

MEDICINA nei SECOLI

Arte e Scienza

A CURA/EDITED BY

DIPARTIMENTO MEDICINA SPERIMENTALE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI "LA SAPIENZA" DI ROMA
DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL MEDICINE, UNIVERSITY OF ROME "LA SAPIENZA"

DIRETTORE SCIENTIFICO/EDITOR Luigi Stroppiana

COMITATO SCIENTIFICO/ADVISORY BOARD

Raffaele A. Bernabeo, Bologna
Franco Crainz, Roma
Luigi Frati, Roma
Francesco Leoni, Cassino

Giuseppe M. Pontieri, Roma
Loris Premuda, Padova
Bruno Zanobio, Milano

Sleim Ammar, Tunisi, TN
Josef Antall, Budapest, H
Miladin Apostolov, Sofia, BG
Tadeusz Brzezinski, Szczecin, PL
Joseph Danon, Barcelona, E
Joseph Habbi, Baghdad, IRQ
Caroline Hannaway, Baltimore, USA
Kuninori Homma, Niigata-Kon, J
José López Sanchez, La Habana, Cuba

John R. Kirkup, Bath Avon, GB
Spyros Marketos, Athens, GR
Mahmoud Nadjmabadi, Teheran, IR
John Parascandola, Bethesda, USA
Boris D. Petrov, Moscow, URSS
Hans Schadewaldt, Düsseldorf, D
Jean Charles Sournia, Paris, F
Jean-Pierre Tricot, Antwerpen, B
Dora B. Weiner, Los Angeles, USA

COORDINATORE EDITORIALE/MANAGING EDITOR Carla Serarcangeli

DIRETTORE RESPONSABILE/EDITORIAL OFFICE Giuseppe Scaria

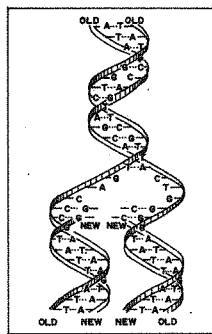
Dipartimento di Medicina Sperimentale - Sezione di Storia della Medicina
Viale Regina Elena, 324 - Policlinico Umberto I - 00161 Roma, Italia
tel. (06) 4462791 - 4457608 - 4940540 - 4461974 telefax (06) 4454820

EDITORE/PUBLISHER Antonio Delfino Editore S.r.l. - Via Lucca, 33 - 00161 Roma
tel. 8831116 - telefax 8831327

Registrazione del Tribunale di Roma/Trade name to the Forum of Rome n. 391/88
Registro Nazionale della Stampa Presidenza del Consiglio dei Ministri
Record at National Register of President of Cabinet n. 2488/88
ISBN n. 0394-9001

MEDICINA NEI SECOLI

ARTE E SCIENZA



GIORNALE DI STORIA DELLA MEDICINA

JOURNAL OF HISTORY OF MEDICINE

Fondato da / Founded by Luigi Stroppiana

QUADRIMESTRALE / EVERY FOUR MONTHS

NUOVA SERIE / NEW SERIES VOL. III - Supplemento ANNO / YEAR 1990

SOMMARIO

1. IL PANORAMA CULTURALE NEL QUALE NASCE LA GENETICA P. 1
2. LA NATURA DEL GENE DOPO LA RISCOPERTA DELLE LEGGI DI MENDEL P. 7
3. I CONTRIBUTI "NON GENETICI" ALLA DEFINIZIONE DELLA NATURA FISICA DEL GENE P. 15
4. ALLA RICERCA DI UNA FUNZIONE PER IL DNA P. 25
5. LA BIOLOGIA MOLECOLARE E LA DOPPIA ELICA .. P. 35
6. GLI SVILUPPI DEL CONCETTO DI GENE P. 49
7. LA PRIMA CRISI: LE ECCEZIONI AL CISTRONE P. 67
8. LA SECONDA CRISI: LA VIOLAZIONE DELLA COLINEARITÀ P. 79
9. IL GENE COME UNITÀ DI TRASCRIZIONE P. 89
10. CONCLUSIONI P. 97

STORIA DELL'EVOLUZIONE DEL CONCETTO DI GENE

Mario Lunadei,

Dipartimento di Biopatologia umana, sezione
Biologia cellulare, Facoltà di Medicina,
Università "La Sapienza", Roma Italy

THE EVOLUTION OF GENE CONCEPT STORY

Summary

In this paper the story of gene concept is composed of two different parts: The first one refers to the discovery of the genetic material (DNA), the second concerns the concept changes from 1960 to the present.

It should be stressed that we are still along way from being able to clearly define a gene from a modern point of view. It is necessary to assemble more information in order to arrive to an adequate scientific paradigm.



Friedrich Miescher (1844-1895)

1.

IL PANORAMA CULTURALE NEL QUALE NASCE LA GENETICA

Il termine “gene” è stato usato per la prima volta nel 1909 da W. Johannsen, il quale con tale denominazione indicava quei “fattori” che Mendel riteneva i responsabili dei caratteri ereditari. Sempre Johannsen nello stesso anno scriveva:

la parola “gene” è completamente priva di una qualsiasi ipotesi; essa esprime il solo fatto che, in ogni caso, molte delle caratteristiche dell’organismo sono specificate nelle cellule germinate..... in breve, precisamente, ciò che noi vogliamo chiamare geni (1.1).

Il termine “genetica” debutta sulla scena scientifica nel 1906, quando W. Bateson nel corso dei lavori della “International Conference on Hybridization and Plant Breeding” dove propose di denominare “Genetica” una serie di linee di ricerca che, dopo la riscoperta delle leggi di Mendel, si andava via via sviluppando.

La storia dell’evoluzione del concetto di gene nasce dunque con W. Johannsen, ed è quindi solo latamente derivata dal lavoro di Mendel, del quale quindi non si riferisce. È opportuno, invece, qualche cenno sulle conoscenze biologiche acquisite alla fine del XIX secolo.

Nel 1879 Walter Flemming dimostra che i cromosomi si dividono longitudinalmente e che un membro di ciascuna coppia viene distribuito in ognuna delle cellule figlie, attraverso un processo che definisce “mitosi”.

Quasi contemporaneamente nel 1883 van Beneden scopre che il corredo cromosomico subisce una divisione riduzionale all’atto della formazione dei gameti (meiosi) e che il caratteristico numero cromosomico somatico si ripristinava al momento della fecondazione. Vale la pena ricordare che, in quegli anni, K. Rabl avanza l’ipotesi che il numero dei cromosomi sia costante in cellule diverse dello stesso organismo.

Medicina nei secoli (Supplemento)

Il panorama culturale alla fine dell'800 viene ad arricchirsi di due nuove teorie, quella della pangenesi intracellulare formulata da H. de Vries e quella del plasma germinale di A. Weissman. Secondo quest'ultima, che ha il grande pregio di aver introdotto una distinzione tra soma e germe (1.2), gli elementi germinali sono elementi discontinui, derivati direttamente dall'uovo o dallo spermatozoo.

Dopo che Flemming nel 1879 introdusse il termine "cromatina" per indicare il materiale intensamente colorabile presente nel nucleo, tra i ricercatori sorse un notevole interesse per questa sostanza. È da ricordare tra gli altri E. Zacharias che applicò allo studio dei cromosomi le tecniche sviluppate da Miescher. Zacharias trovò che un enzima, la pepsina, digeriva il protoplasma della cellula, lasciando integro il nucleo; osservò inoltre che i cromosomi erano resistenti alla digestione con pepsina, risultato da attendersi se il materiale che costituisce i cromosomi non è di natura proteica. Sulla base di queste informazioni Flemming propose una identità tra la cromatina e la nucleina scoperta da Miescher nel 1869.

Successivamente sia il botanico E. Strasburger che lo zoologo O. Hertwig confermarono l'identità tra nucleina e cromatina nucleare e agli inizi del secolo uno dei biologi più famosi, E.B. Wilson, nel suo celebre libro "The cell in development and heredity" sosteneva:

i cambiamenti periodici della capacità di colorazione mostrati dalla cromatina durante le fasi del ciclo vitale della cellula, assieme alle ricerche della chimica fisiologica e della composizione chimica e delle reazioni di colorazione della nucleina, indicano che la sostanza ricca in fosforo nota come nucleina abbia un ruolo importante nei processi dello sviluppo. Durante le fasi vegetative della cellula questa sostanza si combina con notevoli quantità di istoni, protamine e sostanze simili, e probabilmente con l'albumina stessa, per formare la nucleina. Durante il processo riproduttivo o mitotico tale associazione si dissolve, gli elementi albuminoidi vengono allontanati, lasciando la sostanza cromosomica con una alta percentuale di acido nucleinico, come risulta dall'analisi diretta dei nuclei spermatici e dalle reazioni di colo-

Il panorama culturale nel quale nasce la genetica

razione dei cromosomi. C'è, pertanto, una buona base per ipotizzare che chimicamente questa sostanza è l'elemento più importante trasmesso da una cellula all'altra, sia attraverso la divisione cellulare che per fecondazione..... (1.3).

A volte i lavori degli scienziati della fine del secolo scorso possono far sorridere per quella che ora ci appare una ingenuità delle teorie esposte: consideriamo, ad esempio, un passo nel quale K. Nägeli tratta della natura del materiale ereditario:

sotto l'influenza di *forze molecolari* tuttavia le micelle assumono un orientamento definitivo, la nuova struttura, composta principalmente di micelle proteinacee possiede un basso contenuto d'acqua e molto stabile. Esso è l'*idioplasma* (1.4)..... La forma, la grandezza, e la disposizione delle micelle idioplasmiche è realmente l'essenza dell'organismo, determinando precisamente come l'organismo si svilupperà, come reagirà agli stimoli esterni e come queste caratteristiche verranno trasmesse alla discendenza (1.5).

È evidente come in quell'epoca tra i biologi vi fosse un notevole interesse per la definizione della base chimico-fisica dell'ereditarietà anche se le conoscenze di chimica erano ben scarse. È interessante tuttavia notare che se è vero che le ipotesi sulla natura chimica del materiale ereditario erano nel XIX secolo molto arretrate, è pur vero che era convinzione comune tra i biologi che il nucleo fosse il latore dei caratteri ereditari.

Hugo de Vries, noto per i suoi studi tesi a spiegare le mutazioni, nel suo libro "Intracellular pangenesis", si esprimeva così:

come risultato di maggior rilievo degli studi sulla cellula nell'ultimo decennio, io considero la teoria che tutte le predisposizioni ereditarie (*Anlage*) dell'organismo debbano essere rappresentate nel nucleo della cellula.....

.....tutti i caratteri ereditari devono, perciò, essere rappresentati nel nucleo dai rispettivi pangeni. I nuclei, pertanto, debbono essere considerati come serbatoi di caratteri ereditari... e la trasmissione dei caratteri ereditari dal nucleo al citoplasma deve aver luogo, in qualche modo.

A. Weissman che, per primo ipotizzò una divisione tra linea somatica e germinale, riteneva che il processo dell'ereditarietà si esplicasse attraverso il trasferimento da una generazione all'altra di una sostanza dalla costituzione chimica ben definita. Questa sostanza che denominò "germoplasma" doveva possedere tutte le informazioni necessarie per permettere lo sviluppo dell'organismo.

A questo punto della nostra trattazione possiamo trarre due conclusioni circa le conoscenze (o le credenze) della Biologia del XIX secolo nel quale sorge la Genetica.

Innanzitutto, vi era un notevole interesse, anche se non generalizzato, per la conoscenza della base fisica del materiale ereditario. In secondo luogo, anche se l'enzimologia dell'epoca era solo agli albori, alcuni ricercatori come Zacharias avevano sviluppato tecniche che permettevano di trattare enzimaticamente la cromatina. Si può sicuramente concordare con F.H. Portugal e J.S. Cohen quando nel loro libro "A Century of DNA. A History of the discovery of the structure and function of the genetic substance" affermano:

un semplice esperimento avrebbe potuto risolvere il problema della composizione chimica dei cromosomi. La perdita di colorabilità avrebbe potuto essere dovuta ad una delle due possibilità: perdita di acido nucleico od accumulo di proteine, che avrebbero impedito la colorabilità dei cromosomi. Come si sarebbe potuto risolvere il problema all'inizio del ventesimo secolo? Il lavoro di Zacharias indubbiamente suggeriva la strada. Fu Zacharias che digerì le proteine con enzimi, lasciando i cromosomi intatti perché resistenti all'azione enzimatica. Su questa base Flemming postulò che il cromosoma avrebbe dovuto contenere acido nucleico. Supponiamo che le cellule che mostravano la perdita di colorabilità della cromatina fossero sottoposte ad azione della pepsina, e successivamente colorate. Se veramente l'acido nucleico non era presente non vi sarebbe stata colorazione. D'altro canto, la rimozione delle proteine, avrebbe permesso una ricomparsa della colorazione. Questo esperimento avrebbe portato la prova necessaria che il cromosoma era veramente composto di acido nucleico. Non sappiamo se un tale esperimento sia stato mai provato. Se lo è stato non ha suscitato l'attenzione dei ricercatori dell'epoca (1.6).

Pertanto, se è vero che numerose "intuizioni" avessero fatto "intravvedere" i segreti dell'ereditarietà, è pur vero che il contesto culturale tuttavia non era maturo perché venissero perfezionate ricerche che vedessero il nucleo ed i cromosomi come latori dell'informazione ereditaria.

Il panorama concettuale dell'epoca inoltre, non riteneva necessarie solide basi sperimentali, e la Biologia che era prevalentemente basata su osservazioni di caratteri morfologici non si avvaleva delle conoscenze della Chimica e della Fisica. I risultati raggiunti nella chimica degli acidi nucleici e delle proteine portarono invece i biologi a considerare le proteine come la componente più importante dei cromosomi. Ci si aspettava che la molecola responsabile dell'ereditarietà fosse stabile e molto complessa e permetesse di esistere in numerose forme per poter spiegare la diversità e la complessità delle forme viventi. La conoscenza della struttura delle proteine le indicava quali candidate a rispondere a tale requisiti. A quell'epoca le nozioni circa la struttura degli acidi nucleici rendevano difficile ascrivere ad essi la funzione di materiale ereditario.

NOTE E BIBLIOGRAFIA

1. 1 Johannsen W., Elemente der exakten Erblichkeitslehre, p. 143, Fischer G., Jena, 1909.
1. 2 Wiesmann A., Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung p. 56, Fisher G., Jena, 1885.
1. 3 Wilson E.B., The cell in development and heredity, 2 ed., p.358, Mac Millan, London, 1900.
1. 4 Idioplasma può essere considerato sinonimo di cromatina.
1. 5 Nägeli K., Zur Entwicklungsgeschichte des Pollens bei den Phanerogamen, p. 39, Orell and Fussli, Zurich, 1842.
1. 6 Portugal F.H. e Cohen J.S., A century of DNA, MIT Press, Cambridge, London, 1977, traduzione in italiano "Un secolo di DNA" Boringhieri, Torino.

2.

LA NATURA DEL GENE DOPO LA RISCOPERTA DELLE LEGGI DI MENDEL

Alla fine del primo decennio di questo secolo domina la dottrina di Johannsen introdotta con la sua definizione di gene, genotipo e fenotipo.

Nel 1909, W. Johannsen nel suo libro "Elemente der exakten Erblichkeitslehre" definisce in questi termini il gene:

....il (termine) "gene", che a noi interessa deriva dalla ben nota parola usata da Darwin (Pangenesi) e pertanto sostituisce l'indesiderabile ed ambiguo termine "determinante". Di conseguenza noi diremo semplicemente "il gene" ed "i geni" invece di "pangen" e "i pangeni". Il termine "ene" è completamente privo di alcuna ipotesi; esso esprime solo il fatto evidente, che in ogni caso, molte caratteristiche dell'organismo sono specificate nelle cellule germinali per mezzo di condizioni speciali, di basi, e determinanti, che sono presenti in uniche, separate, e quindi in modi indipendenti - in breve, quello che noi dovremmo chiamare geni.

A quei tempi non vi era alcuna relazione sperimentale tra gene e cromosomi. Secondo Johannsen il fenotipo era la manifestazione o comparsa del carattere, mentre con genotipo s'intendeva la base genetica per la comparsa del fenotipo.

Successivamente si arrivò ad identificare con il termine di mutazione le variazioni discontinue già note a Darwin, senza peraltro conoscere alcunchè del relativo meccanismo di insorgenza. Benchè la riscoperta delle leggi di Mendel fosse avvenuta ad opera di studiosi europei, e la moderna Genetica nascesse in Inghilterra nel 1906 nei primi due decenni del XX secolo i contributi più stimolanti vennero tuttavia dagli Stati Uniti.

Tra i biologi dell'epoca era molto vivo l'interesse sui possibili rapporti tra meccanica cromosomica (processo della mitosi e della meiosi) e i fenomeni dell'ereditarietà. Uno studente del laboratorio di Wilson, W.S.Sutton, studiava la maturazione degli spermatociti di una cavalletta, la *Brachystola magna*. Lo stu-

Medicina nei secoli (Supplemento)

dio dell'appaiamento degli omologhi e della sinapsi durante la meiosi condusse l'autore nel 1903 alle seguenti conclusioni:

.....L'unione delle cellule germinali, mediante la fecondazione, ciascuna con la metà del normale assetto cromosomico....., produce le combinazioni diverse osservate da Mendel (2.1).

Con molta acutezza Sutton arrivò alla generalizzazione che i determinanti genetici potevano essere localizzati sui cromosomi e nello stesso lavoro conclude:

.....Accettando queste conclusioni noi saremmo in grado di trovare una esatta corrispondenza tra il comportamento di un singolo cromosoma e il corrispondente carattere associato ad esso nell'organismo (2.1).

Sutton arriva anche ad anticipare che vi può essere più di un carattere sullo stesso cromosoma:

.....non abbiamo sinora indagato se un intero cromosoma o soltanto parte di esso deve essere considerato come la base di un singolo allelomorfo (unità di carattere). La risposta è inequivocabilmente a favore della seconda possibilità: d'altra parte il numero di caratteri diversi posseduti da ciascun individuo non potrebbe superare il numero dei cromosomi caratteristici delle cellule germinali, che è indubbiamente contrario ai fatti..... È possibile che il cromosoma possa essere diviso in entità più piccole.....e possono essere indipendentemente dominanti o recessive (2.1).

Indubbiamente l'uso della citologia congiunto allo studio dell'eredità dei caratteri aveva dato risultati incoraggianti. Negli anni 1910-11 alla Columbia University si venne a costituire un gruppo di ricercatori sotto la guida di T.H. Morgan. W.Castle gli aveva suggerito di usare per i suoi studi il moscerino della frutta, la *Drosophila melanogaster*. In quegli anni, insieme agli studenti C.B. Bridges ed A.H. Sturtevant, Morgan applicò la mutagenesi chimica e fisica allo studio dei caratteri ereditari. Egli notò che l'ereditarietà del carattere occhi bianchi (le mosche in natura hanno occhi rossi) aveva caratteristiche particolari

La natura del gene dopo la riscoperta delle leggi di Mendel

che potevano essere spiegate con una associazione di questo carattere (colore dell'occhio) con i cromosomi sessuali.

In un primo momento Morgan fu molto cauto nei confronti di questa sua scoperta dal momento che altri studi compiuti su farfalle non si accordavano con i suoi dati. Solo in seguito si capì che tali discrepanze erano dovute alla diversa determinazione del sesso dei due organismi, con il maschio eterogametico nella *Drosophila* ed omogametico nelle farfalle.

Proseguendo nel suo lavoro di mutagenesi in *Drosophila melanogaster* Morgan riscontrò che altri caratteri seguivano questa ereditarietà "strana" che poteva essere spiegata con la localizzazione sul cromosoma X dei caratteri colore dell'occhio, del corpo ed un tipo di ali ridotte.

In questo modo Morgan ed il "Drosophila group" diedero la dimostrazione che nella *Drosophila* più geni erano localizzati sul cromosoma X.

Successivamente questi stessi ricercatori arrivarono alla dimostrazione della associazione di più caratteri su uno stesso cromosoma. In un lavoro comparso nel 1911 Morgan descrive così il fenomeno:

.....In conseguenza, noi troveremo associazione per alcuni caratteri, e poca se non alcuna evidenza di associazione per altri caratteri; la differenza dipende dalla distanza lineare che separa il materiale cromosomico tra i fattori..... I risultati dipendono semplicemente dal modo con cui il materiale è localizzato nei cromosomi, e dall'unione dei cromosomi omologhi, e le proporzioni che risultano non sono altro che la espressione di un sistema numerico che dipende dalla posizione relativa dei fattori nei cromosomi. Invece della segregazione casuale nel senso Mendeliano noi troviamo la "associazione dei fattori" che sono localizzati quasi vicini nei cromosomi. La citologia fornisce il meccanismo che attendevamo (2.2).

Indubbiamente il gruppo di Morgan aveva trovato la strada giusta. Appena due anni dopo Sturtevant non solo arriva a postulare un arrangiamento lineare dei caratteri ereditari sul cromosoma, ma propone anche che l'associazione tra i caratteri

dipenda dalla loro distanza e che la frequenza del crossing-over (scambio) tra cromatidi possa essere convertita in una misura lineare della distanza tra i caratteri.

La scelta della Drosofila come oggetto di studi genetici permise progressi molto rapidi: nel 1915 Sturtevant ipotizzò che un dato fenotipo (ad es. carattere occhi bianchi o rossi) può essere determinato dal concorso di più geni. Tale idea, concettualmente molto avanzata, fu formulata senza inferire nulla sulla modalità con cui il gene arriva a determinare il carattere. Riportiamo il passo in questione:

Sebbene sappiamo poco circa la natura dei geni Mendeliani, sappiamo che non sono "determinanti" nel senso Weissmaniano. Questo è vero nel caso seguente. La differenza tra il (selvatico) occhio rosso e non colorato (bianco) nella drosofila è dovuto alla differenza in un singolo gene. Il rosso è un colore complesso, che richiede l'interazione di almeno cinque (e forse anche di più) geni diversi per la sua produzione. E questi geni sono completamente indipendenti, ogni cromosoma porta qualcuno di loro. Tuttavia, il colore degli occhi è dipendente in maniera indiretta da un gran numero di altri geni, come quelli dai quali dipende la vita della mosca. Noi non possiamo, allora, in alcun senso identificare un singolo gene con il colore rosso dell'occhio, anche se c'è un solo gene che differenzia l'occhio in assenza di colore..... Ciò significa che quando noi parliamo di un gene per gli occhi rosa, è un gene che differenzia una mosca con occhi rosa da quella normale - non un gene che produce gli occhi rosa *per sé*, il carattere occhi rosa dipende dall'azione di numerosi altri geni (2.3).

Quale significato generale si trasse dai risultati ottenuti dagli studi sulla Drosofila?

Innanzitutto si era dimostrato sperimentalmente che i geni erano localizzati sui cromosomi, cosa precedentemente solo intuita o supposta. Inoltre, si era arrivati ad immaginare un ordine lineare dei geni lungo il cromosoma (la mappa del cromosoma 2 e della X confortano questa idea).

In terzo luogo, la costituzione genetica di un individuo, durante la meiosi poteva subire dei rimaneggiamenti (lo scambio) formando quelle combinazioni diverse che spiegavano la grande variabilità osservata tra gli individui.

Questi risultati aprivano una nuova prospettiva su natura e funzione dei geni. Anche in questo campo il contributo del "Drosophila group" fu di notevole importanza, sebbene, come vedremo in seguito, le loro idee non fossero esenti da critiche.

Nel 1916 dopo una certa riluttanza, come ci fa sapere Muller, Morgan si convinse della validità dell'ipotesi di Sutton sull'interpretazione cromosomica dei fenomeni Mendeliani:

A priori non vi è alcun motivo perché numerosi cambiamenti mutativi non possano aver luogo nello stesso locus di un cromosoma. Se noi pensiamo che un cromosoma sia fatto da una catena di particelle chimiche, vi potrebbe essere un numero di ricombinazioni o riarrangiamenti all'interno di ciascuna particella (geno). Ogni cambiamento potrebbe avere un effetto sul prodotto finale dell'attività della cellula e dar luogo ad un nuovo mutante (2.4).

Due anni prima Muller si esprimeva in questi termini circa la possibile localizzazione dei geni sui cromosomi:

.....È difficile pensare che i gruppi di geni più grandi (gruppi di associazione) dovrebbero seguire la distribuzione dei cromosomi più grandi senza immaginare la connessione tra geni e cromosomi, al punto che i geni siano particelle materiali realmente localizzate e facenti parte del cromosoma con il quale vengono trasportate (2.5).

Queste considerazioni di Morgan e Muller ebbero notevole rilievo. In primo luogo, un consistente gruppo di ricercatori, il Drosophila group, proponeva una base fisica dei geni, pur non suggerendo nulla sulla loro natura. Inoltre cominciava ad intravedersi una relazione stretta tra cromosoma (inteso come latore delle informazioni ereditarie) e presenza in esso di "catene di particelle chimiche". Era stata dimostrata, infine, la presenza di più alleli ad locus (colore degli occhi in Drosophila).

Non dobbiamo però ritenere che tali risultati fossero universalmente accettati: la teoria di Morgan e Muller venne infatti vivacemente contrastata da R. Goldschmidt, il quale, riprendendo la teoria della Pangenesi di de Vries, sosteneva che

i cromosomi costituissero semplicemente un veicolo per i geni. I geni al termine della divisione cellulare lasciavano i cromosomi per entrare nel metabolismo cellulare e ritornare infine nei cromosomi stessi.

Nel 1922 erano stati localizzati sul quarto cromosoma della *Drosophila* circa 2000 geni. Morgan cercò di stimare la dimensione del gene avvalendosi del seguente ragionamento. Poiché il cromosoma 4 misura 7,5 micron ed ha una "larghezza" di 0,2 micron calcolando il volume e dividendo poi per il numero dei geni, si ottiene, come diametro di un gene, un valore di 0,02 micron. Questi calcoli portavano Morgan a concludere:

Non è privo di interesse comparare queste stime con le dimensioni delle molecole organiche. La molecola dell'emoglobina ha (un diametro) di 2,5/1.000 di micron, e quella della caseina ha valori simili. La dimensione di un gene sulla base di queste stime sembra essere più grande, ma non molto più grande di molte molecole proteiche (2.6).

È evidente che Morgan accettasse l'ipotesi che la sostanza genetica fosse di natura proteica, confortato in questa sua idea dal fatto che i dati ottenuti nello studio del virus del Mosaico del Tabacco dimostravano che esso era costituito dal 90% di proteine.

Usando i raggi X per indurre mutazioni in drosofila Muller ottenne numerosi ceppi mutanti, i cui cromosomi mostravano cospicue alterazioni della loro forma. Ciò costituiva un'altra evidenza del rapporto tra cromosomi ed ereditarietà.

Nel 1914 per indurre mutazioni in drosofila vennero usati i raggi ultravioletti: in questo caso si ottenevano mutanti che non mostravano alterazioni della struttura dei cromosomi.

Dall'inizio del secolo si sapeva che gli acidi nucleici e le proteine avevano un assorbimento diverso se attraversate da radiazioni UV. Poiché era noto che i raggi X non erano in grado di rompere un legame peptidico le radiazioni ultraviolette, più deboli di quelle X, non potevano indurre rotture di legami peptidici. Per sanare questa discrepanza tra le rotture cromosomiche

che indotte dalle radiazioni X e la supposta natura proteica dei geni, Muller propose che la radiazione colpisce il cromosoma in modo particolare:

Poiché sappiamo che una molecola proteica non può essere divisa in due parti senza produrre la rottura di un legame peptidico - almeno questo sostengono le più comuni teorie su queste molecole - risulta molto probabile che le nostre grosse rotture cromosomiche, siano rotture, almeno, tra queste grandi molecole piuttosto che al loro interno (2.7).

Benché qui si possa apprezzare l'idea che il gene fosse una macromolecola, le speculazioni di Muller per sostenere la natura proteica del materiale ereditario ci appaiono ora ingenue e denunciano l'ignoranza della chimica e della fisica, condivise peraltro dalla maggioranza dei biologi dell'epoca. Una volta accertato che il gene è una macromolecola, la ragione che faceva propendere verso una sua natura proteica e non nucleica consisteva nel fatto che gli acidi nucleici erano un insieme di tetranucleotidi, e quindi poco eterogenei per costituire la base fisica dei caratteri ereditari. In tali condizioni era inevitabile pensare che i geni fossero molecole proteiche.

È opinione comune tra gli epistemologi che i Genetisti non si interessarono, se non marginalmente, alla natura chimica del materiale ereditario, lasciando tale compito ad altri.

È bene ricordare tra i tanti ricercatori che cercarono di arrivare a determinare la base chimica del materiale ereditario, A. Garrod che si occupò della base chimica delle malattie ereditarie e F. Griffith che iniziò gli studi sulla trasformazione batterica, proseguiti dalla scuola di Avery. Alla soluzione di questo problema hanno contribuito in seguito in modo determinante gli esperimenti sulla trasformazione batterica.

A sostegno dello scarso interesse dei genetisti per la base fisica del materiale ereditario citiamo un passo della relazione che Morgan tenne nel 1933 in occasione del conferimento del premio Nobel:

Ora che li localizziamo nei cromosomi, abbiamo ragione di considerarli come unità materiali, come corpi chimici di ordine su-

Medicina nei secoli (Supplemento)

periore alle molecole? Francamente, questi sono interrogativi che il genetista non si è posto molto, se non saltuariamente, per congetturate sulla natura degli elementi postulati. Non vi è alcun consenso di opinioni tra i genetisti circa quello che i geni sono - se essi realmente esistono oppure se sono finti - in quanto, al livello in cui si svolgono gli esperimenti di genetica, non fa la benchè minima differenza che un gene sia una unità ipotetica o una particella materiale. In ambedue i casi, l'unità è associata con un cromosoma specifico e può esservi localizzata mediante una analisi puramente genetica. Quindi, se il gene è un'unità materiale, è un segmento di cromosoma; se è un'unità fittizia, deve essere riferita a una ben definita localizzazione su un cromosoma: nella stessa sede dell'ipotesi precedente. Non fa alcuna differenza, per la ricerca genetica nella sua realtà, quale dei due punti di vista è accolto (2.8).

Indubbiamente una affermazione del genere può farci chiedere perché i genetisti, dopo più di trenta anni di ricerche avessero una visione del gene non molto diversa da quella che aveva W. Johannsen, che nel 1909 affermava che:

il termine gene è privo di alcuna ipotesi (2.9).

NOTE E BIBLIOGRAFIA

2. 1 Sutton W.S., On the morphology of the chromosome group in *Brachistola magna*, the chromosome in heredity, Biol.Bull. 4 (1903) 233.
2. 2 Morgan T.H., Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance, Science 34 (1911) 384.
2. 3 Sturtevant A.H., The behaviour of the chromosomes as studied through linkage, Ziet-schrift fur inductive Abstammungs und Vererbungslehre, 13 (1911) 265.
2. 4 Morgan T.H. e Bridges C.B., Sex linked inheritance in *Drosophila*, Carnegie Institution of Washington, n. 237 (1916) 13.
2. 5 Müller H.J., A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*, J.Exp.Zool. 17 (1914) 325.
2. 6 Morgan T.H., On the mechanism of heredity, Proc. Roy. Soc. Biol. 94 (1922) 196.
2. 7 Muller H.J., Induced mutations in *Drosophila*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 9 (1941) 184.
2. 8 Morgan T.H., The relation of genetics to physiology and medicine, in Autori vari, letture del Nobel, Fisiologia e Medicina 1922-1941, p.313, 1933, Elsevier Amsterdam, 1965.
2. 9 Johannsen W., Elemente der exakten Erblichkeitslehre, p. 143, Fischer G., Jena, 1909.

3.

I CONTRIBUTI "NON GENETICI" ALLA DEFINIZIONE DELLA NATURA FISICA DEL GENE

Mentre i genetisti ponevano la loro attenzione esclusivamente sui meccanismi dell'eredità, altri intrapresero lo studio della natura delle molecole responsabili di tali meccanismi. Benchè già all'inizio del XX secolo alcuni biologi ritenevano che l'acido nucleico, componente della nucleina, fosse implicato nell'eredità, tale ruolo fu in seguito attribuito unicamente alle proteine, in quanto ritenute le uniche molecole dotate delle caratteristiche richieste al materiale ereditario.

Sarebbe erroneo pensare che la scoperta del DNA, della sua natura e della sua funzione biologica sia avvenuta in pochi anni e per merito di un ristretto numero di scienziati: fù necessario infatti più di un secolo di ricerche. Non possiamo non concordare con Portugal e Cohen quando nel loro libro "A Century of DNA. A history of the discovery of the structure and function of the genetic substance" si riferiscono a questo secolo di ricerche:

Un numeroso gruppo di ricercatori che lavorava in numerosi campi diversi contribuì al risultato finale, ma pochi, ricevettero di più di una soddisfazione personale dovuta all'aver partecipato a questo noioso, ed attentissimo lavoro. Le scoperte più recenti appaiono particolarmente eccitanti poichè sono avvenute in un'epoca nella quale la gran parte del "puzzle" era stato completato suggerendo la tanto sospirata soluzione. Il "puzzle" cominciò, comunque, con la scoperta del DNA nel 1869.

La storia di questa straordinaria scoperta è veramente interessante. J.F. Miescher, che si occupava di ricerche sulle cellule linfoidi e di processi infiammatori, lavorava nel laboratorio diretto dal Dr. Hoppe-Seyler a Tubinga. Egli si proponeva di identificare e caratterizzare un gruppo di sostanze, chiamate proteine, scoperte circa trenta anni prima da G.E. Mulder. Le

Medicina nei secoli (Supplemento)

periore alle molecole? Francamente, questi sono interrogativi che il genetista non si è posto molto, se non saltuariamente, per congetturate sulla natura degli elementi postulati. Non vi è alcun consenso di opinioni tra i genetisti circa quello che i geni sono - se essi realmente esistono oppure se sono finti - in quanto, al livello in cui si svolgono gli esperimenti di genetica, non fa la benchè minima differenza che un gene sia una unità ipotetica o una particella materiale. In ambedue i casi, l'unità è associata con un cromosoma specifico e può esservi localizzata mediante una analisi puramente genetica. Quindi, se il gene è un'unità materiale, è un segmento di cromosoma; se è un'unità fittizia, deve essere riferita a una ben definita localizzazione su un cromosoma: nella stessa sede dell'ipotesi precedente. Non fa alcuna differenza, per la ricerca genetica nella sua realtà, quale dei due punti di vista è accolto (2.8).

Indubbiamente una affermazione del genere può farci chiedere perché i genetisti, dopo più di trenta anni di ricerche avessero una visione del gene non molto diversa da quella che aveva W. Johannsen, che nel 1909 affermava che:

il termine gene è privo di alcuna ipotesi (2.9).

NOTE E BIBLIOGRAFIA

2. 1 Sutton W.S., On the morphology of the chromosome group in *Brachistola magna*, the chromosome in heredity, Biol.Bull. 4 (1903) 233.
2. 2 Morgan T.H., Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance, Science 34 (1911) 384.
2. 3 Sturtevant A.H., The behaviour of the chromosomes as studied through linkage, Ziet-schrift fur inductive Abstammungs und Vererbungslehre, 13 (1911) 265.
2. 4 Morgan T.H. e Bridges C.B., Sex linked inheritance in *Drosophila*, Carnegie Institution of Washington, n. 237 (1916) 13.
2. 5 Müller H.J., A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*, J.Exp.Zool. 17 (1914) 325.
2. 6 Morgan T.H., On the mechanism of heredity, Proc. Roy. Soc. Biol. 94 (1922) 196.
2. 7 Muller H.J., Induced mutations in *Drosophila*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 9 (1941) 184.
2. 8 Morgan T.H., The relation of genetics to physiology and medicine, in Autori vari, letture del Nobel, Fisiologia e Medicina 1922-1941, p.313, 1933, Elsevier Amsterdam, 1965.
2. 9 Johannsen W., Elemente der exakten Erblichkeitslehre, p. 143, Fischer G., Jena, 1909.

3.

I CONTRIBUTI "NON GENETICI" ALLA DEFINIZIONE DELLA NATURA FISICA DEL GENE

Mentre i genetisti ponevano la loro attenzione esclusivamente sui meccanismi dell'eredità, altri intrapresero lo studio della natura delle molecole responsabili di tali meccanismi. Benchè già all'inizio del XX secolo alcuni biologi ritenevano che l'acido nucleico, componente della nucleina, fosse implicato nell'eredità, tale ruolo fu in seguito attribuito unicamente alle proteine, in quanto ritenute le uniche molecole dotate delle caratteristiche richieste al materiale ereditario.

Sarebbe erroneo pensare che la scoperta del DNA, della sua natura e della sua funzione biologica sia avvenuta in pochi anni e per merito di un ristretto numero di scienziati: fù necessario infatti più di un secolo di ricerche. Non possiamo non concordare con Portugal e Cohen quando nel loro libro "A Century of DNA. A history of the discovery of the structure and function of the genetic substance" si riferiscono a questo secolo di ricerche:

Un numeroso gruppo di ricercatori che lavorava in numerosi campi diversi contribuì al risultato finale, ma pochi, ricevettero di più di una soddisfazione personale dovuta all'aver partecipato a questo noioso, ed attentissimo lavoro. Le scoperte più recenti appaiono particolarmente eccitanti poichè sono avvenute in un'epoca nella quale la gran parte del "puzzle" era stato completato suggerendo la tanto sospirata soluzione. Il "puzzle" cominciò, comunque, con la scoperta del DNA nel 1869.

La storia di questa straordinaria scoperta è veramente interessante. J.F. Miescher, che si occupava di ricerche sulle cellule linfoidi e di processi infiammatori, lavorava nel laboratorio diretto dal Dr. Hoppe-Seyler a Tubinga. Egli si proponeva di identificare e caratterizzare un gruppo di sostanze, chiamate proteine, scoperte circa trenta anni prima da G.E. Mulder. Le

stesse parole di Miescher ci riveleranno come si giunge alla in-sperata scoperta.

Innanzitutto feci un tentativo per vedere se fosse possibile otte-nere sostanze dal protoplasma purificato, vale a dire separato dal nucleo.....Nell'esperimento in cui impiegavo soluzioni debolmen-te alcaline per neutralizzarle si determinavano dei precipitati, che risultavano insolubili sia in acqua che in soluzioni di cloruro di sodio e pertanto non potevano appartenere ad alcuna delle pro-teine conosciute sino ora.Dove veniva quel materiale?..... Esa-minando le cellule purulente sotto il microscopio notò che trat-tamenti con soluzioni debolmente alcaline provocava un rigon-fiamento del nucleo ed a volte anche la sua rottura.In ac-cordo con le conoscenze dell'istologia, la sostanza avrebbe potu-to appartenere al nucleo e perciò mi affascinò. L'approccio più razionale fu quello di purificare i nuclei (3.1).

Dopo numerosi insuccessi decise di usare un enzima la pep-sina. Purificata la pepsina dallo stomaco del maiale, trattò le cellule per numerose ore: il sedimento osservato al microscopio risultò costituito da nuclei puri. Li trattò come aveva fatto in precedenza ed ottenne ancora il precipitato insolubile. Alla fine dell'agosto del 1869 Miescher aveva ottenuto gli stessi ri-sultati usando cellule di lievito, di rene, di fegato e di testicolo.

A Miescher non restava che determinare la composizione ele-mentare della sostanza; e in ciò fu aiutato dall'analisi eseguita a Tubinga che indicò una elevata presenza di fosforo ed un rap-porto P/N veramente unico.

Miescher si convinse che:

non posso chiudere la mia mente all'idea della essenzialità del P (fosforo) (3.1).

In quegli anni Miescher credeva che la sostanza da lui isola-ta, che chiamò nucleina, non fosse altro che un sistema di ac-cumulo di fosforo per le esigenze della cellula. La scoperta del-la nucleina non fu accettata facilmente: nel dicembre dello stesso anno Miescher sottopose il lavoro per la pubblicazione al Me-dical Chemical Journal, ma incontrò molte difficoltà da Hoppe-

Seyler, al punto che il lavoro non fu pubblicato prima del 1871. D'altra parte gli studi di Miescher erano molto discontinui e si interessavano a numerosi problemi diversi che esulavano dal-la nucleina.

Nella primavera del 1872 Miescher comunicò alla Basel So-ciety for Biological Research che nei nuclei degli spermatozoi dei salmoni, insieme alla nucleina, trovava una nuova sostanza proteica che chiamò protamina. Nel 1878 descrisse la com-po-sizione elementare della nucleina che risultò $C_{29} H_{49} N_9 P_3 O_{33}$. Nel 1889 R. Altmann riuscì ad ottenere la nucleina priva di pro-teine e suggerì per questo composto ricco di fosforo il nome di acido nucleico.

Nel 1893 Miescher scriveva:

La continuità risiede non soltanto nella forma, ma anche più pro-fondamente nelle molecole chimiche. Essa risiede nella struttu-ra dei gruppi atomici. In questo senso io sono un sostenitore con-vinto della teoria chimica dell'ereditarietà. (3.2)

Successivamente egli si poneva in termini ancora più critici rispetto alla sua proposta ed aggiungeva:

È esclusivamente la sostanza od è la forma così come tale che vie-ne ereditata? (3.2)

L'opera venne così ricordata nell'elogio funebre fatto dal Prof. C. Ludwig:

...completi ed immortali studi il cui punto focale era la conoscen-za del nucleo, e così i successori in tali ricerche, in tutti i paesi, ricorderanno le sue ricerche come pionieristiche nel campo (3.3)

Miescher morì nell'agosto 1895, 26 anni dopo la scoperta della nucleina. Benchè sia la funzione biologica di tale sostanza che la sua struttura chimica fossero del tutto oscure (e ben pochi credessero che la nucleina avesse a che fare con i fenomeni ere-ditari), Miescher, aveva fondato una solida scuola: un suo stu-diente, A. Kossel, proseguì gli studi tesi a chiarire la composi-

zione chimica della nucleina. Nel 1879 appare il suo primo contributo sulla nucleina e nel 1910 egli viene proposto per il premio Nobel in Medicina.

Kossel per prima cosa aveva cercato di capire se la nucleina estratta da cellule diverse contenesse gli stessi componenti e nel 1885 dimostrò che in essa erano presenti le basi azotate adenina, xantina ed ipoxantina.

Nel 1893, con l'aiuto di A. Neumann, Kossel descrisse una nuova base la timina, e nello stesso anno propose l'esistenza di almeno quattro tipi di acidi nucleici, ciascuno caratterizzato da una sola base azotata.

Successivamente, Kossel si avvalse di un'altra procedura sperimentale per identificare i componenti degli acidi nucleici. Dopo l'idrolisi dell'acido nucleico estratto da timo di vitello, trattava il precipitato con differenti concentrazioni di acido, con tempi d'idrolisi e temperature diverse. Con queste tecniche Kossel e Neumann identificarono nell'acido nucleico di timo: timina, adenina, citosina, acido levulinico e come prodotti di degradazione ac.formico, ammoniaca e fosforo. A. Ascoli in un suo lavoro attribuisce a Kossel la scoperta di un'altra base azotata, l'uracile.

A quei tempi erano noti due tipi di acido nucleico: quello estratto dalle cellule di lievito e quelle del timo di vitello.

I ricercatori di quell'epoca non sapevano che il primo è una buona fonte di RNA e il secondo di DNA, e non sapevano neanche che le cellule eucariotiche contengono ambedue gli acidi nucleici, anche se in proporzioni diverse. Si credeva invece che l'acido nucleico estratto dal lievito fosse caratteristico delle piante, mentre quello estratto dal timo fosse caratteristico delle cellule animali.

Per arrivare a definire la natura degli zuccheri presenti negli acidi nucleici furono necessarie molte ricerche. Infatti, benché una prima scoperta sia addirittura del 1893 (per opera di O. Hammersten che isolò dal DNA estratto dal pancreas uno zucchero identificato come un pentoso), la definitiva identificazione degli zuccheri presenti nei nucleotidi avvenne nel 1910.

Uno dei motivi di questo ritardo, oltre all'inefficienza delle tecniche dell'epoca, va ricercato anche nel contesto culturale nel quale tali ricerche venivano condotte. Infatti, così come Miescher aveva ritenuto che l'alto contenuto in P degli acidi nucleici li rendesse null'altro che una riserva di fosforo per la cellula, anche Kossel per molto tempo pensò che gli acidi nucleici non costituissero altrettanto una fonte di carboidrati per l'organismo.

Kossel fu invitato a tenere una "Harvey Lecture" nell'ottobre del 1911. In questa occasione egli espose le sue opinioni sulla biochimica della cellula ed introdusse il concetto di "Baustine" (elementi strutturali):

Il termine 'Baustine' indicava che queste unità potevano essere unite per formare strutture più grandi e la loro unione aveva luogo secondo un piano determinato o una idea. Attraverso la unione di "Baustine" si formano aggregati più ampi che noi chiamiamo sia proteine, grassi, ac.nucleici, fosfatidi, polisaccaridi a seconda dei casi.

D'altro canto, le "Baustine" non sono le unità più piccole dei tessuti viventi, esse stesse sono costituite da un certo numero di atomi diversi, comunemente carbonio, idrogeno, azoto, ossigeno e zolfo. Esse sono, tuttavia, non soltanto unità anatomiche o strutturali ma anche unità fisiologiche. (3.4)

In questa lunga serie di ricerche tese ad elucidare la struttura degli acidi nucleici, merita di essere menzionato un altro ricercatore P.A.T. Levene. Egli, insieme a W.A. Jacobs, ottenne nel 1909 dal nucleoside dell'inosina e della guanosina uno zucchero, il D-riboso, in forma cristallina. Nello stesso anno questi Autori introdussero i termini nucleoside e nucleotide. Nel 1930 Levene e i suoi collaboratori ottennero dal timo di vitello il 2-deossi-riboso mediante azione enzimatica e successiva idrolisi con acidi diluiti.

Essendo così giunti all'identificazione ed alla purificazione di tutti i componenti degli acidi nucleici, per formare un acido nucleico non restava che spiegare come sono uniti i singoli componenti, i nucleotidi. Questo obiettivo, tuttavia, sarà raggiunto solo nel 1953 ad opera di Watson e Crick.

C'era invero difficoltà ad isolare gli acidi nucleici, ma soprattutto sino agli anni 40 nessuno pensava agli ac. nucleici come macromolecole. Un ostacolo notevole alla considerazione macromolecolare dell'ac. nucleico è da attribuire a Levene e Jacobs per la loro ipotesi del tetranucleotide.

Kossel e Neumann nel 1893 avevano trovato nell'ac. nucleico un rapporto quantitativo di due purine con due pirimidine. Nel 1902 T.B. Osborne ed I.F. Harris riportarono per l'ac. nucleico estratto dal lievito i rapporti seguenti: guanina, adenina, due uracili e quattro atomi di fosforo. Solo nel 1909 Levene ipotizzò che gli ac. nucleici contenessero quattro basi in proporzioni equimolecolari (3.5). Nel 1914 W. Jones confermò questi risultati, i quali assieme ai dati di sedimentazione che indicavano un peso molecolare di 1500 (3.5), indussero Levene a formulare l'ipotesi del tetranucleotide.

Le tecniche di estrazione dell'ac. nucleico erano altamente degradative (attacchi nucleolitici) e l'azione delle idrolisi acide od alcaline determinavano dimensioni tali da far pensare che la molecola di DNA non fosse costituita da più di quattro nucleotidi.

È accaduto spesso nella storia delle scoperte scientifiche che quando si ritiene di essere ad un punto morto, una nuova scoperta, anche se in un campo apparentemente lontano dalla ricerca principale, apre nuovi ed inattesi orizzonti. Fu così che nel 1924, E. Hammersten, utilizzando una tecnica ideata da I. Bang, separò gli istoni dall'acido nucleico mediante azione di alte concentrazioni di cloruro di sodio. Procedendo con molta attenzione e raffinando le tecniche di estrazione del DNA, Hammersten e successivamente un suo studente T. Caspersonn arrivarono a preparare DNA con pesi molecolari sino a 250.000.

Tra il 1920-30 T. Svedberg usando la tecnica della ultracentrifugazione arrivò a determinare per molecole di DNA pesi di decine di migliaia di dalton.

Quando Caspersonn nel 1934 tentò di filtrare il DNA per purificarlo dalle proteine, notò con sorpresa che esso rimaneva attaccato al filtro.

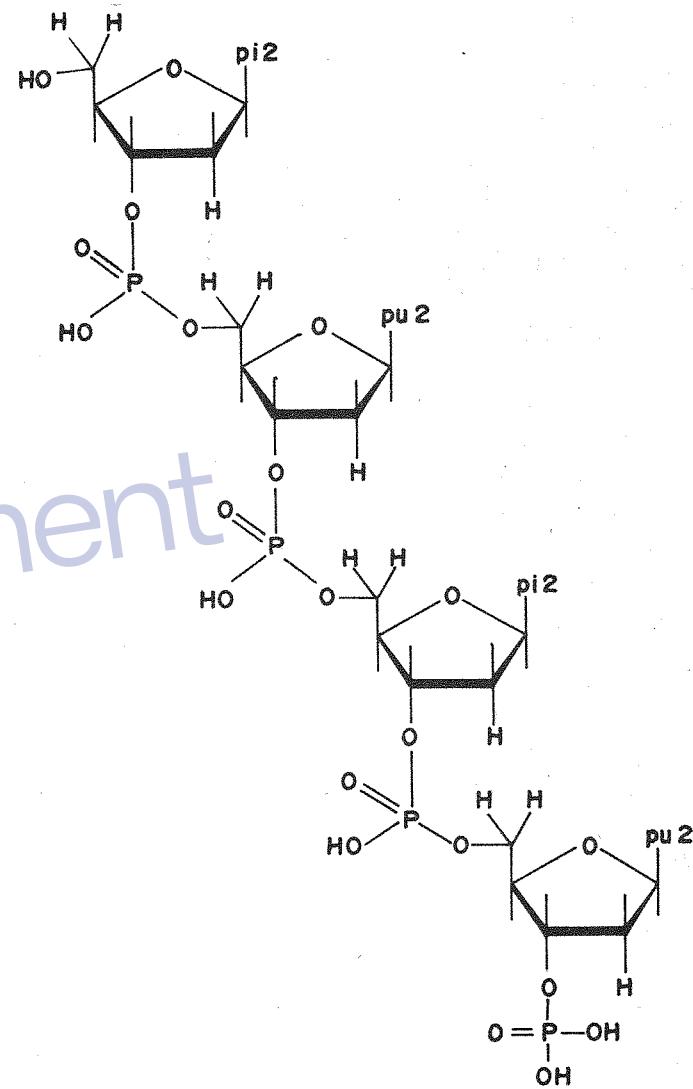


Figura 1 Modello che raffigura l'ipotesi del tetranucleotide. Nella figura *pir* sta per base pirimidinica e *pur* per base azotata purinica.

Medicina nei secoli (Supplemento)

....Il fatto stupefacente era che i complessi di acido nucleico devono essere più grandi delle molecole proteiche. (3.6)

L'idea che il DNA fosse una macromolecola era ormai matura e lo stesso Levone nel 1931 arrivò a considerare che il DNA fosse un colloide. In quegli anni infatti le sostanze che mostravano alti pesi molecolari erano considerate molecole colloidali, ovvero aggregati molecolari tenuti insieme da legami ionici. Poichè lo stato delle conoscenze sulle macromolecole era limitato alla proposizione di uno stato colloidale della materia, si pensava che il DNA potesse essere un aggregato di tetranucleotidi.

Agli inizi degli anni venti H. Staudinger conduceva le sue ricerche sulle proteine che considerò molecole di grandi dimensioni, chiamandole macromolecole o polimeri (3.7), nei quali i singoli componenti erano legati tra loro con legami covalenti.

Queste scoperte, tuttavia, non destarono troppa attenzione nel mondo scientifico. Caspersonn, considerando del tutto accidentale la scoperta della natura macromolecolare del DNA e non credendo che i quattro nucleotidi potessero costituire una molecola così complessa come deve essere il latore delle informazioni ereditarie, manifestò l'intenzione di cercare un metodo che evidenziasse nei nuclei delle eventuali strutture proteiche.

Un qualche mutamento nel mondo scientifico si era comunque prodotto, se J.M. Gulland, un illustre biochimico degli acidi nucleici, poteva così affermare alla Chemical Society of London nel 1938:

sino a poco tempo addietro si pensava che i nuclei di tutte le cellule vegetali contenessero un solo acido nucleico, mentre un altro acido nucleico, simile alla costituzione, ma con dettagli diversi, caratterizza le cellule animali. Questa generalizzazione non è più accettabile (3.8)

Lo stesso ricercatore alla stessa Società avvalorò nel 1943 la idea che il DNA fosse una macromolecola:

I contributi "non genetici" alla definizione della natura fisica del gene

...la concezione di una molecola costituita da tetranucleotidi polimerizzati ha ricevuto conferma dalle indagini che dimostrano alti pesi molecolari... (3.9)

Egli suggeriva che i rapporti tra le basi potessero essere "statistici", ma in maniera sorprendentemente contraddittoria raccomandava come ipotesi pratica di lavoro l'idea di un polite-tranucleotide.

Tra i contributi non strettamente genetici dobbiamo ricordare anche alcuni studi di biologia cellulare.

Nel 1914 Feulgen mise a punto una reazione colorimetrica per titolare il DNA (3.10), e nel 1923 questa tecnica divenne applicabile ai nuclei di cellule contenute in sezioni di tessuto. Caspersonn arrivò a rendere quantitativa questa reazione, usando una lampada all'ultravioletto connessa ad un citofotometro. Notò così che durante la meiosi:

...nel periodo tra l'inizio del leptotene, in cui difficilmente si può individuare nei nuclei una qualsiasi sostanza che assorba all'ultravioletto, e lo sviluppo delle tetradi complete, ricche di acidi nucleici, si deve evidentemente avere una nuova sintesi genuina di DNA (3.11)

Poiché l'interfase e la successiva profase erano correlate con la perdita o con una nuova sintesi di sostanze assorbenti (DNA), questa sostanza doveva essere essenziale per la duplicazione dei cromosomi. Nello stesso lavoro Caspersonn attribuì agli acidi nucleici una funzione di sostegno del materiale ereditario: si può dire che da allora in poi il gene verrà considerato una nucleoproteina.

Per concludere, si può dire che sia il metodo diretto (biochimico) che quello indiretto (genetico) fallirono nel raggiungere il risultato che si erano prefissi: l'identificazione del materiale ereditario.

Ricorda J. Brachet, già allora protagonista della ricerca biologica, che nel 1931 un testo fondamentale come "Chemical Embryology" di J. Needham dedicava soltanto 16 pagine, su di un totale di 1724, alla nucleina e i derivati dell'azoto. Ciò non era

tuttavia sorprendente, ricorda Brachet, perchè a quel tempo tutti erano interessati alla produzione di energia da parte della cellula, al metabolismo intermedio ed ai meccanismi molecolari delle ossidazioni, e ben pochi ricercatori si interessavano agli acidi nucleici. Infine, benchè lo stesso J. Brachet avesse dimostrato che l'RNA in qualche modo dirige la sintesi delle proteine (3.12), questo risultato non destò troppo interesse visto che molti dei biochimici dell'epoca pensavano alla sintesi proteinica come il processo inverso della proteolisi.

Schultz e Caspersonn, che utilizzarono i metodi citochimici per studiare il DNA come latore delle informazioni ereditarie, arrivarono alla conclusione che l'RNA dei cromosomi salivari della drosofila è sintetizzato sotto il controllo delle circostanti sequenze di DNA (3.13).

NOTE E BIBLIOGRAFIA

3. 1 Miescher F., Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen, Hoppe-Seyler's Medizinisch-Chemischen Untersuchungen, 4 (1871) 441.
3. 2 Miescher F., Die histomischen und physiologischen Arbeiten, ed. W. His, Vogel, Leipzig vol. 1 pag 6 1936.
3. 3 ibid. pag. 34
3. 4 Kossel A., The chemical composition of the cell, Harvey Lectures, 7 (1911) 35.
3. 5 Levene P.A., The structure of Yeast nucleic acid, J. Biol. Chem., 31 (1917) 591.
3. 6 Caspersonn T., Druckfilterung von Thymonucleinsäure, Biochem. Zeit., 270 (1934) 161.
3. 7 Staudinger H., Über Polymerization, Ber. Deutsche Chem. Gesell., 53 (1920) 1073.
3. 8 Gulland J.M., Nucleic Acids, J. Chem. Soc., 203 (1938) 1722.
3. 9 Gulland J.M., Some aspects on the chemistry of nucleotides, J. Chem. Soc., 208 (1943)
- 3.10 Feulgen R. e Rossenbeck G., Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Tymus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten, Hoppe-Seyler's Zeit, Physiol. Chem. 135 (1924) 203.
- 3.11 Caspersonn T., Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zelkerns, Acta Med. Skand., 83 (8) (1936) 1.
- 3.12 Brachet J., La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'Amphibiens en voie de développement, Arch. Biol. 53 (1942) 205.
- 3.13 Schultz J. e Caspersonn T., Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 26 (1940) 507.

4.

ALLA RICERCA DI UNA FUNZIONE PER IL DNA

Alla fine degli anni trenta la Genetica era giunta alla conclusione che un allele controlla una differenza in un carattere. La differenza tra un allele e l'altro presumibilmente doveva consistere nella presenza o nella assenza di una reazione chimica, la quale a sua volta era forse controllata da un enzima. L'enzima veniva considerato come il prodotto primario del gene, a meno che, enzima e gene non fossero addirittura la stessa cosa.

Proprio quando sia lo studio diretto (della costituzione chimica del DNA e dei cromosomi) che quello indiretto (tentativo di conoscere la natura del gene studiandone il prodotto finale, il carattere) si erano rivelati infruttuosi, un fenomeno molto particolare come la trasformazione batterica, assunse un ruolo centrale nella dimostrazione che il gene non era di natura proteinica, bensì un acido nucleico.

I due scienziati che, con i loro lavori sulla trasformazione batterica e sulla identificazione della sostanza trasformante, contribuirono in maniera determinante a svelare la natura del gene furono F.Griffith e O.T. Avery. Le loro ricerche erano tese a scoprire la natura della sostanza chimica che rende patogeni gli Pneumococci responsabili della polmonite.

Negli Stati Uniti agli inizi del secolo tale malattia era una delle principali cause di morte.

Griffith era occupato come microbiologo in un laboratorio del Ministero della Sanità ed aveva notato in una zona dell'Inghilterra un fatto estremamente interessante. Nel volgere di pochi anni, nella zona di Smethwick un tipo di pneumococco era diventato molto diffuso a scapito di un altro tipo che era praticamente scomparso. Nel tentativo di comprendere la base del fenomeno cercò nel suo laboratorio di determinare quale(i) fattore(i) fossero implicati nella conversione di un tipo di pneumococco nell'altro tipo all'interno dell'ospite. In particolare, la sua attenzione si rivolse ad un tipo di pneumococco detto R (rough = rugoso), privo della capsula che riveste la cellula ed

tuttavia sorprendente, ricorda Brachet, perchè a quel tempo tutti erano interessati alla produzione di energia da parte della cellula, al metabolismo intermedio ed ai meccanismi molecolari delle ossidazioni, e ben pochi ricercatori si interessavano agli acidi nucleici. Infine, benchè lo stesso J. Brachet avesse dimostrato che l'RNA in qualche modo dirige la sintesi delle proteine (3.12), questo risultato non destò troppo interesse visto che molti dei biochimici dell'epoca pensavano alla sintesi proteinica come il processo inverso della proteolisi.

Schultz e Caspersonn, che utilizzarono i metodi citochimici per studiare il DNA come latore delle informazioni ereditarie, arrivarono alla conclusione che l'RNA dei cromosomi salivari della drosofila è sintetizzato sotto il controllo delle circostanti sequenze di DNA (3.13).

NOTE E BIBLIOGRAFIA

3. 1 Miescher F., Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen, Hoppe-Seyler's Medizinisch-Chemischen Untersuchungen, 4 (1871) 441.
3. 2 Miescher F., Die histomischen und physiologischen Arbeiten, ed. W. His, Vogel, Leipzig vol. 1 pag 6 1936.
3. 3 ibid. pag. 34
3. 4 Kossel A., The chemical composition of the cell, Harvey Lectures, 7 (1911) 35.
3. 5 Levene P.A., The structure of Yeast nucleic acid, J. Biol. Chem., 31 (1917) 591.
3. 6 Caspersonn T., Druckfilterung von Thymonucleinsäure, Biochem. Zeit., 270 (1934) 161.
3. 7 Staudinger H., Über Polymerization, Ber. Deutsche Chem. Gesell., 53 (1920) 1073.
3. 8 Gulland J.M., Nucleic Acids, J. Chem. Soc., 203 (1938) 1722.
3. 9 Gulland J.M., Some aspects on the chemistry of nucleotides, J. Chem. Soc., 208 (1943)
- 3.10 Feulgen R. e Rossenbeck G., Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Tymus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten, Hoppe-Seyler's Zeit, Physiol. Chem. 135 (1924) 203.
- 3.11 Caspersonn T., Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zelkerns, Acta Med. Skand., 83 (8) (1936) 1.
- 3.12 Brachet J., La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'Amphibiens en voie de développement, Arch. Biol. 53 (1942) 205.
- 3.13 Schultz J. e Caspersonn T., Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 26 (1940) 507.

4.

ALLA RICERCA DI UNA FUNZIONE PER IL DNA

Alla fine degli anni trenta la Genetica era giunta alla conclusione che un allele controlla una differenza in un carattere. La differenza tra un allele e l'altro presumibilmente doveva consistere nella presenza o nella assenza di una reazione chimica, la quale a sua volta era forse controllata da un enzima. L'enzima veniva considerato come il prodotto primario del gene, a meno che, enzima e gene non fossero addirittura la stessa cosa.

Proprio quando sia lo studio diretto (della costituzione chimica del DNA e dei cromosomi) che quello indiretto (tentativo di conoscere la natura del gene studiandone il prodotto finale, il carattere) si erano rivelati infruttuosi, un fenomeno molto particolare come la trasformazione batterica, assunse un ruolo centrale nella dimostrazione che il gene non era di natura proteinica, bensì un acido nucleico.

I due scienziati che, con i loro lavori sulla trasformazione batterica e sulla identificazione della sostanza trasformante, contribuirono in maniera determinante a svelare la natura del gene furono F.Griffith e O.T. Avery. Le loro ricerche erano tese a scoprire la natura della sostanza chimica che rende patogeni gli Pneumococci responsabili della polmonite.

Negli Stati Uniti agli inizi del secolo tale malattia era una delle principali cause di morte.

Griffith era occupato come microbiologo in un laboratorio del Ministero della Sanità ed aveva notato in una zona dell'Inghilterra un fatto estremamente interessante. Nel volgere di pochi anni, nella zona di Smethwick un tipo di pneumococco era diventato molto diffuso a scapito di un altro tipo che era praticamente scomparso. Nel tentativo di comprendere la base del fenomeno cercò nel suo laboratorio di determinare quale(i) fattore(i) fossero implicati nella conversione di un tipo di pneumococco nell'altro tipo all'interno dell'ospite. In particolare, la sua attenzione si rivolse ad un tipo di pneumococco detto R (rough = rugoso), privo della capsula che riveste la cellula ed

Medicina nei secoli (Supplemento)

ha un comportamento non virulento, e ad un altro tipo detto S (smooth = liscio) le cui cellule erano circondate da una capsula di polisaccaridi ed era virulento per l'ospite.

Le sue esperienze furono comunicate dall'Autore stesso nel Congresso Internazionale di Microbiologia che si tenne a Londra nel 1936. In sostanza egli era giunto alla conclusione che, se si iniettavano in un topo cellule vive di pneumococco della forma R del tipo I assieme a cellule uccise al calore della forma S del tipo II, i topi non riuscivano a sopravvivere all'infezione e morivano. Dal loro sangue, Griffith isolò colonie della forma S. Non solo si era verificata la conversione dal tipo R a S, ma la sostanza della capsula nelle colonie isolate era identica a quella delle cellule morte di tipo S e non apparteneva quindi al tipo capsulare da cui erano state ottenute le cellule vive R. Egli attribuiva alla sostanza S:

pdfeliminate

una struttura proteica specifica del pneumococco virulento, che gli permette di costruire un carboidrato specifico solubile. Questa proteina sembra essere il materiale necessario al ceppo R per costituire la specifica struttura proteica della forma S (4.1)

Le esperienze di Griffith furono estese anche allo studio del fenomeno *in vitro* ed ottenne lo stesso risultato osservato *in vivo*.

Quasi contemporaneamente anche Avery, nei laboratori del Rockefeller Institute di New York, si occupava delle variazioni osservate nei ceppi di Pneumococco, ponendo le prime basi per la comprensione del fenomeno della trasformazione batterica. Nel laboratorio da lui diretto L. Alloway aveva elaborato un sistema acellulare in grado di produrre la trasformazione. Egli era riuscito ad ottenere dopo lisi cellulare, centrifugazione e precipitazione in alcool:

un precipitato che lentamente si depositava sul fondo della provetta (4.2)

Alloway concluse che l'esatta natura del materiale attivo in questi estratti era ancora da determinare anche se, per la verità, propendeva per una sostanza di natura proteica.

Alla ricerca di una funzione per il DNA

Nel 1941 Avery scriveva nei *Scientific Reports* della Rockefeller che:

gli studi sulla relazione tra capsula con carboidrati e virulenza suggerivano che alcuni fattori responsabili della virulenza erano localizzati all'interno della cellula e non correlati con la capsula o con il tipo di polisaccaride prodotto.

Il Rockefeller Institute era a quel tempo all'avanguardia nel settore dell'enzimologia: era quindi naturale che per studiare l'identità della sostanza trasformante se ne tentasse la degradazione enzimatica e di conseguenza la scomparsa del fenomeno.

Procedendo su questa strada con l'aiuto di C. MacLeod e M. McCarty, Avery arrivò alla pubblicazione del famoso lavoro: "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types" comparso nel 1944 su *Journal of Experimental Medicine*.

La lettura del lavoro chiarisce molte cose sulle modalità sperimentali e sul significato del lavoro stesso:

l'interesse maggiore era il tentativo di isolare il principio attivo da estratti batterici crudi e se possibile identificarne la natura chimica od almeno caratterizzarlo al punto da collocarlo in un gruppo di sostanze chimiche ben note (4.3)

Tra le metodiche sperimentali, va ricordato che durante la purificazione si aggiungeva alcool e si osservava:

...il materiale attivo si separava sotto forma di filamenti fibrosi che si avvolgevano attorno alla bacchetta usata per miscelare (4.3)

Quando la sostanza fu esaminata, rivelò la presenza di fosforo, assorbiva la luce ultravioletta con un massimo a 260 nm e risultava avere un P.M. di almeno 500.000. Essa diede una forte reazione *al Dische* per il DNA, ma anche una leggera reazione *Biol* per l'RNA. L'analisi elementare della sostanza trasformante, confrontata con i valori teorici per il timonucleato di sodio, concordò con essi.

Medicina nei secoli (Supplemento)

La strada seguita per identificare la natura chimica del materiale ereditario fu essenzialmente un processo per esclusione. La sostanza trasformante non risultò essere un carboidrato perché l'idrolisi enzimatica non ne modificava la capacità trasformante: non avendo le proprietà di solubilità in alcool ed in etere tipiche di un grasso non poteva essere di natura lipidica. La sostanza in questione non poteva essere una proteina perchè dopo degradazione con chimotripsina non perdeva le capacità trasformante e risultava, inoltre, negativa ai test per le proteine (Biureto e Millon). Anche quando gli Autori cimentarono la sostanza con la ribonucleasi, che idrolizza le molecole di RNA, la capacità trasformante rimaneva. A questo punto, per esclusione, rimaneva soltanto la possibilità che la sostanza fosse l'acido deossiribonucleico ed, infatti, il suo trattamento con la deossiribonucleasi rimuoveva completamente l'attività trasformante.

Gli Autori esplicitamente affermarono:

I dati ottenuti per via chimica, enzimatica e mediante analisi sierologiche, con gli esami condotti con elettroforesi e con spettrofotometria all'ultravioletto indicano che, entro i limiti delle metodiche, la frazione attiva non contiene tracce rilevabili di proteine, né di lipidi non legati, né polisaccaridi sierologicamente positivi; consiste principalmente, se non solamente, di un acido deossiribonucleico in una forma molto polimerizzata e viscosa (4.3).

Le loro conclusioni fanno chiaramente intendere il valore della scoperta che avrebbe aperto la strada alla identificazione della sostanza responsabile dei fenomeni ereditari.

I nostri risultati fanno ritenere che un acido deossiribonucleico è l'unità fondamentale del principio trasformante del Pneumococco di tipo III.

Potrebbe essere possibile che l'attività biologica della sostanza descritta sia una proprietà non intrinseca dell'acido nucleico ma dovuta ad una minima quantità di qualche altra sostanza assorbita ad esso oppure così intimamente connessa con l'acido nucleico da sfuggire all'analisi. Se, tuttavia, la sostanza biologicamente attiva, isolata nella forma di un sale sodico dell'acido deos-

Alla ricerca di una funzione per il DNA

siribonucleico, prova che esso è il principio trasformante, poichè le evidenze a disposizione suggeriscono tale conclusione, allora gli acidi nucleici di questo tipo devono essere considerati non unicamente come elementi strutturali importanti ma come funzionalmente attivi nel determinare la attività biochimiche e le caratteristiche specifiche della cellula di Pneumococco (4.3).

Successivamente, nel 1946, McCarthy ed Avery spiegarono meglio la loro ricerca.

Nel corso dei tentativi fatti per determinare la natura della sostanza trasformante, estratti di Pneumococchi relativamente impuri furono sottoposti all'azione enzimatica, nella speranza che, cimentati con enzimi, si potesse avere qualche lume sull'identità del costituente biologicamente attivo. La tripsina, la chimotripsina e la ribonucleasi cristallizzata non avevano alcun effetto sulla capacità trasformante, mentre alcuni preparati enzimatici grezzi "di DNAsi" erano in grado di provocare la perdita completa di tale attività (4.4).

Contrariamente a quanto ci si potrebbe attendere l'interesse che tale scoperta suscitò fu in realtà limitato, forse anche a causa di una obiezione mossa da A. Mirsky. Questi, che lavorava anch'esso al Rockefeller Institute, sosteneva che le preparazioni di DNA di Avery e collaboratori potevano essere contaminate da un 1-2% di proteine e concludeva affermando:

Non sono stati ancora compiuti esperimenti che ci permettano di decidere se questa proteina è eventualmente presente nell'agente trasformante purificato, e se fosse così, allora è di fondamentale importanza per la sua attività, in altre parole non è ancora stabilito se l'agente trasformante sia un acido nucleico od una nucleoproteina (4.5).

E ancora, in un lavoro successivo Mirsky esprime nuovamente un dubbio:

...c'è, in base a quanto esposto, qualche dubbio che il DNA sia es-
so stesso l'agente trasformante. (4.6)

A nulla servì la replica di McCarthy del 1946:

...le prove accumulate hanno stabilito oltre ogni ragionevole dubbio che la sostanza attiva responsabile della trasformazione sia un acido nucleico del tipo deossiriboso (4.7)

In definitiva, tali lavori ebbero ben poca rilevanza per il mondo scientifico. Infatti, anziché verificare che la nucleoproteina era l'agente responsabile della trasformazione oppure mettere a punto un sistema di purificazione del DNA che ne garantisse l'assenza di proteine, ci si attestò sull'idea, ormai diffusissima, che erano le proteine le latrici dell'informazioni ereditaria.

Occorre ancora approfondire le conoscenze scientifiche degli anni '40 che permisero a Watson e Crick di avanzare la loro ipotesi della identità tra DNA e materiale ereditario.

Per descrivere la storia dei collegamenti tra genetica e biochimica che tanta importanza ebbero per arrivare alla comprensione della funzione del gene, dobbiamo tornare indietro nel tempo, quasi alla fine del XIX secolo. Infatti, se è vero che l'ipotesi "un gene - un enzima" non venne formulata in maniera esplicita che negli anni quaranta da Beadle e Tatum, è pur vero che vi erano stati numerosi tentativi di collegare la genetica con la biochimica ed i più significativi furono quelli di Garrod, Kühn ed Ephrussi.

Meritano particolare attenzione le scoperte di un medico inglese, Sir A. Garrod, il quale sin dal 1895 si era occupato dell'alcaptonuria. Era noto che gli individui affetti da tale malattia sono omozigoti per un allele mutato e che tale condizione determina l'incapacità di metabolizzare l'acido omogentisico, con conseguente accumulo di questo metabolita nelle urine. I pannolini dei neonati affetti da questa malattia assumevano un colore scuro quando venivano esposti all'aria e ciò impressionava i genitori che si rivolgevano ai medici.

Garrod studiando un bambino affetto da alcaptonuria che aveva in cura, giunse alle medesime conclusioni alle quali erano giunti altri due medici Wolkow e Baumann: l'alcaptonuria era causata da un accumulo di acido omogentisico.

Nel suo classico libro "Inborn errors of metabolism" del 1909 Garrod afferma che il catabolismo è costituito da una serie di reazioni nelle quali si ha la trasformazione successiva di prodotti intermedi. Se nel metabolismo di una sostanza accade che l'agente che la deve trasformare non è presente o è presente in una forma inattiva, allora si ha l'accumulo di un prodotto intermedio e ciò può causare una malattia.

Benché l'esposizione delle idee di Garrod ci possa oggi apparire semplice, dobbiamo pensare che nel suo libro sono presenti almeno due intuizioni molto avanzate: la prima è il concetto di via metabolica e la seconda è il collegamento tra fenotipo malato e blocco metabolico.

Le idee di Garrod erano indubbiamente molto avanzate per l'epoca: accadde così che furono recepite ben poco tra i chimici ed affatto tra i genetisti ed i medici. È evidente che a noi sembra sin troppo facile pensare che se si fossero collegate le ricerche di Miescher a quelle di Garrod, già agli inizi del XX secolo sarebbe stato possibile costruire un paradigma concettuale che avrebbe permesso di comprendere le successive scoperte e programmare esperimenti significativi nella ricerca della costituzione chimica del materiale ereditario.

Tra gli anni venti e quaranta, in molti laboratori europei si studiava la formazione del colore rosso degli occhi di alcuni insetti come la drosofila o la *Ephestia kühniella*.

Benché a queste ricerche dessero fondamentali contributi A. Kühn, T. Caspari e B. Ephrussi non si giunse tuttavia al di là della comprensione che mutazioni geniche specifiche erano correlate con la produzione o l'assenza di sostanze chimiche.

A Parigi G. Beadle nel laboratorio di Ephrussi cercò di coltivare *in vitro* cellule di drosofila per studiare quali sostanze determinavano la comparsa del colore rosso dell'occhio. Egli avanzò l'ipotesi che, malgrado l'assenza di una:

prova diretta dell'intervento di enzimi nel sistema, esso viene comunque ammesso perché, per il momento, costituisce un meccanismo semplice grazie al quale i geni possono controllare le reazioni (4.8)

Medicina nei secoli (Supplemento)

Al ritorno negli Stati Uniti Beadle divenne professore di Genetica alla Stanford University in California dove potè avvalersi della collaborazione di E.L.Tatum che aveva lavorato nel campo dei fattori di crescita dei microorganismi. L'unione dei loro sforzi fu coronata da successo poiché il loro lavoro condotto sulla Neurospora avrebbe portato alla celebre formulazione "un gene - un enzima".

Vediamo quali furono le ragioni che indussero Beadle e Tatum ad abbandonare gli insetti ed a scegliere come oggetto della loro ricerca la Neurospora. Essi, infatti, si resero ben presto conto che tutto sarebbe stato più facile se avessero usato un organismo con esigenze di crescita più semplici. La scelta della Neurospora venne così giustificata:

I funghi, invece, sembravano più promettenti. L'ascomicete *Neurospora* ha un ciclo vitale praticamente ideale per gli studi di genetica, può essere coltivato in condizioni asettiche, non ha necessità di spazio irragionevoli, ed è stato studiato piuttosto ampiamente dal punto di vista genetico (4.9)

Ancora più felice fu la decisione di capovolgere il sistema d'indagine sino allora usato, ovvero:

la nostra idea di invertire la rotta e di cercare mutazioni geniche che influenzassero reazioni chimiche note, ci sembra ovvia. (4.10)

Beadle e Tatum irradiarono con raggi X ceppi selvatici di *Neurospora* capaci di crescere su un terreno minimo. A seguito dell'irradiamento ottennero colonie mutanti che crescevano solo su un terreno arricchito di un fattore di crescita (nel caso in questione essi si occupavano della sintesi della vitamina *B₆*). Per identificare il danno indotto, ovvero i geni implicati, incrociavano la colonna irradiata con una di tipo selvatico. In questo modo, in pochi anni, essi disposero di centinaia di mutanti ciascuno dei quali per una determinata funzione (la sintesi di una vitamina, di un aminoacido ecc...).

Alla ricerca di una funzione per il DNA

L'approccio ci appare oggi molto semplice: i raggi X provocano un danno al DNA e il DNA mutante determina a sua volta la comparsa di un carattere mutante (fenotipo mutante).

Quando il fenotipo mutante era determinato dalla assenza di una particolare capacità presente invece nel ceppo selvatico, occorreva aggiungere al terreno di crescita del ceppo mutante una determinata sostanza, detta fattore di crescita: in tal modo si osservava di nuovo la crescita del ceppo. La incapacità di crescere su un terreno minimo indicava la perdita di una qualche funzione necessaria alla crescita e la sostanza che una volta aggiunta permetteva nuovamente la crescita rivelava il danno indotto dalle radiazioni.

Gli Autori pubblicarono nel 1941 le loro ricerche, che ancora oggi rappresentano un brillante esempio di integrazione di diverse discipline. Essi, infatti, trassero dalla Genetica la tecnica dell'induzione delle mutazioni con raggi X e quella dell'incrocio; mentre è un approccio di tipo biochimico lo studio degli intermedi delle vie metaboliche.

La premessa del loro lavoro afferma chiaramente che:

È legittimo supporre che (questi) geni (che sono essi stessi parte del sistema) controllano o regolano specifiche reazioni (nel sistema) sia agendo direttamente come enzimi o determinando la specificità degli enzimi (4.11)

Le conclusioni fanno chiaramente intravvedere come il loro approccio avesse aperto una nuova strada:

può offrire una premessa favorevole ad un metodo che permetta di conoscere qualcosa di più su come i geni regolano lo sviluppo e la funzione (4.11)

La conclusione più rilevante del loro lavoro consiste, comunque, nel fatto che per i successivi quindici anni si penserà al gene come a qualcosa che specifica un enzima.

NOTE E BIBLIOGRAFIA

4. 1 Griffith F., The significance of Pneumococcal types, *J. Hygiene* 27 (1928) 113.
4. 2 Alloway L., Further observation on the use of Pneumococcus extracts in affecting transformation of type *in vitro*, *J. Exp. Med.* 57 (1933) 265.
4. 3 Avery T., Mac Leod C.M. e McCarthy M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types, *J. Exp. Med.* 79 (1944) 137.
4. 4 McCarthy M., Purification and properties of deoxyribonuclease isolated from beef pancreas, *J. Gen. Physiol.* 29 (1946) 123.
4. 5 Mirsky A.E. e Pollister A.W., Chromosomin, a deoxyribose nucleoprotein complex in the cell nucleus, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1946) 117.
4. 6 Mirsky A.E., Some chemical aspects of cell nucleus, in "Genetics of the 20th century", Ed. L.C.Dunn, MacMillan, New York (1951).
4. 7 MacCarthy M., Chemical nature and biological specificity of the substance inducing transformation of Pneumococcal types, *Bact. Res.* 10 (1946) 63.
4. 8 Beadle G.W., Genetic control of the production and utilization of hormones, *Int. Conf. Genet.*, VII, 58 (1939)
4. 9 Beadle G.W., Genetics and metabolism in Neurospora, *Physiol. Rev.*, XXV (1945) 643.
- 4.10 Beadle G.W., Genes and chemical reactions in Neurospora, in Autori vari, *Lecture del Nobel, Fisiologia e Medicina*, (1942-62) pag. 587-599, Elsevier Publishing Co., Amsterdam - London - New York (1964)
- 4.11 Beadle G.W. e Tatum E.L., Genetic control of biochemical reactions in Neurospora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 27 (1941)

pdf elektronik

5.

LA BIOLOGIA MOLECOLARE E LA DOPPIA ELICA

Io penso che la scoperta della doppia elica e gli sviluppi che ne sono derivati costituiscono il più grande sviluppo della Biologia e delle nostre conoscenze della vita che abbia avuto luogo negli ultimi cento anni L. Pauling (1974)

Gli anni quaranta vengono generalmente ricordati come gli anni della nascita della biologia molecolare. Per quanto concerne il termine biologia molecolare sarà bene ricordare come già J.C.Kendrew asseriva che era stato infelice ridurre la denominazione originale che definiva questa disciplina come "biologia a livello molecolare" a quella divenuta poi popolare intorno agli anni 60.

Tra i numerosi contributi alla nascita della biologia molecolare ricordiamo la scuola strutturistica di W.T. Astbury e di L. Pauling ed il gruppo del fago fondato da M. Delbrück. Ricordare questi scienziati è doveroso per i loro fondamentali contributi alla definizione stessa di biologia molecolare, ma accanto a questi contributi è bene annoverare quello della biochimica (5.1). Astbury, ad esempio, definiva la biologia molecolare come segue:

Essa è particolarmente implicata con la forma delle molecole biologiche..... la biologia molecolare è principalmente strutturale e tridimensionale, non vuol dire, tuttavia, che sia semplicemente una riformulazione della morfologia.

Essa deve allo stesso tempo indagare la nascita e la funzione delle molecole (5.2)

Secondo G.S. Stent le scuole di biologia molecolare furono essenzialmente due: "strutturistica" o tridimensionale e quella "informazionale" o unidimensionale.

L'Autore aggiunge:

..... vi è una profonda differenza tra i fondatori delle due scuole nei confronti dell'importanza della fisica in biologia.... Non solo

NOTE E BIBLIOGRAFIA

4. 1 Griffith F., The significance of Pneumococcal types, *J. Hygiene* 27 (1928) 113.
4. 2 Alloway L., Further observation on the use of Pneumococcus extracts in affecting transformation of type *in vitro*, *J. Exp. Med.* 57 (1933) 265.
4. 3 Avery T., Mac Leod C.M. e McCarthy M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types, *J. Exp. Med.* 79 (1944) 137.
4. 4 McCarthy M., Purification and properties of deoxyribonuclease isolated from beef pancreas, *J. Gen. Physiol.* 29 (1946) 123.
4. 5 Mirsky A.E. e Pollister A.W., Chromosomin, a deoxyribose nucleoprotein complex in the cell nucleus, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1946) 117.
4. 6 Mirsky A.E., Some chemical aspects of cell nucleus, in "Genetics of the 20th century", Ed. L.C.Dunn, MacMillan, New York (1951).
4. 7 MacCarthy M., Chemical nature and biological specificity of the substance inducing transformation of Pneumococcal types, *Bact. Res.* 10 (1946) 63.
4. 8 Beadle G.W., Genetic control of the production and utilization of hormones, *Int. Conf. Genet.*, VII, 58 (1939)
4. 9 Beadle G.W., Genetics and metabolism in Neurospora, *Physiol. Rev.*, XXV (1945) 643.
- 4.10 Beadle G.W., Genes and chemical reactions in Neurospora, in Autori vari, *Lecture del Nobel, Fisiologia e Medicina*, (1942-62) pag. 587-599, Elsevier Publishing Co., Amsterdam - London - New York (1964)
- 4.11 Beadle G.W. e Tatum E.L., Genetic control of biochemical reactions in Neurospora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 27 (1941)

pdf elektronik

5.

LA BIOLOGIA MOLECOLARE E LA DOPPIA ELICA

Io penso che la scoperta della doppia elica e gli sviluppi che ne sono derivati costituiscono il più grande sviluppo della Biologia e delle nostre conoscenze della vita che abbia avuto luogo negli ultimi cento anni L. Pauling (1974)

Gli anni quaranta vengono generalmente ricordati come gli anni della nascita della biologia molecolare. Per quanto concerne il termine biologia molecolare sarà bene ricordare come già J.C.Kendrew asseriva che era stato infelice ridurre la denominazione originale che definiva questa disciplina come "biologia a livello molecolare" a quella divenuta poi popolare intorno agli anni 60.

Tra i numerosi contributi alla nascita della biologia molecolare ricordiamo la scuola strutturistica di W.T. Astbury e di L. Pauling ed il gruppo del fago fondato da M. Delbrück. Ricordare questi scienziati è doveroso per i loro fondamentali contributi alla definizione stessa di biologia molecolare, ma accanto a questi contributi è bene annoverare quello della biochimica (5.1). Astbury, ad esempio, definiva la biologia molecolare come segue:

Essa è particolarmente implicata con la forma delle molecole biologiche..... la biologia molecolare è principalmente strutturale e tridimensionale, non vuol dire, tuttavia, che sia semplicemente una riformulazione della morfologia.

Essa deve allo stesso tempo indagare la nascita e la funzione delle molecole (5.2)

Secondo G.S. Stent le scuole di biologia molecolare furono essenzialmente due: "strutturistica" o tridimensionale e quella "informazionale" o unidimensionale.

L'Autore aggiunge:

..... vi è una profonda differenza tra i fondatori delle due scuole nei confronti dell'importanza della fisica in biologia.... Non solo

Medicina nei secoli (Supplemento)

la scuola unidimensionale o informazionale non ebbe nulla in comune con la biochimica ma i suoi iniziali seguaci erano addirittura ostili ad essa. La scuola tridimensionale o strutturistica, tuttavia, può essere considerata una vera e propria branca della biochimica. (5.3)

Secondo Stent questa seconda discende a buon diritto dalla scuola inglese e corrisponde alla definizione di Astbury di biologia molecolare che abbiamo appena riportato. (5.4 - 5.7)

La paternità della scuola informazionale viene generalmente attribuita a Delbrück, il quale alla vigilia della seconda guerra mondiale lascia la Germania per raggiungere gli Stati Uniti dove comincia nel 1938 il lavoro con i batteriofagi (virus che infettano i batteri per assicurare la loro riproduzione). Delbrück considerava tali particelle oggetti ideali di studio non solo per l'autoreplicazione del materiale biologico ma anche per la comprensione della base fisica dell'eredità. La scelta di questo materiale di studio va anche ricondotto al fatto che nel 1935 W.M. Stanley era riuscito a purificare il virus del mosaico della foglia del tabacco (TMV). (5.8)

Se è vero che il lavoro di Stanley ha avuto una influenza determinante nell'orientare lo studio delle proprietà autoriproduttori del materiale vivente verso i virus, è pur vero che ponendo l'accento sulla quasi esclusiva presenza delle proteine come costituenti del TMV condizionò notevolmente il pensiero di scienziati come Muller e Delbrück circa l'identità del materiale ereditario.

Delbrück non fu l'unico fisico ad interessarsi di biologia: tra gli altri, S. Benzer, M. Wilkins e G.S. Stent si avvicinarono a questa disciplina dopo aver letto il libro di E. Schrödinger "What is Life"; un testo che influenzò profondamente molti altri ricercatori tra cui F. Crick.

Nel 1950 E. Chargaff scrisse un articolo che ha posto alcune delle basi per la formulazione, da parte di Watson e Crick, del celebre modello del DNA.

Chargaff scriveva:

La biologia molecolare e la doppia elica

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad una enorme riviviscenza di interesse per le proprietà chimiche e biologiche degli acidi nucleici, che sono componenti essenziali per la vita di tutte le cellule. Ciò non è particolarmente sorprendente, poiché la chimica degli acidi nucleici rappresenta uno dei maggiori problemi non risolti in biochimica. Non è facile dire ciò che ha fornito l'impulso di questa quasi improvvisa rinascita. Sarà stato il lavoro di E. Hammersten (5.9) sulla polimerizzazione dell'acido deossiribonucleico del timo di vitello? Oppure questa rinascita dipende da studi biologici come quelli di Brachet (5.10) o di Casperson (5.11). Oppure è stata l'importantissima scoperta di Avery e collaboratori sulla trasformazione del pneumococco che ha iniziato questa valanga....

Lo stato dell'arte del problema degli acidi nucleici, a quel tempo era contenuto nella monografia di Levene (5.12). La vecchia ipotesi del tetranucleotide era ancora dominante.....

Quantunque la formulazione dell'ipotesi del tetranucleotide risulta spiegabile su di una base storica, essa manca di una adeguata base sperimentale, in particolare per quanto riguarda "l'acido timonucleico". Sebbene solo due acidi nucleici, l'acido deossiribonucleico o di timo di vitello o l'acido ribonucleico, siano stati analizzati con qualche dettaglio, tutte le conclusioni che provengono dallo studio di queste sostanze sono state immediatamente estese a tutta la natura, un salto di una tale ampiezza che stupirebbe un acrobata....

Il peso molecolare dell'acido nucleico di origine animale non è attualmente noto resta che l'acido deossipentoso sia una sostanza ad alto peso molecolare al pari di quello di una proteina se non superiore.

Chargaff così conclude il suo articolo:

Gli acidi deossipentoso derivanti da cellule di animali o da microorganismi contengono proporzioni diverse dei quattro componenti azotati, come adenina, guanina, citosina e timina. La loro composizione risulta essere caratteristica della specie, e non del tessuto, dalla quale essi derivano...

I risultati permettono di confutare l'ipotesi del tetranucleotide. Tuttavia vale la pena di notare - non si può ancora dire se questo sia nulla di più che un fatto incidentale - che in tutti gli acidi nucleici contenenti il deossipentoso ed esaminati sinora, i rapporti molari tra le purine totali e le pirimidine totali, ed anche dell'adenina rispetto alla timina e della guanina rispetto alla citosina, non sono lontani dall'unità (5.13)

I risultati raggiunti da Chargaff e collaboratori costituiscono il ribaltamento della ipotesi del tetranucleotide, e questi indicavano che:

I rapporti molari rivelano certe sorprendenti regolarità forse prive di significato (5.14)

Chargaff, che aveva intrapreso tale studio al fine di stabilire un parallelo tra *relazione tassonomica* e composizione in basi del DNA, trovò quasi fastidiose queste regolarità che troveranno una propria spiegazione.

In Inghilterra intanto si studiavano le proteine ed acidi nucleici con i raggi X. Nel 1938 Astbury e Bell in un loro lavoro affermavano:

Da ciò che noi sappiamo dallo studio con raggi X e gli studi sulle proteine fibrose ... è naturale assumere, almeno come prima ipotesi di lavoro, che esse (proteine) costituiscano la carta sulla quale è scritta la storia della vita (5.15)

Ancora una volta, il DNA viene relegato ad un ruolo secondario, sebbene questi stessi Autori studiassero con la cristallografia ai raggi X le preparazioni del DNA fornite loro da Hammersten, ipotizzando anche una loro struttura (Fig. 2)

Questi contributi della scuola strutturistica inglese permetteranno a Watson, Crick, Wilkins e la Franklin, di giungere alla comprensione della struttura tridimensionale del DNA.

Ancora in Inghilterra negli anni '50 l'interesse per lo studio della struttura del DNA, aveva portato J.D. Bernal ad invitare S. Fueberg, dell'Università di Oslo, a lavorare nel suo laboratorio. Questi cominciò ad occuparsi di cristallografia dei nucleotidi forniti da D.O. Jordan di Nottingham.

Abbiamo ricordato come Wilkins, di origine fisico, si sia avvicinato alla Biologia dopo la lettura di 'What is Life?'. Terminata la seconda guerra mondiale, egli ritornò da J.T. Randall al King's College di Londra, dove cominciò ad occuparsi dell'orientamento delle basi azotate nell'RNA del virus del mosaico

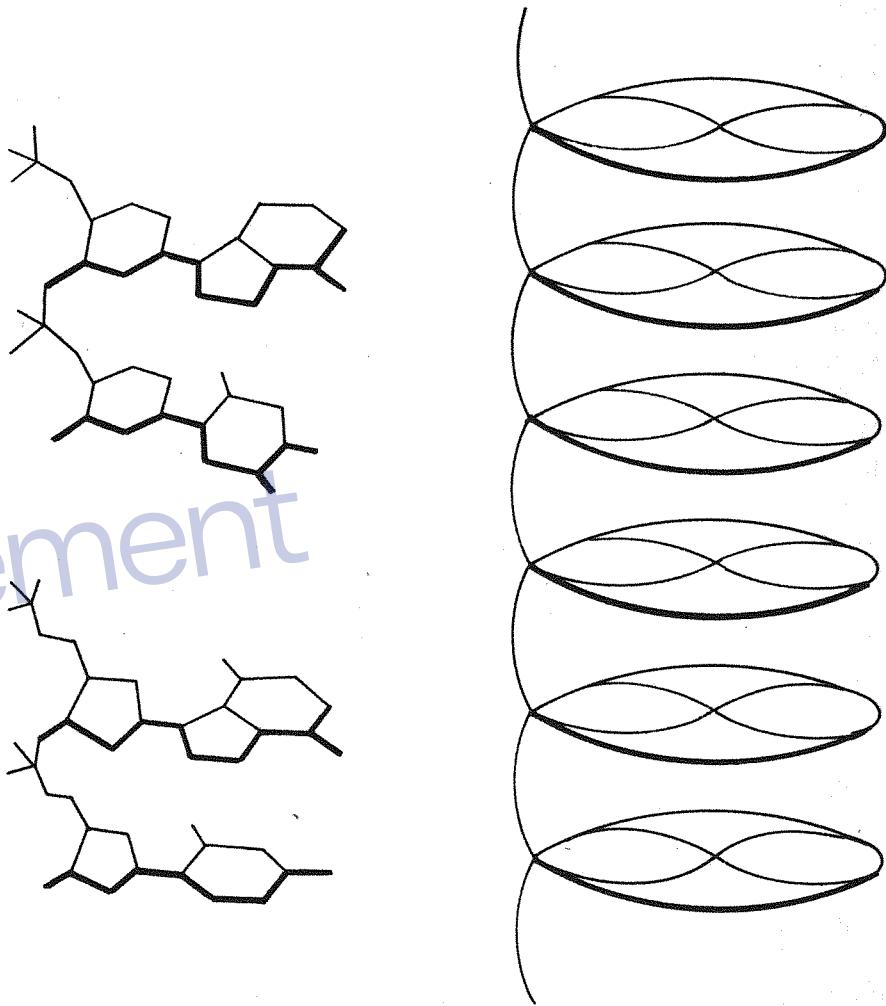


Figura 2 Rappresentazione di un modello della molecola di DNA proposto da Astbury e Bell. Risulta evidente la natura elicoidale del modello anche se raffigura una molecola a singolo filamento. Sulla sinistra è rappresentato l'andamento planare delle basi azotate, oggi sappiamo essere la condizione perché s'instaurino le forze idrofobiche tra le basi sovrapposte determinando la grande stabilità delle doppia elica.

Medicina nei secoli (Supplemento)

delle foglie del tabacco. Nel 1951 egli giunse alla conclusione che i risultati ottenuti con la diffrazione ai raggi X, permettevano di affermare che il DNA possedeva le caratteristiche di un'elica.

Nel 1951 R. Franklin si aggiunse al gruppo di Randall e questi gli suggerì di occuparsi della cristallografia delle fibre del DNA. Il lavoro doveva essere seguito da R.G. Goslin.

Per numerose ragioni i contatti tra la Franklin e Wilkins non furono molti né cordiali. Nel contempo Wilkins andò alla Stazione Zoologica di Napoli dove ottenne delle preparazioni di spermatozoi sui quali condurre i suoi studi.

Poiché tutti coloro che si occupavano di cristallografia del DNA disponevano di fibre di DNA e non di cristalli, era di vitale importanza sapere quale grado di idratazione avessero tali fibre. Si era comunque concluso che le forme A e B del DNA avessero una struttura essenzialmente simile e che le differenze erano dovute al grado di idratazione.

Anche F. Crick, come Wilkins, era un fisico e lavorava al Medical Research Council di Cambridge ed era costantemente informato dei progressi del suo amico Wilkins. Con l'arrivo di J. Watson a Cambridge aumentò l'interesse di Crick per la struttura del DNA.

Watson, conseguì un Bachelor in scienze a Chicago, dopo la laurea era rimasto affascinato dalla virologia; venuto in contatto con Luria, decise di conseguire un Dottorato sulla genetica dei virus.

Watson trascorse un periodo di tempo in Europa occupandosi del progetto che prevedeva lo studio del destino del tracciante radioattivo P_{32} (incorporato nel DNA) all'interno del fago. Nel 1951 partecipò a Napoli ad un congresso sulla struttura delle macromolecole biologiche, dove venne a conoscenza dei risultati di Wilkins.

L'interesse di Watson per la molecola del DNA e la sua struttura nasceva dal fatto che, come egli afferma nel suo libro "La doppia elica":

La biologia molecolare e la doppia elica

gli esperimenti di Avery suggeriscono con forza che la futura sperimentazione dimostrerà che tutti i geni dovrebbero essere composti di DNA. (5.16)

Sempre dalla stessa fonte apprendiamo che disse a Luria:

la vera risposta verrà soltanto dopo che si sarà conosciuta la struttura chimica del gene di un virus (5.16)

Possiamo immaginare che dopo la permanenza a Napoli Watson non cercasse altro che andare a lavorare in un laboratorio dove potesse apprendere i segreti della cristallografia. Dopo aver escluso Londra ed il California Institute of Technology di Pasadena decise di andare da M.F. Perutz a Cambridge. Luria cercò di favorire questo interesse e raccomandò Watson a J. Kendrew, il quale fece in modo che Watson conoscesse Crick. Nonostante possedessero caratteri molto diversi i due si affiatarono molto presto.

Poiché in Inghilterra la ricerca sulla struttura del DNA era quasi monopolio di Wilkins, l'amicizia che mediante la cristallografia legava Crick a Wilkins lo indusse a non invadere questo campo d'indagine. Fu così che Watson e Crick scelsero di costruire, come già aveva fatto Pauling, dei modelli molecolari che fossero compatibili con i risultati ottenuti dalla cristallografia negli altri laboratori:

Tutto ciò che dovevamo fare era di costruire un certo numero di modelli con struttura elicoidale (5.16)

L'ipotesi di lavoro di Watson e Crick era dunque che il DNA avesse una struttura ad elica. Essi erano convinti che l'unione della cristallografia con la strettistica molecolare sarebbe stata la carta vincente nella corsa alla decifrazione della struttura del DNA. L'idea di Crick era che:

si deve imitare L. Pauling e batterlo sul suo stesso campo (5.16)

Nel novembre del 1951 Watson ascoltò al King's College un seminario tenuto da R. Franklin che lo scoraggiò molto. Infat-

ti, secondo la Franklin, era possibile giungere alla comprensione della struttura del DNA soltanto con la cristallografia, mentre riteneva del tutto collaterale l'approccio dei modelli molecolari. Quella sera stessa Watson riferì a Crick (peraltro in maniera inesatta) i dati della Franklin e su questa base decisero di costruire un modello a tripla elica con lo scheletro zuccherofosfato al centro della molecola. Questa strada cieca verrà seguita anche da Pauling che non la abbandonerà più.

Quando Crick espose a Wilkins il modello da loro costruito, questi obiettò subito che non si accordava con i dati cristallogрафici della Franklin. Fu così che Watson e Crick abbandonarono temporaneamente la costruzione dei modelli molecolari.

Nel maggio del 1952 H. Hershey aveva concluso il suo lavoro sulle modalità d'ingresso del DNA del batteriofago all'interno della cellula ospite, lavoro che metteva in rilievo senza dubbio l'importanza del DNA come materiale ereditario. Quando Watson e Crick seppero che Pauling e Corey si stavano occupando della struttura del DNA (e che la Franklin riteneva che il DNA fosse costituito da un doppio filamento con lo scheletro zuccherofosfato all'esterno) ritornarono rapidamente al lavoro di costruzione dei modelli.

Leggendo il lavoro di Pauling e Corey, Watson e Crick si accorsero che questi consideravano le fibre del DNA come anidre e per questo motivo gli Autori erano portati a proporre per il DNA una struttura a tre eliche.

Nel febbraio del 1953 Watson si recò a Londra per discutere con la Franklin e Wilkins la struttura pubblicata da Pauling. La discussione risultò abbastanza burrascosa e quasi subito la Franklin si ritirò nel suo laboratorio. In quella occasione, tuttavia, Wilkins mostrò a Watson per la prima volta, un'ottima copia di un diffratogramma di un DNA di tipo B ottenuta dalla Franklin. Subito Watson notò che tale imagine faceva pensare ad una struttura ad elica, ma non comprese bene le motivazioni per cui la Franklin asseriva che nel DNA di tipo B i due filamenti dovessero essere avvolti ad elica.

Alla richiesta se la fotografia era compatibile con un modello a due eliche Wilkins rispose affermativamente.

Durante il viaggio di ritorno a Cambridge Watson rifletté molto se il modello dovesse essere a due o tre filamenti e giunto al College saltando il cancello decise per il modello a due filamenti. Appena ne parlò con Crick, questi si dimostrò d'accordo, consapevole dell'importanza della complementarietà nelle strutture biologiche.

La scelta del modello a due filamenti merita di essere analizzata più a fondo. È ovvio che è del tutto improbabile che sia stato il salto del cancello del College a determinare l'abbandono da parte di Watson del modello a tre filamenti a favore di quello a due. Più ragionevolmente, la lettura di un lavoro di Pauling e Delbrueck (5.17) potrebbe aver contribuito a tale scelta. Pauling ricorda circa venti anni dopo:

filamento

...di non aver dimenticato che lui e Delbrück avevano suggerito che il gene potrebbe essere costituito da due molecole complementari, ma che per qualche ragione, che ora non mi è più chiara, la struttura a tripla elica mi attraeva, probabilmente perché assumere una struttura con un triplice asse semplificò la ricerca di una struttura accettabile (5.18).

Altre considerazioni potevano aver indotto Watson e Crick a scegliere una doppia elica. Watson, infatti, ricordava che la Franklin era giunta alla conclusione che le basi erano al centro e lo scheletro zuccherofosfato all'esterno. Perutz, inoltre, aveva mostrato a Crick, nel febbraio del 1953, un rapporto riservato ai membri del comitato di Biofisica del MRC dove erano raccolti i dati che la Franklin e Randall avevano raggiunto nel dicembre del 1952. Perutz ricorda che Crick fu molto impressionato:

un indizio importante era quello che suggeriva l'esistenza di un doppio asse di simmetria che era normale all'asse della fibra, ciò imponeva che le catene della doppia elica avessero polarità inverse (5.19)

Medicina nei secoli (Supplemento)

Nel corso delle loro ricerche Watson e Crick si avvalsero della collaborazione di J. Griffith, il nipote di Avery, al quale Crick propose:

Poiché le base sono piane, forse lo sono perché possono impilarsi l'una sull'altra ed attrarsi. Perchè non cerchi di vedere se l'adenina attrae l'adenina e così via? (5.20)

Durante un successivo incontro occasionale con Griffith, Crick chiese:

Ha già fatto i calcoli? e questi rispose: "Si, ho trovato che l'adenina attrae la timina e la guanina la citosina" (5.20)

Crick ricorda:

...sono sicuro che non ero al corrente, a quell'epoca, delle regole di Chargaff, anche se Watson sostiene che me le aveva menzionate già tempo prima. Se anche lo avevo fatto, le avevo semplicemente dimenticate nel frattempo (5.20)

Poco dopo questo incontro Kendrew presentò Crick a Chargaff, che quel luglio del 1952 era in visita a Cambridge.

Crick ricorda così l'incontro:

Chargaff ribatté "Ma ci sono i rapporti 1:1" Che cosa sono? - chiesi - "È tutto pubblicato". Non avevo mai letto la letteratura e pertanto non sapevo nulla; poi mi parlò e l'effetto su di me fu elettrizzante: ecco perchè lo ricordo. Subito pensai: "Mio Dio, se si hanno degli appaiamenti complementari, allora si è costretti ad avere un rapporto 1:1". A questo punto avevo dimenticato che cosa Griffith mi aveva detto. Non ricordavo il nome delle basi. Così mi recai da lui e gli chiesi quali erano queste basi: me le scrisse su un foglio di carta. Avevo dimenticato ora quello che Chargaff mi aveva detto, per cui dovetti tornare indietro e cercare nella letteratura. Con mio stupore, le coppie di cui avevo parlato con Griffith erano le stesse a cui si era riferito Chargaff. (5.20)

L'ignoranza di Watson e Crick circa la struttura chimica delle basi azotate aveva molto colpito Chargaff:

La biologia molecolare e la doppia elica

Quando li incontrai per la prima volta a Cambridge, nella primavera del 1952, non sembrava che essi sapessero molto o addirittura nulla del mio lavoro, e neppure della struttura e della chimica delle purine e delle pirimidine Per quanto posso ricordare, fui io a spiegare per primo a Watson e Crick, a un pranzo organizzato da Kendrew, le nostre osservazioni sulle regolarità del DNA e a dir loro che, a qualsiasi struttura pervenissero, essa avrebbe dovuto tener conto dei nostri rapporti complementari. Si informarono da me mi pare, dei possibili accoppiamenti tra le basi ed io risposi: "Adenina con timina, guanina con citosina, purine con pirimidine". (5.20)

Un grande aiuto, per la soluzione del problema, venne loro da J. Donohue, un esperto di legami idrogeno. Egli spiegò a Watson che le basi da lui usate erano in forma tautomerica errata (quella enolica) suggerendo di usare invece la forma chetonica. Watson e Crick erano ormai in grado di appaiare correttamente le basi e di formare il legame d'idrogeno, e fu così che quando si misero a costruire il modello con le basi appaiate all'interno apparve loro chiaro perchè i rapporti tra le basi, trovati da Chargaff, erano di 1:1.

Nella costruzione del modello sorsero altre difficoltà, come ad esempio, il tipo di legame che teneva uniti i nucleotidi all'interno della catena polinucleotidica (usarono il legame 3'-5') oppure la misura dell'angolo che le basi azotate dovevano formare rispetto all'asse dell'elica. Watson mostrò il modello a Crick ed ottenuta la sua approvazione, consultò Donohue perchè verificasse la correttezza dell'appaiamento delle basi.

Watson e Crick ormai sicuri del loro modello, inviarono una lettera a Delbrück, nella quale descrivevano i risultati da loro ottenuti, pregandolo tuttavia di non darne notizia a Pauling. Kendrew un ricercatore amico di Perutz cercò Wilkins, e lo avvertì che il modello era pronto: quando Wilkins lo vide, ne rimase convinto; il modello era in accordo con i suoi dati e con quelli della Franklin.

Gli autori insieme a Bernall e Randall raggiunsero l'accordo di inviare alla rivista Nature tre lavori distinti: uno di Wilkins,

Strokes e Wilson, un secondo della Franklin e Goslin ed un terzo di Watson e Crick.

Il terzo contributo quello di Watson e Crick, fu tuttavia il primo ad essere pubblicato, nel fascicolo del 25 aprile del 1953. Perchè l'Editore ha ritenuto importante premettere il modello agli altri due lavori?

Benché non si abbia una risposta certa a questa domanda, è probabile che i risultati di Watson e Crick fossero stati ritenuuti più "spettacolari", dando così la preferenza alle conclusioni piuttosto che alle meno "appariscenti" prove del modello.

Alcuni mesi dopo la pubblicazione su Nature del loro lavoro Watson e Crick ne pubblicarono un altro. In questo essi specularono attorno ad una caratteristica essenziale della molecola del DNA: la capacità di autoreplicazione.

Questa cornice concettuale permise a numerosi ricercatori di affrontare il problema delle modalità della replicazione della molecola del DNA. Tra questi meritano una particolare menzione Meselson e Stahl (5.21), i quali dimostrarono che in un batterio, *E. coli*, la replicazione del DNA avviene in maniera semiconservativa, ovvero, un filamento della doppia elica serve da stampo per l'altro filamento che viene sintetizzato sulla base della complementarietà delle basi. In questo modo ogni cellula figlia riceve un filamento di DNA che è identico a quello della cellula madre (rappresentato dal filamento vecchio) ed uno neosintetizzato (filamento complementare a quello vecchio). Questo esperimento, insieme a quello di Taylor (5.22) che ottenne gli stessi risultati in organismi eucariotici, ha fatto sì che il mondo scientifico accettasse il modello di Watson e Crick, concludendo una prima tappa nella identificazione della base chimica del materiale ereditario, la cui storia era iniziata nel 1869.

Biochimica e Genetica si ricongiungono quando si è raggiunta la prova che il gene è costituito da un acido deossiribonucleico. In effetti dobbiamo ricordare anche le esperienze di Fraenkel-Conrat e Williams nel 1955 che dimostrarono che il virus del mosaico della foglia di tabacco è costituito da protei-

ne ed RNA e solo quest'ultimo è necessario per la replicazione *in vitro* del virus.

Questi i risultati più significativi raggiunti dai genetisti:

1915 - Morgan, Sturtevant, Muller e Bridges pubblicano "Mechanism of mendelian heredity" nel quale dimostrano, in maniera convincente, la relazione che esiste tra i geni ed i cromosomi della *D. melanogaster*, e concludevano che i cromosomi si comportano esattamente come se fossero i latori delle informazioni ereditarie (5.23).

1920 - Muller riporta i dati sul crossing-over ottenuti sul cromosoma X della *D. melanogaster* e li interpreta come prova di un ordine lineare dei geni sul cromosoma (5.24).

1929 - Muller e Painter, con l'uso dei raggi X, dimostrarono che le aberrazioni cromosomiche così indotte permettono di correlare la mappa cromosomica con la posizione fisica dei geni sui cromosomi (5.25).

1931 - Stern dimostra che lo scambio tra cromosomi omologhi è accompagnato dal trasferimento di pezzi di cromosoma citologicamente evidenziabili (5.26).

1938 - Goldschmidt propone di considerare il cromosoma e non il gene come unità di controllo dello sviluppo.

Si doveva pertanto abbandonare il concetto di gene come unità fondamentale dell'eredità che doveva essere sostituita dal cromosoma (5.27).

NOTE E BIBLIOGRAFIA

5. 1 Olby R., Biochemical origins of molecular biology: a discussion, Trends in Biochem. 11 (1986) 303.
5. 2 Astbury W.T., Adventures in molecular biology, Harvey Lectures, XLVI, pag. 3 (1950-51), Ed. C.C.Thomas Publ. Springfield, USA 1951.

Medicina nei secoli (Supplemento)

5. 3 Stent G.S., That was the molecular biology that was, Science 160 (1968) 390.
5. 4 Chargaff E., Preface to a grammar of biology, Science 172 (1971) 637.
5. 5 Edsall J.T., History of biochemistry and molecular biology, Science 170 (1970) 349.
5. 6 Stent G.S., Molecular Genetics, An introductory narrative, traduzione in italiano "Genetica molecolare" N. Zanichelli, Bologna (1977).
5. 7 Thuieller P., Comment est née la biologie moléculaire, La Recherche 23 (1972) 439.
5. 8 Stanley W. M., Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus, Science 81 (1935) 644.
5. 9 Hammersten E., Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung der Nucleinsäurerverbindungen, Biochem. Zeit. 144 (1924) 383.
- 5.10 Brachet J., The metabolism of nucleic acids during embryonic development, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12 (1947) 18.
- 5.11 Casperson T., in 'Nucleic acids', Symp. Soc. Exp. Biol. 17 (1947), Cambridge Univ. Press 127.
- 5.12 Levene P.A., On the structure of thymus nucleic acid and on its possible bearing on the structure of Plant nucleic acid, J.Biol.Chem. 48 (1921) 119.
- 5.13 Chargaff E., Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation, Experientia 6 (1950) 245.
- 5.14 Vischer E., Zamenhof S. e Chargaff E., Microbial nucleic acids: the desoxypentose nucleic acids of avian tubercle bacilli and yeast, J.Biol.Chem. 177 (1949) 429.
- 5.15 Astbury W.T. e Bell F.C., Some recent developments in the X-ray study of proteins and related structures, Cold Spring Harbor Quant.Biol., 6 (1938) 114.
- 5.16 Watson J.D., The Double Helix, Atheneum Pub., New York 1968.
- 5.17 Pauling L. e Delbrück M., The nature of intermolecular forces operative in biological systems, Science 92 (1940)
- 5.18 Pauling L., Molecular basis of biological specificity, Nature, 248 (1974) 771.
- 5.19 Perutz M.F., DNA helix, Science, 164 (1969) 1437.
- 5.20 Olby R., The path of double helix, traduzione in italiano "Storia della doppia elica", Mondadori 1978.
- 5.21 Meselson M. e Stahl F.W., The replication of DNA in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44 (1958) 671.
- 5.22 Taylor H.J., Woods P.S. e Hughes W.L., The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 43 (1957) 122.
- 5.23 Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J. e Bridges C.B., The mechanism of mendelian heredity, Ed. H.Holt Co., New York 1915.
- 5.24 Muller H.J., Are the factors of the heredity arranged in a line?, Am.Nat., 54 (1921) 97.
- 5.25 Muller H.J. e Painter T.S., The cytological expression of changes in gene alignment produced by X-rays in *Drosophila*, Am.Nat., 63 (1929) 193.
- 5.26 Stern C., Zytologisch-genetische untersuchungen als beweise für die Morgansche theorie des faktorenaustausches, Bid. Zbl., 51 (1931) 547.
- 5.27 Goldschmidt R., The theory of the gene, Scientific Monthly, 46 (1938) 268.

6.

GLI SVILUPPI DEL CONCETTO DI GENE

Chiamando la struttura delle fibre cromosomiche un "codice scritto" intendiamo dire che un intelletto acuto potrebbe capire dalla loro struttura se un uovo si svilupperà in un gallo nero o in una gallina screziata, in un moscerino o in una pianta di mais, in un coleottero, un topo o una donna.... Ma il termine codice scritto è naturalmente troppo restrittivo. Le strutture cromosomiche sono infatti attive nel portare a compimento lo sviluppo che esse prevedono. Esse sono un codice legislativo e potere esecutivo, oppure per usare una similitudine, esse sono un piano di architetto ed abilità di costruttore in uno.

E. Schrödinger (1945)

La connotazione moderna della parola "gene" indica una molecola di DNA la cui specifica struttura autoreplicante può attraverso un meccanismo ignoto, divenire tradotta nella specifica struttura di una catena polipeptidica.

F. Jacob e J. Monod (1961)

Agli inizi degli anni cinquanta i genetisti pensavano al gene come ad una unità localizzata in punti specifici e costanti sul cromosoma. Questa concezione evocava l'immagine di una "collana di perle" (6.1). In quello stesso periodo i genetisti affiancarono ai classici studi di trasmissione dei caratteri un approccio biochimico che portò a considerare il gene come il responsabile della produzione di un enzima. Questa acquisizione formidabile non permetteva però di spiegare tutti i risultati che si erano accumulati sino a quel tempo. Si era, infatti, giunti alla conclusione che "un fattore mendeliano" non sempre controllava un solo carattere fenotipico e Morgan nel suo libro "The mechanism of mendelian heredity" citava mutazioni che coinvolgono un solo gene pur determinando numerosi effetti sul fenotipo. Vi sono numerosi esempi di questo tipo di mutazioni, tra le quali il *locus white* in drosofila, che viene considerato un locus complesso o locus con alleli multipli.

Lo studio della trasmissione dei caratteri permise ai genetisti di giungere alla conclusione che un fenotipo può risultare dall'effetto additivo di due o più geni. Inoltre, la prima eviden-

Medicina nei secoli (Supplemento)

5. 3 Stent G.S., That was the molecular biology that was, *Science* 160 (1968) 390.
5. 4 Chargaff E., Preface to a grammar of biology, *Science* 172 (1971) 637.
5. 5 Edsall J.T., History of biochemistry and molecular biology, *Science* 170 (1970) 349.
5. 6 Stent G.S., Molecular Genetics, An introductory narrative, traduzione in italiano "Genetica molecolare" N. Zanichelli, Bologna (1977).
5. 7 Thuieller P., Comment est née la biologie moléculaire, *La Recherche* 23 (1972) 439.
5. 8 Stanley W. M., Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus, *Science* 81 (1935) 644.
5. 9 Hammersten E., Zur Kenntnis der biologischen Bedeutung der Nucleinsäurerverbindungen, *Biochem. Zeit.* 144 (1924) 383.
- 5.10 Brachet J., The metabolism of nucleic acids during embryonic development, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12 (1947) 18.
- 5.11 Casperson T., in 'Nucleic acids', *Symp. Soc. Exp. Biol.* 17 (1947), Cambridge Univ. Press 127.
- 5.12 Levene P.A., On the structure of thymus nucleic acid and on its possible bearing on the structure of Plant nucleic acid, *J.Biol.Chem.* 48 (1921) 119.
- 5.13 Chargaff E., Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation, *Experientia* 6 (1950) 245.
- 5.14 Vischer E., Zamenhof S. e Chargaff E., Microbial nucleic acids: the desoxypentose nucleic acids of avian tubercle bacilli and yeast, *J.Biol.Chem.* 177 (1949) 429.
- 5.15 Astbury W.T. e Bell F.C., Some recent developments in the X-ray study of proteins and related structures, *Cold Spring Harbor Quant.Biol.*, 6 (1938) 114.
- 5.16 Watson J.D., *The Double Helix*, Atheneum Pub., New York 1968.
- 5.17 Pauling L. e Delbrück M., The nature of intermolecular forces operative in biological systems, *Science* 92 (1940)
- 5.18 Pauling L., Molecular basis of biological specificity, *Nature*, 248 (1974) 771.
- 5.19 Perutz M.F., DNA helix, *Science*, 164 (1969) 1437.
- 5.20 Olby R., The path of double helix, traduzione in italiano "Storia della doppia elica", Mondadori 1978.
- 5.21 Meselson M. e Stahl F.W., The replication of DNA in *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44 (1958) 671.
- 5.22 Taylor H.J., Woods P.S. e Hughes W.L., The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 43 (1957) 122.
- 5.23 Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J. e Bridges C.B., *The mechanism of mendelian heredity*, Ed. H.Holt Co., New York 1915.
- 5.24 Muller H.J., Are the factors of the heredity arranged in a line?, *Am.Nat.*, 54 (1921) 97.
- 5.25 Muller H.J. e Painter T.S., The cytological expression of changes in gene alignment produced by X-rays in *Drosophila*, *Am.Nat.*, 63 (1929) 193.
- 5.26 Stern C., Zytologisch-genetische untersuchungen als beweise für die Morgansche theorie des faktorenaustausches, *Bid. Zbl.*, 51 (1931) 547.
- 5.27 Goldschmidt R., The theory of the gene, *Scientific Monthly*, 46 (1938) 268.

6. GLI SVILUPPI DEL CONCETTO DI GENE

Chiamando la struttura delle fibre cromosomiche un "codice scritto" intendiamo dire che un intelletto acuto potrebbe capire dalla loro struttura se un uovo si svilupperà in un gallo nero o in una gallina screziata, in un moscerino o in una pianta di mais, in un coleottero, un topo o una donna.... Ma il termine codice scritto è naturalmente troppo restrittivo. Le strutture cromosomiche sono infatti attive nel portare a compimento lo sviluppo che esse prevedono. Esse sono un codice legislativo e potere esecutivo, oppure per usare una similitudine, esse sono un piano di architetto ed abilità di costruttore in uno.

E. Schrödinger (1945)

La connotazione moderna della parola "gene" indica una molecola di DNA la cui specifica struttura autoreplicante può attraverso un meccanismo ignoto, divenire tradotta nella specifica struttura di una catena polipeptidica.

F. Jacob e J. Monod (1961)

Agli inizi degli anni cinquanta i genetisti pensavano al gene come ad una unità localizzata in punti specifici e costanti sul cromosoma. Questa concezione evocava l'immagine di una "collana di perle" (6.1). In quello stesso periodo i genetisti affiancarono ai classici studi di trasmissione dei caratteri un approccio biochimico che portò a considerare il gene come il responsabile della produzione di un enzima. Questa acquisizione formidabile non permetteva però di spiegare tutti i risultati che si erano accumulati sino a quel tempo. Si era, infatti, giunti alla conclusione che "un fattore mendeliano" non sempre controllava un solo carattere fenotipico e Morgan nel suo libro "The mechanism of mendelian heredity" citava mutazioni che coinvolgono un solo gene pur determinando numerosi effetti sul fenotipo. Vi sono numerosi esempi di questo tipo di mutazioni, tra le quali il *locus white* in drosofila, che viene considerato un locus complesso o locus con alleli multipli.

Lo studio della trasmissione dei caratteri permise ai genetisti di giungere alla conclusione che un fenotipo può risultare dall'effetto additivo di due o più geni. Inoltre, la prima eviden-

za che anche l'ordine del materiale ereditario sul cromosoma potesse avere un effetto sul fenotipo venne dallo studio della mutazione *Bar* dell'occhio della drosofila.

Gli studi tesi a chiarire la funzione del cromosoma portarono i citogenetisti ad identificare delle zone del cromosoma (blocki di eterocromatina) a cui non era possibile attribuire alcuna funzione genica. Inoltre, al fine di adeguare il modello del cromosoma furono intrapresi studi tra i quali merita ricordare quello di S. Benzer.

Benché la prima smentita all'indivisibilità del gene sia stata data da Green e Green (6.2) nel 1949, bisognò attendere il 1955 perché Benzer smentisse l'idea dei geni collocati su di una "collana di perle", colmando la lacuna concettuale esistente tra le inferenze basate esclusivamente su osservazioni di genetica formale e concernenti differenze di caratteri e le conclusioni tratte da osservazioni di natura puramente chimica, relative a nucleotidi.

Nei suoi studi Benzer prese in esame una piccola regione (rII) del cromosoma del fago T 4. Egli era in possesso di una classe di mutanti di questa regione che sono in grado di crescere in un ceppo batterico ospite permissivo (*E. coli K*) (Fig. 3).

Quando il ceppo non permissivo viene infettato con due tipi di mutanti della regione rII si può osservare la crescita fagica o meno a seconda dei mutanti usati (Fig. 4).

La capacità di crescita viene ripristinata solo con l'infezione contemporanea del mutante 1 e 3 o 2 e 3. Nel caso della infezione dei mutanti 1 e 2 non si osserva crescita fagica. Nei primi due casi le mutazioni portate dai fagi 1 e 3, 2 e 3 non colpiscono la stessa funzione necessaria per la crescita e *complementano* ricostituendo la funzione selvatica.

Le mutazioni 1 e 2 interessano lo stesso tratto di DNA e poiché colpiscono la stessa funzione non possono complementare e si dice che appartengono allo stesso cistrone.

Mediante questo test *cis-trans*, già proposto da Muller nel 1921 (6.3) si può definire se due mutazioni appartengono allo stesso cistrone o a cistroni diversi.

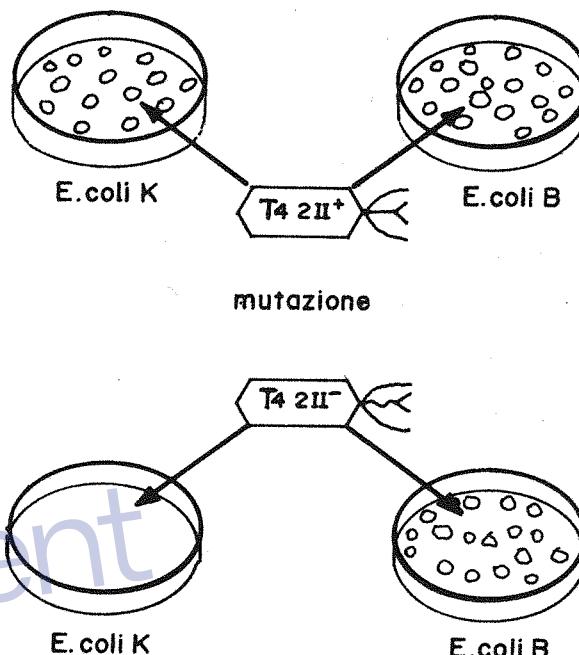


Figura 3 Modalità di crescita di fagi T4 in ospiti permissivi e non. Per ulteriori dettagli si veda il testo.

Nel decennio compreso tra il 1953 e il 1963, Benzer collezionò un gran numero di mutanti rII del fago T 4.

Incrociandoli tra loro riuscì ad ottenere fagi ricombinanti la cui frequenza permise di organizzare i mutanti secondo un ordine lineare.

La mappa costruita da Benzer indicò che la ricombinazione genetica è un processo che può separare siti genetici rappresentati praticamente da nucleotidi contigui. Benzer raccolse i suoi mutanti in due gruppi A e B: tutti i mutanti che appartengono ad un gruppo complementano con ciascun mutante dell'altro gruppo, producendo, se fatti crescere insieme, una progenie infettiva nel ceppo K. Non si ha affatto complementazio-

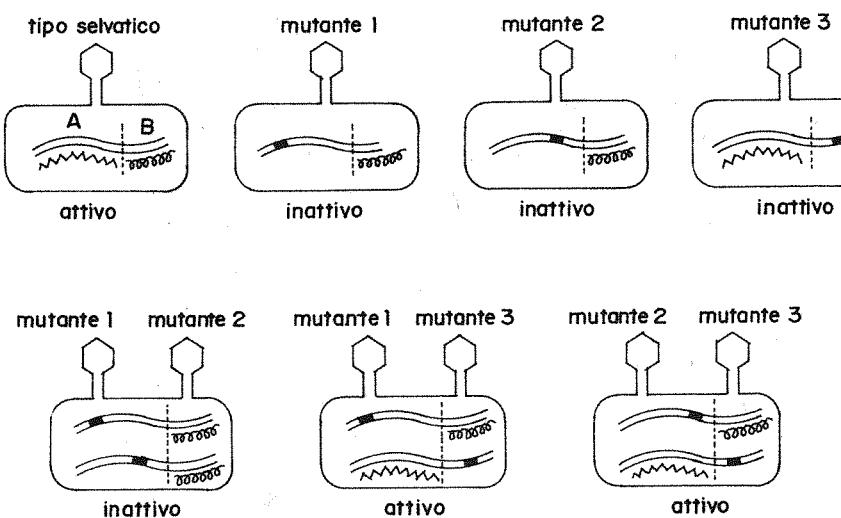


Figura 4 Il test cis-trans o test di complementazione dei mutanti *rII* in *E. Coli* ceppo K. In alto: i geni A e B sono integri cosicché vengono formati entrambi i polipeptidi A e B (indicati con le linee seggettate e spirali). I mutanti 1 e 2 presentano due mutazioni diverse nel gene A e possono quindi sintetizzare solo il polipeptide B; il mutante 3 ha una mutazione nel gene B e formerà soltanto il polipeptide A. Tutti e tre i mutanti sono incapaci di replicarsi nel ceppo K.

In basso: se viene fatta una infezione mista con i mutanti 1 e 2 non ha luogo la crescita nel batterio *E. coli* K, ciò accade invece nel caso d'infezione dei mutanti 1 e 3 oppure 2 e 3 in quanto il mutante 1 fornisce il polipeptide B mentre gli altri due forniscono il polipeptide A permettendo così la crescita.

ne, invece, se si cimentano mutanti dello stesso gruppo. È importante far rilevare come i lavori di Benzer abbiano condotto alla definizione sperimentale di gene. Nella Genetica classica la parola "gene" rappresentava l'unità del materiale ereditario, che può essere riconosciuta attraverso la sua capacità di *mutare* a stadi alternativi (alleli), di *ricombinare* con altre unità simili e di *funzionare* nell'organismo determinando un certo fenotipo.

Pertanto questi tre aspetti - mutazione, ricombinazione e funzione - venivano prima di Benzer attribuiti ad una sola unità ereditaria: il gene. Concludiamo con le stesse parole di Benzer:

questo lavoro descrive una regione del genoma del batteriofago che è correlata funzionalmente e che può essere suddivisa mediante mutazione e ricombinazione genetica....Estendendo questo tipo di approccio....si può pensare che riusciremo a caratterizzare in termini molecolari le dimensioni delle unità di ricombinazione, mutazione e funzione.....Al fine di caratterizzare l'unità funzionale è necessario definire quale funzione si vuole studiare. L'intera regione *rII* è unica nel senso che mutazioni che accadono nella regione producono il fenotipo *rII*. In base al test fenotipico nel quale due mutazioni sono in configurazione *trans* la regione può essere suddivisa in due segmenti funzionalmente separabili, ciascuno dei quali può contenere all'incirca 4×10^3 copie di nucleotidi. Se si assume che ogni segmento ha la "funzione" di specificare la sequenza degli aminoacidi caratteristico di una catena polipeptidica, allora i nucleotidici caratteristici per ciascun aminoacido possono essere considerati una funzione unitaria (6.4).

Gli esperimenti di Benzer fecero definitivamente crollare due concezioni molto in voga in quei tempi: il cromosoma come una collana di perle e la corrispondenza un gene - un enzima.

Per quanto attiene alla prima concezione, infatti, la mappa proposta da Benzer non presenta alcuna discontinuità e quindi se il gene è rappresentato dalla perla non vi è spazio per il filo tra di esse. Inoltre, poiché questa analisi genetica ha dimostrato che la funzione codificata dalla regione *rII* del fago T 4, (cioè la capacità di crescere su un ceppo di *E. coli* K), è dovuta alla presenza contemporanea dei due polipeptidi A e B, viene a cadere anche l'idea un gene - un'enzima che viene sostituita con quella più corretta un gene - una catena polipeptidica.

È bene rilevare che dagli anni 60 è venuto in uso indicare indifferentemente gene o cistrone e questi due termini verranno in seguito usati senza distinzione.

Dai lavori di Benzer anche il concetto di gene come unità di mutazione e ricombinazione viene frantumato così come si era già frantumata la concezione del cromosoma come una collana di perle. In seguito anche l'idea un gene - una catena polipeptidica, almeno in alcuni casi, si mostrerà non vera, lasciando un vuoto concettuale enorme.

Negli anni a cavallo del 1960 vengono acquisite molte informazioni su quella che viene indicata la funzione eterocatalitica del gene. Come osservò Stent (6.5), siamo nell'epoca dogmatica della biologia molecolare e infatti egli sostiene che dopo la proposizione del Dogma centrale della biologia molecolare, il modello dell'operone costituisce la sola grande estensione teorica di quei tempi. Sempre in quegli anni viene decifrato, grazie a Crick (6.6) ed a Niremberg (6.7), il codice genetico; si cominciano, inoltre, a conoscere numerosi dettagli delle modalità con cui avviene la sintesi delle proteine (6.8,6.9).

In sostanza, dopo aver definito che il DNA è la molecola nella quale sono iscritte tutte le informazioni necessarie a costituire un dato fenotipo, si comincia a conoscere come, su istruzione del nucleo, il citoplasma sintetizza le proteine, le quali costituiscono il fenotipo cellulare.

Nel 1961 Jacob e Monod si pongono il problema, già più volte affrontato dai genetisti, della esistenza accanto ai geni strutturali (sequenze di nucleotidi che vengono tradotte in catene polipeptidiche) dei geni regolatori: essi si chiedono se la sintesi di determinate proteine dipenda da:

...strutture (geni) che non siano controllate da fattori ambientali oppure la loro sintesi possa essere provocata o soppressa nella cellula, sotto l'influenza specifica di agenti esterni...

Almeno in forma provvisoria - essi affermano - permetteteci di assumere il messaggio contenuto in un gene è necessario e sufficiente per determinare la struttura di una proteina. Gli effetti di altri agenti oltre al gene strutturale stesso nel promuovere o inibire la sintesi di una proteina devono essere descritti come operazioni che controllano la velocità di trasferimento dell'informazione strutturale dal gene alla proteina....

In aggiunta ai classici geni strutturali, questi sistemi abbisognano di altri due tipi di determinanti genetici (regolatore ed operatore) che svolgono specifiche funzioni nei meccanismi di controllo. I meccanismi di controllo operano a livello del gene, cioè, regolando l'attività dei geni strutturali (6.10)

Essi facevano moltiplicare cellule di *E. coli* in assenza di latoso o di altri beta-galattosidi e potevano misurare la presenza

di non più di cinque molecole attive di galattosidasi per cellula (la galattosidasi è l'enzima che scinde il legame beta-galattosidico). Per ottenere la dimostrazione dell'esistenza dei geni regolatori, aggiunsero al terreno di coltura un galattoside, osservando quindi l'effetto della *induzione*; ovvero l'attivazione della sintesi dell'enzima (beta-galattosidasi) promossa dalla presenza dell'induttore. In questo caso essi misurarono un incremento del numero di molecole enzimatiche di un fattore mille. Questo fenomeno avveniva in pochi minuti dall'aggiunta dell'induttore ed il processo era completamente reversibile. Dopo rimozione dell'induttore, infatti, nel volgere di pochi minuti si osservava la cessazione della attività dell'enzima.

Jacob e Monod avevano un gran numero di mutanti che interessavano una regione del cromosoma del batterio (*E. coli*) detta regione *lac*, ed erano in grado di verificare, con il test cis-trans, se due mutazioni appartenevano allo stesso cistrone. Essi, inoltre, disponevano di mutanti *z*⁻ che avevano perso la capacità di produrre galattosidasi e mutanti *y*⁻ che avevano perso la capacità di indurre la galattoside-permeasi (un altro enzima necessario al metabolismo del latoso).

Mediante la sesdazione (6.11), costruirono dei cloni diploidi stabili per le seguenti funzioni

$$\begin{array}{l} z^+ y^- / F z^- y^+ \\ z^- y^+ / F z^+ y^- \end{array}$$

Entrambi questi cloni manifestavano il fenotipo selvatico, ovvero sintetizzavano galattosidasi e galattoside-permeasi attive.

La supposizione, che il processo di induzione determina la sintesi dell'enzima, sarà confermata dallo studio di alcune mutazioni che convertono i sistemi *inducibili* o *reprimibili* in sistemi *costitutivi* (6.12).

Se questa supposizione è esatta, mutazioni che colpiscono il sistema di controllo non dovrebbero comportarsi come alleli del gene strutturale. Vennero usati in questi studi anche un altro mutante *i*⁻ chiamato costitutivo. Il fenotipo di questi mu-

tanti è rappresentato dall'espressione di grandi quantità di galattosidasi e permeasi in assenza dell'induttore. Jacob e Monod osservarono che i mutanti i^- producevano galattosidasi e permeasi nello stesso rapporto delle cellule selvatiche. Ciò lasciava intendere che il prodotto del gene i era lo stesso bersaglio su cui agiva l'induttore.

Per saggiare questa ipotesi produssero mediante sesduzione i seguenti cloni

$$\begin{array}{l} i^+ z^- / F i^- z^+ \\ i^- y^+ / F i^+ y^- \end{array}$$

ed osservarono che il gene i^+ produce un allele dominante sull'allele i^- che determina il fenotipo costitutivo.

Essi proposero allora che le mutazioni i appartenevano ad un altro cistrone e controllavano l'espressione di y , e z mediante un componente citoplasmatico. Essi provarono inoltre, che il gene i^+ determinava la sintesi di un repressore, assente od inattivo nel caso dei cloni i^- .

Essi si interrogarono anche sulla natura molecolare del repressore e giunsero in un primo momento alla errata conclusione che esso non fosse di natura proteica, ammettendo che tuttavia, l'argomento non poteva essere considerato esaurito.

Riportiamo le loro conclusioni:

...definiamo un nuovo tipo di gene, che noi chiameremo "gene regolatore" (6.13). Un gene regolatore non contribuisce all'informazione strutturale delle proteine che controlla. Il prodotto di un gene regolatore è una sostanza citoplasmatica, che impedisce il trasferimento dell'informazione dal gene strutturale (o geni) alla proteina. In contrasto alla struttura di un classico gene strutturale, un gene regolatore può controllare la sintesi di numerose proteine differenti: non si applica più la regola un gene - una proteina (6.10).

Allo scopo di generalizzare la loro scoperta, essi estesero ad un altro sistema il loro approccio sperimentale, prendendo in considerazione le analogie esistenti tra i sistemi adattativi e quelli lisogenici.

Questa è la loro conclusione:

...l'analisi dei sistemi lisogenici rivela che l'espressione dei geni virali in questi sistemi è controllata da una sostanza citoplasmatica detta repressore, la cui sintesi è governata da un particolare gene "regolatore" che appartiene al genoma virale (6.10)

Una volta terminata la discussione sulle modalità con cui il trasferimento delle informazioni dei geni strutturali alle proteine è controllata da repressori specifici, sintetizzati dai geni regolatori, Jacob e Monod esaminarono le modalità di azione del repressore. Essi postularono che la caratteristica più importante del repressore è la sua caratteristica *pleiotropica*. Difatti, mutazioni del gene i in *E. coli* determinano la contemporanea sintesi di acetilasi e di galattosidasi e queste due proteine sono prodotte nella stessa misura. Se esiste un elemento di controllo, che gli Autori hanno chiamato "operatore" (6.10), gli alleli di questo locus devono essere *dominanti* rispetto al sistema di regolazione appena descritto. In altri termini, una cellula diploide per sesduzione che abbia il genotipo o^c / o^+ manifesta la sintesi costitutiva dell'enzima.

Una volta identificato un "locus operatore", ci si può attendere che esso sia una proprietà integrale dell'unità genetica z ed y , che il prodotto di questo locus si associa nel citoplasma ai prodotti dei loci z ed y controllandone la espressione. La prima ipotesi comporta che le mutazioni del locus operatore si comportino come se appartenessero contemporaneamente ai due cistroni. Nel caso contrario le stesse mutazioni si comportano come appartenessero ad un cistrone diverso da quello di z ed y .

Per descriminarne tra le due ipotesi, essi fecero i seguenti incroci

$$\begin{array}{l} o^+ z^+ / F o^c z^- \\ o^+ z^- / F o^c z^+ \end{array}$$

In presenza d'induttore, ottennero da questi cloni diploidi sia la galattosidasi normale prodotta dal locus Z^+ che la proteina

alterata (CRM, cross reacting material, cioè non attiva anche se riconosciuta da un anticorpo contro la proteina nativa) prodotta dall'allele del locus Z_1 . In assenza di induttore invece, si otteneva o il prodotto CRM che è in posizione *cis* rispetto al locus O^c o la galattosidasi *in cis* rispetto la locus O^c . Questi risultati li portarono a concludere:

Il locus O^c , pertanto, non ha effetto sull'allele Z in posizione *trans*. Ovvero, usando altri termini, l'espressione dell'allele z attaccato ad O^+ rimane completamente sensibile al repressore anche in presenza della mutazione O^c in posizione *trans* (6.10).

Nel diploide $O^+ z^- y^+ / F O^c z^+ y^-$ la galattosidasi (z) è sintetizzata in maniera costitutiva, ed (y) è prodotto solo in presenza d'induttore, mentre nel diploide $O^+ z^+ y^- / F O^c z^+ y^+$ tutti e due gli enzimi sono sintetizzati in maniera costitutiva.

Jacob e Monod stabilirono la impossibilità di distinguere con il test *cis-trans* tra le sequenze che codificano per i geni strutturali dell'operone e le sequenze che hanno funzione regolativa agendo *in cis* cioè, riconosciute dalla RNA polimerasi o da proteine con funzione regolativa. Pertanto una mutazione in un elemento di controllo adiacente ad un gene, si comporta, nel test di complementazione, come parte del gruppo di mutazioni che appartengono al gene strutturale.

Essi riassunsero graficamente la costituzione dell'operone in accordo con gli esperimenti sin qui condotti ammettendo peraltro di non poter discriminare tra i due modelli (Fig. 5).

Oggi sappiamo che il modello A è quello reale.

Jacob e Monod proposero che il repressore potesse essere una molecola di RNA che dopo, essere stata sintetizzata su informazione del gene regolatore, agirebbe su di un dato operatore.

Nonostante questa interpretazione erronea (dobbiamo ricordare che allora non erano note le modalità con cui una cellula sintetizzava le proteine) essi stabilirono alcune caratteristiche dell'operone, che ancora oggi meritano di essere lette, in quanto esempio di una metodologia scientifica di grande lucidità:

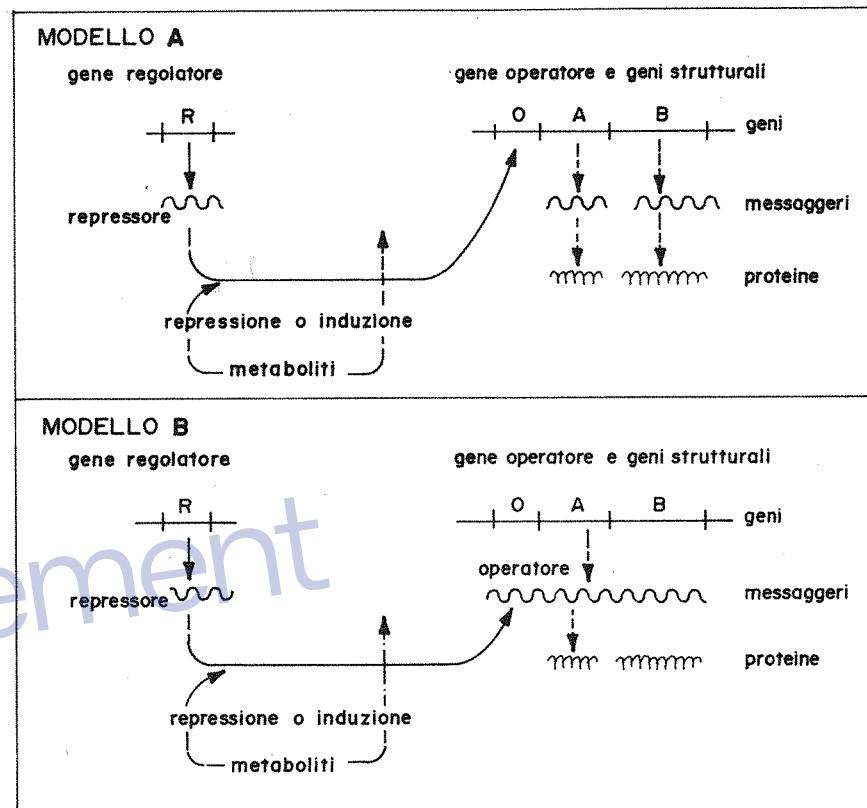


Figura 5 Rappresentazione di due modelli alternativi di regolazione genica nei Prokaryoti proposti da Jacob e Monod.

Oggi sappiamo che il modello A risulta essere vero per il quale gli Autori ammettono una azione diretta del prodotto del gene (R) repressore sul gene (O) operatore.

Ci sia concesso di discriminare con chiarezza le conclusioni raggiunte con esperimenti dalle speculazioni: 1. la conclusione più certa è l'esistenza di geni *regolatori* - che distinguiamo dai geni strutturali in quanto - mutazioni del gene strutturale, che producono una alterazione della proteina, non hanno effetto sui meccanismi di regolazione. Mutazioni che alterano i meccanismi di regolazione non alterano la proteina e non mappano nei geni strutturali.

turali. I geni strutturali obbediscono al principio un gene - una proteina, mentre i geni regolatori possono interessare la sintesi di numerose proteine. 2. L'esistenza di un operatore, inteso come il sito di azione del repressore, è dedotta dall'esistenza e dalla specificità di azione del repressore..... L'assunzione che l'operatore rappresenti il punto di inizio per la trascrizione di numerosi geni strutturali è una semplice speculazione (6.10).

Va solo ricordato che questa organizzazione dei geni in forma di operone è diffusissima tra i virus ed i procarioti e praticamente assente negli eucarioti.

Gli esperimenti di Jacob e Monod rappresentano la prima ed inequivocabile prova che nel genoma esistono delle sequenze che, pur non determinando un prodotto proteico, hanno una notevole importanza nella espressione del gene.

Appendice al cistrone

Esistono dei virus, detti fagi della serie T pari, che hanno come ospite nel quale riprodursi il batterio *E. coli*. Tali virus, una volta infettato un batterio, ne producono la lisi, dopo essersi riprodotti al suo interno. Per questo loro comportamento vengono chiamati *fagi lisogeni*.

Il meccanismo d'infezione del fago è molto specifico: vi sono delle strutture fagiche, dette "fibre della coda", che permettono l'adesione sulla parete batterica. A seguito di questa interazione, il DNA contenuto nella "testa" o capsidge del fago viene "iniettato" all'interno della cellula dove dirige tutte le sintesi macromolecolari (replicazione del DNA e sintesi dei costituenti il capsidge) necessari alla sua riproduzione. In genere dopo l'infezione si ha la lisi batterica con la quale vengono liberate nell'ambiente circa cento particelle fagiche in grado di compiere altrettante nuove infezioni. Questo processo avviene in circa 20 minuti.

Esistono due ceppi di fagi, A e B, che separatamente non sono in grado di infettare un batterio *E. coli*. Se però eseguiamo una infezione mista, cioè infettiamo lo stesso ceppo batterico

con tutti e due i ceppi fagici si ha l'infezione del batterio e la produzione di una progenie fagica. Ne deduciamo che i due ceppi, pur mostrando lo stesso fenotipo, incapacità di infettare un batterio, sono portatori di due mutazioni su unità funzionali diverse e che possono quindi complementare ripristinando il fenotipo selvatico, cioè la capacità di infettare il batterio (Fig. 6).

Questo test di complementazione o *test cis-trans* permette di ascrivere due mutazioni allo stesso cistrone (gene) o meno a seconda dell'esito del test. Nel caso illustrato in precedenza le mutazioni che hanno colpito A e B non appartengono allo stesso cistrone, perché complementano, ovvero l'infezione mista ripristina il fenotipo selvatico.

Se ciò non avviene diciamo che le due mutazioni appartengono allo stesso cistrone (Fig. 7).

L'assenza di complementazione tuttavia, *non sempre indica che due mutazioni coinvolgono lo stesso gene*. Questa incertezza è dovuta alle seguenti ragioni:

- una delle due mutazioni coinvolge un sito regolatore del gene in questione
- una delle due mutazioni dà origine ad un inibitore.

Medicina nei secoli (Supplemento)

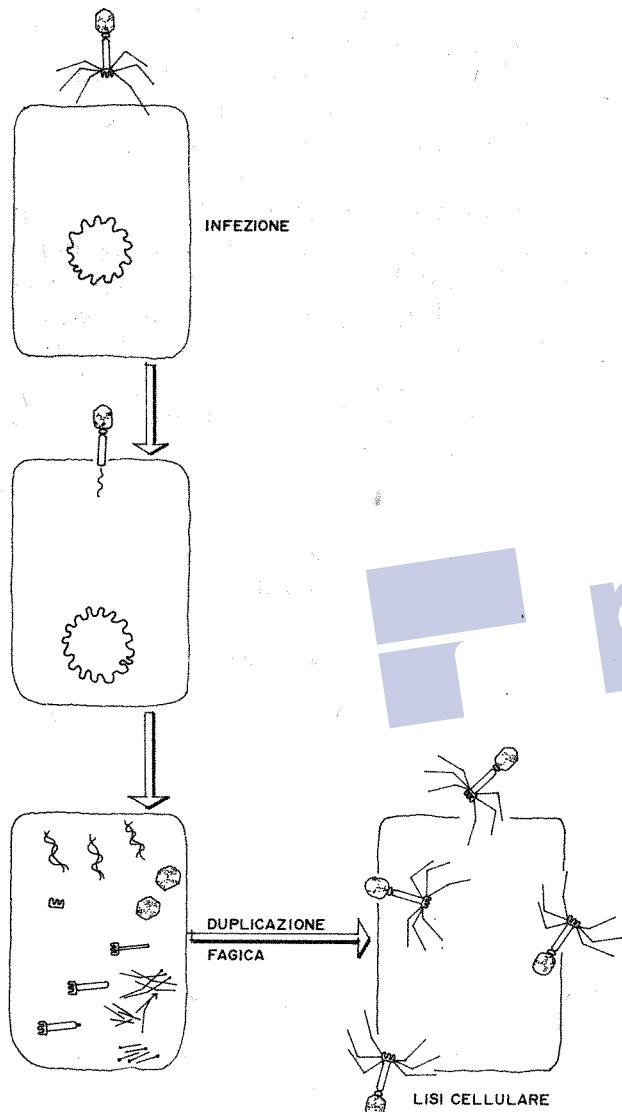


Figura 6 Schema semplificato dalle modalità della replicazione di un batteriofago in una cellula batterica.

Gli sviluppi del concetto di gene

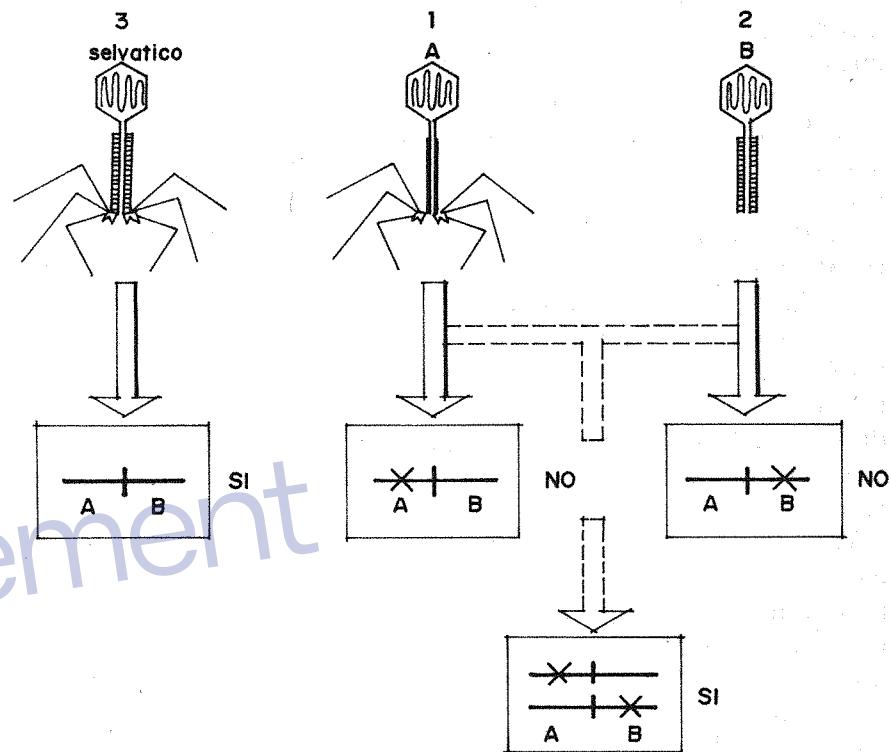


Figura 7 Esempio di complementazione genica a seguito della infezione mista di virus in un batterio.

Appendice all'operone

Gli esperimenti di Jacob e Monod hanno permesso di proporre il modello dell'operone come spiegazione della espressione coordinata di geni strutturali in risposta ad una molecola che funge da induttore. Gli elementi genetici di questo modello sono un gene *regolatore*, un gene *operatore* ed un dato numero di geni strutturali.

Il gene regolatore produce una proteina detta *repressore* che interagisce con il gene operatore, adiacente ai geni strutturali che controlla. Il legame del repressore all'operatore impedisce la trascrizione dei geni strutturali.

La figura 8 raffigura lo schema di un operone nel quale una specifica sequenza *p* serve come sito di legame per la RNA polimerasi, viene indicata anche la sequenza *p* alla quale si attacca la RNA polimerasi e permette la trascrizione dei geni strutturali (Fig. 8).

Nella figura si nota un operone nella condizione "repressa" (Fig. 8.a) oppure "attivo", cioè *indotto* (fig. 8 b). Perché si possa passare dalla condizione repressa a quella attiva la molecola del repressore deve interagire con un *induttore* (rappresentato da un triangolo), che induce una transizione conformazionale del repressore che non può più interagire con la sequenza operatore.

W. Gilbert e B. Muller-Hill (6.14) hanno dimostrato che la molecola del repressore, nel caso dell'operone del lattoso, è una proteina costituita da 4 sottounità identiche di massa equivalente a 37.000 D (6.15) ciascuna delle quali lega una molecola d'induttore.

Nel caso in esame l'induttore può essere costituito da numerose molecole, la più attiva è rappresentata da IPTG (isopropil- β -D-tiogalattoside).

Successivamente Gilber ha isolato il frammento di DNA che si lega al repressore e la sua sequenza è risultata essere

AATTGTGAGCGGATACAATT

Altri studi hanno dimostrato che l'azione coordinata di questi geni ha bisogno di altre molecole tra le quali l'AMP ciclico.

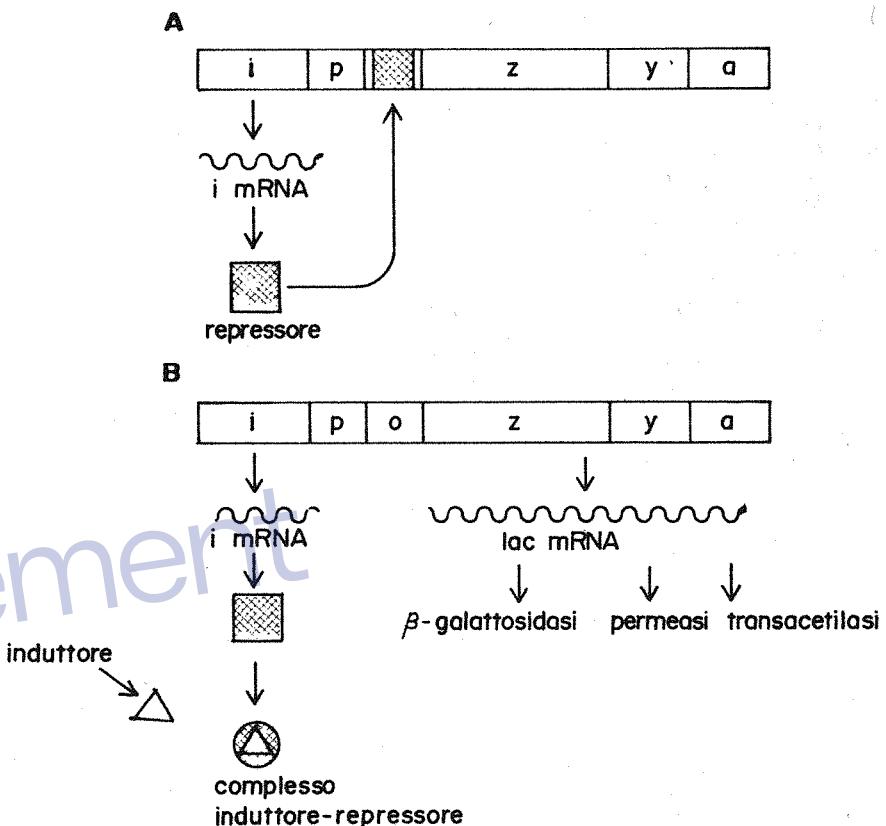


Figura 8 Schema di repressione (A) ed induzione (B) dell'operone del lattoso. Il gene *i* codifica per il repressore; *o* è la sequenza di DNA alla quale si lega la molecola repressore; le sequenze *z*, *y*, *a* codificano per le proteine necessarie al metabolismo del lattoso.

L'induzione, ovvero la sintesi degli enzimi, avviene in seguito alla interazione dell'induttore con il repressore determinando in questa molecola una variazione conformazionale che ne impedisce il legame alla sequenza *o*.

NOTE E BIBLIOGRAFIA

6. 1 Per una diffusa trattazione del concetto di gene secondo la Genetica classica si veda B. Fantini "La Genetica classica" Loescher 1979.
6. 2 Green M.M. e Green K.G., Crossing-over between alleles at the lozenge locus in *Drosophila melanogaster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35 (1949) 586
6. 3 Muller H.J., Are the factors of the heredity arranged in a line?, Am. Nat. 54 (1921) 97
6. 4 Benzer S., Fine structure of a genetic region in bacteriophage, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 41 (1955) 344
6. 5 Stent G.S., That was the molecular biology that was, Science 160 (1968) 390
6. 6 Crick F.H.C., Barnett L., Brenner S. e Watts-Tobin R.J., General nature of the genetic code "for proteins", Nature, 192 (1961) 1227
6. 7 Niremberg M.W., The genetic code II Sci. Am. 208, 80 (1963) traduzione in italiano per "Le Scienze", Zanichelli, Bologna 1968
6. 8 Crick F.H.C., On protein synthesis, Symp. Soc. Exp. Biol., 12 (1958) 138
6. 9 Autori Vari, The genetic code, Cold Spring Harbor Quant. Biol. 31 1966
- 6.10 Jacob F. e Monod J., Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins, J. Mol. Biol. 3 (1961) 318
- 6.11 La sesdizione è l'uso di un plasmide (fattore di fertilità F) che possiede oltre alle informazioni genetiche sue proprie le informazioni dell'operone lac. In questo modo si determina una condizione di diploidia nel batterio per la regione del lac operon.
- 6.12 *inducibile* è il termine con cui si definisce un sistema enzimatico la cui espressione viene promossa dalla presenza di una molecola induitrice (ad es. un galattoside) *reprimibile* è un sistema enzimatico la cui espressione è bloccata dalla presenza di una molecola detta repressore.
- 6.13 *costitutivo* è una caratteristica fenotipica di un sistema enzimatico che mostra l'espressione degli enzimi sia in presenza che in assenza dell'induttore.
- 6.14 Jacob F. e Monod J., Gènes de structure et gènes de regulation dans la biosynthèse des protéines, C.R. Acad. Sci., Paris 249 (1959) 1282
- 6.14 Gilbert W. e Muller-Hill B., Isolation of lac repressor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56 (1966) 1891
- 6.15 D (dalton) è l'equivalente in massa di una molecola d'idrogeno.

7.

LA PRIMA CRISI: LE ECCEZIONI AL CISTRONE

Intorno agli anni settanta erano sorti molti sospetti che l'organizzazione del genoma degli eucarioti fosse più complessa di quella dei procarioti, cioè con impegno di un numero maggiore di sequenze di DNA. Esperimenti di ibridazione molecolare potevano essere spiegati supponendo che solo una piccola parte del genoma venisse trascritta e quindi potesse ibridare con il DNA corrispondente. Due erano le ipotesi avanzate per spiegare questo fenomeno peculiare degli eucarioti: o una gran parte (anche l'80%) delle sequenze non rappresentano geni strutturali oppure il gene strutturale contiene più sequenze di quante siano presenti nell'RNA messaggero. Tutte e due le ipotesi erano suffragate da evidenze sperimentali; in particolare, la seconda era sostenuta dalla scoperta che RNA presenti nel nucleo (Hn RNA) (RNA eterogeneo nucleare) contenevano sequenze in comune con gli mRNA ma erano di dimensioni maggiori rispetto a questi ultimi (7.1,7.2).

P. Leder, per primo, scoprì mediante la tecnica della ibridazione tra mRNA e DNA, che nel DNA di un gene eucariotico erano presenti delle sequenze che risultavano invece assenti nell'mRNA. Ibridando infatti l'RNA messaggero della globina di topo con il corrispondente DNA, al microscopio elettronico si potevano osservare delle anse, cioè delle zone di non appaiamento (7.3), che potevano venir spiegate come sequenze presenti nel DNA e assenti nell'mRNA (Fig. 9).

Questa osservazione fu seguita da altre (7.4 - 7.7) che confermavano l'esistenza all'interno dei geni eucariotici di sequenze intercalanti. Tali sequenze vennero chiamate *introni* in contrapposizione agli *esoni* che costituivano la porzione codificante del gene.

Lo stupore dei biologi di fronte a tali risultati fu grande ed ancora oggi, benché siano state avanzate molte ipotesi sulla funzione di questa organizzazione "barocca" del gene eucariotico, non si hanno ancora prove chiare di quali meccanismi evolutivi (e quindi quali vantaggi) abbiano favorito la comparsa del "ge-

NOTE E BIBLIOGRAFIA

6. 1 Per una diffusa trattazione del concetto di gene secondo la Genetica classica si veda B. Fantini "La Genetica classica" Loescher 1979.
6. 2 Green M.M. e Green K.G., Crossing-over between alleles at the lozenge locus in *Drosophila melanogaster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35 (1949) 586
6. 3 Muller H.J., Are the factors of the heredity arranged in a line?, Am. Nat. 54 (1921) 97
6. 4 Benzer S., Fine structure of a genetic region in bacteriophage, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 41 (1955) 344
6. 5 Stent G.S., That was the molecular biology that was, Science 160 (1968) 390
6. 6 Crick F.H.C., Barnett L., Brenner S. e Watts-Tobin R.J., General nature of the genetic code "for proteins", Nature, 192 (1961) 1227
6. 7 Niremberg M.W., The genetic code II Sci. Am. 208, 80 (1963) traduzione in italiano per "Le Scienze", Zanichelli, Bologna 1968
6. 8 Crick F.H.C., On protein synthesis, Symp. Soc. Exp. Biol., 12 (1958) 138
6. 9 Autori Vari, The genetic code, Cold Spring Harbor Quant. Biol. 31 1966
- 6.10 Jacob F. e Monod J., Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins, J. Mol. Biol. 3 (1961) 318
- 6.11 La sesdizione è l'uso di un plasmide (fattore di fertilità F) che possiede oltre alle informazioni genetiche sue proprie le informazioni dell'operone lac. In questo modo si determina una condizione di diploidia nel batterio per la regione del lac operon.
- 6.12 *inducibile* è il termine con cui si definisce un sistema enzimatico la cui espressione viene promossa dalla presenza di una molecola induitrice (ad es. un galattoside) *reprimibile* è un sistema enzimatico la cui espressione è bloccata dalla presenza di una molecola detta repressore.
- 6.13 *costitutivo* è una caratteristica fenotipica di un sistema enzimatico che mostra l'espressione degli enzimi sia in presenza che in assenza dell'induttore.
- 6.14 Jacob F. e Monod J., Gènes de structure et gènes de regulation dans la biosynthèse des protéines, C.R. Acad. Sci., Paris 249 (1959) 1282
- 6.14 Gilbert W. e Muller-Hill B., Isolation of lac repressor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56 (1966) 1891
- 6.15 D (dalton) è l'equivalente in massa di una molecola d'idrogeno.

7.

LA PRIMA CRISI: LE ECCEZIONI AL CISTRONE

Intorno agli anni settanta erano sorti molti sospetti che l'organizzazione del genoma degli eucarioti fosse più complessa di quella dei procarioti, cioè con impegno di un numero maggiore di sequenze di DNA. Esperimenti di ibridazione molecolare potevano essere spiegati supponendo che solo una piccola parte del genoma venisse trascritta e quindi potesse ibridare con il DNA corrispondente. Due erano le ipotesi avanzate per spiegare questo fenomeno peculiare degli eucarioti: o una gran parte (anche l'80%) delle sequenze non rappresentano geni strutturali oppure il gene strutturale contiene più sequenze di quante siano presenti nell'RNA messaggero. Tutte e due le ipotesi erano suffragate da evidenze sperimentali; in particolare, la seconda era sostenuta dalla scoperta che RNA presenti nel nucleo (Hn RNA) (RNA eterogeneo nucleare) contenevano sequenze in comune con gli mRNA ma erano di dimensioni maggiori rispetto a questi ultimi (7.1,7.2).

P. Leder, per primo, scoprì mediante la tecnica della ibridazione tra mRNA e DNA, che nel DNA di un gene eucariotico erano presenti delle sequenze che risultavano invece assenti nell'mRNA. Ibridando infatti l'RNA messaggero della globina di topo con il corrispondente DNA, al microscopio elettronico si potevano osservare delle anse, cioè delle zone di non appaiamento (7.3), che potevano venir spiegate come sequenze presenti nel DNA e assenti nell'mRNA (Fig. 9).

Questa osservazione fu seguita da altre (7.4 - 7.7) che confermavano l'esistenza all'interno dei geni eucariotici di sequenze intercalanti. Tali sequenze vennero chiamate *introni* in contrapposizione agli *esoni* che costituivano la porzione codificante del gene.

Lo stupore dei biologi di fronte a tali risultati fu grande ed ancora oggi, benché siano state avanzate molte ipotesi sulla funzione di questa organizzazione "barocca" del gene eucariotico, non si hanno ancora prove chiare di quali meccanismi evolutivi (e quindi quali vantaggi) abbiano favorito la comparsa del "ge-

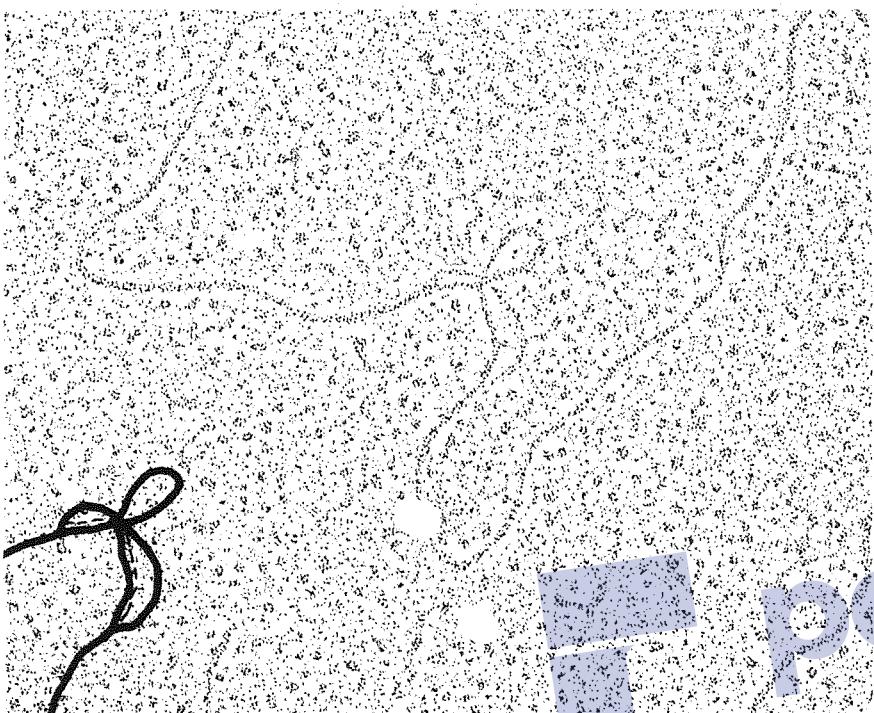


Figura 9 Immagine risultante dall'analisi al microscopio elettronico del prodotto d'ibridazione tra il gene della globina beta del topo e l'm RNA dello stesso gene. Nella parte bassa a sinistra gli Autori mostrano che vi sono delle anse e un anello. Le anse rappresentano uno dei due filamenti del DNA che non è appaiato perché il filamento di DNA complementare è appaiato ad un filamento di RNA (segno tratteggiato). L'anello è stato interpretato come una sequenza di DNA (introne) che non trovando una sequenza complementare costituisce l'anello.

ne in pezzi", rispetto ai geni *essenziali* (streamlined) degli eucarioti.

L'organizzazione di un gene come quello della globina beta dell'uomo, mostra due introni che spezzano l'unità codificante in due punti tra i codoni 31/32 e tra i codoni 104/105 (Fig. 10).

Poiché questi introni si inseriscono allo stesso sito in numerosi altri geni delle globine beta di uccelli o anfibi, si ritiene

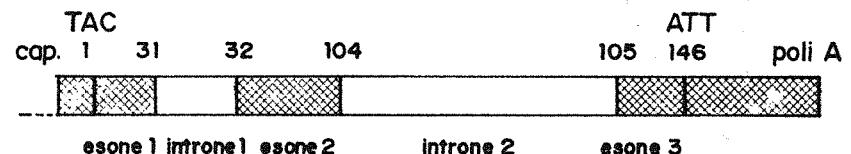


Figura 10 Struttura molecolare dei geni per le globine umane.

che questa grande conservazione evolutiva sia il risultato di un qualche vantaggio nell'organizzazione del gene in pezzi. Accanto alla conservazione del sito di inserzione degli introni, esiste invece una variabilità della loro lunghezza che determina, in ultima istanza la lunghezza del gene.

Questa organizzazione "barocca" è stata trovata in numerosi geni, come ad esempio quello dell'ovoalbumina gallina, costituito da 7500 copie di basi e la cui parte codificante è rappresentata da 8 "esoni" per un totale di 1859 coppie di basi. In questo gene solo il 25% dei nucleotidi hanno funzioni codificanti.

Il "gene in pezzi" sembra essere una condizione abbastanza comune negli eucarioti. Una simile organizzazione si trova infatti anche nei geni per gli RNA ribosomali e per gli RNA transfer, anche se non è necessario pensare che tutti i geni siano interrotti (7.8 - 7.14).

Il confronto tra le sequenze del DNA di geni diversi ha permesso di trovare delle regolarità nelle regioni di confine tra introni ed esoni. In queste zone si trovano delle sequenze che variano da 1 a 4 coppie di basi; le coppie GT sono dette sito donatore e le coppie di basi AG sono dette sito accettore, con meccanismi di rimozione degli introni che richiedono l'intervento di ribonucleoproteine (7.15, 7.16).

Una volta accertato che il gene eucariotico è organizzato in pezzi discontinui (fig. 11) è sorta la domanda di come si ottiene un RNA messaggero delle dimensioni necessarie per codificare la proteina corrispondente. In altri termini, dove e come il trascritto primario o Hn RNA viene modificato fino a costituire l'mRNA che viene tradotto sui ribosomi. Questi processi, sono

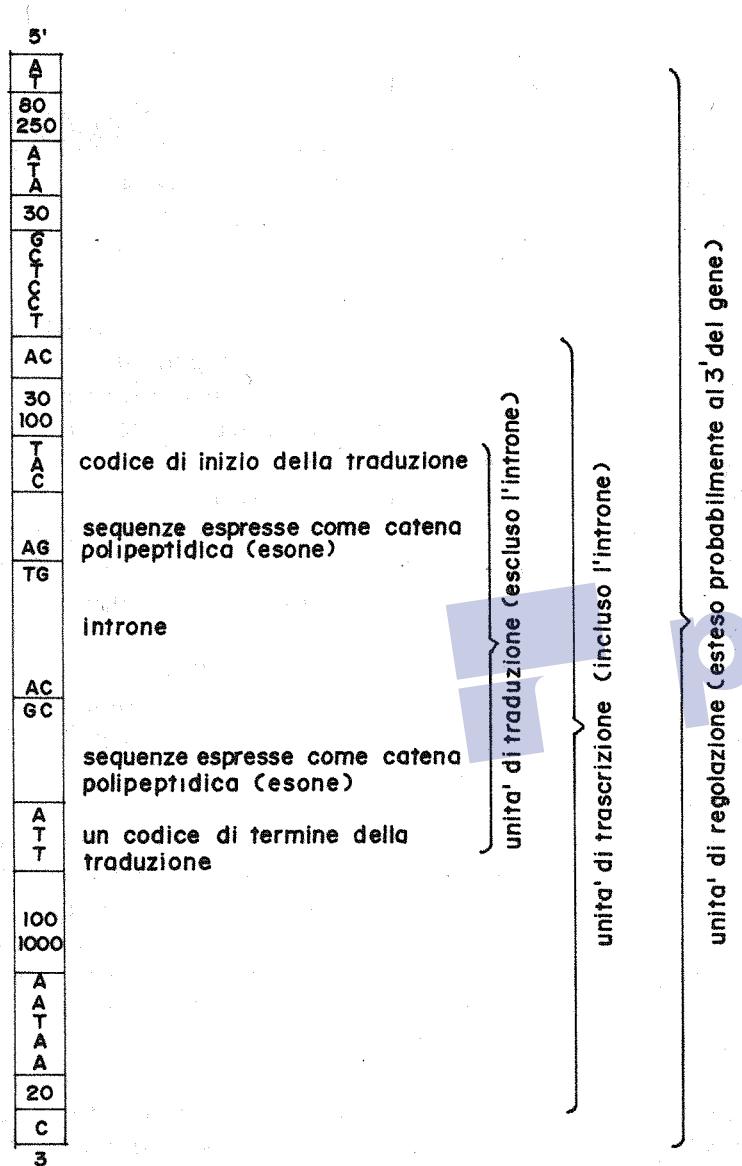


Figura 11 Organizzazione molecolare dei geni eucariotici.

chiamati "RNA splicing" (7.15) ed "RNA processing" (7.16), e complessivamente "maturazione dell'RNA".

In prima analisi la scoperta che la gran parte dei geni eucariotici sono discontinui potrebbe invalidare il concetto di colinearità tra gene e catena polipeptidica.

Una più attenta analisi del processo di maturazione del trascritto primario permette di osservare che la molecola di mRNA maturo contiene tutti gli esoni e che questi sono disposti nell'ordine nel quale li troviamo nella porzione del DNA necessaria a codificarli. Poichè la traduzione avviene dal terminale 5' della molecola di mRNA.

Possiamo dire che il principio della colinearità vale anche per i geni discontinui e che ogni Hn RNA è una copia identica come numero di basi a quella del gene corrispondente. A carico dell'Hn RNA avvengono, però, delle modificazioni successive al processo di trascrizione che lo rendono diverso dal gene dal quale è stato trascritto. Subito dopo la trascrizione di questa molecola viene aggiunta al terminale 3'OH una serie di residui di riboadenine che costituisce la cosiddetta "poly-A tail" (7.17,7.18). La lunghezza di questa "coda" è variabile e può raggiungere anche qualche centinaio di residui. Una coda di poli-A, tuttavia, non sembra essere obbligatoria, dal momento che vi sono molecole di messaggero, come quelle per gli istori, che non possiedono una tale struttura. La molecola di Hn RNA viene ulteriormente modificata mediante l'aggiunta al terminale 5' trifosfato della 7-metil-guanosina. Si forma così quella struttura, detta "cap" ($m^7G(5')pppA$), che viene riconosciuta da una proteina di legame (cap-binding protein), favorendo l'esatta associazione tra mRNA e ribosoma.

La rimozione di una considerevole parte dell'Hn RNA è il processo detto "RNA splicing". Tale processo, nel caso dell'ovoalbumina fa sì che il 75% delle sequenze non raggiungano il citoplasma. Il processo di "splicing" (fig. 12) consiste in tagli a carico dei legami fosfodiesterici dell'Hn RNA e la "saldatura" di "monconi", gli esoni, sino a raggiungere le dimensioni dell'RNA messaggero citoplasmatico maturo.

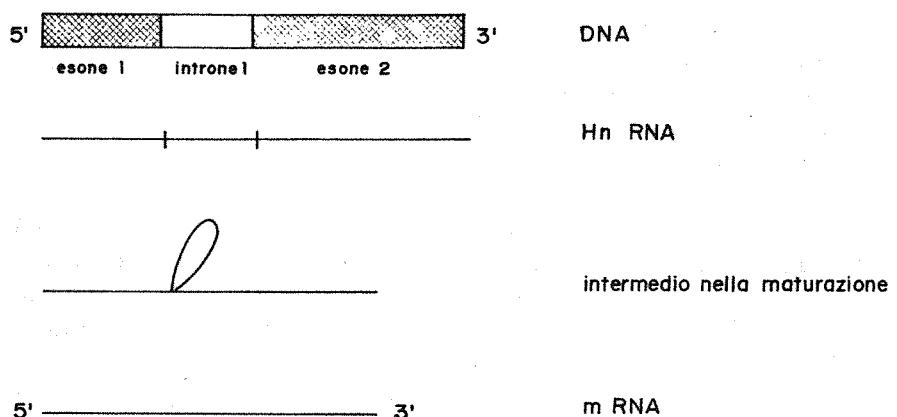


Figura 12 Meccanismo ipotetico di rimozione degli introni in un gene eucariotico (maturazione).

Un gene eucariotico ipotetico consiste di due esoni e di un introne, quest'ultimo viene rimosso nel corso della maturazione dell'HnRNA. Il prodotto citoplasmatico è costituito dalla sequenza dei due esoni legati covalentemente.

L'analisi della molecola di mRNA maturo ci permette di trovare altre sequenze "eccedenti" la capacità codificante, in altri termini la molecola di messaggero contiene più nucleotidi di quelli necessari per la codificazione del corrispondente polipeptide.

È molto interessante notare che questo processo di "maturazione" dei trascritti avviene mediante l'intervento di strutture complesse dette "spliceosomes" costituite da numerose proteine, non ancora completamente identificate, e piccoli RNA nucleari (sn RNA).

Ancora più sorprendente della scoperta del gene in pezzi, è stata la scoperta che nei mitocondri alcuni introni vengono rimossi senza l'intervento di proteine e la rottura e la formazione dei legami non necessita di energia fornita da nucleosidi trifosfati. Questo processo è stato chiamato "self-splicing" (per una dettagliata rassegna si può leggere Cech (7.19).

La scoperta del "gene discontinuo" non solo ha imposto un adattamento del principio della colinearità tra gene e polipeptide, ma soprattutto ha fatto rilevare come sia stato "imprudente" estrapolare agli organismi eucariotici i risultati trovati in *E. coli*.

Una volta accertata la struttura discontinua del gene eucariotico, ha, infatti, senso chiedersi se il test cis-trans è ancora in grado di identificare un gene.

Le mutazioni che colpiscono gli esoni vengono raccolte, per mezzo del test cis-trans, in tanti gruppi di complementazione quanti sono gli esoni. Per quanto riguarda gli introni, invece, poichè non codificano per alcuna funzione, si può ritenere che le mutazioni che colpiscono queste sequenze, non determinando alcun fenotipo, non possono essere mappate in alcun gruppo di complementazione.

Vi è tuttavia una eccezione a quanto appena detto: le mutazioni che colpiscono il sito accettore e donatore dello "splicing" determinano un fenotipo particolare, nel senso che non permettono la normale maturazione del trascritto e quindi si comportano come se fossero mutazioni che alterano la sintesi del polipeptide.

Per questo il test cis-trans non permette di distinguere tra mutazioni nell'esone e mutazioni che colpiscono i siti dello "splicing".

Alcuni introni dei geni mitocondriali del lievito mostrano una caratteristica del tutto peculiare: possiedono infatti un modulo di lettura aperto, cioè senza un codone di terminazione, che codifica per un prodotto necessario per la rimozione dell'intron stesso.

Un tipo di mutazione a carico degli introni di un gene, determina la comparsa di un fenotipo particolare che merita di essere descritto in dettaglio.

Il gene per il citocromo b è costituito da 6400 coppie di basi di cui 1155 sono la parte codificante (Fig. 13).

L'intron 2 possiede un modulo di lettura aperto, che è in registro con il modulo costituito dagli esoni 1 e 2. Si pensa che

Medicina nei secoli (Supplemento)

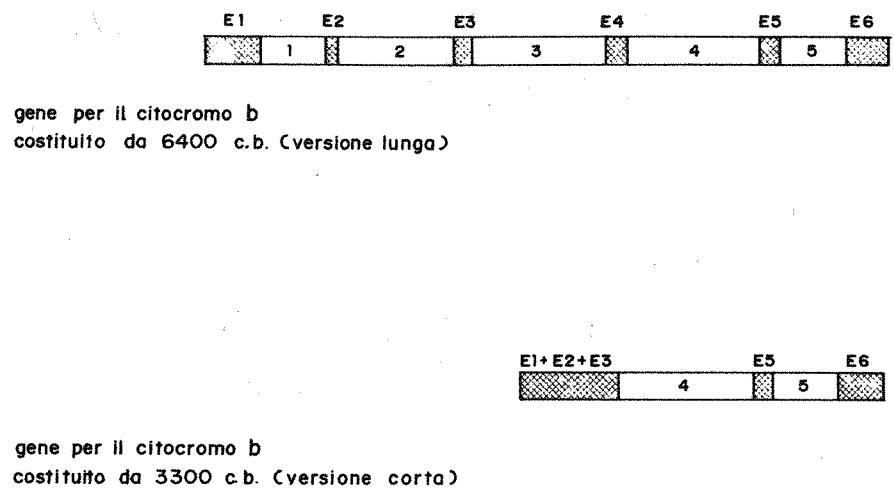


Figura 13 Struttura molecolare dei geni per il citocromo b del lievito.

la maturazione preveda prima la rimozione dell'introne 1, producendo un trascritto che possiede l'esone 1 e 2 contigui e legati covalentemente all'introne 2 ed a tutte le sequenze introniche ed esoniche che seguono.

La sequenza di questo primo trascritto (Fig. 14), che ha subito un solo evento maturativo, mostra un modulo di lettura aperto costituito da 424 codoni, che, se tradotto a partire dall'estremità N-terminale, produce un polipeptide costituito da 144 codoni all'estremità N-terminale, codificati dagli esoni 1 e 2 e da 280 codoni costituiti dal modulo di lettura dell'introne 2.

La traduzione di questo trascritto produce un enzima, la RNA maturasi, che permette la rimozione del secondo introne.

Se avvengono mutazioni nel secondo introne, si ottengono codoni non-senso nel modulo di lettura aperto: di conseguenza non si può più ottenere la RNA maturasi, la cui assenza determina il blocco della maturazione del trascritto.

Si può formulare un modello della maturazione degli mRNA con intervento della maturasi, come un paradigma della rego-

La prima crisi: le eccezioni al cistrone

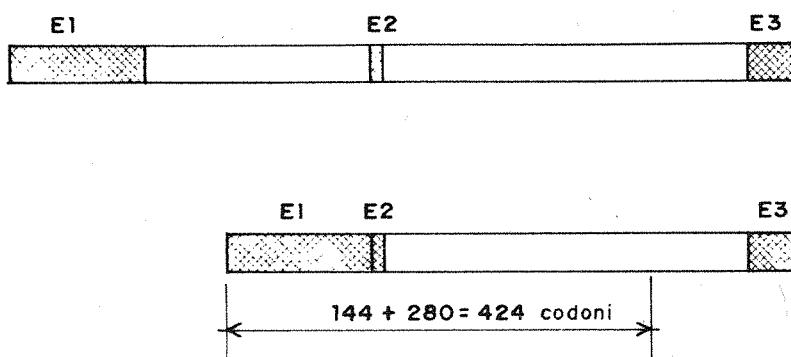


Figura 14 Modalità di formazione della maturasi nel lievito.

In questa figura a differenza della precedente sono presenti solo tre introni e due esoni del gene per il citocromo c. Il prodotto del primo evento maturativo, costituito da 424 codoni, costituirebbe l'RNA messaggero per la presunta RNA maturasi. La sua funzione consisterebbe nella rimozione dei restanti introni con la produzione dell'RNA messaggero maturo per il citocromo c.

lazione dei geni interrotti nel mitocondrio di lievito (7.20 - 7.23). Le mutazioni di questo tipo, non coinvolgendo i siti dello "splicing", per quanto detto in precedenza, ci dovrebbero sfuggire.

È chiaro che, almeno in questo caso, è stato individuato un diverso tipo di mutazione degli introni. Il caso della maturasi del lievito ci permette di conoscere un tipo di mutazione dell'introne che determina l'assenza di un prodotto proteico che agisce *in trans* (7.24).

Dal caso del citocromo b del lievito si comprende che non è esatto affermare che gli introni non abbiano alcuna funzione.

In secondo luogo, nel genoma del mitocondrio anche una "versione" corta del gene del citocromo b (Fig. 14). In questa "versione" sono assenti i primi tre introni e sono presenti le porzioni esoniche 1, 2 e 3 legate covalentemente alla restante parte del gene. Poiché i mitocondri del lievito possono vivere ugualmente bene con ambedue le versioni del gene, c'è da chiedersi quale sia la funzione della RNA maturasi, nel quadro più generale della maturazione dei trascritti di eucarioti inferiori (7.25).

Il caso della maturasi non è unico : sono stati, infatti, scoperti altri casi nei quali dalla sequenza del gene si può inferire la presenza di moduli di lettura aperti.

Il *Flavobacterium*, ad esempio, è stato isolato nel 1975 dalle acque di lavaggio delle fabbriche del nylon (7.26). Questo batterio può crescere in un terreno di coltura che contenga come fonte di carbonio ed azoto il dimero ciclico dell'acido-6-amino esanoico, che è in grado di trasformare grazie a due plasmidi che codificano per due idrolasi.

Questi due enzimi sono molto specifici e non scindono altri legami amidici naturali. Poiché la sintesi del nylon è iniziata nel 1938 ci si può chiedere come si siano prodotte queste due nuove idrolasi.

La sequenza dei geni che codificano per uno di questi enzimi (7.27) ha indotto S. Ohno (7.28) a considerare che la intera sequenza del gene costituita da 392 codoni sia derivata da una sequenza di 11 basi così costituita:

CAGCTGGCAGG

che ripetuta tre volte permette di codificare per il peptide Gln-Leu-Ala-Gly-Ser-Trp-Gln-Ala-Ala-Gly-Arg. L'analisi della sequenza (7.26) ha permesso di individuare un modulo di lettura aperto che codifica per un polipeptide di 427 residui ricco in Arginina. Se avviene la inserzione di una sola Timina si produce la chiusura di questo modulo di lettura e si ottiene un nuovo modulo di lettura aperto che permette la sintesi di un polipeptide di 392 aminoacidi che ha la specificità enzimatica di idrolizzare il nylon.

Secondo Ohno questo rapido adattamento evolutivo sarebbe determinato dal passaggio da una precedente sequenza già utilizzata, mediante l'inserzione di una base, ad un modulo di lettura inutilizzato.

Perché questa lunga digressione rispetto al problema della evoluzione del concetto di gene?

Sino agli anni 80 era impossibile conoscere un gene in base alla sua sequenza di basi e quindi ci si accontentava di seguire la sua trasmissione e la sua funzione dapprima come un fenotipo ereditabile, poi come un carattere determinato da un polipeptide. Da un decennio è possibile conoscere direttamente la sequenza del gene.

È sorprendente ed allo stesso tempo interessante che anche senza conoscere la funzione, si possa ipotizzare la presenza di un gene in base alla identificazione di un modulo di lettura aperto.

Siamo in questo senso arrivati alla capacità predittiva della Fisica che è in grado di anticipare l'esistenza di particelle ancora prima della loro scoperta.

NOTE E BIBLIOGRAFIA

7. 1 Georgiev G.P., The nature and biosynthesis of nuclear ribonucleic acids, in Prog.Nucleic Acid Res. Mol.Biol. 6 259, Academic Press, New York, London (1967)
7. 2 Scherrer K., Lathaman H. e Darnell J.E., Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in Hela cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 49, 240 (1963)
7. 3 Leder P., Tilghmann S., Tiemier D., Polksy F.I., Seidmann J.G., Edgel M.H., Enquist L.W. e Normann B., The cloning of mouse globin and surrounding gene sequences in bacteriophage lambda, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 42 (1978) 915.
7. 4 Proudfoot N.J., Shauder M.H.M., Mouley J.M., Gefter M.L. e Maniatis T., Structure and *in vitro* transcription of human globin genes, Science 209 (1980) 1329.
7. 5 Jeffreys A.J. e Flavell R.A., The rabbit α -globin gene contains a large insert in the coding sequence, Cell 12 (1977) 1907.
7. 6 Brack C. e Tonegawa S., Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell on 1250 nontranslated bases apart, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74 (1977) 5652.
7. 7 Breathnach C. e Chambon p., Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins, A.R. Biochem. 50 (1981) 349.
7. 8 Ford-Doolittle W., Genes in pieces: were they ever together?, Nature 272 (1978) 581.
7. 9 Gilbert G., Why genes in pieces?, Nature 271 (1978) 501.
- 7.10 Blake C.C.F., Exons-present from the beginning, Nature 306 (1983) 535.
- 7.11 Blake C.C.F., Exons and the structure, function and evolution of haemoglobin, Nature 291 (1981) 616.

Medicina nei secoli (Supplemento)

- 7.12 Blake C.C.F., Do genes-in-pieces imply proteins-in-pieces?, *Nature* 273 (1978) 267.
- 7.13 Crick F.H.C., Split genes and RNA splicing, *Science* 204 (1979) 264.
- 7.14 Darnell J.E., Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells, *Science* 202 (1978) 1257.
- 7.15 Williamson R., Processing of Hn RNA and its relation to mRNA, *Cell Biol.* 3 547, editori L. Goldstein e D.M. Prescott, Academic Press, New York, London 1980.
- 7.16 Padgett R.A., Gobrowski P.J., Konarska M.M., Seiler S. e Sharp P.A., Splicing of messenger RNA precursors, *A.R. Biochem.* 55 (1986) 1119.
- 7.17 Proudfoot N.J. e Brownlee G.G., 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA, *Nature* 263 (1976) 211.
- 7.18 Mcdevitt M.A., Imperiale M.J., Ali H. e Nevins J.R., Requirement of a downstream sequence for generation of a poly(A) addition site, *Cell* 37 (1984) 993.
- 7.19 Cech T.R. e Bass B.L., Biological catalysis by RNA, *A.R. Biochem.* 55 (1986) 599.
- 7.20 Lowoska J., Jacq C. e Slonimski P.P., Sequence of introns and flanking exons in wild-type and *box* 3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron, *Cell* 22 (1948) 33.
- 7.21 Church G.M., Slonimski P.P. e Gilbert W., Pleiotropic mutations within two yeast mitochondrial cytochrome genes block mRNA processing, *Cell* 18 (1979) 1209.
- 7.22 De La Salle H., Jacq C. e Slonimski P.P., Critical sequences within mitochondrial introns: pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the *box* intron controlling reductase oxidase, *Cell* 28 (1982) 721.
- 7.23 Borst P. e Grivell L.A., One genés is another genés exon, *Nature* 289 (1981) 439.
- 7.24 Vengono indicate con il termine "cis-acting" ad esempio, le sequenze dei promotori e degli enhancer; con "trans-acting" i fattori proteici che agiscono su queste sequenze.
- 7.25 Cech T.R., The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing, *Cell* 44 (1986) 206.
- 7.26 Kinoshita S., Terada T., Tanaguchi T., Takene Y., Masuda S., Matsunaga N. e Okada H., Purification and isolation of 6-aminohexanoic acid-oligomer hydrolase of *Flavobacterium*, *Eur. J.Biochem.* 116 (1981) 547.
- 7.27 Okada H., Negoro S., Kimura H. e Nakamura S., Evolutionary adaptations of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers, *Nature* 306 (1983) 203.
- 7.28 Ohno S., The birth of a unique new enzyme from an alternate reading from of the preexisted internally repetitive coding sequence, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81 (1984) 2421.

8.

LA SECONDA CRISI: LA VIOLAZIONE DELLA COLINEARITÀ

In alcuni casi il gene eucariotico non si conforma alla idea tradizionale di gene (cistrone), poiché non si osserva una relazione univoca tra cistrone e catena polipeptidica. In questi casi, in cui il principio della colinearità tra gene e catena polipeptidica non è più valido, dalla stessa porzione codificante (gene) si ottengono polipeptidi diversi. Esaminiamo alcuni esempi:

1. gene per la calcitonina e polipeptide simile alla calcitonina (CGRP)

In questo caso osserviamo la produzione di due molecole di mRNA diverse pur essendo presente un solo gene per la calcitonina. Sono stati isolati due mRNA che differiscono per le modalità di maturazione del trascritto primario. In un caso le cellule della tiroide producono un mRNA (Fig. 15 a) maturo che possiede quattro dei sei esoni presenti nell'eterogeneo nucleare, nel caso delle cellule dell'ipotalamo (Fig. 15 b) e di altre zone del cervello le cellule possiedono un mRNA maturo che possiede anche il quinto ed il sesto esone. La produzione di questi due messaggeri dipende da meccanismi di 'splicing' e siti di poliadenilazione alternativi (8.1). Si pensa che ogni tipo cellulare possieda specifici fattori proteici necessari per la "maturazione".

2. gene della α -amilasi del topo

In questo caso osserviamo che il trascritto viene "maturato" diversamente nelle cellule delle ghiandole salivari e in quelle epatiche. Sia il gene che il trascritto primario sono identici nei due tipi cellulari e le differenze risiedono al terminale 5' della molecola di mRNA maturo (Fig. 16).

Nel messaggero delle cellule epatiche è presente un esone L che è invece assente nelle ghiandole salivari. Nell'mRNA matu-

Medicina nei secoli (Supplemento)

- 7.12 Blake C.C.F., Do genes-in-pieces imply proteins-in-pieces?, *Nature* 273 (1978) 267.
- 7.13 Crick F.H.C., Split genes and RNA splicing, *Science* 204 (1979) 264.
- 7.14 Darnell J.E., Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eukaryotic cells, *Science* 202 (1978) 1257.
- 7.15 Williamson R., Processing of Hn RNA and its relation to mRNA, *Cell Biol.* 3 547, editori L. Goldstein e D.M. Prescott, Academic Press, New York, London 1980.
- 7.16 Padgett R.A., Gobrowski P.J., Konarska M.M., Seiler S. e Sharp P.A., Splicing of messenger RNA precursors, *A.R. Biochem.* 55 (1986) 1119.
- 7.17 Proudfoot N.J. e Brownlee G.G., 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA, *Nature* 263 (1976) 211.
- 7.18 Mcdevitt M.A., Imperiale M.J., Ali H. e Nevins J.R., Requirement of a downstream sequence for generation of a poly(A) addition site, *Cell* 37 (1984) 993.
- 7.19 Cech T.R. e Bass B.L., Biological catalysis by RNA, *A.R. Biochem.* 55 (1986) 599.
- 7.20 Lowoska J., Jacq C. e Slonimski P.P., Sequence of introns and flanking exons in wild-type and *box* 3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron, *Cell* 22 (1948) 33.
- 7.21 Church G.M., Slonimski P.P. e Gilbert W., Pleiotropic mutations within two yeast mitochondrial cytochrome genes block mRNA processing, *Cell* 18 (1979) 1209.
- 7.22 De La Salle H., Jacq C. e Slonimski P.P., Critical sequences within mitochondrial introns: pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the *box* intron controlling reductase oxidase, *Cell* 28 (1982) 721.
- 7.23 Borst P. e Grivell L.A., One genés is another genés exon, *Nature* 289 (1981) 439.
- 7.24 Vengono indicate con il termine "cis-acting" ad esempio, le sequenze dei promotori e degli enhancer; con "trans-acting" i fattori proteici che agiscono su queste sequenze.
- 7.25 Cech T.R., The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing, *Cell* 44 (1986) 206.
- 7.26 Kinoshita S., Terada T., Tanaguchi T., Takene Y., Masuda S., Matsunaga N. e Okada H., Purification and isolation of 6-aminohexanoic acid-oligomer hydrolase of *Flavobacterium*, *Eur. J.Biochem.* 116 (1981) 547.
- 7.27 Okada H., Negoro S., Kimura H. e Nakamura S., Evolutionary adaptations of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers, *Nature* 306 (1983) 203.
- 7.28 Ohno S., The birth of a unique new enzyme from an alternate reading from of the preexisted internally repetitive coding sequence, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81 (1984) 2421.

8.

LA SECONDA CRISI: LA VIOLAZIONE DELLA COLINEARITÀ

In alcuni casi il gene eucariotico non si conforma alla idea tradizionale di gene (cistrone), poiché non si osserva una relazione univoca tra cistrone e catena polipeptidica. In questi casi, in cui il principio della colinearità tra gene e catena polipeptidica non è più valido, dalla stessa porzione codificante (gene) si ottengono polipeptidi diversi. Esaminiamo alcuni esempi:

1. gene per la calcitonina e polipeptide simile alla calcitonina (CGRP)

In questo caso osserviamo la produzione di due molecole di mRNA diverse pur essendo presente un solo gene per la calcitonina. Sono stati isolati due mRNA che differiscono per le modalità di maturazione del trascritto primario. In un caso le cellule della tiroide producono un mRNA (Fig. 15 a) maturo che possiede quattro dei sei esoni presenti nell'eterogeneo nucleare, nel caso delle cellule dell'ipotalamo (Fig. 15 b) e di altre zone del cervello le cellule possiedono un mRNA maturo che possiede anche il quinto ed il sesto esone. La produzione di questi due messaggeri dipende da meccanismi di 'splicing' e siti di poliadenilazione alternativi (8.1). Si pensa che ogni tipo cellulare possieda specifici fattori proteici necessari per la "maturazione".

2. gene della α -amilasi del topo

In questo caso osserviamo che il trascritto viene "maturato" diversamente nelle cellule delle ghiandole salivari e in quelle epatiche. Sia il gene che il trascritto primario sono identici nei due tipi cellulari e le differenze risiedono al terminale 5' della molecola di mRNA maturo (Fig. 16).

Nel messaggero delle cellule epatiche è presente un esone L che è invece assente nelle ghiandole salivari. Nell'mRNA matu-

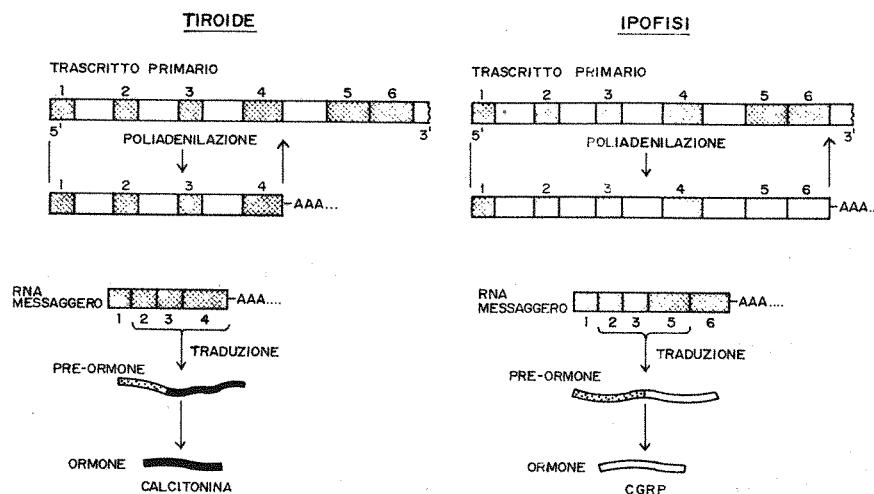


Figura 15 Maturazione differenziale dell'RNA eterogeneo nucleare (Hn RNA) nella tiroide (a) e nell'ipofisi (b) del gene della calcitonina.

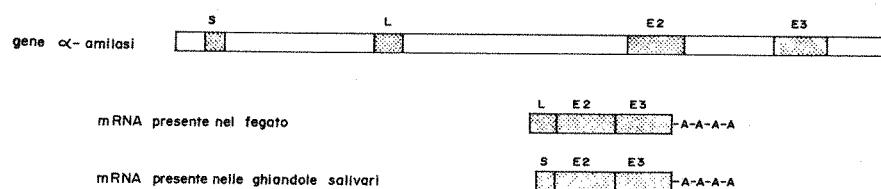


Figura 16 Maturazione differenziale dell'RNA eterogeneo nucleare (HnRNA) nel gene della alfa-amilasi.

La seconda crisi: la violazione della colinearità

ro di queste ultime è presente un esone S che manca, naturalmente, nei trascritti delle cellule epatiche (8.2). Accanto alla eterogeneità dei trascritti dovuta a maturazione alternativa degli esoni si deve aggiungere che il termine della trascrizione avviene centinaia di nucleotidi dopo il segnale principale della terminazione su indicazione di segnali accessori, (8.3 - 8.5) determinando una sequenza non tradotta a valle della tripletta di termine (trailer sequence). Possiamo, infine, aggiungere che la "maturazione" del trascritto ha luogo dopo che questo ha assunto, con l'ausilio di proteine, una struttura tridimensionale complessa detta "particella ribonucleoproteica" (RNP). Questa struttura permette l'identificazione di particolari sequenze necessarie per la "maturazione" e per la "poliadenilazione". La produzione di mRNA diversi in tessuti diversi di un organismo a partire da un unico cistrone e da un solo Hn RNA, potrebbe aver luogo perché in tessuti diversi la componente proteica delle RNP sarebbe diversa (8.6 - 8.8).

Un'altra evidenza di non corrispondenza tra gene e prodotto proteico è il caso dei geni sovrapposti. Dal 1976 è ben nota l'esistenza di geni di questo tipo in batteriofagi e virus di cellule animali, in batteri e in geni mitocondriali.

Con questo termine s'intende un'unica sequenza nucleotidica che codifica per più di un polipeptide, descritta per la prima volta in un virus a DNA a singolo filamento (8.9), e quindi in un altro fago a DNA (8.10).

La più logica interpretazione di queste osservazioni è che è necessario di ottimizzare la ridotta quantità d'informazione genetica che può essere introdotta nella testa del fago. Ma poiché successivamente il fenomeno ha mostrato di essere più comune e non solo ristretto ai batteriofagi, si è ipotizzato che la sovrapposizione delle sequenze possa avere implicazioni a livello regolativo.

Si possono aggiungere altri esempi:

nel genoma di *E.coli* K 12 l'operone *frd* e l'operone *amp* sono sovrapposti: il primo operone codifica per la fumarico reduttabile, l'altro per la lattamasi beta cromosomica.

La sequenza delle basi indica che il promotore dell'operone *amp C* è localizzato allo interno della sequenza del gene *frd* in modo che 10 aminoacidi posti al terminale carbossilico della proteina codificata dal gene *frd* sono in comune con la sequenza che codifica per il promotore del gene *amp C* (8.11).

Sicuramente più stupefacente è il caso degli *elementi trasponibili* (8.12) che possiedono un ampio modulo di lettura aperto, che si estende per quasi tutta la lunghezza dell'elemento. Gli elementi trasponibili possiedono anche un altro modulo di lettura più piccolo con direzione opposta al primo e localizzato completamente al suo interno. Ancora più sorprendente è stata la scoperta che il secondo modulo usa lo stesso registro di lettura dei codoni del primo modulo. Rak (8.13) ha dimostrato che l'elemento trasponibile IS5 può esprimere, oltre a un polipeptide codificato dal modulo di lettura maggiore, anche un polipeptide di 12.300 D che corrisponde ad un modulo di lettura aperto di direzione opposta al primo. Si pensa che i polipeptidi codificati da ambedue i promotori siano necessari per la trasposizione (8.14). Il ritrovamento di geni sovrapposti in organismi tra loro così distanti evolutivamente lascia supporre che questa organizzazione sia il risultato di necessità regolative sia a livello trascrizionale che a livello delle interazioni tra i polipeptidi. Questi esempi confermano che anche una sovrapposizione di sequenze non risponde necessariamente ad una minimizzazione della informazione del DNA, mentre *la esistenza di geni sovrapposti dimostra che la informazione genetica codificata nel DNA è disposta in unità la cui organizzazione va ancora chiarita, aumentando le difficoltà per una definizione soddisfacente del termine di gene.*

Agli inizi degli anni sessanta Benzer, Yanofsky, Jacob e Monod hanno fornito dei paradigmi concettuali molto utili e precisi che hanno permesso lo sviluppo delle ricerche scientifiche che hanno portato alla revisione di molti concetti di genetica negli anni ottanta. Altre osservazioni, oltre a quelle descritte, hanno fatto sì che *negli organismi eucariotici il principio della colinearità e l'analisi della complementazione siano talvolta inapplicabili.*

Consideriamo ad esempio il caso dei geni delle immunoglobuline (Ig), che ha contraddetto in maniera chiara *la concezione un gene - una catena polipeptidica.*

In numerosi vertebrati, dai pesci sino ai mammiferi, c'è un sistema raffinato che permette di riconoscere all'interno dell'organismo quali molecole sono proprie e quali estranee: il vero problema del sistema immunitario è come possono essere sintetizzati milioni di anticorpi diversi senza implicare che vi siano altrettanti geni preposti alla loro sintesi.

Per motivi di chiarezza e per evitare di entrare in dettagli non necessari ai nostri fini, ci occuperemo soltanto dell'organizzazione dei geni delle immunoglobuline, senza considerare le cellule che li sintetizzano. Esiste una profonda diversità nell'organizzazione di queste sequenze tra la linea germinale e i linfociti (cellule che sintetizzano queste molecole). In altri termini, la organizzazione fisica di queste sequenze è diversa nelle cellule che costituiscono la linea germinale da quella che osserviamo nei linfociti (cellule differenziate).

Si conoscono più molecole di immunoglobuline, sostanzialmente riconducibili ad una molecola "tipo" (Fig. 17) costituita da quattro catene polipeptidiche identiche a due a due, due leggere e due pesanti. La eterogeneità delle immunoglobuline è assicurata dal fatto che ogni catena leggera o pesante ha una regione variabile (V) ed una regione costante (C). Nella figura 17 si vedono anche le sequenze di giunzione che uniscono la parte variabile a quella costante. Il sito al quale si legherà la sostanza considerata estranea (antigene) dal sistema immunitario è costituito dalle porzioni variabili della molecola.

Pur sapendo che esistono alcune decine di geni per le catene leggere e pesanti e che la loro combinazione permette la produzione di più di 100 milioni di anticorpi diversi, discutiamo un tipo ideale di organizzazione delle sequenze nel DNA che codificano per le catene leggere e quelle pesanti.

Prendiamo in esame come viene costruita la catena leggera di una immunglobulina, che è un polipeptide di 220 aminoacidi. Di questi, 107 aminoacidi prossimi al terminale aminico co-

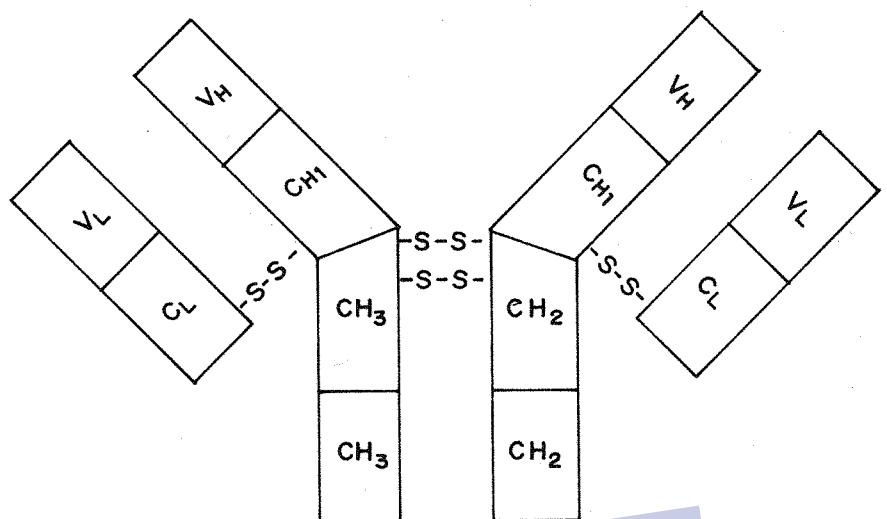


Figura 17 Struttura schematica di una molecola di immunoglobulina (Ig).

constituiscono la porzione variabile mentre i restanti residui compongono la parte costante (Fig. 18). L'esame della figura 18 ci mostra un fatto insospettabile, cioè che nel DNA dello zigote, prima del differenziamento cellulare, la sequenza, che codifica per il dominio variabile della immunoglobulina (V), è localizzata in una regione del DNA, mentre la sequenza J (giunzione) è prossima alla sequenza che specifica il dominio costante (C) e tutte e due sono distanti dalla sequenza V. Durante lo sviluppo assistiamo a fenomeni differenziativi, con la comparsa dei linfociti, cellule preposte alla sintesi delle immunoglobuline. In queste cellule, come possiamo vedere nella parte bassa della figura 18, una copia della sequenza V viene unita ad una copia della sequenza J ed una C, mediante un processo di ricombinazione genica, producendo un gene "maturo" per una catena leggera.

La seconda crisi: la violazione della colinearità

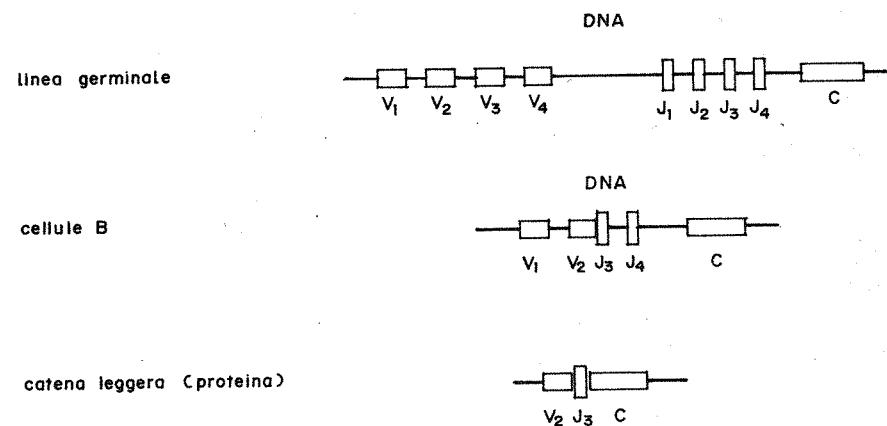


Figura 18 Modalità per il "montaggio" di un "gene" per la catena leggera di una immunoglobulina (Ig).

Esistono perciò, per ogni sequenza necessaria a codificare una catena "leggera", due organizzazioni diverse del DNA: una in cellule embrionali e un'altra nel linfocita maturo.

La catena pesante di una immunoglobulina è costituita da 440 aminoacidi, dei quali 123 costituiscono la porzione variabile (Fig. 17).

Le sequenze che codificano per le catene pesanti sono localizzate in porzioni discrete del genoma. La continuità fisica tra queste sequenze la si riscontra nel linfocita ed è dovuta a fenomeni ricombinatori tra le porzioni in oggetto con modalità simili a quelle già descritte.

Per sintetizzare una molecola di anticorpo si utilizzano porzioni del genoma discrete e distanti tra loro e la loro riunione avviene grazie a fenomeni di ricombinazione genica. Questi fenomeni ricombinatori, naturalmente, determinano anch'essi una ulteriore variabilità da aggiungere a quella assicurata dalla pre-

senza di numerose sequenze C e V, sia per la catena leggera che per quella pesante (8.15).

Questa bizzarra soluzione obbedisce al principio di ottenere con poche centinaia di geni oltre 10^8 possibilità di molecole diverse di immunoglobuline. Come si può conciliare il principio "un gene - una catena polipeptidica" con questa organizzazione delle sequenze per le immunoglobuline? In questo caso dobbiamo inventare una nuova dizione e cioè che *sequenze diverse mediante ricombinazione costituiscono una sequenza lineare di DNA, che solo dopo questa fase si può considerare gene.*

Nel caso dei *geni* per le immunoglobuline, inoltre ci sono due organizzazioni delle stesse sequenze, ovvero l'organizzazione del genoma di una cellula non differenziata (zigote nel corso dello sviluppo) e quella di una cellula differenziata (linfocita).

Quale delle due condizioni scegliere per poi verificare se è applicabile il principio della colinearità?

Non è legittima nessuna scelta che non risulti arbitraria: *in questo caso, il principio della colinearità tra gene e catena polipeptidica non è dunque applicabile.*

NOTE E BIBLIOGRAFIA

8. 1 Rosenfeld M.G., Amara S.G., Roos B.A., Ong E.S. e Evans R.M., Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism, *Nature* 290 (1981) 63.
8. 2 Hagenbüchle O., Tosi M., Schliber U., Bovey R., Wellauer P.K. e Young R.A., Mouse liver and salivary gland, α -amylase mRNAs differ only in 5' non-translated sequences, *Nature* 289 (1981) 643.
8. 3 Le Meur M.A., Galliot e Gerlinger P., Termination of the ovalbumin gene transcription, *EMBO J.* 3 (1984) 2779.
8. 4 Hagenbüchle O., Wellauer P.K., Cribbs D.L. e Schibler U., Termination of transcription in the mouse α -amylase gene *Amy-2 a* occurs at multiple sites downstream of the polyadenylation site, *Cell* 38 (1984) 737.
8. 5 Citron B., Falk-Pedersen E., Salditt-Georgieff M., Darnell J.E., Transcription termination occurs within a 1000 base pair region downstream from the poly (A) site of the mouse β -globin (major) gene, *N.A.Res.* 12 (1984) 8723.

8. 6 Leff S.E. e Roesenfeld M.G., Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing, *A.R.Biochem.* 55 (1986) 1091.
8. 7 Breitbart R.E., Andrealis A. e Nadal-Girard B., Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes, *A.R. Biochem.* 56 (1987) 467.
8. 8 Nevins J.R., The pathway of eukaryotic mRNA formation, *A.R. Biochem.* 52 (1983) 441.
8. 9 Barrell B.G., Air G.M. e Hutchinson C.A., Overlapping genes in bacteriophage ΔX 174, *Nature* 264 (1976) 34.
- 8.10 Godons G.N., Barrell G.B., Staden R. e Fiddes J.C., Nucleotide sequence of bacteriophage G4 DNA, *Nature* 276 (1978) 236.
- 8.11 Grundström T. e Jaurin B., Overlap between *amp C* and *frd* operons on the *E. coli* chromosome, *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 79 (1982) 1111.
- 8.12 Con elemento trasponibile si intende una sequenza di DNA capace di replicazione e di inserire una nuova copia in un sito diverso del genoma
- 8.13 Rack B., Lusky M. e Hable M., Expression of two proteins from overlapping and oppositely oriented genes on transposable DNA insertion element IS5, *Nature* 297 (1982) 124.
- 8.14 Normark S., Bergström S., Edlund T., Grundström T., Jaurin B., Lindberg F.P., e Olsson O., Overlapping genes, *A.R. Genet.* 17 (1983) 499.
- 8.15 Tonegawa S., Sakano S., Mocki R., Traunecker A., Heinrich G., Roeder W. e Kurosawa Y., Somatic reorganization of immunoglobulin genes during lymphocyte differentiation, *Cold Spring Harb.Symp. Quant.Biol.* 41 (1976) 839.

9. IL GENE COME UNITÀ DI TRASCRIZIONE

La scoperta del gene "in pezzi" e le osservazioni successive hanno reso molto difficile e a volte impossibile identificare il gene col cistrone. Così col tempo si è cominciato a definire il gene come unità di trascrizione, benché, ovviamente *ciò è possibile solo per quelle sequenze il cui trascritto viene tradotto in un solo polipeptide*. Queste sequenze vengono definite "loci semplici" e in questo caso il gene si definisce come il:

segmento di DNA dal quale avviene la trascrizione e che può portare alla formazione di mRNA. Nei batteri e nei batteriofagi le unità di trascrizione sono identificate geneticamente (operoni)...nelle cellule eucariotiche...l'unico modo soddisfacente di definire l'unità di trascrizione è lo studio della sintesi di RNA *in vivo*, o in casi particolarmente favorevoli, osservare al microscopio elettronico la trascrizione (9.1)

I numerosi esempi elencati precedentemente (β -amilasi etc.) fanno tuttavia ritenere che la definizione appena fornita non è sempre applicabile: nei casi citati, infatti, si ha a che fare con unità di trascrizione complesse e vedremo che vi sono nel gene sequenze non codificanti che risultano critiche per la regolazione della trascrizione.

Nella figura 12 viene indicata una unità di trascrizione semplice (9.2).

Prima di esaminare queste sequenze critiche a livello regolativo, è bene ricordare che cosa s'intende per sequenza che agisce in *cis* od in *trans*. La TATA box, ad esempio, ovvero quella sequenza necessaria per la trascrizione della regione del DNA ad essa contigua, non produce molecole di RNA o proteine ma agisce come tale, cioè esercita la sua funzione soltanto sulle sequenze che sono poste sulla medesima doppia elica di DNA nella quale essa stessa risiede. Al contrario sequenze che agiscono in *trans*, producono delle molecole (di RNA o proteiche) che possono agire su tutte le sequenze competenti poste sia sulla stes-

sa molecola che su molecole diverse di DNA. Per quanto concerne le molecole che agiscono *in trans* sulle unità di trascrizione, ricordiamo l'azione di un piccolo RNA nucleare (sn RNP U4) implicato nella "maturazione" del trascritto rimuovendo le sequenze a valle del terminale 3' (8.3). Queste sequenze, possono rispondere della formazione di più trascritti a partire dalle stesse unità di trascrizione.

Nella descrizione di una unità di trascrizione semplice, non vanno dimenticate le sequenze dette "enhancer" le quali agendo sul promotore hanno la funzione di aumentare la trascrizione di quella sequenza anche mille volte (9.4). Il loro effetto si esercita indipendentemente dalla distanza dalla quale sono situate rispetto al promotore. Per immaginare come tali sequenze possono esercitare la loro azione si può pensare a delle strutture terziarie del DNA che potrebbero essere riconosciute da fattori che agiscono *in trans*. Numerose sono le proteine proteine nucleari, la cui funzione non è ben nota, ma la cui azione può essere catalogata come fattori che agiscono *in trans* (9.5).

La descrizione sin qui fatta di queste unità che, con difficoltà, si possono omologare ad una unità di trascrizione semplice si contrappongono ai "loci complessi".

La concezione, più volte ricordata, del cromosoma come una collana di perle portò a ritenere eccezionali gli alleli di uno stesso gene che subivano ricombinazione. L'eccezionalità risiedeva nella violazione delle leggi mendeliane della segregazione degli alleli alla meiosi, e pertanto, alleli che non segregavano furono chiamati pseudoalleli (9.6). Di conseguenza, un locus con più alleli che potevano ricombinare veniva chiamato locus pseudoollelico.

In seguito divenne comune considerare questi fenomeni come caratteristiche dei loci complessi, come ad esempio il locus *white*, *zeste*, o *rudimentary* in drosofila. Con locus complesso s'intende un numero finito di unità distinte, ma funzionalmente correlate, che possono essere separate attraverso ricombinazione (9.7).

La descrizione della organizzazione molecolare del locus *white* della drosofila consente, grazie alle numerose mutazioni esistenti in questo locus, di distinguere mutazioni che colpiscono la porzione codificante del gene da quelle che ne colpiscono la regione con funzione regolativa.

Mediante le metodiche del DNA ricombinante è stata mappata una regione del cromosoma X di circa 15 Kb nella quale sono localizzate tutte le mutazioni del locus *white*.

Il gene è costituito da un esone posto al terminale 5' e da altri quattro esoni, interrotti da quattro introni.

Il trascritto maturo è costituito da un mRNA di 2.6 Kb (Fig. 19).

La mappatura delle varie mutazioni ha permesso di distinguere due porzioni del locus, una a sinistra della mutazione *w^l* ed una alla sua destra.

Nella porzione a sinistra sono localizzate le mutazioni che determinano il fenotipo "occhi bianchi" oppure "occhi colorati". Se si esclude un elemento trasponibile *copia*, tutte le mutazioni mappate in questa regione sono puntiformi. Nella porzione alla destra della mutazione *w^l* si verificano invece prevalentemente mutazioni per inserzione di elementi trasponibili noti, che danno origine a mutanti con diversa colorazione dell'occhio, ma sempre con produzione di pigmento.

La trascrizione di questo gene avviene a partire da 400 copie di basi a monte dell'esone 1 e quindi, (figura 19) alla destra della mutazione *w^l*. L'espressione del gene *white* comporta non solo la presenza di pigmento negli occhi ma anche accumulo di pigmento nei tubuli malpighiani e nei testicoli del moscerino.

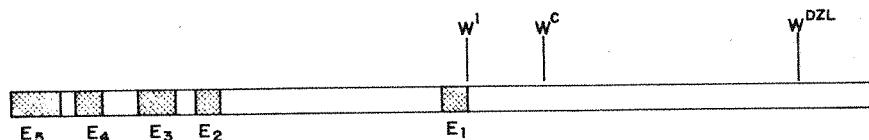


Figura 19 Rappresentazione schematica del locus *white* in drosofila.

no. La espressione di questo gene nei diversi tessuti è regolata da una sequenza di circa duemila coppie di basi, posta a monte del sito di inizio della trascrizione, che possiede al suo interno una sequenza di 118 coppie di basi simile a quella di un "enhancer". Il prodotto del locus *zeste*, una proteina che si lega al DNA, promuove la trascrizione del locus *white*. Sono state così localizzate sequenze a monte del sito d'inizio della trascrizione che sono bersaglio di fattori che agiscono *in trans* tipo il prodotto del locus *zeste* (9.8,9.9).

Recentemente il locus *zeste* è stato clonato (9.10) ed è stato dimostrato che il suo prodotto è una proteina di circa 90 Kd che si lega ad una porzione del locus *white* prima dell'inizio della trascrizione. L'interazione tra questi due loci, nota da tempo, viene chiamata *trasvezione* (9.11) e può essere considerata come una complementazione tra due alleli (9.12). Perchè avvenga la trasvezione occorre che vi sia un appaiamento omologo tra regioni di cromosomi X dove sono localizzati i loci *white* e *zeste* e che sia attivo almeno un allele del locus *zeste*. Si pensa che più molecole del prodotto del locus *zeste* agiscano sul promotore del locus *white*. A rinforzare l'evidenza della interazione tra i loci *zeste* e *white* per una corretta espressione di quest'ultimo si è trovato che un allele del locus *z1 zeste* produce l'inibizione della trascrizione del locus *white* in particolari condizioni (9.11). Si può vedere, nella figura 19, quale sia la porzione del locus che viene trascritta; ma non è altrettanto semplice definire con esattezza gli estremi del locus: *in altri termini non sappiamo dove termina il locus white e dove inizia il locus zeste*, anche se mediante incroci genetici si è convenuto che la mutazione *wDZL* segna un limite del locus *white*.

Se si volesse dunque identificare il locus *white* come una unità di funzione si dovrebbe comprendere in essa anche il locus *zeste*, così come si considera parte integrante dell'operone del lattofiso le sequenze *i o, p*. In questo caso, tuttavia, ciò non risulterebbe corretto. Infatti, è noto che il prodotto del locus *zest* attiva il promotore di un altro locus, *Ultrabithorax ubx* e quindi

il contributo del locus *zeste* non si esaurisce nell'espressione del locus *white* ma coinvolge anche il locus *Ubx*.

Questo esempio dimostra che un utile accordo tra genetica classica e genetica molecolare viene a cadere in quanto la funzione che veniva attribuita al locus non è in alcun modo identificabile. In altri termini i loci *white* e *zeste* non codificano né per il pigmento rosso degli occhi della drosofila né per un prodotto specifico per quel locus (*zeste*).

Si è detto che il prodotto di trascrizione del locus *white* è un mRNA di 2,6 Kb e che la sua sintesi è influenzata da fattori che agiscono sia in *cis* che in *trans*. Per lungo tempo si è pensato che il locus fosse deputato alla sintesi del pigmento che è deposito negli ommocromi, oggi si ha motivo di supporre che il suo prodotto sia una proteina di 7.8 Kd implicata nel trasporto di membrana (9.13).

La identificazione del gene con il cistrone ha portato a considerare quest'ultimo come unità di funzione, ovvero il segmento di DNA che codificava per il prodotto polipeptidico corrispondente. Le conoscenze sulla genetica delle immunoglobuline rendono difficile pensare ad un cistrone come un segmento che codifica per una catena polipeptidica. Peraltro i geni sovrapposti ed i meccanismi di maturazione alternativi rendono poco affidabile la identificazione del gene come unità di trascrizione, così come ad essi non è possibile applicare il termine cistrone.

Sino a che non saranno note tutte le sequenze e tutti i fattori proteici che hanno rilevanza sulla trascrizione di una sequenza di DNA, non si può essere in grado di fornire una definizione soddisfacente di gene.

Si è così giunti ad un paradosso: a 40 anni dalla scoperta del DNA quale responsabile dei caratteri ereditari e dopo l'epoca delle grandi scoperte di Benzer, Yanofsky, Jacob e Monod si è di fronte alla difficoltà di definire in maniera univoca il gene. E ancora più paradossale è pensare che l'avvento della metodologia del DNA ricombinante non ha certamente fornito una definizione più accurata di gene.

A quanto già detto si può aggiungere che sia in organismi procariotici che eucariotici sono stati spesso trovati trascritti detti anti-senso.

Queste molecole di RNA sono trascritte da entrambi i filamenti di DNA del gene. Nei procarioti (9.14,9.15) si è supposto che tale fenomeno abbia una funzione regolativa. Nel caso del gene della dopa-carbossilasi nella drosofila (9.16) si è visto che sono presenti contemporaneamente i due trascritti solo nel testicolo, mentre negli altri tessuti è presente l'uno o l'altro dei due trascritti.

Anche per gli eucarioti si è pensato ad una funzione regolativa dei trascritti anti senso: sono state proposte alcune ipotesi molto suggestive su come tale regolazione potrebbe avvenire, ma allo stato attuale non sono altro che delle speculazioni (9.17).

È evidente, invece, che *non è facile capire come questo fenomeno della trascrizione di ambedue i filamenti si possa conciliare con il concetto di cistrone nè con quello di colinearità del gene ed ancora meno con la visione di gene come unità di trascrizione. Dal momento che non si ha qui lo scopo descrivere tutti fatti non spiegati della Genetica bensì di mostrare che si sta vivendo una crisi concettuale per quanto attiene il concetto di gene.* ci si può infine chiedere perché non siano stati presi in esame i geni per gli RNA di trasferimento nè quelli per l'RNA ribosomiale: lo spazio dato non lo ha permesso e sono state peraltro, già, esposte numerose "bizzarrie" da rendere inutile un elenco più lungo.

B. Lewin, nel suo celebre "Genes", nel tentativo di definire i rapporti tra geni e polipeptidi sostiene la seguente tesi:

Invece di dire "un gene - un polipeptide", possiamo descrivere la relazione come "un polipeptide - un gene". Così possiamo considerare la sequenza che è in realtà responsabile della produzione del polipeptide (che include esoni ed introni) come il gene riconoscendo al tempo stesso che dal punto di vista di un'altra proteina, parte di questa stessa sequenza, potrebbe anche appartenere al suo gene. Ciò suggerisce l'uso di espressioni co-

me "geni sovrapposti". Dato questo uso di "gene" come un termine che sta a significare una sequenza di DNA responsabile della sintesi di una proteina, le circostanze fanno capire che non possiamo continuare ad attribuirgli quei precisi connotati di complementazione e quella unicità di rappresentazione che sarebbero stati impliciti solo poco tempo fa.

Può stupire che un ricercatore così attento come Lewin, tenda ad una semplificazione che può essere facilmente confutata. In altri termini, se è necessaria una formulazione di gene che sia la più universale possibile (è poi necessario che sia universale?), come ricondurre alla definizione "un polipeptide - un gene" le sequenze che codificano per molecole di rRNA e tRNA: i tempi per una "rivoluzione" del concetto di gene non sono ancora maturi.

NOTE E BIBLIOGRAFIA

9. 1 Darnell J.E., Evans R., Fraser N., Goldberg S., Nevins J., Salditt-Georgiev M., Schwartz H., Weber J. e Ziff E., The definition of transcription units for mRNA, Cold Spring Harb.Symp.Quant.biol 42 (1977) 515.
9. 2 Nevins J.R., The pathway of eukaryotic mRNA formation, A.R.Biochem. 52 (1983) 441.
9. 3 Bergett S.M., Are U4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation?, Nature 309 (1984) 179.
9. 4 Voss S.D., Schlokat U. e Gruss P., The role of enhancers in the regulation of cell-type-specific transcriptional control, Trends Biochem. 11 (1986) 287.
9. 5 Sassone-Corsi P. e Borrelli E., Transcriptional regulation by trans-acting factors, Trends Genet. 2 (1986) 215.
9. 6 Lewis E.B., Pseudoallelism and gene evolution, Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 16 (1951) 159.
9. 7 Judd B.H., Genetic units of *Drosophila*-complex loci, in The genetic and biology of *Drosophila*, vol. 1b 767, M.Ashburner e E. Novitsky ed., Academic Press, New York, London 1976.
9. 8 Pirrotta V., Steller H. e Bozzetti M.P., Multiple upstream regulatory elements control the expression of the *Drosophila white* gene, EMBO J. 4 (1985) 3501.

Medicina nei secoli (Supplemento)

9. 9 Davidson D., Chapman C.H., Wedeen C. e Bingham P.M., Genetic and Physical studies of a portion of the white locus participating in transcriptional regulation and in synoysin-dependent interactions in *Drosophila* adult tissues, *Genetics*, 110 (1985) 479.
- 9.10 Mariani C., Pirrotta V. e Manet E., Isolation and characterization of the *zeste* locus of *Drosophila*, *EMBO J.* 4 (1985) 2405.
- 9.11 Gans M., Etude génétique et physiologique du mutant *z* de *Drosophila melanogaster*, *Bull Biol. France Belg. (Suppl.)* 38 (1953) 1.
- 9.12 Judd B.H., TRansection : Allelic cross talk, *Cell* 53 (1988) 841.
- 9.13 Higgins C.F., Hiles I.D., Salmond G.P.C., Gill D.R., Downie J.A., Evans I.J., Holland I.B., Grey L., Buckel S.D., Bell A.W. e Hermodson M.A., A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria, *Nature* 323 (1986) 448.
- 9.14 Simons R.W. e Kleckner N., Translational control of IS10 transposition, *Cell* 34 (1983) 683.
- 9.15 Tomizawa J. e Itoh T., The importance of RNA secondary structure in ColE1 primer formation, *Cell* 31 (1982) 575.
- 9.16 Spencer C.A., Daniel R., Gietz G. e Hodgetts R.B., Overlapping transcription units in the dopa decarboxylase region of *Drosophila*, *Nature* 322 (1986) 279.
- 9.17 Proudfoot N.J., Transcriptional interference and termination between duplicated β -globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation, *Nature* 322 (1986) 562.

10. CONCLUSIONI

Vi sono numerose opinioni sul ritardo nella identificazione del DNA come responsabile dei caratteri ereditari: è certo che l'interesse per lo studio della base fisica dei fenomeni ereditari nasce dalle esperienze di Miescher e quindi in qualche modo la nascita della Genetica risulta come un freno allo sviluppo di questi studi.

In secondo luogo, al di là degli indubbi contributi che P.A. Levene ha fornito, la sua ipotesi del tetranucleotide, ha messo fuori causa per circa 30 anni gli acidi nucleici quali possibili candidati come latori dei caratteri ereditari. È fin troppo facile rilevare che all'inizio del XX secolo non si aveva nozione che gli acidi nucleici fossero delle macromolecole. Infatti il concetto di macromolecola è solo del 1920, quando H. Staudinger prova con certezza che le proteine sono delle macromolecole e coinvolge gli acidi nucleici solo nel 1938 quando studi di ultracentrifugazione del DNA dimostrarono che anche gli acidi nucleici sono delle macromolecole.

Nonostante che questa scoperta permettesse di superare il blocco costituito dall'ipotesi del tetranucleotide, non c'è alcun tentativo di riconsiderare il ruolo acidi nucleici; sino alle osservazioni di Avery, McLeod e McCarthy.

All'epoca in verità si poteva dubitare, come ha fatto Mirsky, della completa assenza di proteine nelle preparazioni di DNA di Avery. Ma non si può non rimanere stupiti, quando, nove anni dopo Hershey e Chase ammettono che il 20% delle proteine virali entrano all'interno del batterio. L'occasione era importante ma, non rappresentò alcun elemento di dubbio nel considerare il DNA come responsabile delle informazioni genetiche essenziali alla replicazione virale.

Gli esperimenti di Hershey, più tardi, colpirono molto la fantasia di Watson e lo indussero a pensare che gli acidi nucleici fossero dei buoni candidati a costituire i caratteri ereditari. Allora come è possibile che la stessa critica alle metodologie sperimentali ebbe esiti così diversi?

Medicina nei secoli (Supplemento)

9. 9 Davidson D., Chapman C.H., Wedeen C. e Bingham P.M., Genetic and Physical studies of a portion of the white locus participating in transcriptional regulation and in synoysin-dependent interactions in *Drosophila* adult tissues, *Genetics*, 110 (1985) 479.
- 9.10 Mariani C., Pirrotta V. e Manet E., Isolation and characterization of the *zeste* locus of *Drosophila*, *EMBO J.* 4 (1985) 2405.
- 9.11 Gans M., Etude génétique et physiologique du mutant *z* de *Drosophila melanogaster*, *Bull Biol. France Belg. (Suppl.)* 38 (1953) 1.
- 9.12 Judd B.H., TRansection : Allelic cross talk, *Cell* 53 (1988) 841.
- 9.13 Higgins C.F., Hiles I.D., Salmond G.P.C., Gill D.R., Downie J.A., Evans I.J., Holland I.B., Grey L., Buckel S.D., Bell A.W. e Hermodson M.A., A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria, *Nature* 323 (1986) 448.
- 9.14 Simons R.W. e Kleckner N., Translational control of IS10 transposition, *Cell* 34 (1983) 683.
- 9.15 Tomizawa J. e Itoh T., The importance of RNA secondary structure in ColE1 primer formation, *Cell* 31 (1982) 575.
- 9.16 Spencer C.A., Daniel R., Gietz G. e Hodgetts R.B., Overlapping transcription units in the dopa decarboxylase region of *Drosophila*, *Nature* 322 (1986) 279.
- 9.17 Proudfoot N.J., Transcriptional interference and termination between duplicated β -globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation, *Nature* 322 (1986) 562.

10. CONCLUSIONI

Vi sono numerose opinioni sul ritardo nella identificazione del DNA come responsabile dei caratteri ereditari: è certo che l'interesse per lo studio della base fisica dei fenomeni ereditari nasce dalle esperienze di Miescher e quindi in qualche modo la nascita della Genetica risulta come un freno allo sviluppo di questi studi.

In secondo luogo, al di là degli indubbi contributi che P.A. Levene ha fornito, la sua ipotesi del tetranucleotide, ha messo fuori causa per circa 30 anni gli acidi nucleici quali possibili candidati come latori dei caratteri ereditari. È fin troppo facile rilevare che all'inizio del XX secolo non si aveva nozione che gli acidi nucleici fossero delle macromolecole. Infatti il concetto di macromolecola è solo del 1920, quando H. Staudinger prova con certezza che le proteine sono delle macromolecole e coinvolge gli acidi nucleici solo nel 1938 quando studi di ultracentrifugazione del DNA dimostrarono che anche gli acidi nucleici sono delle macromolecole.

Nonostante che questa scoperta permettesse di superare il blocco costituito dall'ipotesi del tetranucleotide, non c'è alcun tentativo di riconsiderare il ruolo acidi nucleici; sino alle osservazioni di Avery, McLeod e McCarthy.

All'epoca in verità si poteva dubitare, come ha fatto Mirsky, della completa assenza di proteine nelle preparazioni di DNA di Avery. Ma non si può non rimanere stupiti, quando, nove anni dopo Hershey e Chase ammettono che il 20% delle proteine virali entrano all'interno del batterio. L'occasione era importante ma, non rappresentò alcun elemento di dubbio nel considerare il DNA come responsabile delle informazioni genetiche essenziali alla replicazione virale.

Gli esperimenti di Hershey, più tardi, colpirono molto la fantasia di Watson e lo indussero a pensare che gli acidi nucleici fossero dei buoni candidati a costituire i caratteri ereditari. Allora come è possibile che la stessa critica alle metodologie sperimentali ebbe esiti così diversi?

G.S. Stent (10.1) ritiene che il rifiuto della scoperta di Avery da parte dalla comunità scientifica sia imputabile alla "prematurità" della scoperta. L'Autore si chiede cosa voglia dire prematurità e la definisce nel modo seguente:

Una scoperta è prematura se le sue implicazioni non possono essere unificate, mediante una serie di passaggi logici, alle conoscenze canoniche, ovvero generalmente accettate (10.1)

Egli commenta la storia della scoperta della doppia elica del DNA a partire dagli studi di Miescher e conclude che l'incapacità nel mondo scientifico dell'epoca ha sottovalutato Miescher ed Avery perché esiste una innata predisposizione al conservatorismo tra gli scienziati. Stent aggiunge che il buon ricercatore è:

....un uomo privo di pregiudizi con la mente molto aperta che è pronto a sposare ogni nuova idea che sia corroborata dai fatti. La storia della Scienza mostra, tuttavia, che gli scienziati non si conformano a questa credenza (10.1)

La storia del DNA ne è una riprova. Vi sono certamente delle eccezioni a questa visione, rappresentate da Mendel e da Watson e Crick.

In cosa questi scienziati non si conformano ai comportamenti usuali degli scienziati?

Sono tutti degli "outsider", nel mondo della ricerca in senso accademico, ma non dei dilettanti della rigorosità della loro sperimentazione. Mendel aveva sottoposto a K. Näheli i suoi "rivoluzionari" dati, ma questi, pur essendo una autorità nella Botanica all'epoca, non li aveva compresi affatto.

Siamo debitori a Mendel per le sue scoperte, ma queste sono state "dimenticate" per quasi cinquanta anni.

La scoperta della doppia elica fatta da Watson e Crick è altrettanto "rivoluzionaria" in quanto riesce a ricomporre tutte le precedenti scoperte (Avery compreso) ed aprire una prospettiva di ricerca che ancora non si è conclusa.

Watson e Crick erano certamente due "outsider" della ricerca quando giunsero alla loro scoperta, Chargaff, che li conobbe prima della loro scoperta, dice:

Quando incontrai per la prima volta F.H.C. Crick e J.D. Watson a Cambridge negli ultimi giorni del maggio 1952, mi sembrarono una coppia male assortita. Questo episodio per niente memorabile è stato dipinto e ridipinto ("Cesare entra nel Rubicone"), ritoccato o riverniciato. Le diverse autoglorificazioni e agiografie (10.2,10.3) sono state così generose di aureole posticce (10.4)

Chargaff ricorda che incontrò Watson e Crick in occasione di una visita al Cavedish Laboratory tra il 24 ed il 27 maggio 1952, ed aggiunge che:

La mia prima impressione non fu certo buona e non migliorò nonostante le facezie che animavano il colloquio tenuto subito dopo, se "colloquio" è il vocabolo giusto per designare qualcosa che sembrava una tirata di parole slegate fra loro. Per prevenire l'accusa di *crimen laesarum maiestatum*, devo rilevare che coppie mitologiche o storiche, come Castore e Polluce, Armodio e Aristogitone, Romeo e Giulietta, dovevano sembrare del tutto diverse prima dell'azione rispetto a quel che sarebbero state successivamente (10.2)

E in un successivo passo del suo libro aggiunge:

....ebbi la sfortuna di conoscere quei due grandi quando erano ancora straordinariamente piccoli; ciò che spuntava fuori dai loro zaini non erano propriamente bastoni da maresciallo, e persino gli zaini erano ben poco appariscenti. Il mio giudizio fu sicuramente affrettato e forse sbagliato (10.2)

Chargaff analizza retrospettivamente l'incontro che ebbe con loro:

....i due, non gravati da alcuna cognizione di chimica su questo argomento, volevano in qualche modo definire il DNA come un'elica; il principale motivo di ispirazione sembrava il modello a elica-

β di una proteina, descritto da Pauling, perchè era naturale estendere questo principio di struttura ad altre macromolecole concatenate. Non mi ricordo se effettivamente ho avuto l'opportunità di vedere un modello dimensionalmente corretto di una catena di polinucleotidi, però non lo credo, perchè quei ricercatori non avevano ancora alcuna familiarità con le strutture chimiche dei nucleotidi; già allora si preoccupavano invece, e probabilmente avevano ragione, della corretta geometria della loro spirale. Mi è anche uscito di mente se siano state mai citate le ricerche della struttura del DNA, effettuate con i raggi Röntgen contemporaneamente da Rosalind Franklin e da M.H.F. Wilkins al King's College di Londra (10.2)

Ed aggiunge ancora:

Era chiaro che mi trovavo di fronte a una novità assoluta: enorme ambizione e aggressività, associate a una quasi totale ignoranza e disprezzo della chimica, la più reale di tutte le scienze esatte, un disprezzo che più tardi doveva esercitare un'influenza molto dannosa sullo sviluppo della "biologia molecolare" (10.2)

Chargaff, infine, si interroga sul perchè a lui sia "sfuggita" la scoperta della doppia elica e conclude:

....ero stato troppo sciocco, ma se Rosalind Franklin e io avessimo potuto lavorare insieme, avremmo portato a termine qualcosa del genere in uno o due anni. Dubito, però, che saremmo riusciti a elevare la doppia elica a ciò che una volta ho definito "il simbolo potente che ha sostituito la croce come firma dell'analfabeta di biologia" (10.2)

Il giudizio finale di Chargaff testimonia il rammarico per un'occasione mancata e cerca di redimersi con una frase ad effetto. Vi sono in altri capitoli del libro dei passaggi che provano la 'prematurità' della scoperta di Avery. L'Autore si chiede nel 1948, cosa avrebbe potuto significare che:

....il DNA contiene uguali quantità di purine e pirimidine? (10.2) e racconta che durante una serie di seminari da lui tenuti nel 1949 egli accennò a questa idea della regolarità nel DNA:
....ma incontrai di nuovo una scarsa comprensione (10.2)

Egli stesso giustifica questa scarsa udienza alle sue idee:

....del resto, neppure io....vedo di buon occhio che si enuncino leggi naturali sulla base di concezioni e pertanto lasciai da parte la scoperta della complementarietà.... (10.2)

In occasione della valutazione della scoperta di Avery e collaboratori e dei suoi stessi contributi alla scoperta della doppia elica, Chargaff così si espriime:

Avery esercitò la sua influenza su un piano del tutto diverso, limitandosi alle scienze biologiche, e il suo nome è tuttora sconosciuto in larghe cerchie. Mentre i successori di Mendel poterono dimostrare che le leggi dell'ereditarietà da lui scoperte erano rinconducibili a fattori ereditari realmente esistenti e riscontrabili nei cromosommi, la scoperta di Avery richiamava la natura chimica di quei fattori, cioè la composizione dei geni. Le osservazioni fatte nel mio laboratorio completarono la ricerca, in quanto dimostravano che gli acidi deossiribonucleici potevano effettivamente rappresentare testi ricchi di informazioni precise e che, inoltre, tali testi avevano in comune una qualità del tutto nuova, presentando un appaiamento rarissimo e inaspettato di componenti del DNA. Tutte queste scoperte erano il risultato di un pensiero induttivo, si fondavano su numerose osservazioni sperimentali, come fu il caso di successive importanti scoperte: per esempio, nella scoperta dei meccanismi di duplicazione degli acidi nucleici e nell'esplorazione del codice genetico. Il modello a doppia elica del DNA, che ebbe un notevole influsso sulle scienze biologiche, è qualcosa di affatto diverso. Nel modo in cui fu presentato, questo modello è in sostanza un capolavoro di imballaggio, un gioco estremamente abile ed arguto della mente, e come tale ben si adattò alla vigorosa campagna pubblicitaria che si scatenò quasi subito dopo la sua formulazione. Dodici anni più tardi, volgendo lo sguardo a quel trambusto iniziale, così scrisse: - non è questa la sede per scrivere l'*histoire intime* di una scoperta, ma voi sapete che il più eminente simbolo carismatico del nostro tempo - la scala a chiocciola, che, come speriamo, conduce al cielo - è stato oggetto di una pubblicità notevolmente penetrante. È servita come emblema, si trova impressa sulle cravatte, orna i fogli di carta di lettera, è collocata davanti a certi edifici come scultura di richiamo commerciale -. (10.2)

Si può dire che vi sono state molte polemiche attorno al libro di Watson "La doppia elica" che uscì nel 1968 : tra queste è da ricordare quella tra M.F. Perutz e Watson.

Lo scopritore della doppia elica racconta, nei capitoli 24 e 25 del suo libro (10.3), come venne in possesso, alla fine di gennaio del 1953 di un "rapporto confidenziale", stilato dal Prof. J.T. Randall, che conteneva "vitali" informazioni circa i risultati degli esperimenti di diffrazione ai raggi X della molecola di DNA; secondo Watson avrebbe avuto il rapporto da Perutz.

In un articolo Perutz dice testualmente, a questo proposito che:

l'incidente, come è stato raccontato da Watson costituisce una ingiustizia alla storia di una delle più grandi scoperte del secolo (10.4)

Perutz aggiunge che Watson nel suo libro descrive:

....Wilkins e la signorina Franklin come gelosi custodi dei loro dati e che Watson e Crick ne vengono in possesso in maniera segreta attraverso un rapporto confidenziale che io diedi loro (10.4)

Perutz ricorda che incontrò Randall il 15 Dicembre 1952; in quella occasione Randall parlò dei suoi dati e consegnò il famoso "report". Secondo Perutz, Watson venne a conoscenza del "report" da Wilkins, a cui chiese di vederlo. Ciò accadde, secondo Perutz, perchè non vi era *nulla di segreto* e perchè lui, all'epoca, inesperto, permise a Watson di leggere il "report" senza che ne fosse stato autorizzato da Randall. Aggiunge, inoltre, che il famigerato "report" conteneva dati che Watson doveva conoscere. Perutz allega parte dei contenuti del "report" che hanno il titolo "X-ray studies of calf thymus DNA" di R.E. Franklin e R.G. Gosling ed un contributo di M.H.F. Wilkins "Desoxyribose nucleic acid and nucleoprotein structure".

Perutz afferma, senza ombra di dubbio, che Wilkins:

permise di conoscere a molti, anche se forse non tutti, i dati ottenuti al King (College) anche a Watson che a Crick (10.4)

Infine ricorda che se Watson non avesse sbagliato (non compreso) il seminario tenuto da R. Franklin nel novembre del 1951, tutti i dati *misteriosamente contenuti nel rapporto* li avrebbe già conosciuti nel 1951. Riconosce, Perutz, inoltre che queste informazioni erano di vitale importanza per costruire il modello della doppia elica del DNA.

Nello stesso fascicolo di Science vi è una replica di Watson il quale dice:

Il fatto importante non è che nel novembre 1951 *io avrei potuto* appuntarmi i dati di Rosalind..... ma che *non lo feci*. Quando Francis (Crick) vide.... (il rapporto di Randall) subito comprese l'asse di simmetria (che si evinceva dai diffrattogrammi) e le sue implicazioni sulla struttura del DNA (10.5)

In un passo successivo Watson aggiunge:

"The fiasco" del novembre 1951 ebbe origine principalmente per la mia cattiva comprensione dei dati di Rosy e per la mia scarsa conoscenza della cristallografia.... Perciò il rapporto, sebbene non necessario, fu molto, molto utile (10.5)

Watson conclude la sua replica nel seguente modo:

E se Max (Perutz) non ha fatto parte del Comitato, ritengo che né Francis (Crick) né io avremmo potuto vedere il rapporto; e se accadde ciò, fu un colpo di fortuna che mai potessimo vederlo (il rapporto). Infine, l'asserzione di Max che il laboratorio del King (College) era generalmente aperto allo scambio dei dati semplifica in maniera sbagliata una situazione, che nel mio libro, ho provato a descrivere come molto complicata dal punto di vista dei rapporti umani (10.5)

Quando passioni e tesi recenti si scontrano non è facile ricostruire l'intreccio cronologico dello sviluppo del pensiero scientifico.

Si capisce perchè, due soli personaggi, per quanto autorevoli, come Chargaff e Perutz abbiano commentato solo alcuni aspetti del libro di Watson sulla scoperta della doppia elica.

Risulterà ovvio da quanto segue come il testo inteso a delucidare la storia della doppia elica non chiarisca del tutto gli eventi (10.3).

La rivista *Nature* nell'aprile del 1974, in occasione del 21° anno di età del modello di Watson e Crick, in un fascicolo titolano "Molecular biology comes of age" e riportano articoli di F. Crick (10.5), L. Pauling (10.6), E. Chargaff (10.7) e di A. Klug (10.8).

Ciascuno di questi articoli merita la più attenta lettura se si vuole comprendere il contributo di questi protagonisti della scoperta e le loro opinioni personali. In particolare credo, che Crick sia una delle rare volte che si cimenta con la "sua" storia di questa scoperta. Ritengo utile per il lettore che ne prenda visione integralmente mentre citerò solo alcuni passi dell'articolo di R. Olby (10.9), nel quale si racconta quali fossero le idee circa il DNA prima del 1953. Olby riferisce che nel 1950 in una conferenza sulla biochimica degli acidi nucleici si diceva:

La grande quantità di acidi nucleici che compone le cellule lascia pensare che queste sostanze siano implicate in alcune importanti funzioni biologiche. Ciononostante, con la sola eccezione (la trasformazione batterica) non vi sono state prove di una data funzione biologica mediata da alcuno di questi polinucleotidi; nè enzimi, nè ormoni, nè vitamine o nessuna importante "sostanza di crescita" sono state identificate come acidi nucleici (10.9)

In altro passo Olby cita D. Mazia che pensava:

Lo spermatozoo non ha altra funzione che rappresentare un ponte tra due generazioni; le sue attività fisiologiche sono limitate alla trasmissione di un nucleo all'interno dell'uovo. Se la componente proteica (dello spermatozoo) degeneranoi possiamo provare che un completo complemento genetico è trasmesso dal nucleo, è suadente pensare che questa componente (DNA) abbia le proprietà dei geni (10.10)

Infine, la scoperta che il DNA induceva la trasformazione anche in *E. coli*, fatta da Boivin-Vanderly nel 1948 (10.11) dimostra che il lavoro di Avery provocò, almeno in alcuni, uno stimolo per lo sviluppo di importanti ricerche sugli acidi nucleici.

Se il lavoro di Avery non fu compreso, esso non fu completamente ignorato.

Olby conclude con due riflessioni:

Dal 1950 la specificità chimica e biologica del DNA era emersa - e valuta il contributo di E. Chargaff - la chiave del modello (della doppia elica) era l'accoppiamento delle basi, e ciò era in accordo con le regole di Chargaff....Ora, dopo 21 anni quale fecondo raccolto si è avuto da questa semplice idea (10.9)

Perché sia dato a Cesare ciò che è di Cesare riportiamo una cronologia (10.12) delle scoperte che hanno portato Watson e Crick a formulare la loro ipotesi.

1. Il lavoro di Levene (1909-1937) ha portato all'identificazione della natura chimica dei nucleosidi e dei nucleotidi, Todd e i suoi colleghi (1945-1952) hanno studiato con dettaglio la natura del legame tra i nucleotidi.
2. Caspersson ed altri ricercatori (dal 1938) hanno dimostrato che il DNA era una macromolecola.
3. Chargaff e Wyatt (dal 1948) hanno determinato un rapporto quantitativo tra le basi puriniche e pirimidiniche nel DNA.
4. Avery e collaboratori (1944) dimostrarono l'importanza genetica del DNA, confermata da Hershey e Chase (1952).
5. Cochran, Crick, Vand e Stokes (1952) hanno formulato la teoria della diffrazione ai raggi X delle eliche.
6. Le fotografie dei diffrattogrammi ai raggi X fatte da Astbury e Bell (1938) e da Wilkins e Gosling (1950) dimostravano che il DNA era una fibra cristallina con le basi azotate impilate le une sulle altre.
7. Furberg nel 1949 dimostrò che all'interno del nucleoside la base azotata e lo zucchero erano perpendicolari e ciò lo portò a postulare una struttura per il DNA ad elica a singolo filamento.
8. Gli studi mediante la diffrazione ai raggi X eseguiti da Franklin e Gosling permisero di accettare che in base alla idratazione delle fibre esistevano due forme di DNA e che lo sche-

letro zucchero-fosfato era esterno mentre le basi azotate erano poste all'interno, e suggerivano che la molecola poteva essere a doppio o triplo filamento e mostrava un asse di simmetria (1951-1953).

9. Dalla diffrazione delle fibre cristalline di DNA Wilkins e Stokes nel 1951 conclusero che il DNA era organizzato in elica e calcolarono tutti i parametri dell'elica.
10. Gulland e collaboratori nel 1948 dimostrarono il legame idrogeno tra le basi.
11. Donohue nel 1953 fornì a Watson e Crick la giusta forma tautomerica delle basi azotate.

Più volte numerosi Autori hanno attribuito alla scoperta della doppia elica del DNA il termine di una rivoluzione scientifica.

Orbene, per nostra fortuna disponiamo di una definizione precisa di ciò che è una rivoluzione scientifica e questa ci è offerta da K.R. Popper nel suo celebre articolo del 1973 "Problems of scientific revolution". Un passo di questo articolo dice:

..... il progresso nella scienza, pur non essendo rivoluzionario piuttosto che semplicemente cumulativo, è in un senso sempre conservativo : una nuova teoria, quantunque rivoluzionaria, deve sempre essere capace di spiegare pienamente i motivi di successo della teoria precedente (10.13)

Le scoperte di Watson Crick e Wilkinson sono all'interno di un filone ben radicato, quello "strutturistico". Risulta, inoltre evidente come i contributi precedenti il 1940 siano stati essenziali per il lavoro dei ricercatori, quindi nella scoperta della doppia elica questa prima condizione è verificata.

In secondo luogo la scoperta del DNA come latoe delle informazioni ereditarie non può "spiegare pienamente i motivi di successo della teoria precedente" semplicemente perchè non vi era una teoria definita della base materiale dell'ereditarietà.

In un certo senso, poichè sappiamo che i cromosomi sono costituiti da DNA, possiamo dire che le teorie cromosomiche dell'ereditarietà degli inizi del secolo acquisiranno un altro valore alla luce della scoperta del 1953.

Il giudizio di uno scienziato come L. Pauling conferma giustamente l'attributo rivoluzionario alla scoperta della doppia elica; non vi è alcun dubbio quindi che si possa considerare "rivoluzionaria" in senso popperiano la scoperta del DNA quale latore dei caratteri ereditari.

Sorge solo un dubbio, sollevato da G. Giorello, se sia sempre corretta l'analisi popperiana delle rivoluzioni scientifiche: secondo Giorello l'uso degli standard popperiani non avrebbero riconosciuto come "rivoluzionarie" le scoperte di Galilei.

Rimane da verificare nel caso in questione se la rivoluzione scientifica ha anche promosso nuove conoscenze e ricondotto in un solido paradigma concettuale le scoperte precedenti e seguenti ad essa.

Secondo T.S. Kuhn le rivoluzioni scientifiche sono un processo di rielaborazione concettuale nel quale:

I dati richiesti per realizzare la rivoluzione sono esistiti in precedenza al margine della coscienza scientifica, l'emergere di una crisi li porta al centro dell'attenzione e la rielaborazione concettuale rivoluzionaria consente di vederli in una luce nuova (10.14)

Hanson (10.15) sostiene che la scienza sia "cumulativa", ovvero la scienza costruisce su qualcosa di già noto, si pensi a Keplero e Galilei. I fondatori della Genetica e le premesse della teoria mendeliana ed il pensiero di Einstein possono essere considerati come generalizzatori delle teorie precedenti. Inoltre, nella pratica scientifica si arriva spesso alla crisi, ovvero all'abbandono di un paradigma (10.16) per un altro e questo abbandono si verifica in quanto la vecchia teoria si rivela sempre più incapace a risolvere le anomalie incalzanti. La rivoluzione ha luogo perchè nuovi risultati offrono nuovi modi di considerare le cose, e creano a loro volta nuovo problemi.

I vecchi problemi vengono poi archiviati o dimenticati; purtroppo per noi.

Se la scoperta del DNA, come latore delle informazioni ereditarie compiuta da Watson, Crick e Wilkins, è indubbiamente "rivoluzionaria", rimane da chiarire se la biologia molecolare ai giorni d'oggi abbia ancora una funzione rivoluzionaria nell'ambito della conoscenza scientifica. Secondo G.S. Stent (10.17) e chi scrive forse non lo è più, perché in essa prevale la metodologia, rispetto, ad esempio, alla biologia cellulare. La conoscenza dei fattori frenanti che sono emersi nel corso dello sviluppo della biologia molecolare dal 1970 in poi ne costituiscono una prova sommaria. Rimandiamo perciò ad altri questa ricerca.

NOTE E BIBLIOGRAFIA

10. 1 Stent G.S., The prematurity and uniqueness in scientific discovery, *Sci.Am.* 227 (1972) 84.
10. 2 Chargaff E., Das Feuer das Heraklit, traduzione in italiano "Il fuoco di Eraclito", Garzanti, Milano 1985.
10. 3 Watson J.D., The double helix, traduzione in italiano "La doppia elica: trent'anni dopo", Garzanti, Milano 1982.
10. 4 Perutz M.F., DNA helix, *Science* 164 (1969) 1537.
10. 5 Watson J.D., DNA helix, *Science* 164 (1539).
10. 6 Crick F.H.C., The double helix: a personal view, *Nature* 248 (1974) 766.
10. 7 Pauling L., Molecular basis of biological specificity, *Nature* 248 (1974) 769.
10. 8 Chargaff E., Building the tower of Babble, *Nature* 248 (1974) 776.
10. 9 Klug A., Rosalind Franklin and the double helix, *Nature* 248 (1974) 787.
- 10.10 Olby R.,DNA before Watson-Crick, *Nature* 248 (1974) 782.
- 10.11 Mazia D., in Molecular trends in physiology and biochemistry, E.S.C. Barron ed., New York, 1952.
- 10.12 Boivin A., Vanderly R. e Vanderly C., L'acide desoxyribonucléique du noyau cellulaire, depositaire des caractères hereditaires; arguments d'ordre analitique, *C.R. Acad. Sci. Paris* 226 (1948) 1061.

- 10.13 Portugal F.H. e Cohen J.S., A century of DNA, MIT Press, Cambridge, London 1977.
- 10.14 Popper K.R., Problems of scientific revolutions, in H. Spencer Lectures a cura di R. Harré, Oxford University Press pp 72-105 1975.
- 10.15 Kuhn T.S., L'aventure de la science, Mélanges A. Koyré vol II pp 307-34, Hermann Paris 1964.
- 10.16 Hanson N.R., Patterns of discovery, Cambridge University Press 1958 (traduzione italiana "I modelli della scoperta scientifica", Feltrinelli Milano 1978).
- 10.17 Kuhn T.S., The structure of scientific revolutions, Chicago University Press 1970 (traduzione italiana "La struttura delle rivoluzioni scientifiche" Einaudi Torino (1978))
- 10.18 Stent G.S., That was the molecular biology that was, *Science* 160 (1968) 390.