

Il materiale genetico: DNA e RNA (parte 2)

Gli Acidi Nucleici: struttura dei nucleotidi

I nucleotidi sono molecole in cui si possono riconoscere tre porzioni: una base azotata, uno zucchero e un gruppo fosforico. I nucleotidi si differenziano per il tipo di zucchero, 2'-deossi-D-ribosio o D-ribosio o e per la base azotata, purinica o pirimidinica. In particolare, i deossiribonucleotidi contenenti 2'-deossi-D-ribosio sono le unità monomeriche che costituiscono il DNA; i ribonucleotidi contenenti D-ribosio sono invece le unità costituenti dell'RNA. Le basi azotate si formano da alcuni aminoacidi, dall'acido folico, da ammoniaca e da anidride carbonica. Le basi azotate sono adenina (A), timina, (T), citosina (C) e guanina (G) nel DNA, ma nell'RNA la timina è sostituita dall'uracile (U). A e G sono basi puriniche. T, C e U sono basi pirimidiniche. La struttura delle basi azotate è riportata in Figura 1.

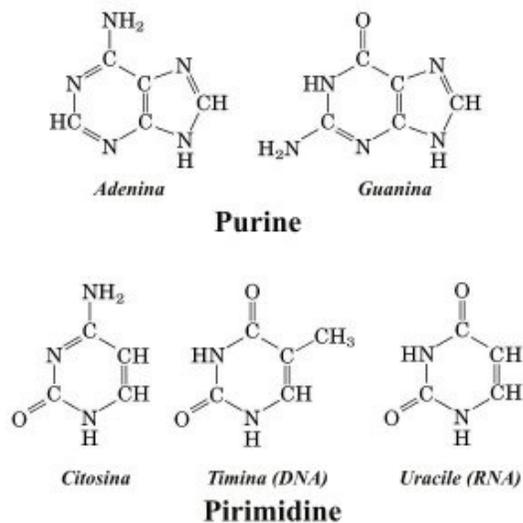


Figura 1. Struttura delle basi azotate.

In Figura 2 è mostrata la struttura di un nucleotide, dove la base azotata è legata al C1 e il gruppo fosforico al C5 del pentosio; ma nel deossiribonucleotide il gruppo ossidrilico (OH) sul C2 del pentosio è sostituito da un atomo di idrogeno (H).

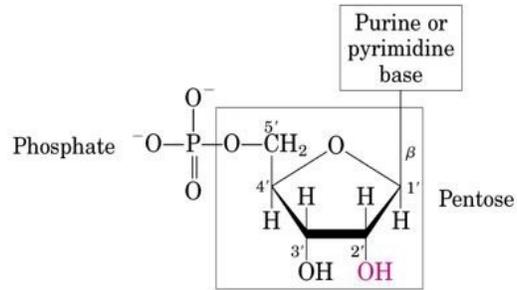


Figura 2. Struttura del nucleotide.

I nucleotidi del DNA e dell'RNA sono uniti tra loro in successione mediante legami covalenti tra gruppi fosforici. Il gruppo ossidrilico 5' di un'unità nucleotidica è unito al gruppo ossidrilico 3' di quella successiva formando un legame fosfodiesterico. Lo scheletro covalente è costituito da un'alternanza di gruppi fosfato e residui di pentosio, mentre le basi azotate possono essere considerate come gruppi laterali. Le catene degli acidi nucleici hanno una specifica polarità, ed estremità 3' e 5' distinte (Figura 3). Per definizione:

- l'estremità 5' ha il gruppo ossidrilico in posizione 5' libero
- l'estremità 3' ha il gruppo ossidrilico in posizione 3' libero

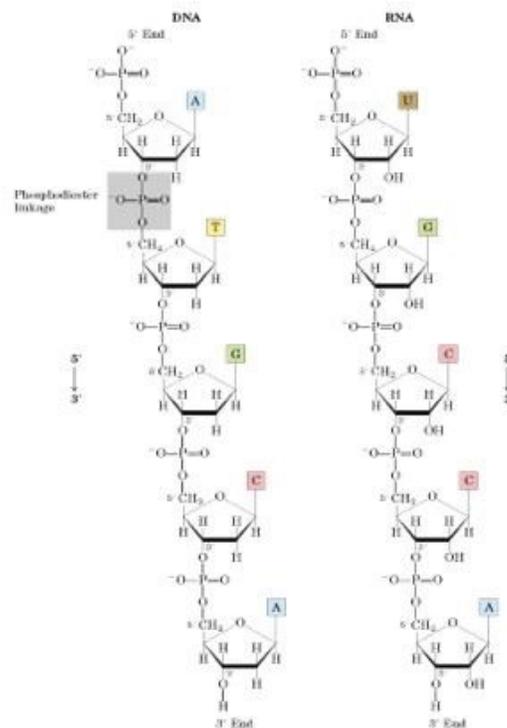


Figura 3. Scheletro covalente del DNA e dell'RNA.

I nucleotidi svolgono numerose funzioni cellulari oltre al loro ruolo di subunità costituenti degli acidi nucleici. Essi, infatti possono essere adoperati dalla cellula come trasportatori di energia chimica, componenti di cofattori enzimatici e messaggeri chimici. Per quanto riguarda il trasporto dell'energia chimica, i nucleotidi possono legare gruppi fosforici addizionali legati al gruppo fosforico presente sul carbonio 5' del ribosio; si parla appunto di nucleosidi mono, di e tri-fosfato. I tre gruppi fosforici vengono indicati con le lettere α , β e γ . Il gruppo fosforico α è legato al ribosio con un legame estereo. I legami tra α β e tra β γ sono anidridici (Figura 4).

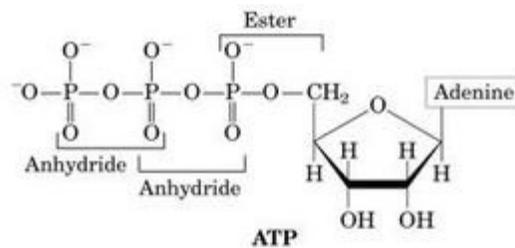


Figura 4. Struttura dell'adenosina trifosfato (ATP).

L'idrolisi dei nucleosidi trifosfato, come l'ATP rappresenta una importante fonte di energia chimica per la cellula. L'energia rilasciata dall'idrolisi dipende, tuttavia dal legame in cui il gruppo fosforico è coinvolto. L'idrolisi dei legami anidridici fornisce una quantità di energia maggiore dell'idrolisi del legame estereo. Come accennato, i nucleosidi sono anche i componenti di cofattori enzimatici e contengono nella loro struttura l'adenosina come: il coenzima A, il FAD e il NAD⁺. Questi cofattori hanno strutture diverse e quindi svolgono funzioni differenti. I nucleotidi sono anche dei messaggeri, ad esempio l'adenosina 3',5'-monofosfato ciclico (cAMP), prodotto dall'ATP in una reazione catalizzata dall'adenilato ciclastasi. I nucleotidi possono svolgere il ruolo di messaggeri nella cascata di trasduzione di un segnale molecolare, nella regolazione del metabolismo cellulare e la riproduzione. L'AMP ciclico svolge funzioni regolatrici in tutte le cellule, ad eccezione delle cellule vegetali. Un altro nucleotide regolatore è la guanosina 3',5'-monofosfato ciclico (cGMP).

Organizzazione del DNA a doppia elica e dell'RNA

La molecola del DNA è costituita da due catene polinucleotidiche appaiate e avvolte intorno allo stesso asse, in modo da formare una doppia elica. La molecola presenta tre caratteristiche importanti:

- le due catene sono complementari e antiparallele;
- i legami tra i nucleotidi all'interno di ciascuna catena sono legami covalenti, mentre quelli che uniscono i due filamenti appaiati sono legami a idrogeno;

- l'elica ha diametro costante e avvolgimento destrorso.

Ogni catena o filamento del DNA è formata da una sequenza di nucleotidi uniti mediante legami covalenti tra il gruppo fosfato di un nucleotide e il carbonio in posizione 3' del nucleotide precedente. I legami covalenti si formano per condensazione tra un gruppo ossidrilico del desossiribosio e uno del gruppo fosforico. Pertanto, ogni nucleotide della catena forma legami con altri due nucleotidi. Nella molecola di DNA le due catene sono complementari e sono tenute insieme da legami a idrogeno tra le basi e sono rivolte verso il centro appaiandosi in modo specifico; invece zuccheri e gruppi fosfato sono disposti verso l'esterno e formano l'ossatura verticale della molecola, che è sempre costante. L'appaiamento delle basi azotate dei due filamenti avviene in accordo con la regola di Chargaff: l'adenina (A) si appaia con la timina (T) formando due legami a idrogeno; la guanina (G) si appaia con la citosina (C) formando tre legami a idrogeno. Ciascuna coppia di basi contiene pertanto una purina (A o G) e una pirimidina (T o C); questo schema di appaiamento prende il nome di complementarità delle basi (Figura 5).

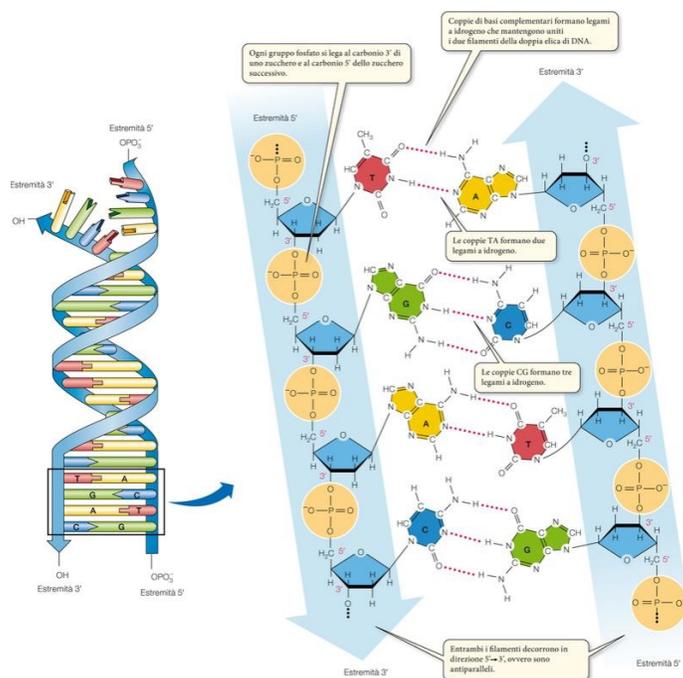


Figura 5. Appaiamento delle basi complementare; infatti le purine (A e G) si appaiano con le pirimidine (T e C) a formare coppie di basi di uguale lunghezza, simili ai gradini di una scala a pioli. La scala si avvolge su sé stessa a formare una struttura a doppia elica.

I due filamenti oltre a essere complementari, sono anche antiparalleli, cioè sono orientati in direzioni opposte. Possiamo evidenziare il diverso orientamento delle due catene considerando la disposizione dei gruppi terminali liberi (cioè non legati a un altro nucleotide) all'estremità di ciascuna di esse. Ogni catena presenta a un'estremità, detta estremità 5', un gruppo 5' fosfato (-

OPO3-) e all'altra estremità, detta estremità 3', un gruppo ossidrile (-OH). In una doppia elica di DNA, l'estremità 5' di un filamento corrisponde all'estremità 3' dell'altro filamento; in altre parole, se per ciascun filamento si traccia una freccia che va da 5' a 3', le due frecce puntano in direzione opposta. La molecola del DNA ha la forma di una doppia elica; possiamo immaginarla come una scala a pioli in cui i montanti sono formati da gruppi fosfato e zuccheri alternati e ogni scalino corrisponde a una coppia di basi. Le coppie di basi sono planari (distese orizzontalmente) e al centro della molecola sono stabilizzate da interazioni idrofobiche, che contribuiscono alla stabilità complessiva della doppia elica. Poiché le coppie AT e GC hanno la stessa lunghezza, e quindi si inseriscono agevolmente fra i due montanti come i pioli di una scala, l'elica ha un diametro costante. Ogni piolo inoltre è ruotato rispetto a quello precedente di circa 36°. L'elica pertanto compie un giro completo ogni 10 coppie di basi. L'elica è destrorsa: osservandola dall'alto essa appare avvolgersi in senso orario.

La molecola di RNA è molto simile alla molecola del DNA, con la seguente composizione di basi e di differenze strutturali:

- Nell'RNA lo zucchero è ribosio invece di desossiribosio.
- Nell'RNA non troviamo la timina (T); invece, è presente l'uracile (U). Anche l'uracile lega con l'adenina come fa la timina.
- L'RNA non forma una doppia elica ma ha la struttura di una catena semplice. La struttura tridimensionale dell'RNA è di gran lunga più svariata di quella del DNA.

Un'altra differenza tra DNA e RNA è che mentre il DNA esegue essenzialmente la funzione di contenere l'informazione, al contrario per l'RNA ci sono specie differenti nella cellula, che eseguono funzioni differenti. Infatti l'RNA è presente in diverse forme, ognuna specializzata in una determinata funzione: RNA messaggero (mRNA), RNA di trascrizione (tRNA), RNA ribosomiale (rRNA). L'mRNA è una molecola prodotta dalla trascrizione del DNA, che porta il codice genetico sul sito della sintesi proteica. Le due estremità sono diverse perché sia riconoscibile il corretto senso di lettura. L'tRNA è costituito da piccole molecole a forma di trifoglio, ciascuna delle quali porta uno specifico aminoacido. A ogni codone dell'mRNA (un codone è la sequenza di tre basi azotate, specifica per ogni aminoacido) corrisponde un anticodone del tRNA. Infine, l'rRNA è il principale costituente dei ribosomi, i microscopici organuli cellulari su cui avviene la sintesi proteica (Figura 6).

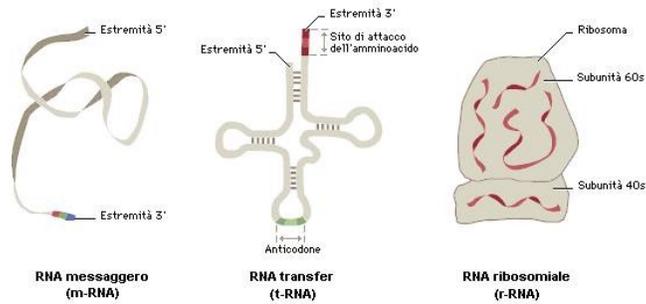


Figura 6. Tipi di RNA.

Organizzazione del DNA nei cromosomi eucariotici

Negli eucarioti, il DNA è organizzato nel nucleo in una struttura nucleoproteica nota come 'cromatina'. Per lungo tempo la cromatina è stata considerata un semplice sistema di 'impacchettamento', deputato a immagazzinare i quasi 2m di DNA genomico umano nel ristretto spazio nucleare, caratterizzato da un diametro di circa 10µm. Solo recentemente la percezione della funzione della cromatina è cambiata, con l'attribuzione di molteplici funzioni, modulate nel tempo e nello spazio. L'unità di base della cromatina è il nucleosoma, costituito da 146 paia di basi (bp) di DNA che si avvolgono per circa due volte intorno a un ottamero di piccole proteine altamente basiche (cariche positivamente), note come 'istoni'. Ogni nucleosoma contiene due molecole di ognuno dei quattro istoni del core (H2A, H2B, H3 e H4), che si organizzano in un tetramero centrale formato da H3 e H4, fiancheggiato da due eterodimeri di H2A e H2B. I nucleosomi, regolarmente spazati lungo il filamento di DNA, sono separati tra loro da 10÷100bp di DNA linker (di connessione). Questa configurazione, nota anche come 'fibra da 10nm' o 'collana di perle', rappresenta il primo livello di organizzazione della cromatina (Figura 7).

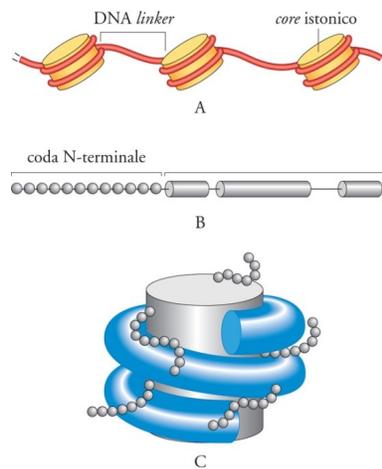


Figura 7. Il primo livello di organizzazione della cromatina. (A) Rappresentazione grafica della fibra da 10nm, o collana di perle: le perle sono i nucleosomi, formati da proteine, gli istoni, e DNA. (B) Struttura di un tipico istone del core. La coda N-terminale è il target della maggior parte delle modificazioni post-traduzionali. Il dominio globulare, formato da tre α -eliche ed è implicato nelle interazioni proteina-proteina e nell'avvolgimento del DNA. (C) Immagine schematica del nucleosoma. Il cilindro grigio rappresenta l'ottamero istonico, il tubo blu il DNA. Le code N-terminali degli istoni, non strutturate, protrudono all'esterno del nucleosoma.

Ogni istone del core contiene due distinti domini funzionali: un motivo globulare, C-terminale, altamente conservato, detto histone fold, e un'estremità (coda) N-terminale, unica per ogni specie istonica. Il primo dominio, deputato all'assemblaggio istonico, è implicato sia nella eterodimerizzazione specifica con un altro istone (H2A con H2B, H3 con H4) sia nell'avvolgimento del DNA nucleosomiale. Al contrario, le code N-terminali, apparentemente non strutturate, protrudono all'esterno del nucleosoma e non contribuiscono significativamente alla sua formazione, né alla sua stabilità; sono invece implicate nell'organizzazione delle strutture cromatiniche di ordine superiore mediante l'interazione con altre proteine e nucleosomi. Esperimenti in vitro dimostrano, infatti, che la rimozione delle code istoniche permette la formazione della fibra da 10nm, ma questa struttura non riesce a organizzarsi nei successivi livelli strutturali. Oltre agli istoni del core, i nucleosomi degli organismi pluricellulari contengono anche una molecola di istone linker, quale H1, che permette l'avvolgimento di altre 20÷30bp di DNA. Benché la condensazione sia una proprietà intrinseca alla fibra nucleosomiale, la presenza di H1 favorisce la formazione del livello strutturale immediatamente superiore, costituito dalla fibra da 30nm (Figura 8).

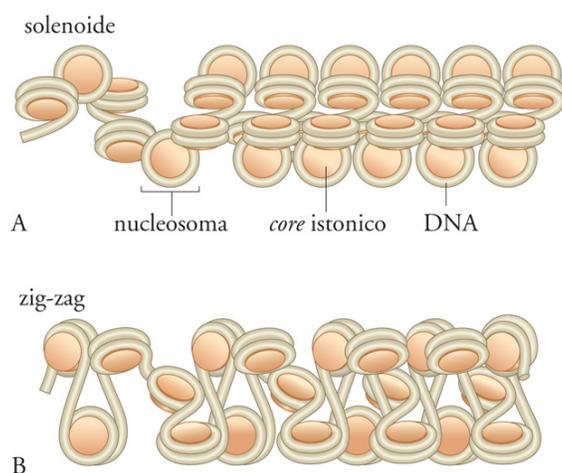


Figura 8. La fibra da 30nm. (A) Rappresentazione grafica della fibra da 30nm secondo il modello del solenoide in cui 6 nucleosomi consecutivi formano un giro della spirale. (B) Modello a 'zig-zag' della fibra da 10nm in cui i nucleosomi consecutivi presentano una disposizione alternata.

Anche i diversi membri della famiglia degli istoni di connessione, pur non derivando evolutivamente dagli istoni del core, sono caratterizzati da un dominio globulare fiancheggiato da due estremità non strutturate: una breve coda N-terminale e una C-terminale, altamente basica e di circa 100 residui amminoacidici. Studi strutturali hanno permesso di dimostrare come il dominio globulare sia essenziale per il legame dell'istone linker al nucleosoma; in particolare, esso interagisce con il DNA avvolto intorno all'ottamero istonico e non con le proteine del core. Al contrario, la coda C-terminale sembra giocare un ruolo fondamentale nella formazione delle strutture cromatiniche di ordine superiore. Nonostante oltre venti anni di assidui studi, non si è ancora compreso quale sia la reale struttura della cromatina condensata. L'organizzazione spaziale della fibra da 30nm, per esempio, viene spiegata da due diversi modelli. Un primo modello propone una struttura solenoidale, in cui 6 nucleosomi consecutivi formano un giro di un'elica che si superavvolge in una spira con un passo di 11nm. Questa struttura sarebbe determinata e tenuta insieme dalle diverse interazioni tra gli istoni. Un secondo modello, più recente, favorisce una struttura a zig-zag, in cui il legame di H1, producendo un definito angolo di entrata e di uscita del DNA dal nucleosoma, genererebbe una disposizione alternata (a zig-zag) dei nucleosomi. Nonostante le sostanziali differenze fra le due architetture, è molto difficile ottenere evidenze sperimentali che supportino in maniera univoca l'uno o l'altro modello; le più recenti evidenze sembrano comunque favorire quello a zig-zag. La compattazione del DNA raggiunta con la fibra da 30nm è ancora insufficiente per alloggiare l'intero genoma nel nucleo della cellula; intervengono, quindi, altri meccanismi di condensazione che determinano la formazione delle fibre dello spessore di 100÷400nm, che caratterizzano la cromatina interfascica, o strutture ancora più compatte tipiche del cromosoma metafasico. Sebbene la natura di queste strutture non sia ancora nota, diverse prove sperimentali suggeriscono che la fibra da 30nm formi delle anse di dimensioni variabili da alcune decine di chilobasi fino a più di 10megabasi. Queste anse sarebbero poi bloccate alla loro base da un complesso proteico denominato scaffold nucleare (Figura 9).

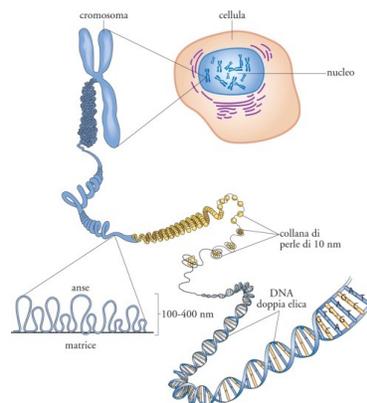


Figura 9. Dalla doppia elica alla struttura del cromosoma: i diversi livelli di compattazione. Un possibile modello utile a spiegare come la fibra da 30nm si organizzi nei livelli strutturali superiori

utili a dare il cromosoma metafaseico. Tale condensazione passa probabilmente attraverso la formazione di anse, tenute alla base da interazioni con la matrice, o scaffold nucleare.

Qualunque sia l'organizzazione del DNA all'interno della fibra cromatinica, è oggi ben chiaro che essa ostacola il legame di proteine che devono 'leggere' e/o copiare la sequenza nucleotidica, impedendo di conseguenza la trascrizione. Per questo motivo, negli eucarioti, si è evoluta e affermata una complessa serie di proteine capaci di alterare la struttura della cromatina e di regolarne il livello di compattazione. In particolare, queste funzioni vengono svolte da complessi enzimatici che modificano post-traduzionalmente gli istoni o che, mediante l'idrolisi di ATP, alterano la posizione o la struttura dei nucleosomi. Un terzo meccanismo usato per modulare la conformazione e composizione della cromatina consiste nella sostituzione degli istoni del core con varianti dotate di specifiche caratteristiche strutturali e funzionali.