamento molecolare di un trasposone: l'evoluzione del sistema V(D)J	308		Uno sguardo di insieme alla via dell'RNAi indotta dai siRNA	346
I CONCETTI IN SINTESI		310		La scoperta dell'RNAi	347
I CONCETTI IN PRATICA		312		Il macchinario dell'RNAi	348
11	Il processamento dell'RNA e la regolazione genica post-trascrizionale	313		La scoperta dei miRNA in <i>Caenorhabditis elegans</i>	348
11.1	Introduzione	313		Il processamento dei miRNA	349
11.2	La scoperta dei geni interrotti	314		I miRNA sono caricati su un complesso Argonata (Ago) di silenziamento	351
	► FOCUS 11.1 Piccoli RNA nucleolari codificati da introni e geni "rovesciati"	315		I miRNA indirizzano l'mRNA alla degradazione o all'inibizione trascrizionale	351
11.3	Lo splicing avviene attraverso meccanismi diversi	316		I miRNA possono regolare una vasta gamma di mRNA bersaglio	352
	Gli introni di gruppo I richiedono un cofattore esterno G per lo splicing	316		Che cosa stabilisce se deve essere bloccata la traduzione o tagliato l'mRNA?	352
	Gli introni di gruppo II richiedono una A sporgente interna per lo splicing	316	11.8	Il turnover dell'RNA nel nucleo e nel citoplasma	353
	Gli introni mobili di gruppo I e II	317		Il controllo di qualità dell'RNA e gli esosomi nucleari	353
	Gli introni degli archei sono sottoposti a splicing da un'endoribonucleasi	319		Il turnover dell'RNA citoplasmatico	354
	Alcuni geni nucleari dei tRNA contengono un introne	320	I CONCETTI IN SINTESI		356
11.4	Le modifiche cotrascrizionali del pre-mRNA nucleare	320	I CONCETTI IN PRATICA		358
	L'aggiunta del cappuccio 5' di 7-metilguanossina	322	12	Il meccanismo della traduzione	360
	La modifica N ⁶ -metiladenosina (m ⁶ A) avviene durante la trascrizione	323	12.1	Introduzione	360
	Terminazione e poliadenilazione	323	12.2	Struttura e assemblaggio dei ribosomi	360
	► MEDICINA 11.1 La distrofia muscolare oculofaringea: espansione di una ripetizione trinucleotidica nel gene di una proteina che lega poliA	325		La struttura dei ribosomi	360
	La poliadenilazione alternativa	326		Il nucleolo	363
	► MEDICINA 11.2 L'atrofia muscolare spinale: difetti della biogenesi delle snRNP	328		La biogenesi dei ribosomi	364
	► MEDICINA 11.3 Le mutazioni del gene <i>Prp8</i> causano la retinite pigmentosa	333	12.3	Le aminoacil-tRNA sintetasi	365
11.5	Lo splicing alternativo	334		Il caricamento delle aminoacil-tRNA sintetasi	365
	Gli effetti dello splicing alternativo sull'espressione genica	335		L'attività di proofreading delle aminoacil-tRNA sintetasi	366
	► FOCUS 11.2 Il gene <i>DSCAM</i> : splicing alternativo estremo	335	12.4	L'inizio della traduzione	367
	La regolazione dello splicing alternativo	336		Formazione del complesso ternario e caricamento sulla subunità ribosomiale 40S	368
	Il <i>trans</i> -splicing	337		Il caricamento dell'mRNA sulla subunità ribosomiale 40S	368
				Scansione e riconoscimento dell'AUG	369

▶ TECNICHE 12.1 Saggi di toeprinting della traduzione	370	Il DNA plasmidico come vettore	393
L'unione delle subunità ribosomiali 40S e 60S	371	▶ TECNICHE 13.1 La reazione a catena della polimerasi (PCR)	394
▶ MEDICINA 12.1 Il fattore di inizio eucariote 2B e la scomparsa della sostanza bianca	371	Il batteriofago lambda (λ) come vettore	398
12.5 Allungamento e altri eventi all'interno del tunnel ribosomiale	371	▶ TECNICHE 13.2 La cromatografia liquida	399
La decodifica del messaggio	372	I vettori basati su cromosomi artificiali	400
Formazione del legame peptidico e traslocazione	373	Le fonti del DNA da clonare	401
L'attività peptidiltrasferasica	373	La costruzione di librerie di DNA	401
Le prove biochimiche che l'rRNA 23S è un ribozima	374	▶ TECNICHE 13.3 La sintesi del DNA complementare (cDNA)	402
Le prove strutturali che l'rRNA forma il sito attivo del ribosoma	375	13.5 Lo screening delle librerie e le sonde	403
Gli eventi nel tunnel ribosomiale	377	I tipi di sonde di DNA ed RNA	404
12.6 La terminazione della traduzione	378	La marcatura delle sonde	404
12.7 Il controllo traduzionale e post-traduzionale	379	Lo screening delle librerie	404
La fosforilazione di eIF2 α blocca la formazione del complesso ternario	379	▶ TECNICHE 13.4 I metodi di marcatura radioattiva e non radioattiva	405
Quattro proteina chinasi distinte mediano la fosforilazione di eIF2 α	380	▶ TECNICHE 13.5 La marcatura degli acidi nucleici	406
I CONCETTI IN SINTESI	382	Lo screening delle librerie di espressione	406
I CONCETTI IN PRATICA	383	13.6 La mappatura di restrizione e l'analisi degli RFLP	409
13 La tecnologia del DNA ricombinante e gli organismi geneticamente modificati	384	La mappatura di restrizione	409
13.1 Introduzione	384	▶ TECNICHE 13.6 L'elettroforesi del DNA e dell'RNA	409
13.2 Gli inizi della tecnologia del DNA ricombinante	385	Il polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP)	411
Indizi derivati dai siti coesivi del batteriofago lambda (λ)	385	▶ TECNICHE 13.7 Il Southern blot	412
Indizi dai sistemi batterici di restrizione e modifica	386	▶ MEDICINA 13.1 Il saggio PCR-RFLP per la malattia delle urine a sciroppo d'acero	414
I primi esperimenti di clonaggio	386	13.7 Il sequenziamento del DNA	415
▶ FOCUS 13.1 I timori suscitati dalle molecole di DNA ricombinante	388	Il sequenziamento manuale con il metodo dei dideoossi di Sanger	415
13.3 Il taglio e l'unione del DNA	388	Il sequenziamento automatizzato del DNA	416
Le classi principali di endonucleasi di restrizione	388	Il sequenziamento di nuova generazione	417
Le sequenze di riconoscimento delle endonucleasi di restrizione di tipo II	389	13.8 Introduzione agli organismi geneticamente modificati	419
La DNA ligasi unisce frammenti lineari di DNA	390	13.9 I topi transgenici: microiniezione nel pronucleo	420
13.4 Il clonaggio molecolare	392	Come si produce un topo transgenico	420
La scelta del vettore dipende dalle dimensioni dell'inserito e dallo scopo finale	392	I topi transgenici inducibili	423
		▶ TECNICHE 13.8 La mutagenesi inserzionale mediante trasposoni	423
		13.10 Il gene targeting nelle cellule staminali embrionali di topo	424
		I topi knock out	425
		I topi knock in	428
		I topi knock down	428
		I topi knock out e knock in condizionali	428
		13.11 L'editing del DNA con CRISPR/Cas	430
		Il sistema di immunità adattativa CRISPR/Cas	430
		Le applicazioni di CRISPR/Cas	430
		Un topo per ogni occasione	432

13.12 Le applicazioni degli animali geneticamente modificati	433	14.3 Genomica, proteomica e oltre	461
I primati transgenici non umani	433	Che cos'è la bioinformatica?	461
Bestiame transgenico e gene pharming	434	La genomica e la genomica sintetica	462
Gene drive	434	La proteomica	463
13.13 La clonazione mediante trasferimento nucleare	435	L'era delle omiche e la biologia dei sistemi	463
L'equivalenza genetica dei nuclei delle cellule somatiche: esperimenti di clonazione delle rane	435	14.4 Il sequenziamento di interi genomi	463
La clonazione dei mammiferi mediante trasferimento nucleare	436	L'approccio di assemblaggio del genoma clone per clone	464
“L'innovazione dell'anno”: la clonazione di Dolly	437	L'approccio a shotgun dell'intero genoma	464
Il metodo della clonazione mediante trasferimento nucleare	437	Le bozze e le sequenze rifinite	465
La fonte di mtDNA nei cloni	439	L'analisi comparativa dei genomi	465
Perché la clonazione mediante trasferimento nucleare è inefficiente?	439	► FOCUS 14.2 L'analisi comparativa dei genomi: informazioni dal pesce palla e dal pollo	466
► FOCUS 13.2 Animali da compagnia geneticamente manipolati	442	La famiglia umana	468
Le applicazioni della clonazione mediante trasferimento nucleare	443	Che cos'è un gene e quanti ce ne sono nel genoma umano?	468
13.14 Le piante transgeniche	446	Dai geni all'espressione genica	469
Il trasferimento di geni mediato da T-DNA	446	► FOCUS 14.3 Gli organismi modello	470
► FOCUS 13.3 I raccolti geneticamente modificati: stai mangiando pomodori ingegnerizzati geneticamente?	447	14.5 I geni reporter	472
Elettroporazione e microbalistica	448	I geni reporter di uso comune	473
I CONCETTI IN SINTESI	449	L'analisi della regolazione genica	473
I CONCETTI IN PRATICA	451	► TECNICHE 14.1 La tecnologia antisense	474
14 L'analisi di organizzazione, espressione e funzione dei geni	453	► TECNICHE 14.2 La mutagenesi <i>in vitro</i>	476
14.1 Introduzione	453	La purificazione e le etichette (<i>tag</i>) di rilevazione: le proteine di fusione	476
14.2 La tipizzazione del DNA	453	► TECNICHE 14.3 La produzione di proteine ricombinanti	479
► FOCUS 14.1 La tipizzazione del DNA non umano	454	Le etichette di proteine fluorescenti	480
I polimorfismi del DNA:		► TECNICHE 14.4 Microscopia a fluorescenza, confocale, multifotonica e a super risoluzione	481
le basi della tipizzazione del DNA	455	14.6 La trascrittoma: espressione e localizzazione dell'RNA	485
L'analisi dei minisatelliti	455	L'ibridazione Northern blot	485
Il fingerprinting del DNA classico: analisi dei minisatelliti con una sonda multilocus	456	Il saggio di protezione dall'RNasi (RPA)	486
Le analisi basate sulla reazione a catena della polimerasi	457	L'ibridazione <i>in situ</i>	487
L'analisi delle brevi ripetizioni in tandem (STR)	457	La PCR a trascrittasi inversa	487
L'analisi del DNA mitocondriale	458	La PCR real time quantitativa (Q-PCR)	488
L'analisi del cromosoma Y	460	I microarray di DNA	489
L'analisi mediante amplificazione casuale del DNA polimorfico (RAPD)	460	Il sequenziamento dell'RNA (RNA-seq)	490
		La trascrittoma <i>in situ</i>	491
		14.7 La proteomica: espressione e localizzazione delle proteine	491
		Il Western blot	491
		► TECNICHE 14.5 L'elettroforesi su gel delle proteine	492
		► TECNICHE 14.6 La produzione di anticorpi	494
		Le analisi <i>in situ</i>	496
		Il test ELISA	497
		Gli array di proteine	497
		La spettrometria di massa	498
		► FOCUS 14.4 Il proteoma nucleolare	500

14.8	L'analisi delle interazioni acidi nucleici-proteine	501			
	Il saggio di spostamento della mobilità elettroforetica (EMSA)	501			
	Il footprinting con la DNasi I	501			
	Il saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)	503			
	Legame crociato e immunoprecipitazione (CLIP)	503			
14.9	L'analisi delle interazioni proteina-proteina	504			
	Il saggio di pull-down	504			
	Il saggio di coimmunoprecipitazione	504			
	Il saggio del doppio ibrido di lievito	504			
	Il trasferimento dell'energia di risonanza della fluorescenza (FRET)	505			
	La biotinilazione dipendente dalla vicinanza (BioID)	506			
14.10	L'analisi strutturale delle proteine	506			
	La cristallografia a raggi X	506			
	La criomicroscopia elettronica (cryo-EM)	507			
	La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)	508			
	La microscopia a forza atomica (AFM)	508			
	I CONCETTI IN SINTESI	509			
	I CONCETTI IN PRATICA	511			
15	La biologia molecolare in medicina	513			
15.1	Introduzione	513			
15.2	La medicina genomica	513			
	Gli studi di associazione a livello dell'intero genoma e la medicina personalizzata	513			
	I polimorfismi a singolo nucleotide	514			
	► MEDICINA 15.1 La mappatura di SNP associati a malattie: la malattia di Alzheimer	515			
	Le varianti strutturali	516			
	I polimorfismi genici e il comportamento umano	516			
	Comportamento aggressivo, impulsivo e violento	517			
	Loci di suscettibilità alla schizofrenia	519			
	Il microbioma umano	519			
15.3	La biologia molecolare del cancro	519			
	L'attivazione di protooncogeni e oncogeni	521			
	► FOCUS 15.1 Il modo in cui le cellule tumorali metastatizzano: il ruolo di Src	524			
	L'inattivazione dei geni oncosoppressori	525			
	► MEDICINA 15.2 L'ipotesi dei "due colpi" di Knudson e il retinoblastoma	526			
	► FOCUS 15.2 La scoperta di p53	529			
	L'espressione alterata degli RNA non codificanti nel cancro	530			
	I riarrangiamenti cromosomici e il cancro	531			
	I virus e il cancro	532			
	► MEDICINA 15.3 Il virus del papilloma umano (HPV) e il cancro della cervice uterina	534			
	La cancerogenesi chimica	536			
15.4	La terapia genica	538			
	I progressi nella terapia genica	538			
	► MEDICINA 15.4 La terapia genica del cancro: una "bacchetta magica"?	538			
	► MEDICINA 15.5 Le terapie con RNAi	539			
	I vettori per la terapia genica delle cellule somatiche	539			
	► FOCUS 15.3 Il trasferimento genico mediato da retrovirus: come creare un "vettore sicuro"	541			
	► FOCUS 15.4 La prima morte causata dalla terapia genica	543			
	L'ingegneria genetica di miglioramento	544			
	La terapia genica delle malattie da immunodeficienza ereditaria	544			
	La terapia genica della fibrosi cistica	545			
	La terapia genica dell'HIV-1	546			
	► FOCUS 15.5 Il ciclo vitale di HIV-1	547			
	Il futuro della terapia genica	549			
	I CONCETTI IN SINTESI	550			
	I CONCETTI IN PRATICA	551			
	INDICE ANALITICO	553			

Prefazione

- ▶ Una scrittura scorrevole e una ricca dotazione di disegni e fotografie, unite a un'accurata selezione degli argomenti, rendono *Fondamenti di biologia molecolare* un prezioso alleato per comprendere a pieno i concetti chiave della disciplina e le sue applicazioni in maniera semplice ma aggiornata e completa.
- ▶ Le ricadute e le implicazioni in ambito medico sono trattate in modo esteso e capillare, in particolare sono introdotte nel testo e approfondite nelle schede **MEDICINA**, che permettono di inquadrare i processi molecolari e i loro malfunzionamenti nel contesto delle patologie; inoltre, un intero capitolo è dedicato alle applicazioni della biologia molecolare per la salute umana.
- ▶ Per rendere più profonda e significativa la comprensione, gli argomenti sono presentati secondo l'approccio della ricerca: scoperta, osservazione, domanda, progettazione sperimentale, raccolta dati e conclusione.
- ▶ Il linguaggio tecnico della biologia molecolare è introdotto gradualmente e spiegato in maniera semplice, comprensibile anche per chi non lavora ancora in laboratorio. Molto rilievo è dato ai concetti e alle idee chiave, affinché siano facilmente individuabili e assimilabili.
- ▶ Questa seconda edizione contiene le nuove tecniche sperimentali e le scoperte più recenti e importanti della biologia molecolare. Inoltre, fornisce tutto il supporto necessario per una solida conoscenza dei concetti fondamentali, senza la distrazione che potrebbe derivare da contenuti ormai superati o di importanza marginale.
- ▶ Dato l'ampio numero di esempi legati alle malattie umane, è un testo ideale per tutti i corsi di laurea in cui si approfondisce lo studio della medicina e della salute umana.
- ▶ Ogni capitolo è dotato di un'esauritiva scheda ripielogativa **I CONCETTI IN SINTESI**, che riassume i contenuti e facilita ulteriormente la messa a fuoco di quelli più rilevanti e delle relazioni tra essi.
- ▶ Tra le novità, questo libro fornisce un'introduzione comparativa tra eucarioti e procarioti, chiara e approfondita, che illustra come cambiano i processi cellulari nei diversi organismi: un contenuto fondamentale per comprendere la biologia molecolare nel suo complesso e nel quadro evolutivo.
- ▶ I metodi e le tecniche sperimentali più importanti sono raccolti nelle schede **TECNICHE**, mentre gli argomenti di frontiera o che affrontano particolari strategie sperimentali sono trattati nelle schede **FOCUS**.
- ▶ I capitoli si concludono con una ricca dotazione di domande aperte, **I CONCETTI IN PRATICA**, che stimolano il pensiero critico e l'applicazione di quanto appreso in contesti sperimentali e medici, attraverso tre tipologie di attività: **Domande di analisi**, **Esercizi esplorativi**, **Domande su casi reali**.

Le risorse digitali

A questo indirizzo sono disponibili le risorse digitali di complemento al libro:

online.universita.zanichelli.it/allison2e

Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su **my.zanichelli.it** e inserire il codice di attivazione personale che si trova sul bollino argentato nella prima pagina del libro.

Nel sito del libro sono disponibili:

- numerosi **video** che illustrano i processi cellulari e molecolari;
- le risposte alle domande di fine capitolo, nella sezione **I concetti in pratica**;
- il **glossario** interattivo;
- la **bibliografia**.

Inoltre, dal sito è possibile accedere, con un link, ai **test interattivi di autovalutazione** sulla piattaforma ZTE e alle istruzioni per scaricare l'**ebook**.

Nella pagina successiva sono elencati tutti i video disponibili suddivisi per capitolo; i video e le altre risorse digitali, oltre a essere disponibili nel sito del libro, si possono guardare direttamente sullo smartphone e sul tablet usando l'app **Guarda!**, come illustrato di seguito.

Le risorse digitali protette sono disponibili per chi acquista il libro nuovo. L'accesso all'ebook e alle risorse digitali protette è personale, non condivisibile e non cedibile, né autonomamente né con la cessione del libro cartaceo.

App **GUARDA!**

Con l'app **GUARDA!** si può accedere ai contenuti digitali in modo immediato usando lo smartphone o il tablet.

Inquadrando l'icona presente nella prima pagina di ogni capitolo si possono guardare i video, leggere le risposte alle domande presenti nel testo, consultare il glossario interattivo e la bibliografia ed eseguire i test interattivi.

L'app **GUARDA!** si scarica da App Store (sistemi operativi Apple) o da Google Play (sistemi operativi Android).



INDICE DEI VIDEO

1 Gli inizi della biologia molecolare

- ▶ La prima legge di Mendel
- ▶ La seconda legge di Mendel
- ▶ La terza legge di Mendel
- ▶ Introduzione alla meiosi

2 La struttura del DNA

- ▶ Struttura degli acidi nucleici – Il DNA
- ▶ La trascrizione del DNA
- ▶ Il nucleo

3 La versatilità dell'RNA

- ▶ Struttura degli acidi nucleici – L'RNA
- ▶ Struttura degli acidi nucleici – Il tRNA
- ▶ La struttura e l'attività del ribozima
- ▶ Le caratteristiche dei coronavirus

4 Struttura e ripiegamento delle proteine

- ▶ La sintesi proteica
- ▶ Rappresentazione delle proteine – Il dominio SH2
- ▶ Struttura delle proteine – L' α -elica
- ▶ Struttura delle proteine – Il foglietto β
- ▶ Struttura delle proteine – L'effetto della prolina sull' α -elica
- ▶ Struttura delle proteine – I legami disolfuro
- ▶ Struttura delle proteine – Le proteine oligomeriche
- ▶ Enzimi – Catalisi ed energia di attivazione
- ▶ Struttura degli enzimi – Il lisozima
- ▶ Il lisozima catalizza l'idrolisi dei polisaccaridi
- ▶ Struttura degli enzimi – La chinasi Cdk2

5 L'organizzazione del genoma e l'evoluzione

- ▶ L'organizzazione tridimensionale del DNA nei cromosomi
- ▶ L'assemblaggio del nucleosoma
- ▶ La topologia del DNA
- ▶ L'attivazione del gene *HO*
- ▶ La mitosi: la preparazione
- ▶ La mitosi: profase e metafase
- ▶ La mitosi: anafase e telofase
- ▶ La mitosi: citodieresi

6 La replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri

- ▶ La sintesi del DNA
- ▶ La duplicazione del DNA
- ▶ La replicazione del DNA
- ▶ Struttura degli enzimi – La DNA polimerasi
- ▶ Replicazione del DNA – Le elicasi separano i due filamenti che compongono il DNA
- ▶ Struttura delle proteine – La sliding clamp (proteina pinza scorrevole)
- ▶ L'attività della topoisomerasi
- ▶ L'attività della telomerasi
- ▶ Replicazione del DNA – La formazione dei telomeri

7 Le vie di riparazione del DNA

- ▶ Che cosa sono le mutazioni puntiformi
- ▶ Che cosa sono le mutazioni cromosomiche
- ▶ Che cosa sono le mutazioni genomiche
- ▶ Riparazione del DNA – I meccanismi di riparazione del DNA

- ▶ La ricombinazione omologa
- ▶ Replicazione del DNA – Le giunzioni Holliday
- ▶ Il modello di Holliday

8 La trascrizione nei batteri

- ▶ La regolazione dell'inizio della trascrizione
- ▶ La trascrizione del DNA
- ▶ L'operone *lac*

9 La trascrizione negli eucarioti

- ▶ Struttura delle proteine – La proteina che lega la TATA box
- ▶ Struttura degli enzimi – L'RNA polimerasi II
- ▶ Struttura dei domini proteici – L'omeodominio
- ▶ Struttura dei domini proteici – Il dominio a dita di zinco
- ▶ Struttura dei domini proteici – La cerniera di leucine

10 I meccanismi epigenetici della regolazione genica

- ▶ La ricombinazione per trasposizione
- ▶ Struttura delle proteine – Gli anticorpi

11 Il processamento dell'RNA e la regolazione genica post-trascrizionale

- ▶ Lo splicing dell'RNA
- ▶ Gli introni del gruppo I
- ▶ Lo spliceosoma e gli introni del gruppo II
- ▶ La terminazione della trascrizione negli eucarioti
- ▶ La maturazione dell'RNA

12 Il meccanismo della traduzione

- ▶ La traduzione
- ▶ Il ciclo di vita dell'mRNA
- ▶ Struttura delle proteine G – Il fattore EF-Tu

13 La tecnologia del DNA ricombinante e gli organismi geneticamente modificati

- ▶ Il clonaggio di un plasmide
- ▶ Trasformazione batterica con il gene dell'insulina
- ▶ La reazione a catena della polimerasi (PCR)
- ▶ Analisi di espressione genica tramite un array di oligonucleotidi
- ▶ Il sequenziamento con il metodo dideoxi (metodo Sanger)
- ▶ Il sequenziamento del DNA
- ▶ La creazione di topi transgenici
- ▶ Sintesi di un array di oligonucleotidi
- ▶ Che cos'è CRISPR

14 L'analisi di organizzazione, espressione e funzione dei geni

- ▶ Come si fa il DNA fingerprinting
- ▶ Costrutti reporter
- ▶ La produzione di anticorpi monoclonali
- ▶ L'elettroforesi su gel in SDS
- ▶ L'immunoblotting
- ▶ Identificare proteine con il Western blotting

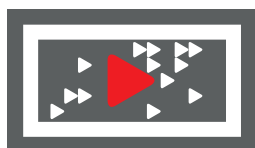
15 La biologia molecolare in medicina

- ▶ Proliferazione cellulare – L'inibizione da contatto e le cellule tumorali
- ▶ Struttura degli enzimi – L'attivazione di Src
- ▶ Struttura delle proteine – Il complesso *p53*-DNA
- ▶ Biochimica dei tumori – La perdita della proteina APC nelle creste intestinali

2

La struttura del DNA

Scarica **GUARDA!** e inquadra qui per vedere le risorse digitali di questo capitolo



La doppia elica nell'arte [Julie Newdoll, *Dawn of the Double Helix*, olio e tecniche miste su tela, © 2003, www.brushwithscience.com.]

Le metafore per descrivere il DNA diventano sempre più numerose con il tempo: prima una stringa di codice, poi una scala a chiocciola e, adesso, qualcosa di molto simile agli origami.

Pennisi, E. *Science* 347(6217), 10 (2015), © 2015 AAAS

2.1 | Introduzione

La doppia elica del DNA è un'icona della biologia moderna, una forma che compare nelle gallerie d'arte così come nel logo di molte industrie. Se lo si guarda dal punto di vista chimico, il DNA è un polimero costituito da mattoncini detti nucleotidi. Ciascun nucleotide è formato da uno zucchero, un gruppo fosfato e una delle basi azotate adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). Come questi tre elementi si organizzino per formare un nucleotide e come i nucleotidi si leghino tra loro era noto già prima del 1953. Quello che Watson e Crick scoprirono è il modo in cui i due filamenti si dispongono nello spazio per dar vita alla doppia elica. La struttura del DNA è sicuramente piacevole dal punto di vista estetico, ma rimane fine a sé stessa se non se ne capisce il legame con la sua funzione. È bene ricordare

che la struttura proposta da Watson e Crick suscitò l'interesse della scienza solo dopo che si comprese il ruolo di questa molecola nella sintesi proteica (Capitolo 1). D'altro canto, è vero anche che non si può comprendere appieno la funzione di qualcosa senza una buona conoscenza della sua struttura. Uno degli scopi di questo capitolo è quello di fornire una descrizione della struttura del DNA, tenendo a mente la sua funzione nelle cellule viventi.

Spesso ci s'immagina il DNA come una sequenza unidimensionale di lettere organizzata in una struttura invariante a doppia elica simile a una scala a chiocciola. Questo capitolo vuole introdurre il concetto che il DNA è una molecola dinamica, la cui tridimensionalità ha ripercussioni importanti sulla sua funzione. Durante il seminario tenuto nel 1998 dall'*European Molecular Biology Organization* (EMBO, Organizzazione Europea di Biologia Molecolare) sulla curvatura e sul ripiegamento del DNA, due intere sessioni furono dedicate a stabilire una nomenclatura comune per descrivere la geometria delle catene e delle eliche degli acidi nucleici. Ne emerse che il DNA può piegarsi, ruotare come un'elica, formare gobbe, arrotolarsi, inclinarsi, oscillare, allungarsi, alzarsi, scivolare e spostarsi! Ma prima di approfondire lo studio della flessibilità degli acidi nucleici, diamo un'occhiata alla loro più nota **struttura**

primaria. Questo capitolo offre una panoramica sia dei costituenti dell'**acido deossiribonucleico (DNA)** sia di quelli dell'**acido ribonucleico (RNA)** per facilitarne il confronto, ma la struttura dell'RNA è spiegata in dettaglio nel Capitolo 3.

2.2 | La struttura primaria: i componenti degli acidi nucleici

Prima che gli acronimi DNA ed RNA entrassero a far parte della nomenclatura standard universale, le due molecole cambiarono spesso identità nel corso del tempo. Per esempio, il DNA fu inizialmente chiamato acido nucleico del timo perché era stato isolato dal timo dei bovini, mentre il primo nome dato all'RNA fu acido nucleico del lievito in quanto estratto da questo organismo. Un **acido nucleico** è una lunga catena o polimero di subunità ripetute dette nucleotidi e ciascun **nucleotide** è composto da tre parti: uno zucchero a cinque atomi di carbonio, un gruppo fosfato e una base azotata. Le strutture chimiche di questi componenti sono mostrate nella **Figura 2.1**.

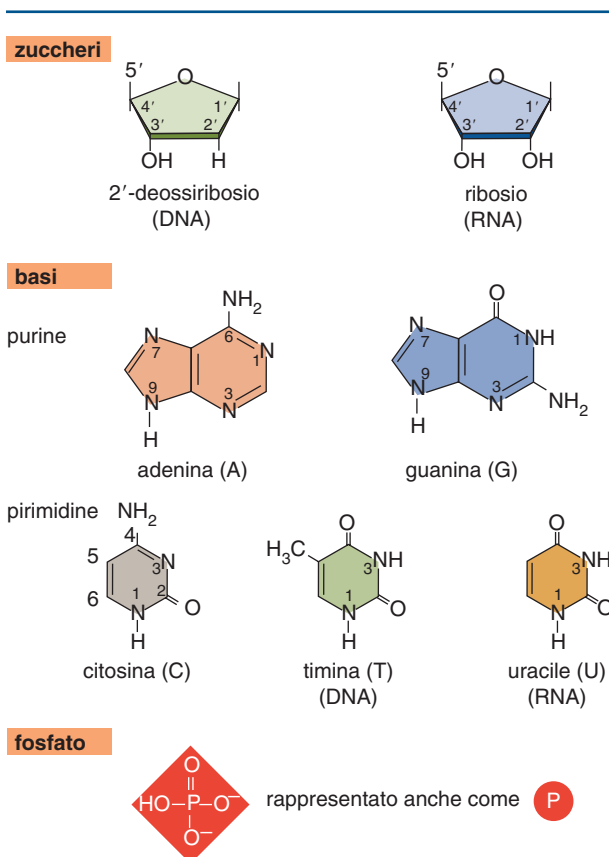


Figura 2.1 I componenti degli acidi nucleici: zuccheri, basi e fosfato. Il segno di primo (') viene usato nella numerazione delle posizioni dell'anello degli zuccheri per differenziarle dalle posizioni dell'anello delle basi. Alcuni atomi di carbonio e di azoto sono stati omessi per rappresentare con maggior chiarezza altre caratteristiche strutturali.

■ Gli zuccheri a cinque atomi di carbonio

Le subunità nucleotidiche dell'RNA contengono uno zucchero pentosio (a cinque atomi di carbonio) chiamato **ribosio**, mentre quelle del DNA lo zucchero **deossiribosio**. Gli zuccheri differiscono soltanto per la presenza o per l'assenza (*deossi*, senza ossigeno) di un atomo di ossigeno sul carbonio in posizione 2 dell'anello dello zucchero. Seppur minima, questa differenza fra RNA e DNA ne influenza drasticamente la funzione. La notevole versatilità dell'RNA dipende in modo cruciale da questo gruppo idrossile aggiuntivo (Capitolo 3). Per distinguere tra loro i diversi atomi di carbonio del pentosio, a ciascuno è assegnato un numero da 1' a 5' (1 primo, 5 primo). Il segno di *primo* viene usato nella numerazione delle posizioni dell'anello degli zuccheri per differenziarle dalle posizioni dell'anello delle basi. In entrambi gli zuccheri, uno dei cinque atomi dell'anello è un ossigeno e il quinto carbonio (o carbonio 5') è esterno all'anello.

■ Le basi azotate

Come il nome stesso suggerisce, una **base azotata** è una molecola che contiene azoto e che ha le proprietà chimiche di una *base*, cioè di una sostanza che accetta uno ione H^+ (o protone) in soluzione. In biologia molecolare è convenzione comune usare il termine generico *basi* per riferirsi alle basi azotate. Le basi **adenina (A)** e **guanina (G)** hanno una struttura con un doppio anello di carbonio-azoto e sono dette **purine**. Le altre tre basi, **timina (T)**, **citosina (C)** e **uracile (U)**, hanno una struttura a singolo anello e sono chiamate **pirimidine**. Mentre la timina si trova nel DNA, l'uracile è specifico dell'RNA.

Pochi anni prima che Watson e Crick proponessero la struttura tridimensionale del DNA, Erwin Chargaff mise a punto un metodo di cromatografia su carta che consente di misurare in quale quantità ciascuna base è presente all'interno di un DNA (Capitolo 13). Chargaff osservò una certa regolarità nel rapporto tra le concentrazioni molari delle diverse basi (**Figura 2.2**), osservazioni oggi dette **regole di Chargaff**. Il ricercatore dimostrò che, in tutti i campioni di DNA, la concentrazione molare di A è uguale a quella di T, ovvero $[A] = [T]$, dove la concentrazione molare della base è indicata dal simbolo della base racchiuso tra parentesi quadre. In modo analogo, la concentrazione molare di G equivale a quella di C: $[G] = [C]$. Inoltre, la quantità delle basi puriniche è uguale a quella delle basi pirimidiniche: $[A] + [G] = [T] + [C]$. Chargaff scoprì anche che la composizione in basi del DNA, definita come la percentuale di G+C, differisce tra le varie specie ma è costante in tutte le cellule di organismi appartenenti a una determinata specie. A seconda della specie, il **contenuto di G+C** può variare dal 22 al 73%. È importante ricordare che le regole di Chargaff fornirono a Watson e Crick informazioni cruciali per risalire alla struttura a doppia elica del DNA (Capitolo 1).

Fonte	adenina guanina	timina citosina	adenina timina	guanina citosina	purine pirimidine	gruppi amminici gruppi idrossi enolici
Bue.....	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1	1,4
Essere umano.....	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0	1,3
Gallina.....	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99	1,5
Salmone.....	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02	1,4
Grano.....	1,22	1,18 ¹	1,00	0,97 ¹	0,99	1,4
Lievito.....	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0	1,3
<i>Hemophilus influenzae</i> , tipo C.....	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0	1,5
<i>Escherichia coli</i> K12.....	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0	1,6
Bacillo della tubercolosi aviaria.....	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1	1,7
<i>Serratia marcescens</i>	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9	1,6
<i>Bacillus Schatz</i>	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0	1,7

¹ Per il calcolo di questi valori si è usata la somma di citosina e metilcitosina. Se si considera la sola citosina, il rapporto fra timina e citosina diventa 1,62 e quello fra guanina e citosina 1,33.

Figura 2.2 I dati di Chargaff che mostrano la composizione in basi del DNA. [Fonte: Chargaff, E., *Federation Proceedings* 10, 654-659 (1951), con il permesso di Blackwell Publishing Ltd.]

Il gruppo funzionale fosfato

Il gruppo funzionale fosfato (PO_4) conferisce al DNA e all'RNA le proprietà di un **acido** (una sostanza che rilascia uno ione H^+ , o protone, in soluzione) a pH fisiologico, da cui il nome *acido nucleico*. I legami formati dai fosfati sono esteri con la proprietà aggiuntiva di essere stabili, anche se possono essere spezzati facilmente dall'idrolisi enzimatica. Il processo di rimozione di un nucleotide da una catena di DNA o di RNA non ne causa la distruzione. Inoltre, dopo la formazione del legame fosfodiesterico (vedi paragrafo seguente), uno degli atomi di ossigeno del gruppo fosfato rimane ionizzato negativamente, conferendo al fosfato una carica negativa che lo rende insolubile nei lipidi. Se ti stai interrogando sul significato di quest'ultima proprietà degli acidi nucleici, prova a pensare a che cosa compone le membrane delle cellule e degli involucri nucleari delle cellule eucariote. In tutti i regni degli esseri viventi, i fosfolipidi sono costituenti fondamentali delle membrane cellulari e il fatto di essere insolubili nei lipidi impedisce agli acidi nucleici di fuoriuscire dalle cellule.

Nucleosidi e nucleotidi

Dopo aver passato in rassegna i singoli componenti di un nucleotide, studiamone ora l'assemblaggio. Il legame covalente di una base con uno zucchero a livello del carbonio 1' del pentosio genera un composto chiamato **nucleoside** (Figura 2.3). Con la successiva aggiunta di un gruppo fosfato (sempre mediante legame covalente) al carbonio 5' dello stesso zucchero, il nucleoside diventa un nucleotide. Infine, mediante reazioni di condensazione, i nucleotidi si uniscono (polimerizzano) tra loro formando una catena (Figura 2.4 a p. 18). Il gruppo idrossile sul carbonio 3' di uno zucchero di un nucleoti-

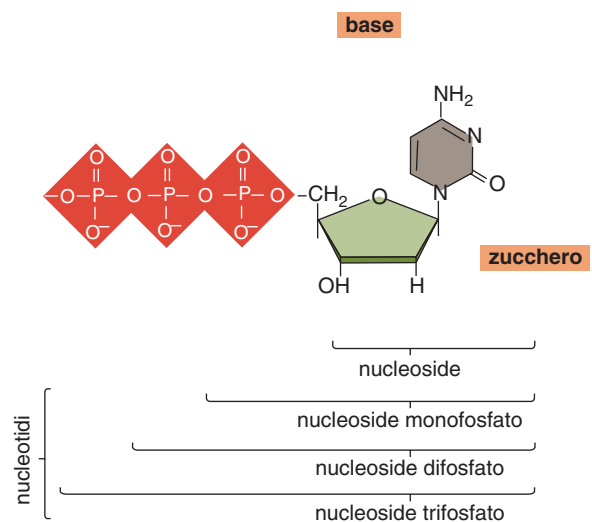


Figura 2.3 La struttura di nucleosidi e nucleotidi. La struttura di un nucleoside e di tre nucleotidi con un diverso numero di gruppi fosfato è mostrata per il DNA.

de forma un legame estere con il fosfato di un altro nucleotide, eliminando una molecola d'acqua e rilasciando due fosfati sotto forma di pirofosfati ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$). Il ponte costituito dal gruppo fosfato che collega gli zuccheri di due nucleotidi adiacenti si chiama **legame fosfodiesterico**, o anche legame fosfodiesterico 5'→3' per indicare la polarità del filamento. In questo contesto, il termine *polarità* si riferisce al fatto che le due estremità di un filamento di DNA e RNA sono diverse e hanno proprietà chimiche differenti.

Un aspetto a cui prestare attenzione è che i vari componenti delle catene di DNA e RNA sono uniti tra loro da legami covalenti. Un **legame covalente** è un legame chimico forte in cui due atomi condividono

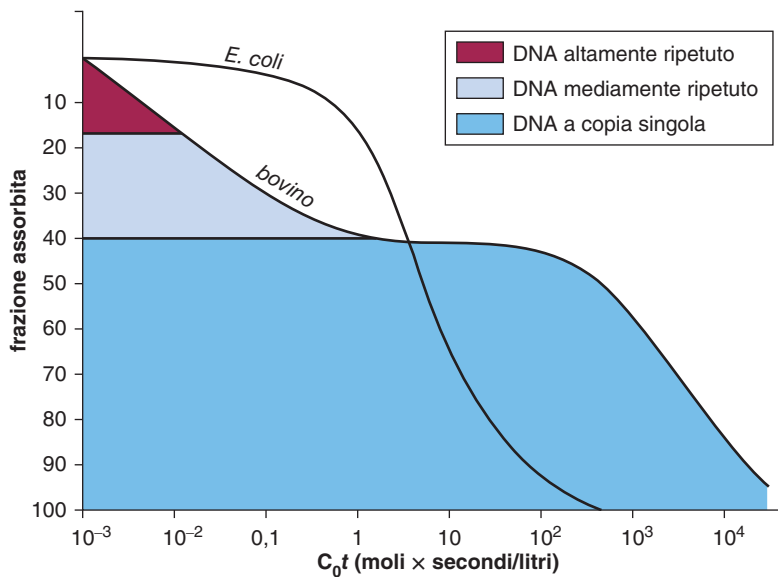


Figura 2.16 Confronto tra le curve Cot del DNA di *Escherichia coli* e del timo bovino. Le curve Cot di campioni di DNA ottenuto da *E. coli* e dal timo di bovino hanno forme diverse perché il genoma bovino contiene quantità maggiori non solo di DNA, ma anche di sequenze ripetute. [Fonte: Britten, R.J. & Kohne, D.E. *Science* 161(3841), 529-540 (1968), © 1968 AAAS.]

ideale mostrata nella figura ha un andamento uniforme, implicando che la rinaturazione procede lentamente ma in modo costante nel tempo. Nella realtà, le curve Cot deviano dalla curva ideale in base alla natura del DNA in soluzione. Quali informazioni si possono ricavare sul DNA di diversi organismi analizzandone le curve Cot?

La **Figura 2.16** mette a confronto le curve Cot del DNA ottenuto dal batterio *Escherichia coli* e dal timo di un bovino. Per facilitarne l'analisi, i DNA sono stati ridotti in frammenti di circa 500 paia di basi ciascuno. Gli andamenti delle due curve appaiono visibilmente diversi, incluso il fatto che il valore di $Cot_{1/2}$ del DNA bovino è superiore a quello del DNA di *E. coli*. La spiegazione per questa differenza è semplice: maggiori sono le dimensioni di un genoma, maggiore sarà il tempo che ciascuna sequenza impiegherà per trovare la sua sequenza complementare. Le due curve differiscono notevolmente anche nella loro forma. Infatti, mentre la curva del DNA batterico ricorda la curva Cot ideale (vedi Figura 2.15), quella del DNA bovino è irregolare. Gli studi pionieristici condotti in questo ambito da Roy Britten e David Kohne verso la fine degli anni Sessanta del secolo scorso riuscirono a spiegare questa diversità. La frazione di DNA bovino che rinatura più rapidamente è costituita da **sequenze ripetute** (sequenze di DNA presenti più di una volta all'interno del genoma di una specie), mentre quella a rinaturazione più lenta è formata da sequenze uniche. La comprensione di questo fenomeno appare intuitiva se si considerano le probabilità di ogni singolo filamento di incontrare una molecola complementare presente nella stessa soluzione. Per esempio, una sequenza che è ripetuta due volte all'interno del genoma avrà a disposizione due sequenze complementari con cui appaiarsi. Ne deriva che il suo valore di Cot sarà la metà di quello di una sequenza presente una sola volta nel genoma.

Il lavoro di Britten e Kohne rivelò che molte migliaia di copie di sequenze di DNA sono state incorporate nei genomi eucarioti (l'organizzazione e la complessità dei genomi sono approfondite nei Capitoli 5 e 14). Inoltre, arrivare a capire che le sequenze ripetute si trovano disperse lungo tutto il DNA consentì di scoprire alcune insolite **strutture secondarie** assunte da questa molecola. Diamo un'occhiata più da vicino ad alcune delle strutture che si formano in tratti di DNA che contengono configurazioni specifiche di sequenze ripetute.

2.4 | Le strutture secondarie insolite del DNA

Il DNA venne dapprima considerato come una sequenza statica e lineare di informazione genetica, ma a partire dalla metà degli anni Sessanta del secolo scorso ci si rese presto conto della versatilità della sua struttura. La scoperta delle proprietà strutturali del DNA ha reso possibile l'utilizzo di questa molecola per la costruzione di modelli e macchine nanometrici, detti anche *origami di DNA* (**FOCUS 2.1**). Di recente, le strutture secondarie insolite che possono essere acquisite da brevi sequenze di DNA hanno suscitato particolare interesse per via del loro ruolo nelle malattie neurologiche ereditarie. In questo paragrafo esamineremo quattro strutture secondarie ben definite di tipo non B che si formano in frammenti di DNA contenenti sequenze ripetute. Nello specifico studieremo le strutture scivolte, le strutture cruciformi, il DNA a tripla elica e quello G-quadruplex, detto anche a quartetti di G. Come avrai modo di vedere nel paragrafo 2.5, la formazione di queste strutture secondarie anomale richiede energia, la quale può essere fornita dal superavvolgimento del DNA in seguito al rilassamento della tensione torsionale.

► FOCUS 2.1

Origami di DNA: costruire "nanomacchine" con le molecole

Nel 2006, la rivista scientifica *Nature* pubblicò in copertina una faccina sorridente. A rendere quella faccina tanto speciale da meritare la prima pagina era il materiale di cui era fatta: il DNA. Nonostante questa emoticon nanometrica fosse tanto piccola da poter essere osservata solo usando un microscopio a forza atomica (vedi Figura 14.37), essa suscitò un enorme interesse e un intenso periodo di attività di costruzione. Tra le prime cose a essere create con la stessa tecnica ci furono un coniglio tridimensionale, una stella a tre punte e una scatola richiudibile. Ma in che modo è possibile realizzare tutte queste forme usando il DNA? La risposta si basa su un principio piuttosto semplice: lo stesso tipo di informazioni e di proprietà strutturali del DNA che rendono possibile lo sviluppo della vita può essere sfruttato per costruire modelli in scala nanometrica attraverso un processo detto "origami di DNA". La doppia elica del DNA ha un diametro di circa 2 nm, un avvistamento che si ripete ogni 3,4-3,6 nm ed è anche relativamente rigida quando raggiunge una lunghezza di circa 50 nm, costituendo quindi un buon materiale da costruzione. L'appaiamento delle basi complementari offre poi un sistema per disegnare le varie forme. In base alla loro sequenza, i filamenti di DNA possono estendersi a eliche vicine creando una ramificazione. L'aggiunta strategica di brevi sequenze di DNA a singolo filamento che sporgono, dette "estremità coesive", può quindi legare le due eliche tra loro secondo il principio della complementarità delle basi, consentendo l'assemblaggio spontaneo di forme più grandi e complesse. Creare faccine e conigli è senza dubbio divertente, ma questa tecnica può avere anche un'applicazione pratica? Certo che sì! Per esempio, "righelli" di origami di DNA con una marcatura fluorescente sono utili nel bioimaging, mentre per svolgere compiti specifici in diversi ambiti, incluso quello medico, sono stati creati macchine molecolari, robot molecolari e dispositivi meccanici basati sul DNA. Con questa molecola si sono costruiti motori a rotazione simili all'ATP sintasi (vedi Figura 4.14) nonché "camminatori" o "ragni" in grado di trasportare nanoparticelle lungo nanotubi di carbonio, o di seguire una pista di origami di DNA per raccogliere nanoparticelle d'oro. La somministrazione *in vivo* di farmaci attraverso gli origami di DNA è una strada promettente per il trattamento dei tumori. Uno degli approcci usati prevede l'utilizzo di un nanorobot a DNA con una forma cilindrica e con cardini che ne consentono l'apertura e la chiusura (Figura 1). Il cilindro contiene un anticorpo (vedi Capitolo 14 per maggiori dettagli sugli anticorpi) e

viene mantenuto chiuso dall'appaiamento di due filamenti complementari di DNA che fungono da "lucchetto", la cui "chiave" è una molecola specifica sulla superficie della cellula in grado di legarsi a uno dei filamenti del lucchetto. Separando i due filamenti, la molecola causa così l'apertura del cilindro e la conseguente fuoriuscita dell'anticorpo. Quest'ultimo può a sua volta legarsi a un recettore sulla superficie cellulare e attivare una via di segnalazione quale, per esempio, quella che induce la morte della cellula. Questo sistema può essere usato per colpire e uccidere in modo specifico le cellule cancerogene sfruttando il riconoscimento di recettori che solo loro esprimono.

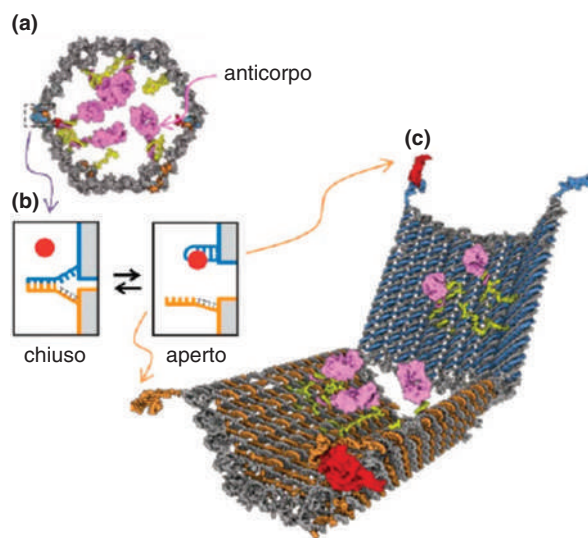


Figura 1 Un robot di DNA per la somministrazione di farmaci. (a) Il nanorobot nella sua conformazione chiusa. Due filamenti di DNA complementari e appaiati fungono da "lucchetto" (rettangolo tratteggiato). All'interno del cilindro sono presenti degli anticorpi (rosa). (b) Il meccanismo di apertura prevede che una specifica molecola (cerchio rosso) agisca da "chiave" legandosi a uno dei filamenti di DNA e causandone la separazione dal filamento complementare. (c) Il nanorobot nella sua conformazione aperta. Gli anticorpi vengono rilasciati e legano gli antigeni specifici sulla cellula. [Fonte: Endo, M. & Sugiyama, H. DNA Origami Nanomachines. *Molecules* 23(7) (2018), © 2018 MDPI.]

■ Le strutture scivolote

Un tipo comune di struttura secondaria anomala è la **struttura scivolata** (Figura 2.17a a p. 30). Essa si forma a livello di quelle ripetizioni in tandem in cui un mancato appaiamento delle ripetizioni porta alla formazione di anse di DNA a singolo filamento. Una **ripetizione in tandem** (detta anche ripetizione diretta) consiste di due o più copie consecutive di una sequenza di nucleotidi, con una disposizione testa-coda. Per esempio, la sequenza 5'-TACGTACGTACGTACG-3' contiene quattro ripetizioni in tandem di TACG. La presenza di

anse all'interno di una struttura scivolata fu identificata per la prima volta grazie all'utilizzo di enzimi in grado di spezzare i legami fosfodiesterici in molecole di DNA a singolo filamento, ma non in quelle a doppia elica. Quello che ancora rimaneva da chiarire, tuttavia, era se questo tipo di struttura avesse una qualche funzione biologica.

A supporto di una risposta affermativa sono emerse nel tempo una serie di osservazioni sperimentali. *In vitro*, le strutture scivolote si trovano a monte di sequenze regolatrici (quali, per esempio, quelle per

presente nelle molecole superavvolte talvolta ne causa la denaturazione localizzata, in cui i filamenti complementari si separano per un breve tratto. Le strutture cruciformi possono intervenire per stabilizzare queste brevi anse di DNA a singolo filamento (vedi paragrafo 2.4). Un aumento del superavvolgimento negativo può causare anche la transizione da DNA B a DNA Z. La conversione di parte del DNA da un'elica destrorsa a una sinistrorsa, infatti, rilassa la tensione dovuta al superavvolgimento negativo, dal momento che la torsione del DNA viene invertita. Nel Capitolo 6, assieme alla replicazione del DNA studieremo anche una classe importante di enzimi detti topoisomerasi. Introducendo interruzioni all'interno dei filamenti di DNA, le topoisomerasi consentono il rilassamento di questo tipo di tensioni. Come vedremo nel paragrafo seguente, tuttavia, il DNA superavvolto svolge anche funzioni cellulari essenziali che dipendono dal rilassamento localizzato del superavvolgimento negativo dell'elica.

■ Il significato del superavvolgimento *in vivo*

Tutto il DNA contenuto nelle cellule procariote ed eucariote si trova di fatto nello stato superavvolto. A oggi, in ogni organismo analizzato si è riscontrata la presenza di membri di un gruppo di **proteine strutturali**, molte delle quali sono in grado di introdurre superavvolgimenti negativi nel DNA una volta legati. All'interno del nucleo delle cellule eucariote, per esempio, proteine strutturali compattano il DNA per formare complessi detti **nucleosomi**. Il Capitolo 5 contiene una spiegazione dettagliata della struttura del nucleosoma, ma è importante anticipare già da ora che la doppia elica del DNA compie quasi due giri completi attorno al nucleosoma in una spirale sinistrorsa del tutto simile a un superavvolgimento nega-

tivo. Un DNA superavvolto attorno a delle proteine viene detto "bloccato". I superavvolgimenti bloccati da proteine sono stabilizzati dall'energia di interazione tra le proteine e il DNA, mentre per i domini superavvolti che non hanno costrizioni si crea un equilibrio tra la tensione e lo svolgimento dell'elica. Dati sperimentali supportano l'ipotesi che il superavvolgimento del DNA abbia un ruolo importante in molti processi genetici, quali replicazione, trascrizione e ricombinazione.

La sintesi sia del DNA sia dell'RNA richiede lo svolgimento localizzato della doppia elica per consentire la formazione di un singolo filamento che funga da stampo per la sintesi del filamento complementare. Il superavvolgimento negativo immette energia nel DNA e lo srotolamento facilita la separazione dei due filamenti della doppia elica. Se ne deduce, quindi, che il superavvolgimento negativo rende più semplice l'apertura delle origini di replicazione e dei promotori dei geni. Tutto ciò ti apparirà più chiaro studiando i capitoli successivi, in cui questi processi vengono analizzati nel dettaglio. Al contrario, a monte delle forcelle di replicazione e dei complessi di trascrizione si forma un superavvolgimento positivo che rende molto più difficile aprire la doppia elica, bloccando così i processi essenziali del DNA.

Non sorprende che le molecole circolari di DNA purificate da batteri ed eucarioti siano di solito superavvolte negativamente. Per esempio, un DNA circolare superavvolto è una caratteristica ben nota del batteriofago PM2. Il genoma di questo batteriofago può trovarsi in forma di cerchio rilassato o superavvolto, il quale ha un aspetto attorcigliato se osservato al microscopio elettronico (Figura 2.21a). È stato dimostrato che nei batteriofagi il DNA circolare rilassato è associato a una ridotta attività di replicazione e di trascrizione, mentre il superavvolgimento negativo porta a un au-

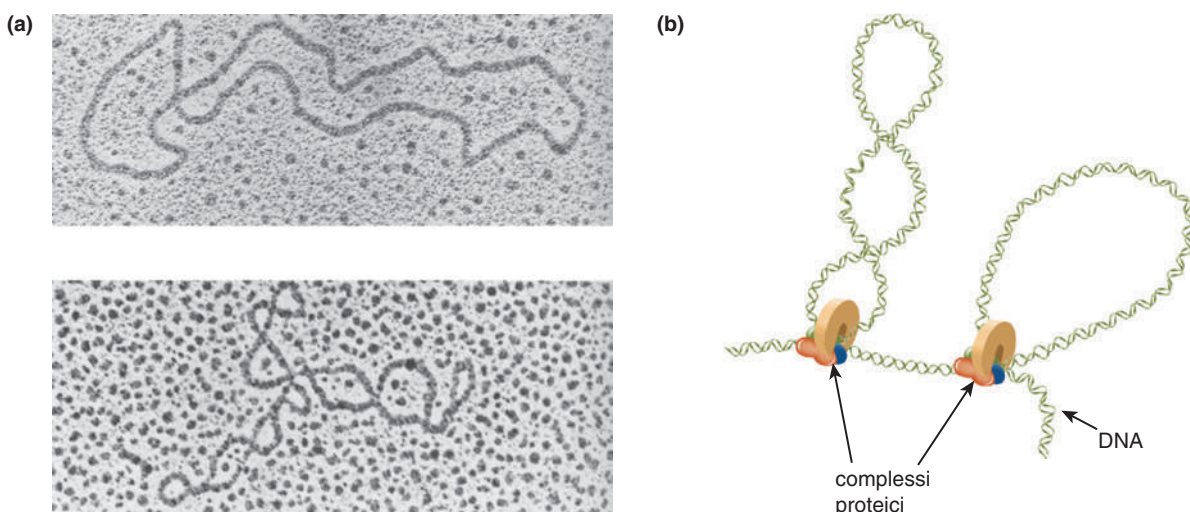


Figura 2.21 Il superavvolgimento esiste in natura. (a) Il DNA del batteriofago PM2 in due forme topologiche: a cerchio rilassato (*riquadro superiore*) e superavvolto (*riquadro inferiore*). Quest'ultimo rappresenta la forma nativa. [Fon-

te: riprodotta con il permesso di Wang, J.C. DNA topoisomerasi. *Scientific American* 247, 97 (1982).] (b) Rappresentazione schematica di domini ad ansa (cerchi) nel DNA genomico dei batteri (genoma circolare) e degli eucarioti (genoma lineare).

mento di entrambe queste attività. In modo analogo, i batteri hanno grandi genomi circolari che possono formare **domini** di DNA **ad ansa** indipendenti tra loro (Figura 2.21b). Ciascun dominio è bloccato nella sua posizione da un complesso proteico, così da creare “sottocerchi” della lunghezza di circa 40 kb che a loro volta formano strutture superavvolte con un ruolo importante nella replicazione e nella trascrizione. Il superavvolgimento negativo attorno a proteine strutturali facilita molto la condensazione dei cromosomi anche nei batteri. È recente l'affascinante scoperta di un cianobatterio in cui il superavvolgimento negativo del genoma cambia secondo un ritmo circadiano: aumenta durante il giorno e diminuisce nel corso della notte. Il ritmo seguito dal superavvolgimento è stato dimostrato essere in correlazione con la generale regolazione dell'espressione genica.

Anche se i cromosomi eucarioti di solito non sono circolari, è possibile che si creino dei superavvolgimenti quando segmenti di DNA lineare sono immersi in un reticolo di proteine associate alla cromatina. Questa associazione può produrre estremità ancorate che formano domini ad ansa indipendenti, come descritto

prima per i batteri (Figura 2.21b). La funzione del superavvolgimento negli eucarioti non è così lampante come nel caso dei batteriofagi e dei batteri. Sono stati riportati casi di un aumento della trascrizione associato al superavvolgimento negativo, ma le dimensioni e la complessità dei genomi eucarioti rendono difficile ottenere risultati definitivi. Inoltre, poiché i processi della replicazione e della trascrizione generano essi stessi un superavvolgimento del DNA, determinare il meccanismo con cui il superavvolgimento del DNA modula i processi genetici risulta problematico.

Dopo una lode così appassionata delle virtù del superavvolgimento negativo potrebbe venire spontaneo concludere che non esistano organismi con genomi superavvolti positivamente. Ma sarebbe un errore. I microrganismi ipertermofili appartenenti al dominio degli **archei**, che vivono a temperature estremamente elevate, usano il superavvolgimento positivo per impedire la denaturazione del loro DNA. Nell'adattamento alle alte temperature, infatti, il superavvolgimento positivo è considerato un elemento chiave perché, stabilizzando la doppia elica, ne impedisce la denaturazione spontanea.

2 I CONCETTI IN SINTESI

Il DNA e l'RNA sono molecole a forma di catena costituite da subunità chiamate nucleotidi unite tra loro da legami fosfodiesterici. Ciascun nucleotide è composto di tre parti: uno zucchero a cinque atomi di carbonio, un gruppo fosfato e una base azotata. Gli RNA naturali hanno dimensioni che vanno da meno di cento fino a molte migliaia di nucleotidi, mentre il DNA può essere lungo da alcune migliaia di basi fino a migliaia di megabasi. Le estremità 5'-PO₄ e 3'-OH di una catena di DNA o di RNA sono diverse e hanno proprietà chimiche differenti.

Il DNA ha una struttura a doppia elica con uno scheletro di zucchero-fosfato all'esterno e coppie di paia di basi all'interno. Nelle cellule, la forma predominante è il DNA B, un'elica destrorsa con 10,5 basi per giro. La doppia elica è stabilizzata da legami idrogeno tra le coppie di basi e da interazioni idrofobiche tra le basi impilate. Le basi si appaiano in maniera specifica: l'adenina (A) con la timina (T) e la guanina (G) con la citosina (C). In natura, il contenuto di G+C di un DNA può variare dal 22 al 73% e ciò può influire profondamente sulle proprietà fisiche della molecola, in particolar modo sulla sua temperatura di fu-

sione (T_m). La T_m di un DNA è la temperatura alla quale i due filamenti sono denaturati al 50%. I filamenti separati possono rinaturare con una velocità che dipende sia dalla lunghezza sia dalla quantità di sequenze ripetute della molecola di DNA. La curva Cot è un grafico che mostra la percentuale di DNA rinaturato in funzione della concentrazione iniziale (C_0) moltiplicata per il tempo. I filamenti provenienti da fonti diverse possono formare una doppia elica con un processo chiamato ibridazione.

Talvolta, le sequenze nucleotidiche ripetute presenti nella doppia elica assumono strutture secondarie insolite quali le strutture scivolte, quelle cruciformi, la tripla elica e la G-quadruplex. Queste strutture secondarie possono influenzare la replicazione e la trascrizione del DNA e alcune di esse dipendono dal superavvolgimento della molecola. Quasi tutto il DNA presente nelle cellule procariote ed eucariote si trova nello stato superavvolto negativamente, il quale agevola la separazione dei filamenti durante la replicazione e la trascrizione. Il genoma degli archei termofili è invece superavvolto positivamente, condizione che protegge il DNA dalla denaturazione.

I CONCETTI IN PRATICA

Le risposte sono disponibili all'indirizzo:

online.universita.zanichelli.it/allison2e

Domande di analisi

1. Studiando la composizione in basi del DNA di una cavalletta si è visto che è costituito per il 29% da adenine.

- Qual è la percentuale di citosine?
- Qual è la composizione completa delle basi del DNA?
- Qual è il contenuto di G1C?

2. I duplex di DNA in a) e b) vengono prima denaturati e poi lasciati rinaturare. Quale delle due molecole ha la T_m più alta? Quale delle due ha minori probabilità di riformare la struttura originale e perché?

- a) 5'-ATATCATATGATATGTA-3'
3'-TATAGTATACTATACAT-5'
- b) 5'-CGGTACTCGTTCAGGT-3'
3'-GCCATGAGCACGTCCA-5'

3. Immagina di avere due campioni di DNA con la stessa concentrazione. Un campione contiene solo DNA a sequenza unica, mentre l'altro è formato prevalentemente da DNA a sequenze ripetute. Disegna le curve Cot che ti aspetteresti di ottenere analizzando la cinetica di rinaturazione di ciascun campione.
4. Immagina di misurare l'assorbanza relativa a A_{260} di un campione di DNA genomico e di uno di mRNA, entrambi purificati da cellule umane. Per quale dei due campioni ti aspetti una maggiore assorbanza relativa della luce UV?
5. All'interno di un campione prelevato da una sorgente idrotermale scopri una nuova specie di microrganismo contenente un piccolo genoma circolare. Ti aspetti che questo DNA sia superavvolto negativamente, superavvolto positivamente o rilassato? Motiva la tua risposta.

Esercizi esplorativi

Figura 2.10 Completa la tabella disegnando i cerchi colorati corretti che rappresentano gli accettori di legami idrogeno, i donatori di legami idrogeno, altri idrogeni o gruppi metile (idrofobi). Quali differenze ci sono tra il solco maggiore e quello

minore? È possibile distinguere la coppia di basi A-T da quella T-A? E la coppia G-C da quella C-G? È possibile distinguere le coppie di basi G-C e A-T?

Solco maggiore					Solco minore				
T				A	T				A
A				T	A				T
C				G	C				G
G				C	G				C

Figura 2.20 Determina il numero di paia di basi per giro, il numero di linking e il numero di giri per la doppia elica di DNA nella figura nel caso in cui la molecola fosse srotolata di un giro completo verso destra e le estremità fossero poi saldate tra loro.

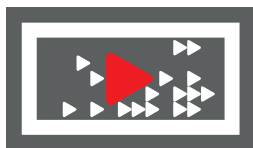
Domande su casi reali

Figura 2.2 La percentuale di guanina in un campione di DNA di salmone è circa il 20%. Utilizzando i valori forniti nella figura, fai una stima della percentuale di adenina nello stesso campione.

Figura 2.14 Servendoti del grafico nella figura, confronta le temperature di fusione di una molecola di DNA con un contenuto di G+C pari al 50% quando viene incubata a concentrazioni saline prima basse e poi alte.

La tecnologia del DNA ricombinante e gli organismi geneticamente modificati

Scarica **GUARDA!** e inquadra qui per vedere le risorse digitali di questo capitolo



La Taq polimerasi, il componente chiave della reazione a catena della polimerasi, venne isolata dal microorganismo *Thermophilus aquaticus* che vive nelle sorgenti termali del parco di Yellowstone (USA). [Fonte: fotografia © 2005, James H. Bassett.]

A volte una buona idea arriva quando si sta pensando ad altro. Per un'improbabile combinazione di coincidenze, ingenuità ed errori fortunati, ho avuto una rivelazione di questo tipo nell'aprile 1983, un venerdì notte, mentre al volante della mia auto percorrevo i tornanti di una strada di montagna illuminata dalla luna, che si addentrava nei boschi di sequoie della California del nord. È stato così che mi sono imbattuto in un processo che poteva produrre un numero illimitato di copie dei geni, un processo oggi noto come reazione a catena della polimerasi (PCR).

Kary B. Mullis, *Scientific American*, 262, 36 (1990)

13.1 | Introduzione

Un tema ricorrente nei racconti di fantascienza è quello di scienziati cattivi o maldestri che lavorano in un laboratorio segreto su un'isola remota, dove i mostri geneticamente modificati da loro creati sfuggono al controllo e provocano il caos. Un esempio classico è rappresentato dal romanzo del 1896 *L'isola del dottor Moreau* di H.G. Wells. Un'altra perla rara è il film del

1959 *I toporagni assassini*: giganteschi, carnivori e velenosi! Un tempo, la condivisione di geni tra le specie e la manipolazione genetica degli organismi erano considerate prospettive inaccettabili. Anche la creazione di cloni a partire dal DNA nucleare di un altro organismo suona come fantascienza, specialmente se accade in un laboratorio sperduto nella giungla come nel film del 1978 *I ragazzi venuti dal Brasile*. Di fatto, l'unione di molte osservazioni sperimentali volte a creare la tecnologia del DNA ricombinante avvenne tra il 1972 e il 1975, grazie allo sforzo di numerosi gruppi di ricerca che lavoravano soprattutto con il batteriofago lambda (λ). Il passato di questo settore è disseminato di scoperte storiche che hanno portato allo sviluppo dei numerosi strumenti oggi disponibili. Gli organismi transgenici sono diventati una realtà a partire dal 1980: le strategie per alterare il genoma di un organismo cambiando nucleotidi specifici mediante gene targeting sono state sviluppate verso la fine degli anni Ottanta e oggi è possibile produrre cloni mediante trasferimento nucleare. Questo capitolo esplora gli inizi della **tecnologia del DNA ricombinante** e l'uso che viene fatto di questi potenti mezzi, tra cui la creazione di **organismi geneticamente modificati**.

13.2 | Gli inizi della tecnologia del DNA ricombinante

Attualmente, la colonna portante della maggior parte delle tecnologie usate in biologia molecolare è il gene. Per facilitarne lo studio, i geni possono essere isolati e amplificati. Un metodo utile allo scopo consiste nel clonare il gene di interesse inserendolo in un'altra molecola di DNA che funga da veicolo, o vettore, in grado di replicarsi nelle cellule. Combinando questi due DNA di origine diversa si ottiene una molecola di DNA ricombinante. Sebbene i processi genetici come il crossing over producano di fatto un DNA ricombinante, il termine viene di solito riservato alle molecole prodotte unendo segmenti derivati da fonti biologiche diverse. La molecola di DNA ricombinante è inserita in una cellula ospite, procariote o eucariote, che si replica producendo un clone. Replicandosi a sua volta, il vettore con il frammento estraneo di DNA viene quindi amplificato e dopo la sua amplificazione, può essere purificato per ulteriori analisi. All'inizio degli anni Sessanta del secolo scorso, prima dell'avvento del clonaggio genico, lo studio

dei geni si basava spesso su scoperte indirette o fortuite, quali la capacità dei batteriofagi di incorporare geni batterici nel loro genoma. Per esempio, un ceppo del fago ϕ (phi) 80 con l'operatore *lac* incorporato nel suo genoma fu usato per dimostrare che il repressore Lac si lega in modo specifico a questa sequenza di DNA (Capitolo 8). Ripercorriamo ora alcune delle scoperte fatte nei batteriofagi che hanno consentito lo sviluppo degli strumenti necessari per manipolare il DNA in laboratorio.

Indizi derivati dai siti coesivi del batteriofago lambda (λ)

Nel 1962, Allan Campbell osservò che il genoma lineare del batteriofago λ , una volta entrato nella cellula batterica ospite, formava un cerchio e che un evento di **ricombinazione** (rottura e riunione) inseriva poi il DNA del fago nel cromosoma ospite. Ulteriori analisi rivelarono che il fago λ possiede brevi regioni di DNA a singolo filamento in ciascuna estremità del genoma lineare le cui sequenze sono complementari tra loro. Queste regioni a singolo filamento furono chiamate **siti coesivi** (*cos*; **Figura 13.1**). L'appaiamento complemen-

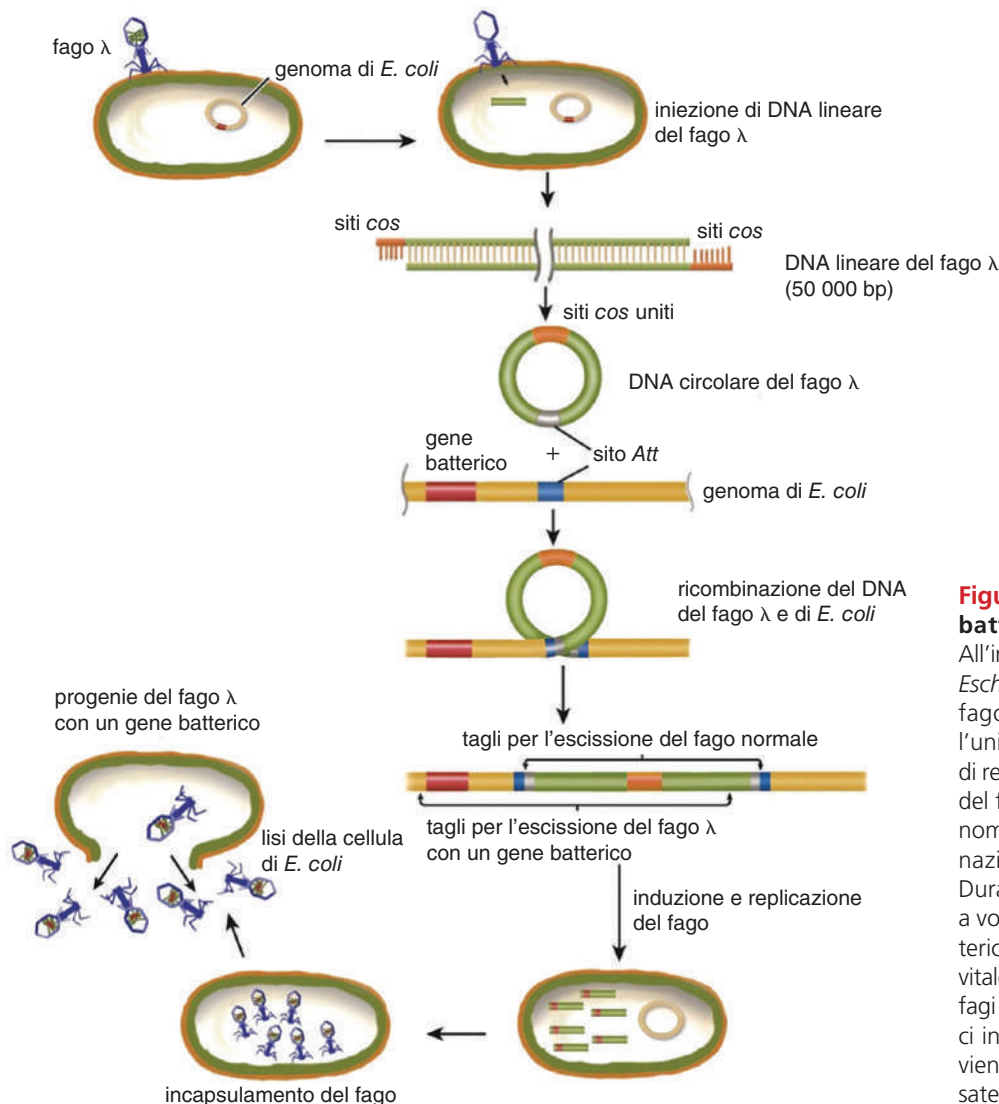


Figura 13.1 I siti coesivi del batteriofago lambda (λ).

All'interno delle cellule ospiti di *Escherichia coli*, il genoma del fago λ circola mediante l'unione dei siti *cos*. Nel modo di replicazione lisogeno, il DNA del fago è incorporato nel genoma dell'ospite per ricombinazione a livello dei siti *Att*. Durante l'escissione, il fago λ a volte incorpora dei geni batterici. Nel modo litico del ciclo vitale del fago, una progenie di fagi λ contenenti i geni batterici incorporati nei loro genomi viene rilasciata dalle cellule lisate di *Escherichia coli*.

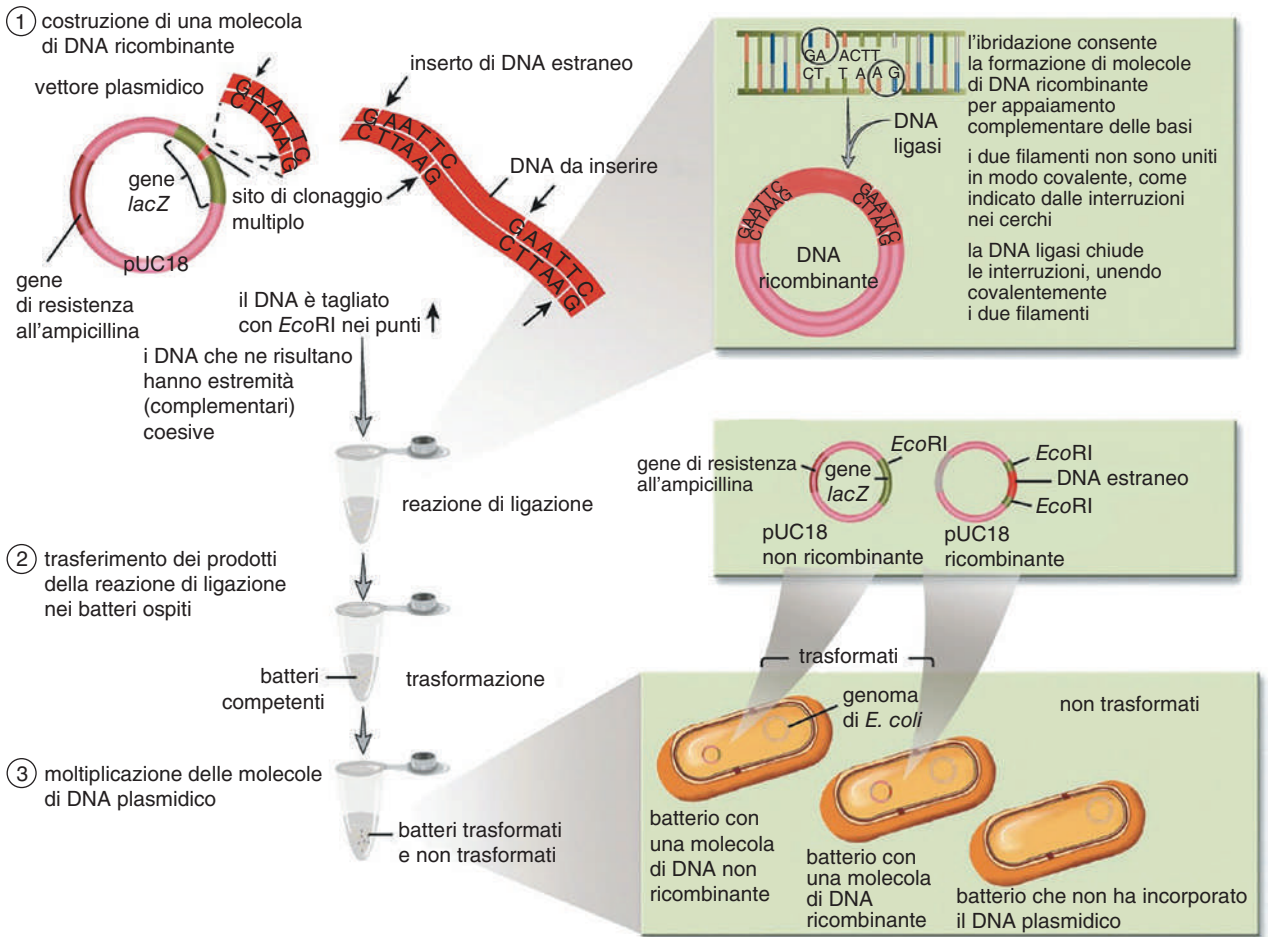


Figura 13.6 Il clonaggio molecolare per mezzo di un vettore plasmidico. Una molecola di DNA ricombinante viene costruita, i prodotti della reazione di ligazione sono trasferiti alla cellula ospite batterica e il plasmide di DNA viene moltiplicato.

TECNICHE 13.1

La reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR è una delle tecniche più potenti e comunemente usate in biologia molecolare, con un impatto rilevante in molte aree del clonaggio molecolare e della genetica. Con questa tecnica, una sequenza bersaglio di DNA può essere amplificata un miliardo di volte in poche ore. L'amplificazione di segmenti specifici di DNA mediante PCR differisce dall'amplificazione del DNA durante il clonaggio e la propagazione in una cellula ospite. Il procedimento viene eseguito interamente *in vitro*. Oltre a essere impiegata in molte strategie di clonaggio molecolare, la PCR è usata anche nell'analisi dell'espressione genica (Capitolo 9), nelle analisi forensi in cui si isolano minuscoli campioni di DNA dalla scena di un crimine (Capitolo 14) e nei test diagnostici per le malattie genetiche (**MEDICINA 13.1**).

La PCR è una reazione della DNA polimerasi e, come tale, richiede uno stampo di DNA e un 3'-OH libero per innescare la polimerasi. Lo stampo è fornito dal campione di DNA da amplificare e i gruppi 3'-OH liberi dai primer nucleotidici specifici per determinati siti. I primer sono complementari a ciascuna delle estremità della sequenza da amplificare. Presta attenzione al fatto che *in vivo* la DNA polimerasi userebbe un primer di RNA (vedi paragrafo 6.4), mentre *in vitro* si usa un primer di DNA, che è più stabile e più facile da sintetizzare.

I tre passaggi della reazione sono denaturazione, ibridazione dei primer ed estensione dei primer (**Figura 1**).

- 1. Denaturazione.** Nel primo passaggio, si usa il calore per denaturare i filamenti stampo e rendere il DNA a singolo filamento.
- 2. Ibridazione.** Il DNA viene raffreddato per permettere ai primer di ibridare, cioè di legarsi al filamento complementare corretto. La temperatura di questo passaggio varia in base alle dimensioni del primer, al contenuto di GC e all'omologia con il DNA bersaglio. I primer sono di solito degli oligonucleotidi di DNA lunghi circa 20 basi ciascuno.
- 3. Estensione dei primer.** In presenza di Mg^{2+} , la DNA polimerasi estende i primer su entrambi i filamenti da 5' a 3' usando la sua attività polimerasica. L'estensione dei primer viene condotta a una temperatura ottimizzata in base alla specifica polimerasi che viene scelta. Un enzima molto usato per questo passaggio è la *Taq* polimerasi, la DNA polimerasi del batterio termofilo (amante del calore) *Thermus aquaticus*. Questo microrganismo vive in sorgenti calde che possono raggiungere temperature vicine al punto di ebollizione, per cui ha bisogno di una polimerasi termostabile.

Questi tre passaggi sono ripetuti da 28 a 35 volte. Ciascun ciclo genera sempre più frammenti composti soltanto dalla regione compresa tra i primer che viene amplificata. Mentre questi frammenti si accumulano in modo esponenziale, il contributo di quelli che si estendono oltre la sequenza bersaglio diventa trascurabile poiché si accumulano in maniera lineare. Dopo 25 cicli all'interno di un termociclatore automatico, la sequenza bersaglio è amplificata 2^{25} volte. I prodotti della PCR possono essere visualizzati su un gel colorato mediante composti fluorescenti specifici per gli acidi nucleici, come bromuro di etidio o SYBR Green. La frequenza di errore della *Taq* è di $2 \cdot 10^{-4}$. Se avviene in uno dei primi cicli, l'errore può diventare rilevante. Altre polimerasi, come la *Pfu*, hanno una fedeltà maggiore. La *Pfu* deriva da *Pyrococcus furiosus* e le rare inserzioni sbagliate che si verificano durante la polimerizzazione sono rapidamente scisse dall'attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ di proofreading di questo enzima.

Quando Kary Mullis sviluppò per la prima volta il metodo della PCR, nel 1985, per i suoi esperimenti usava la DNA polimerasi di *Escherichia coli*. Poiché questo enzima è sensibile al calore, la sua attività veniva distrutta dal passaggio di denaturazione a 95°C e a ogni ciclo bisognava aggiungere una nuova aliquota dell'enzima. La purificazione e il clonaggio della DNA polimerasi da *T. aquaticus* hanno reso la reazione molto più semplice. Nei suoi primi esperimenti, Mullis doveva spostare manualmente la reazione da una temperatura all'altra. Per fortuna, il procedimento è stato poi automatizzato grazie allo sviluppo dei termociclatori, strumenti in grado di passare rapidamente da una temperatura all'altra tra quelle richieste dalla reazione di PCR. È quindi possibile preparare le reazioni, porle nel termociclatore e ritornare qualche ora dopo (o la mattina successiva) a raccogliere i prodotti.

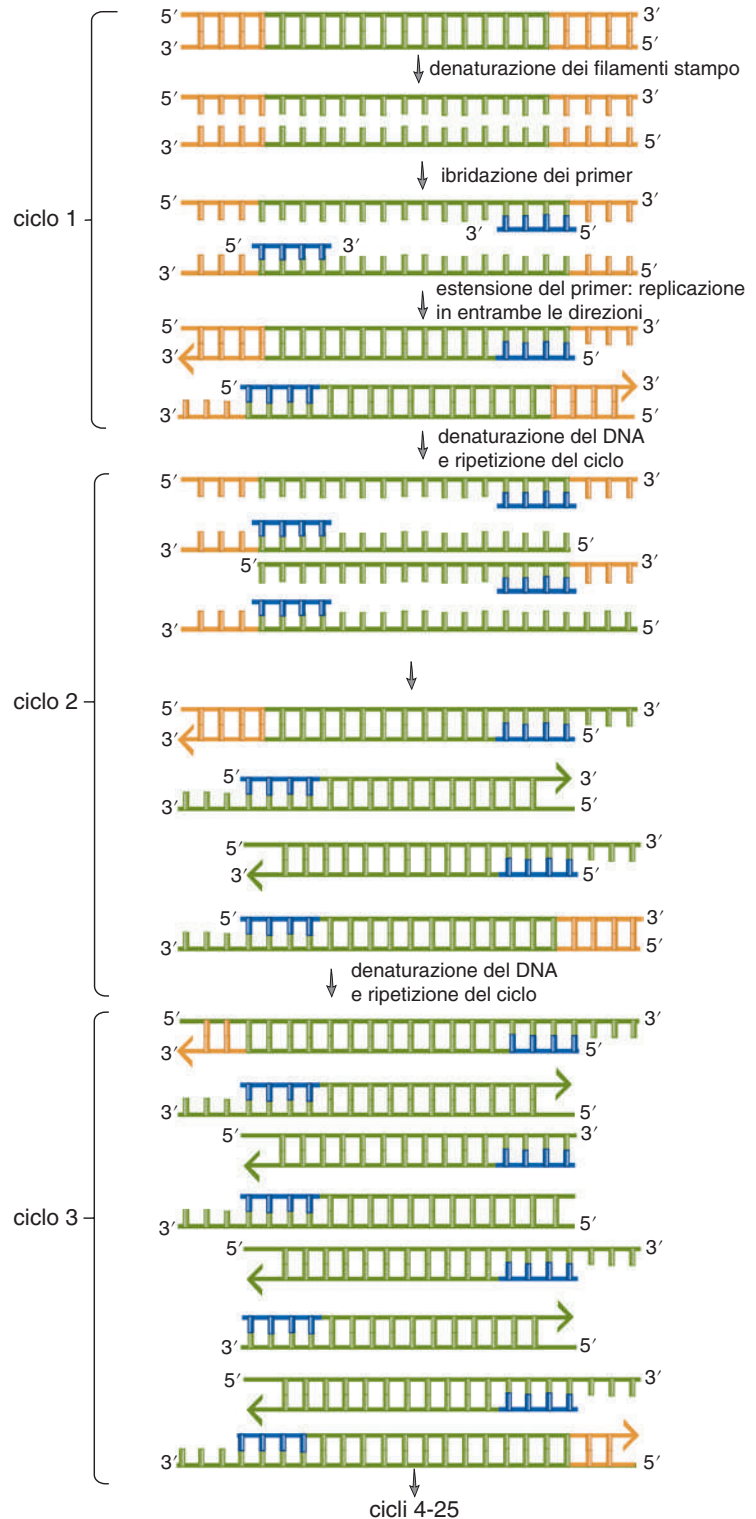


Figura 1 La reazione a catena della polimerasi (PCR).

La sequenza bersaglio da amplificare è indicata in verde. Vengono aggiunte grandi quantità dei due primer (blu), ciascuno con una sequenza complementare a quella presente in un filamento all'estremità della regione da amplificare. Si aggiungono anche una DNA polimerasi termostabile (per esempio la *Taq* polimerasi) e i deossinucleotidi trifosfato (dNTP). Durante il primo ciclo, il riscaldamento a 95°C denatura il DNA a doppio filamento e il successivo raffreddamento a $55\text{-}65^\circ\text{C}$ permette ai primer di ibridare con le sequenze complementari del DNA destinatario.

La *Taq* polimerasi estende ciascun primer da $5'$ a $3'$, generando filamenti di nuova sintesi in entrambe le direzioni che si estendono fino alla fine dei filamenti stampo. L'estensione avviene a 72°C . Nel secondo ciclo, i filamenti originali e quelli di nuova sintesi sono denaturati a 95°C e i primer vengono ibridati con le sequenze complementari a $55\text{-}65^\circ\text{C}$. Ciascun primer ibridato viene di nuovo esteso dalla *Taq* polimerasi. Nel terzo ciclo, si generano due molecole di DNA a doppio filamento esattamente uguali alla sequenza bersaglio. Queste due molecole sono duplicate nel quarto ciclo e poi di nuovo in ciascun ciclo successivo.

► TECNICHE 13.3**La sintesi del DNA complementare (cDNA)**

La maggior parte degli mRNA eucarioti è poliadenilato all'estremità 3' per formare una coda di poliA. Questa caratteristica ha un'importante conseguenza pratica che è stata sfruttata in biologia molecolare. La regione di poliA può essere usata per isolare in modo selettivo l'mRNA dall'RNA totale mediante cromatografia di affinità (Figura 1a). L'mRNA purificato viene quindi usato come stampo per la sintesi di un DNA complementare (cDNA) (Figura 1b e c).

La purificazione dell'RNA

L'RNA totale viene estratto da uno specifico tipo di cellule che esprime una serie determinata di geni. Di questo RNA cellulare totale, l'80-90% è costituito da rRNA, tRNA ed mRNA istonico, nessuno dei quali possiede una coda di poliA. Questi RNA possono essere separati dall'mRNA con poliA facendo passare l'RNA totale attraverso una colonna di affinità di oligodT o oligodU legati a granuli di resina. In condizioni di salinità relativamente alta, l'mRNA con poliA è trattenuto dalla formazione di legami idrogeno con le basi complementari, mentre l'RNA privo di una coda di poliA scorre attraverso la colonna. Le condizioni saline per l'ibridazione sono simili alla concentrazione ionica presente nelle cellule (per esempio, NaCl 0,3-0,6 M). L'mRNA con poliA viene quindi eluito dalla colonna in un tampone di eluizione a bassa salinità (per esempio, NaCl 0,01 M) che promuove la denaturazione dell'ibrido.

La sintesi del primo filamento del cDNA

Per sintetizzare il cDNA dall'mRNA purificato si possono usare diverse strategie, tra cui quella brevemente descritta di seguito, in cui il cDNA è sintetizzato per azione della trascrittasi inversa e della DNA polimerasi (Figura 1b). La trascrittasi inversa catalizza la sintesi di un DNA a singolo filamento a partire dallo stampo di mRNA. Come una regolare DNA polimerasi, anche la trascrittasi inversa richiede un primer da cui iniziare. Per questo motivo viene aggiunto un primer di polidT, il cui 3'-OH libero può essere usato dalla trascrittasi inversa per l'estensione in presenza di deossinucleosidi trifosfato (dNTP). Di solito viene usata una trascrittasi inversa virale come quella del virus della mieloblastosi aviaria (AMV,

Avian Myeloblastosis Virus). La trascrittasi inversa aggiunge dNTP da 5' a 3' mediante appaiamento complementare delle basi. Questo processo prende il nome di sintesi del primo filamento. L'mRNA viene quindi degradato con una ribonucleasi o con una soluzione alcalina.

La sintesi del secondo filamento del cDNA

Per la maggior parte delle applicazioni, compreso il clonaggio di cDNA, è necessario DNA a doppio filamento. Il secondo filamento di DNA viene generato dal frammento di Klenow della DNA polimerasi I di *Escherichia coli* (Figura 1c). L'attività esonucleasica 5'→3' di cui è dotato (FOCUS 6.1) renderebbe questo enzima inadatto a molte applicazioni, ma può essere facilmente rimossa dall'oloenzima esponendolo a una proteasi. Il frammento grande o di Klenow della DNA polimerasi I generato mediante proteolisi possiede le attività polimerasica 5'→3' ed esonucleasica (di proofreading) 3'→5' e viene usato ampiamente in biologia molecolare. I frammenti di Klenow disponibili in commercio sono spesso prodotti facendo esprimere ai batteri una forma tronca del gene della DNA polimerasi I.

La trascrittasi inversa usata nella sintesi del primo filamento ha la tendenza a formare un'ansa su sé stessa e a iniziare a produrre un altro filamento complementare. Questa forcina costituisce un primer naturale per la DNA polimerasi, che genera un secondo filamento di DNA. A questo punto viene aggiunta la nucleasi S1 (di *Aspergillus oryzae*) per tagliare la forcina di DNA a singolo filamento. Alla molecola di DNA a doppio filamento vengono aggiunti dei linker a doppio filamento con estremità complementari a un vettore di clonaggio appropriato prima della ligazione nel vettore di clonaggio. Il risultato finale è un cDNA a doppio filamento in cui il secondo filamento corrisponde alla sequenza dell'mRNA, rappresentando quindi il filamento codificante del gene. Le sequenze che compaiono in letteratura sono le sequenze 5'→3' del secondo filamento del DNA. Le sequenze degli introni, dei promotori e di tutte le regioni a monte del punto di inizio della trascrizione non sono presenti nei cDNA. La libreria formata da tutti i cDNA derivati dagli mRNA presenti in uno specifico tipo cellulare costituisce la libreria dei cloni di cDNA.

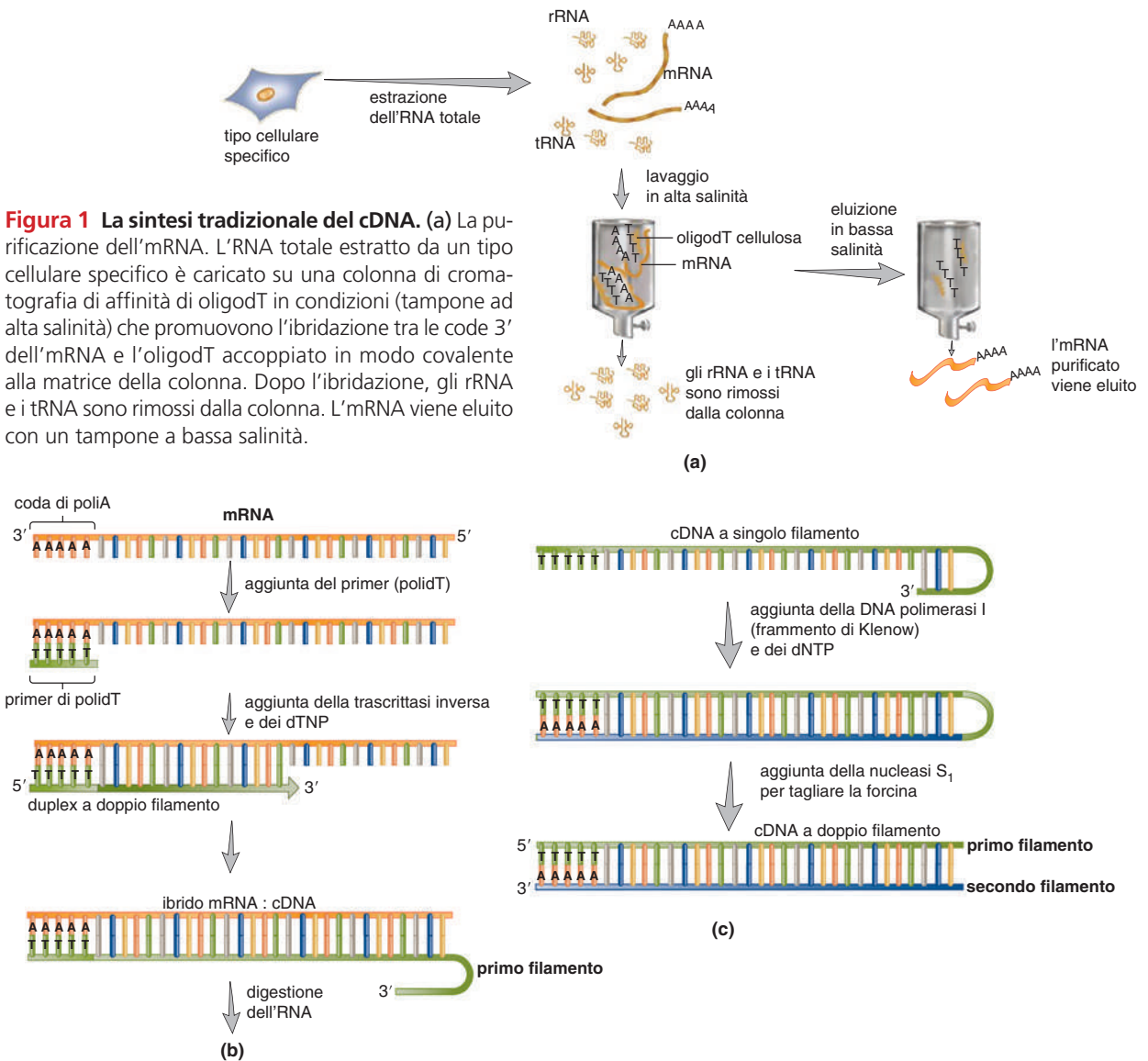
cesso è rappresentato dalla purificazione dei frammenti di dimensioni ottimali mediante elettroforesi su gel o tecniche di centrifugazione. Il passaggio finale consiste nell'inserimento dei frammenti di DNA in un vettore adatto.

Il genoma umano ha dimensioni di circa $3 \cdot 10^9$ bp. Se si considera una dimensione media degli inserti di 20 kb, il numero di frammenti casuali che assicura un'alta probabilità (95-99%) di rappresentare tutte le sequenze è di circa 10^6 cloni per gli esseri umani. In teoria, il calcolo matematico produrrebbe un valore di $1,5 \cdot 10^5$ [cioè $(3 \cdot 10^9 \text{ bp}) : (2 \cdot 10^4 \text{ bp})$], ma nella pratica sono necessari più cloni in quanto l'inserzione

avviene in modo casuale. Per le librerie genomiche si usano di solito vettori cosmidici o del fago λ . Poiché possono contenere un inserto più grande rispetto ai plasmidi, questi vettori offrono maggiori probabilità di clonare la sequenza di un gene che contenga sia la sequenza codificante sia gli elementi regolatori in un solo clone.

Le librerie di cDNA

Il principio alla base del clonaggio del cDNA è che una popolazione di mRNA isolata da specifici tessuti, tipi cellulari o stadi di sviluppo (per esempio embrionale) dovrebbe contenere gli mRNA caratteristici per tutte



(b) La sintesi del primo filamento. La sintesi del primo filamento di cDNA è eseguita usando la trascrittasi inversa e un primer di polidT in presenza di dNTP. Viene prodotto un ibrido mRNA-cDNA e l'mRNA è poi digerito con una soluzione alcalina o con l'enzima ribonucleasi.

(c) La sintesi del secondo filamento. La sintesi di cDNA a doppio filamento si basa su un metodo di autoinesco. Il frammento di Klenow della DNA polimerasi I catalizza la sintesi del secondo filamento usando come primer la forcina naturale del primo filamento. La forcina è tagliata con una nucleasi che taglia il DNA a singolo filamento (nucleasi S₁).

le proteine di quel tipo cellulare o di quello stadio, assieme agli mRNA "costitutivi" che codificano per proteine essenziali, come quelle ribosomiali, e altri mRNA comuni a molti tipi cellulari o a molti stadi di sviluppo. Pertanto, isolando gli mRNA si può studiare una piccola sottopopolazione di tutti i geni presenti nel genoma. Sebbene non sia possibile clonare direttamente gli mRNA, si può clonare una copia di cDNA dell'mRNA (**TECNICHE 13.3**). Poiché una libreria di cDNA deriva da mRNA, la libreria conterrà soltanto la regione codificante dei geni espressi, senza introni né regioni regolatrici. Come vedremo nel Capitolo 15, quest'ultimo aspetto è rilevante quando si applica la tecnologia del

DNA ricombinante alla produzione di animali transgenici e alla terapia genica nell'essere umano.

13.5 | Lo screening delle librerie e le sonde

La ricerca della sequenza specifica di un DNA clonato in una libreria prende il nome di **screening della libreria**. Oggigiorno, grazie all'abbondanza di informazioni sulle sequenze genomiche di molti organismi, è più probabile che una sequenza di DNA di interesse venga isolata mediante PCR (**TECNICHE 13.1**) e non

► **MEDICINA 13.1****Il saggio PCR-RFLP per la malattia delle urine a sciroppo d'acero**

La malattia delle urine a sciroppo d'acero (MSUD, *Maple Syrup Urine Disease*) venne descritta per la prima volta nel 1954. Si tratta di una malattia metabolica ereditata con modalità autosomica recessiva, che colpisce il metabolismo dei tre aminoacidi a catena ramificata leucina, isoleucina e valina. Quando una persona sana consuma più proteine di quelle necessarie alla crescita, gli aminoacidi a catena ramificata vengono degradati per produrre energia; la loro demolizione avviene attraverso una serie di reazioni chimiche. Il secondo passaggio della via di degradazione è mediato da un sistema enzimatico di sei componenti, detto complesso multienzimatico della deidrogenasi dell' α -chetoacido a catena ramificata (**Figura 1a**). Nella MSUD, uno o più geni che codificano per i componenti di questo com-

plesso sono mutati e poiché la via di degradazione è bloccata, i derivati α -chetoacidi dell'isoleucina, della leucina e della valina si accumulano nel sangue e nelle urine. Questo accumulo conferisce alle urine delle persone malate un odore dolciastro, simile a quello dello sciroppo d'acero, e provoca un effetto tossico che interferisce con le funzioni cerebrali.

Le persone con la MSUD classica sviluppano i sintomi a soli 4-7 giorni dopo la nascita, in particolare un progressivo deterioramento neurologico che determina letargia, convulsioni, coma e morte entro le prime 2-3 settimane di vita se non viene trattato. Una diagnosi precoce è quindi essenziale per permettere alle persone con MSUD di avere uno sviluppo normale. Il trattamento consiste in una dieta

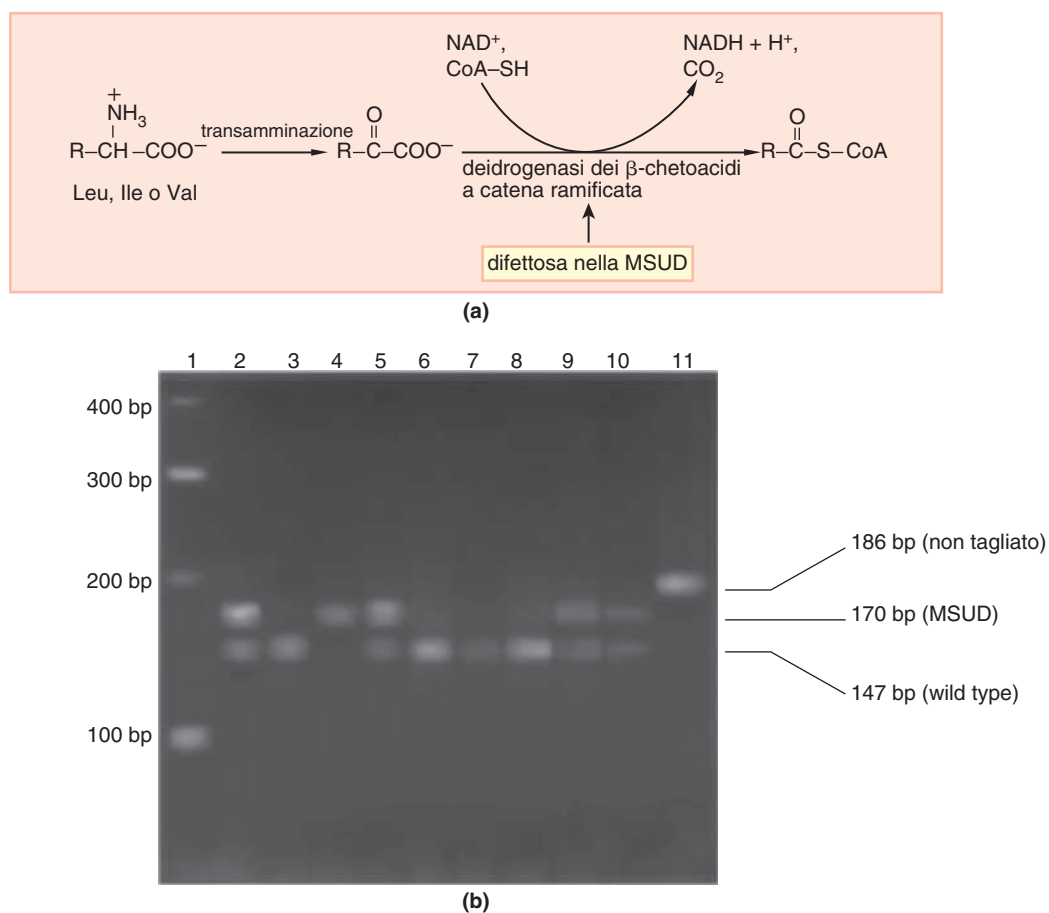


Figura 1 La diagnosi della malattia delle urine a sciroppo d'acero (MSUD). (a) La degradazione degli aminoacidi leucina, isoleucina e valina inizia con la transaminazione e prosegue con la decarbossilazione ossidativa dei rispettivi chetoacidi. Quest'ultima reazione è eseguita da un complesso multienzimatico chiamato complesso della deidrogenasi degli α -chetoacidi a catena ramificata, difettoso in presenza di MSUD. (b) L'analisi del genotipo della MSUD mediante un saggio PCR-RFLP. I campioni di DNA sono stati amplificati attraverso PCR usando dei primer specifici per la MSUD. Dopo la digestione con l'endonucleasi di restrizione *ScaI*, i campioni sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio e colorazione con bromuro di etidio.

Le persone eterozigote sono indicate dalla presenza di un frammento di 170 bp e di uno di 147 bp: corsia 2 (padre), corsia 5 (figlio o figlia), corsia 9 (madre) e corsia 10 (nonna materna). Quelle omozigote per l'allele wild type sono indicate dalla presenza del solo frammento di 147 bp: corsia 3 (nonna paterna) e corsie 6-8 (rispettivamente, bisnonno materno, nonno materno e bisnonna materna). La corsia 4 mostra il frammento che risulta dal membro della famiglia omozigote per l'allele MSUD. La corsia 11 mostra il prodotto della PCR di 186 bp non digerito. [Fonte: Love-Gregory, L.D. *et al. Journal of Inherited and Metabolic Diseases* 24, 393-403 (2001), © 2001 SSIEM and Kluwer Academic Publishers. Ristampata per gentile concessione di John Wiley & Sons.]

speciale attentamente controllata, che richiede il monitoraggio dettagliato dell'assunzione di proteine. La dieta si basa sulla somministrazione di un latte artificiale sintetico che fornisce le sostanze nutritive e tutti gli amminoacidi, tranne leucina, isoleucina e valina. Questi ultimi tre amminoacidi, essenziali per la crescita e lo sviluppo, sono poi aggiunti in quantità dosate con estrema precisione, in modo da fornirne una dose sufficiente senza superare il livello di tolleranza. Nelle persone più adulte con la malattia, questo prodotto metabolico speciale apporta i nutrienti di base e sostituisce il latte vaccino. Il resto della dieta è essenzialmente di tipo vegetariano.

A livello mondiale, l'incidenza della MSUD è di un caso ogni 185 000-225 000 persone, ma in alcune comunità di mennoniti si stima sia di un caso ogni 176 nascite. Nelle persone mennonite con MSUD, la malattia è dovuta al cambiamento di un singolo nucleotide in uno dei geni che codificano per un componente del complesso enzimatico. La mutazione missenso porta alla sostituzione di una tirosina (Y) con un'asparagina (N), detta allele Y393N. Anche se nella popolazione non mennonita la MSUD è clinicamente

e geneticamente eterogenea, l'allele Y393N è comunque presente con una frequenza significativa. È stato messo a punto un saggio degli appaiamenti sbagliati mediante PCR-RFLP per identificare l'allele Y393N. Dato che, per motivi religiosi e culturali, i test prenatali non sono permessi nella comunità mennonita, diventa essenziale il test neonatale. Esistono vari test per monitorare il livello degli amminoacidi e dei loro derivati α -chetoacidi nel sangue e nelle urine. I saggi tradizionali basati sull'analisi del siero possono non essere abbastanza rapidi e sono stati riportati casi di persone decedute prima di ricevere i risultati dei test di screening neonatale. Il saggio degli appaiamenti sbagliati PCR-RFLP si esegue invece in tempi molto brevi. Poiché esso si basa sul DNA, non è necessario attendere l'aumento dei livelli dei derivati degli α -chetoacidi nel siero ematico, che può richiedere anche 72 ore. Vengono usati tamponi della mucosa orale o campioni di sangue e i risultati sono disponibili in un minimo di otto ore. L'allele wild type di 147 bp deriva dal taglio di un prodotto di PCR di 186 bp in due siti di restrizione di *ScaI*. L'allele Y393N di 170 bp si ottiene poiché manca il secondo sito di *ScaI* (Figura 1b).

13.7 | Il sequenziamento del DNA

Fino al 1977, riuscire a determinare la sequenza delle basi del DNA era un processo lungo e laborioso, che si poteva applicare soltanto a sequenze molto brevi come la regione stampo per il tRNA. Con lo sviluppo di tecniche per il **sequenziamento** rapido e su larga scala **del DNA**, determinare la sequenza delle basi è oggi diventata un'attività ordinaria. Una volta che un gene è stato clonato o amplificato mediante PCR, il sequenziamento del DNA consente di ottenere la caratterizzazione finale. Sebbene una sequenza abbia di per sé un valore limitato, essa rappresenta comunque un passaggio necessario per eseguire analisi più approfondite sul gene clonato. Il sequenziamento del DNA è utile per diversi scopi, quali:

- identificare geni;
- determinare la sequenza di promotori e di altri elementi regolatori del DNA che controllano l'espressione dei geni;
- rilevare con precisione la struttura dei geni e di altre sequenze di DNA;
- confermare la sequenza dei cDNA, dei prodotti di PCR e di altri DNA sintetizzati *in vitro*, per esempio dopo mutagenesi *in vitro* per verificare che la mutazione sia avvenuta correttamente;
- aiutare a dedurre la sequenza degli amminoacidi codificata da un gene o da un cDNA.

Grazie all'avvento del sequenziamento automatizzato del DNA, i grandi progetti di sequenziamento dei genomi stanno producendo informazioni sull'evoluzione dei

genomi, sulla posizione delle regioni codificanti, degli elementi regolatori e di altre sequenze, nonché sulla presenza di mutazioni che danno origine alle malattie. Analizzeremo le scoperte derivate dal sequenziamento di interi genomi e dall'analisi comparativa dei genomi nel Capitolo 15.

Il sequenziamento manuale con il metodo dei dideossi di Sanger

Nel 1977, Frederick Sanger, Allan Maxam e Walter Gilbert introdussero dei metodi pionieristici per il sequenziamento del DNA. Quello di Maxam e Gilbert usa un approccio chimico che comporta la degradazione selettiva delle basi. Il metodo più diffuso di sequenziamento del DNA è però il **metodo di sequenziamento dei dideossi** (noto anche come metodo di Sanger), che in pratica consiste in una reazione di sintesi del DNA (Figura 13.14 a p. 416). Il DNA a singolo filamento viene mescolato con un primer radiomarcato allo scopo di fornire il 3'-OH richiesto dalla DNA polimerasi per iniziare la sintesi di DNA. Il primer è di solito complementare a una regione del vettore immediatamente esterna al sito di clonaggio multiplo. Il campione viene quindi diviso in quattro aliquote, ciascuna delle quali contiene una DNA polimerasi (la DNA polimerasi fagica T7, detta anche Sequenasi), quattro dNTP ad alta concentrazione e una bassa concentrazione di un **terminatore della replicazione**. I terminatori della replicazione sono dei **dideossinucleosidi trifosfato (ddNTP)** che, essendo privi del 3'-OH, non possono formare un legame fosfodiesterico con un altro nucleotide. Di conseguenza, ciascuna reazione procede finché non viene aggiunto un terminatore della replicazione e ognuna delle quattro reazioni di sequenziamento produce una serie di mole-

Lizbeth A. Allison

Fondamenti di biologia molecolare

Seconda edizione italiana condotta sulla terza edizione americana

A cura di Daniela Taverna

Attraverso la scrittura scorrevole e le illustrazioni di grande impatto, *Fondamenti di biologia molecolare* espone i concetti chiave della materia e le sue applicazioni in modo semplice, aggiornato e completo.

La presentazione degli argomenti rispetta l'approccio della ricerca – osservazione, domanda, progettazione sperimentale, raccolta dati e conclusione – per rendere più significativa e profonda la comprensione della disciplina. Inoltre, il linguaggio tecnico è introdotto gradualmente e spiegato in modo da essere comprensibile anche a chi non lavora ancora in un laboratorio; i concetti chiave sono messi ben a fuoco e facilmente individuabili, così come le loro relazioni.

Il libro dedica ampio spazio a ricadute e implicazioni in **ambito medico**, esplorate in maniera estesa e capillare: il testo principale introduce i concetti fondamentali, mentre gli approfondimenti sono affidati alle schede *Medicina*, che inquadrano i processi molecolari e i loro malfunzionamenti nel contesto delle patologie; in più, un intero capitolo è riservato alle applicazioni della biologia molecolare per la salute umana.

Questa edizione accoglie le novità più importanti nel settore (tra cui CRISPR/Cas, epigenetica e nutrizione, regolazione da miRNA, genomica sintetica, medicina genomica), e propone un confronto tra eucarioti e procarioti per illustrare come cambiano i processi cellulari nei diversi organismi, fondamentale per comprendere la biologia molecolare nel suo complesso e nel quadro evolutivo.

Oltre alle schede sulla *Medicina*, sono presenti i *Focus*, che affrontano argomenti di frontiera o strategie sperimentali particolari; le *Tecniche*, che raccolgono i metodi e le tecniche sperimentali più importanti; *I concetti in sintesi* e *I concetti in pratica*, presenti in ogni capitolo e destinati al riepilogo e alle domande per mettersi alla prova (*domande di analisi, esercizi esplorativi e domande su casi reali*).

Inquadrando con l'app **Guarda!** l'icona posta all'inizio di ogni capitolo, è possibile visualizzare oltre **80 video** con lo smartphone, consultare il **glossario interattivo** e le risposte alle domande di fine capitolo, accedere ai **quiz interattivi** e alle altre risorse digitali.

Lizbeth A. Allison è professoressa di Biologia presso il College of William and Mary, Williamsburg, Virginia.

Le risorse multimediali



online.universita.zanichelli.it/allisonze

A questo indirizzo sono disponibili le risorse multimediali di complemento al libro. Per accedere alle risorse protette è necessario registrarsi su **my.zanichelli.it** inserendo il codice di attivazione personale contenuto nel libro.

Libro con ebook



Chi acquista il libro nuovo può accedere gratuitamente all'**ebook**, seguendo le istruzioni presenti nel sito. L'ebook si legge con l'applicazione *Booktab*, che si scarica gratis da App Store (sistemi operativi Apple) o da Google Play (sistemi operativi Android).

L'accesso all'ebook e alle risorse digitali protette è personale, non condivisibile e non cedibile, né autonomamente né con la cessione del libro cartaceo.

ALLISON*FOND BIOLOGIA MOLECOL 2ELUMK

ISBN 978-88-08-39976-2



9 788808 399762

4 5 6 7 8 9 0 1 2 (60H)