

Il materiale genetico: DNA e RNA (parte 1)

Esperimento di Griffith

L'esperimento di Frederick Griffith del 1928 fu uno dei primi esperimenti a suggerire che i batteri sono in grado di trasferire informazioni genetiche attraverso un processo noto come trasformazione. In tal modo, esso aprì la strada alla determinazione di quale fosse la natura del materiale genetico. Che esistesse una qualche sostanza in grado di trasmettere l'informazione genetica (il materiale genetico, appunto) era noto da tempo. Tra la fine del 1800 e i primi anni del 1900 venne proposto e dimostrato che il materiale genetico fosse racchiuso nei nuclei delle cellule (August Weismann) e in particolare nei cromosomi (teoria cromosomica dell'ereditarietà di Sutton, Boveri del 1902 dimostrata solo più tardi dagli esperimenti su *Drosophila melanogaster* di Thomas H. Morgan e dei suoi allievi). Rimaneva però aperta la questione intorno alla materia costitutiva del materiale genetico. L'ufficiale medico inglese Frederick Griffith stava studiando il batterio *Streptococcus pneumoniae* o pneumococco, uno degli agenti patogeni della polmonite umana: lo scopo di Griffith era di sviluppare un vaccino contro questa malattia che al tempo, prima della scoperta degli antibiotici, mieteva molte vittime. L'esperimento di Frederick Griffith fu uno dei primi esperimenti a suggerire che i batteri sono in grado di trasferire informazioni genetiche attraverso un processo noto come trasformazione. In tal modo, esso aprì la strada alla determinazione di quale fosse la natura del materiale genetico. Griffith stava lavorando con due diversi ceppi di pneumococco:

Il ceppo S (smooth, in inglese «liscio») era costituito da cellule che producevano colonie a superficie liscia. Essendo ricoperte da una capsula polisaccaridica, queste cellule erano protette dagli attacchi del sistema immunitario dell'ospite. Se iniettate in topi di laboratorio, esse si riproducevano e provocavano la polmonite (il ceppo quindi era virulento). Il ceppo R (rough, in inglese «ruvido») era costituito da cellule che producevano colonie con superficie irregolare. Queste cellule erano prive di una capsula protettiva e non erano virulente.

Era già noto dai tempi di Pasteur che il calore era in grado di rendere innocue le colture batteriche, così Griffith inoculò in alcuni topolini degli pneumococchi S uccisi dal calore e osservò che i batteri erano disattivati, cioè incapaci di produrre l'infezione. Quando però Griffith somministrò a un altro gruppo di topi una miscela di batteri R vivi e batteri S uccisi dal calore, con sua grande meraviglia, notò che gli animali contraevano la polmonite e morivano. Esaminando il sangue di questi animali, Griffith lo trovò pieno di batteri vivi, molti dei quali dotati delle

caratteristiche del ceppo virulento S; egli concluse che in presenza degli pneumococchi S uccisi, alcuni degli pneumococchi R vivi si erano trasformati in organismi del ceppo virulento S (Figura 1).

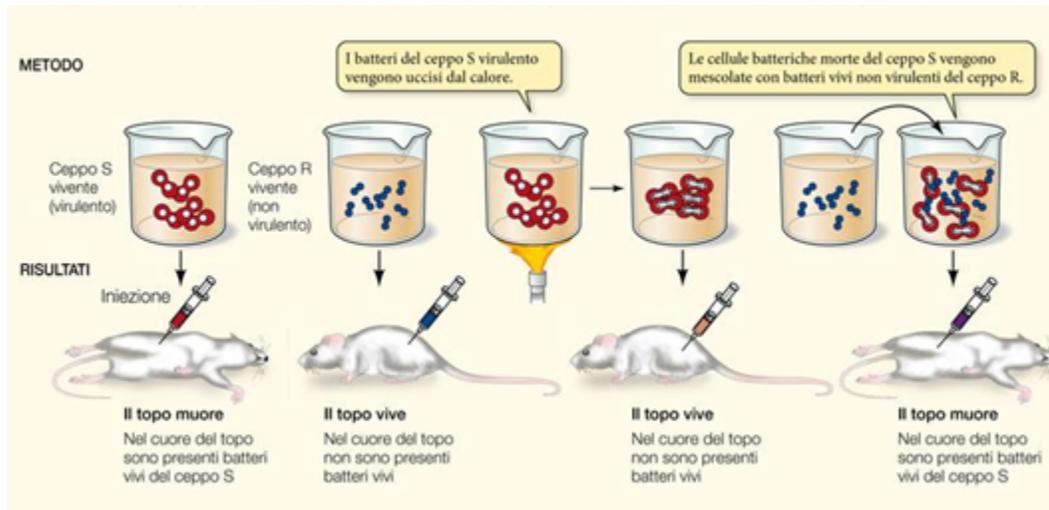


Figura 1. La trasformazione genetica di pneumococchi non virulenti. Gli esperimenti di Griffith dimostrarono che una sostanza presente nel ceppo S virulento poteva trasformare i batteri non virulenti del ceppo R in una forma letale; ciò accadeva anche quando i batteri del ceppo S erano stati uccisi con il calore.

La trasformazione non dipendeva da qualcosa che avveniva nel corpo del topo, perché fu dimostrato che la semplice incubazione in una provetta di batteri R vivi insieme a batteri S uccisi dal calore produceva la stessa trasformazione. Alcuni anni dopo, un altro gruppo di scienziati scoprì che la trasformazione delle cellule R poteva essere prodotta anche da un estratto acellulare di cellule S uccise dal calore (un estratto acellulare contiene tutti gli ingredienti delle cellule frantumate, ma non cellule integre). Questo dimostrava che una qualche sostanza, all'epoca chiamata fattore di trasformazione, estratta da pneumococchi S morti poteva agire sulle cellule R provocando un cambiamento ereditario. A quel punto rimaneva solo da individuare la natura chimica di questa sostanza ma erroneamente, come però la stragrande maggioranza degli scienziati suoi contemporanei, riteneva che questa sostanza dovesse essere di natura proteica. A partire da questo importantissimo esperimento, Avery, MacLeod e McCarty nel 1943 dimostrarono che il materiale genetico in questione era il DNA (anche se la prova definitiva arrivò solo dagli esperimenti di Hershey e Chase del 1953).

Esperimento di Avery-McLeod-MacCarty

L'esperimento di Oswald Theodore Avery e dei suoi colleghi Colin M. MacLeod e Maclyn McCarty risale al 1943 e rappresenta una delle esperienze fondamentali per l'avanzamento

delle conoscenze nel campo della genetica e della biologia molecolare. Fu solo quasi due decenni dopo che il progresso della biochimica permise al gruppo di ricerca di sviluppare l'esperimento di Griffith con la purificazione delle sostanze che compongono le cellule batteriche uccise e riuscirono a dimostrare che il cosiddetto principio trasformante (ovvero il portatore di informazioni geniche) di cui parlava Griffith era il DNA. Partendo dalla coltura di pneumococchi di tipo S uccisi con il calore, i ricercatori lisarono le cellule (cioè ne ruppero la parete e la membrana cellulare) in modo da ottenere una soluzione nella quale era disciolto il materiale contenuto nei batteri, il cosiddetto estratto cellulare o lisato cellulare costituito da zuccheri, proteine, lipidi ed acidi nucleici. Il materiale genetico doveva presumibilmente essere uno dei diversi tipi di macromolecole biologiche presenti nei batteri: (proteine, polisaccaridi, acidi nucleici - ovvero DNA e RNA - e lipidi). Successivamente cercarono di capire quali di queste sostanze erano effettivamente in grado di trasformare batteri R avirulenti in batteri S virulenti. Mescolando ciascuna delle componenti batteriche purificate con una coltura di pneumococchi non patogeni ed inoculando le miscele in animali diversi, solo topi che ricevevano pneumococchi innocui ed acidi nucleici degli pneumococchi patogeni sviluppavano la polmonite. Le cavie sopravvivevano quando trattate con tutte le biomolecole tranne gli acidi nucleici: il materiale genetico doveva essere quindi DNA e/o RNA. Per capire quale delle due sostanze fosse, divisero l'estratto contenente l'acido nucleico in due aliquote: una venne trattata con l'enzima ribonucleasi (RNasi) che degrada selettivamente l'RNA e non il DNA, l'altra venne invece trattata con deossiribonucleasi (DNasi) che degrada selettivamente il DNA e non l'RNA. Ciò che si osservò era la trasformazione dei batteri R in batteri S solo in seguito all'aggiunta dell'aliquota trattata con RNasi. Il materiale genetico doveva allora essere necessariamente il DNA.

Le critiche all'esperimento di Avery-McLeod-MacCarty

Il sopracitato esperimento non convinse tutti gli scienziati dell'epoca. Vi era infatti in quel periodo la convinzione diffusa (tra l'altro insita nello stesso Griffith) che il materiale genetico dovesse essere di natura proteica. Sia il DNA che le proteine sono dei polimeri. Nel caso delle proteine i monomeri (le unità base che ripetute danno il polimero) sono i 20 amminoacidi. Nel caso del DNA i monomeri sono solamente i 4 deossiribonucleotidi. Dal momento che l'informazione genetica doveva essere contenuta in queste macromolecole lineari, e considerata la grande differenza genetica tra le varie specie, pareva più sensato che il materiale genetico fosse natura proteica: in questo modo, rispetto agli acidi nucleici, sarebbero state possibili molte più combinazioni tra i vari monomeri e di conseguenza l'informazione contenuta dalla macromolecola sarebbe stata maggiore. Sotto la spinta di queste convinzioni, quello che veniva criticato ad Avery e colleghi era la non completa purezza degli acidi nucleici utilizzati nell'esperimento: all'interno delle soluzioni contenenti DNA e RNA si ipotizzava fossero presenti anche tracce di proteine, le stesse proteine che gli scienziati scettici pensavano costituissero il materiale genetico. In questo senso, pur

non tralasciando l'importanza dell'evidenza sperimentale, non si può dire che l'esperimento di Avery, MacLeod e McCarty fosse la prova definitiva. Solo una decina di anni più tardi (1953) Hershey e Chase dimostrarono che il materiale genetico è costituito da DNA.

Esperimento di Hershey e Chase

L'esperimento di Alfred D. Hershey e Martha Chase prova definitivamente nel 1953 che il materiale genetico è costituito da DNA e non da proteine. In seguito a questi risultati incontrovertibili anche gli scienziati che avevano criticato l'esperimento di Avery, MacLeod e McCarty si convincono dell'importantissimo ruolo biologico del DNA. Essi lavoravano con i batteriofagi (o fagi), virus che infettano le cellule batteriche. In particolare, i due studiosi utilizzarono il fago T2 che infetta le cellule batteriche di *Escherichia coli* ed è costituito da un involucro proteico che racchiude una molecola di DNA. Questo tipo di struttura rendeva i fagi uno strumento ideale per definire una volta per tutte quale fosse la natura del materiale genetico. Hershey e Chase progettaron un esperimento di grande eleganza per determinare quale delle due componenti del fago fosse responsabile della riprogrammazione genetica delle cellule infettate. I due ricercatori si avvalsero di una procedura basata sulla marcatura dei fagi con isotopi radioattivi e utilizzarono un contatore di radioattività, un semplice frullatore da cucina e una centrifuga. Hershey e Chase prepararono in parallelo due colture di *E. coli*:

- Nel terreno di coltura della prima introdussero fosforo marcato radioattivamente (l'isotopo ^{32}P).
- Nel terreno di coltura della seconda introdussero zolfo marcato radioattivamente (l'isotopo ^{35}S).

I batteri delle due colture metabolizzarono da una parte il fosforo marcato e dall'altra lo zolfo marcato introducendo questi atomi radioattivi nelle biomolecole presenti all'interno delle cellule. In particolare:

Il fosforo marcato si troverà nei nucleotidi e di conseguenza anche negli acidi nucleici; non sarà presente invece in quantità significative nelle proteine.

Lo zolfo marcato si troverà nelle proteine (in particolare nell'amminoacido cisteina) e non si troverà nei nucleotidi.

A questo punto i ricercatori infettarono parallelamente le due colture batteriche con il fago T2. Questo virus utilizza l'apparato biosintetico delle cellule di *E. coli* per replicare il proprio DNA e per sintetizzare le proteine del rivestimento e quindi per costruire virus completi che

causeranno poi la lisi (rottura) della cellula batterica parassitata. Dal momento che i nucleotidi e gli amminoacidi utilizzati nella sintesi del DNA e delle proteine virali sono quelli presenti all'interno della cellula batterica infettata (cresciuta nutrendosi degli isotopi radioattivi), ne risulta che i fagi sviluppati dall'infezione nella prima coltura avranno un DNA marcato radioattivamente, mentre quelli sviluppati dall'infezione della seconda coltura avranno il rivestimento proteico esterno marcato radioattivamente (Figura 2).

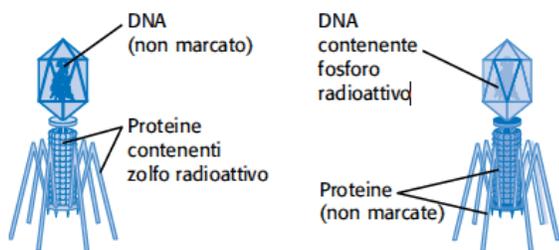


Figura 2. Schema della struttura di un fago T2.

Hershey e Chase separarono i fagi neoformati (quelli marcati) dai due terreni di coltura e, separatamente, li utilizzarono per infettare altre due colture di *E. coli*, in questo caso cresciute su terreni standard (privi di isotopi radioattivi).

- Nel caso in cui i fagi infettanti avevano il DNA marcato, in seguito all'infezione gran parte della radioattività veniva misurata all'interno delle cellule batteriche colpite (e nel DNA di una parte dei nuovi fagi sviluppatisi in seguito a questa infezione).
- Nel caso in cui i fagi infettanti avevano il rivestimento proteico marcato, la radioattività veniva misurata solamente all'esterno delle cellule batteriche colpite (e non era presente sul rivestimento proteico dei nuovi fagi sviluppatisi in seguito a questa infezione).

Il processo utilizzato per determinare se la radioattività provenisse dall'interno o dall'esterno delle cellule fu il seguente: dopo un certo tempo dall'inizio dell'infezione, il terreno di coltura veniva posto in un agitatore. La conseguente agitazione provocava il distacco del rivestimento proteico dei virus dalla membrana cellulare del batterio (in questo caso si parla di "ombre fagiche" poiché questi rivestimenti proteici non contengono il DNA che è già stato iniettato nella cellula). Il tutto veniva poi centrifugato: le cellule batteriche (contenenti eventualmente il DNA marcato) rimanevano sul fondo della provetta, mentre i rivestimenti proteici dei virus, distaccati dalle membrane cellulari dei batteri, rimanevano in sospensione. A seconda di dove si misurava la maggiore radioattività era possibile dedurre se la molecola marcata si trovasse o meno all'interno della cellula batterica. Nel caso del DNA marcato la radioattività si misurò sul fondo della provetta (quindi all'interno dei batteri; viceversa nel caso delle proteine marcate la radioattività si misurò sul soprannatante (quindi all'esterno dei batteri) (Figura 3).

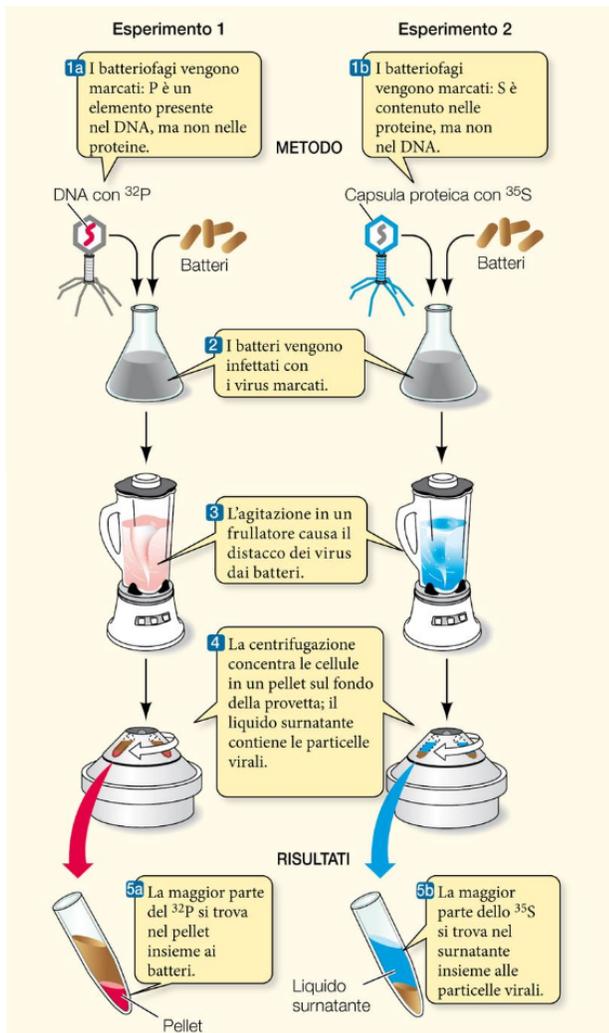


Figura 3. L'esperimento di Hershey e Chase.

Dal momento che il fago per replicarsi ha bisogno di introdurre all'interno della cellula ospite il suo materiale genetico per poter sfruttare l'apparato batterico di biosintesi, appare evidente che questo materiale genetico deve essere per forza il DNA poiché, come dimostrato, le proteine non entrano nella cellula colpita mentre il DNA sì. Tali risultati convinsero anche i più scettici che il materiale genetico, almeno nelle cellule batteriche e nei fagi, era rappresentato dal DNA. Solo un anno più tardi Watson e Crick, basandosi sui dati raccolti da Wilkins e Franklin, avrebbero proposto il modello a doppia elica del DNA.