

La replicazione del DNA: mitosi (parte 1)

Il modello di replicazione semiconservativa: l'esperimento di Meselson e Stahl

L'esperimento di Matthew Meselson e Franklin Stahl del 1958 è stato fondamentale per determinare il meccanismo semiconservativo di replicazione del DNA. All'epoca era già noto ed accettato il modello a doppia elica del DNA proposto da James Watson e Francis Crick. Questo modello prevedeva che le due eliche di DNA si appaiassero tra loro a formare una doppia elica mediante interazioni deboli (legami ad idrogeno, repulsione elettrostatica dei gruppi fosfato, interazione idrofobica delle basi azotate). Prevedeva inoltre che le due eliche interagissero a livello delle basi azotate, ed in particolare erano possibili solo gli appaiamenti complementari Adenina -- Timina e Citosina -- Guanina. Watson e Crick proposero (in realtà in modo velato e senza portare alcuna dimostrazione) che, dato che gli appaiamenti possibili erano esclusivamente quelli appena citati, ognuna delle due eliche contenesse l'informazione necessaria a costruire l'elica complementare. Questo suggeriva un sistema semplice ed efficiente per replicare il materiale genetico: nel momento della replicazione le due eliche si sarebbero dovute separare ed ognuna di queste sarebbe servita da stampo per l'elica complementare. In tal senso si parla di replicazione semiconservativa dal momento che nelle nuove doppie eliche uno dei due filamenti era presente nella doppia elica originale, l'altro è di nuova sintesi (Figura 1).

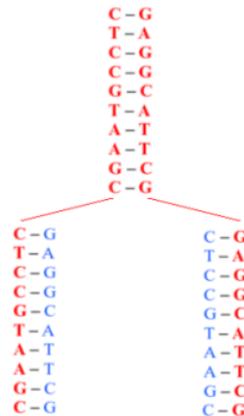


Figura 1. Replicazione semiconservativa.

All'epoca dell'esperimento di Meselson e Stahl, oltre al modello della replicazione semiconservativa erano stati proposti altri due meccanismi: la replicazione conservativa e la replicazione distributiva. La replicazione conservativa prevedeva che a partire da una doppia elica di DNA, in seguito alla replicazione se ne ottenessero due: la prima contenente entrambi i filamenti originari e la seconda contenente due filamenti complementari di nuova sintesi (Figura 2).

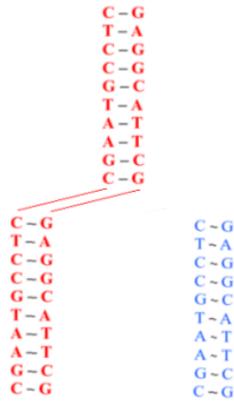


Figura 2. Replicazione conservativa.

Invece la replicazione distributiva poteva essere immaginata come una via di mezzo rispetto a quella semiconservativa e a quella conservativa (Figura 3).

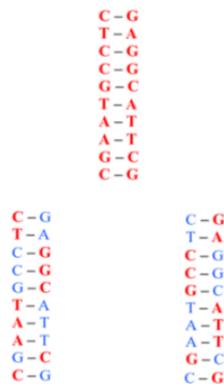


Figura 3. Replicazione distributiva.

Meselson e Stahl fecero crescere dei batteri *Escherichia coli* in un terreno di coltura ricco dell'isotopo pesante ^{15}N . Questi microorganismi metabolizzarono l' ^{15}N che quindi venne ad essere introdotto in molte molecole biologiche; tra queste molecole bisogna ricordare le basi azotate del DNA. In questo modo il DNA presente nei batteri era un "DNA pesante", poiché inglobava atomi di azoto più pesanti della norma. I due scienziati si assicurarono di mantenere i batteri in questo terreno di coltura per un tempo tale da garantire che tutto il DNA fosse effettivamente pesante. Alcuni batteri furono poi prelevati, lisati e, con opportune tecniche di laboratorio, venne estratto il loro DNA. Quest'ultimo venne aggiunto ad una provetta contenente una soluzione concentrata di Cloruro di Cesio (CsCl 6M). La provetta fu poi centrifugata. In queste condizioni nella provetta si è formato un gradiente di densità dal momento che il CsCl tende a concentrarsi verso il fondo della stessa (Figura 4).



Figura 4. Provetta con gradiente di densità di CsCl.

Una volta che si è formato il gradiente di densità, il DNA (ma in generale qualunque molecola nella provetta) migra per fermarsi nella regione della soluzione che ha densità uguale alla sua. Il DNA può essere messo in evidenza in seguito all'introduzione di particolari sostanze che si legano ad esso e divengono visibili se illuminate da luce ultravioletta. Questa particolare tecnica prende il nome di centrifugazione in gradiente di densità e serve a "pesare" il DNA estratto. Ciò che si vide sperimentalmente fu una banda verso il fondo della provetta. A questo punto alcuni batteri furono trasferiti dal primo terreno di coltura in un nuovo terreno standard, in cui cioè era presente ^{14}N anziché ^{15}N . I microorganismi metabolizzarono l'azoto includendolo nelle basi azotate dei nucleotidi che andranno a formare (tra le altre cose) le nuove eliche di DNA. Trascorsi venti minuti, ovvero il tempo necessario per la formazione di una nuova generazione di batteri (ovvero replicazione del DNA), alcuni batteri furono prelevati dal terreno standard, furono lisati e venne estratto il DNA. In seguito ad una centrifugazione in gradiente di densità si ottenne un'unica banda posta in posizione superiore rispetto a quella del caso precedente: il DNA era quindi più leggero. Trascorso il tempo necessario per la successiva replicazione del DNA (altri 20 minuti) venne ripetuta la suddetta procedura. In questo caso si ottennero due bande: la prima in posizione nettamente superiore a quelle ottenute nei casi precedenti, la seconda nella stessa posizione di quella dell'esperimento precedente. A questo punto è stato possibile identificare:

- un DNA "pesante". In cui per forza erano presenti due filamenti ^{15}N .
- un DNA "medio". In cui per forza era presente un filamento ^{15}N e un filamento ^{14}N .
- un DNA "leggero". In cui per forza erano presenti due filamenti ^{14}N .

Alla luce di ciò, l'unico modello in grado di spiegare i pesi delle varie molecole di DNA era quello della replicazione semiconservativa (Figura 5).

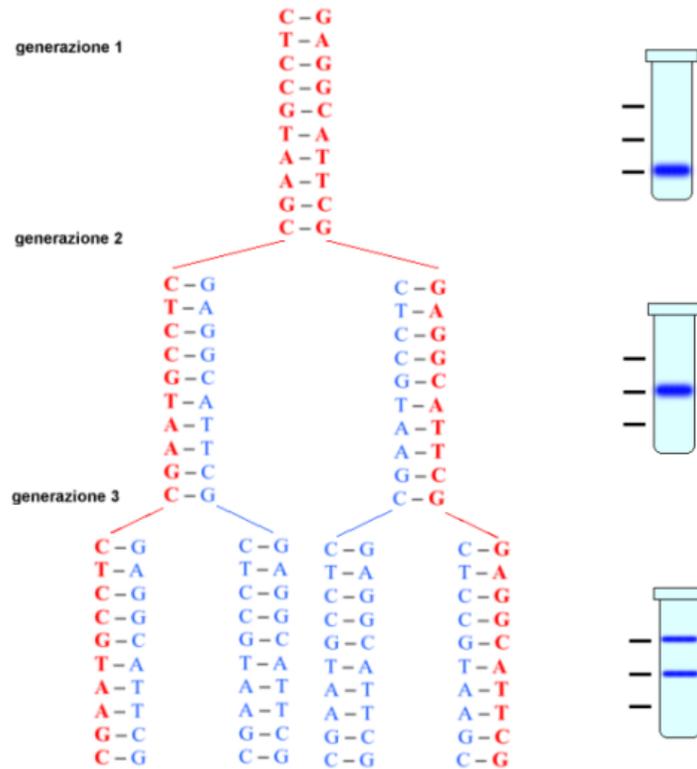


Figura 5. Esperimento di Meselson e Stahl.

Nel caso di replicazione conservativa sarebbe sempre stata visibile la banda della doppia elica $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ (situazione non rispecchiata dai risultati sperimentali), mentre, nel caso della replicazione distributiva nelle generazioni successive alla prima non sarebbe stata presente la banda del DNA $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, cosa che invece i fatti escludono.

L'esperimento di Taylor, Woods e Hughes

Nel 1957, l'anno prima che fosse pubblicato il lavoro di Meselson e collaboratori, J. Herbert Taylor, Philip Woods e Walter Hughes presentarono la prova che la replicazione semiconservativa avviene anche negli organismi eucarioti. Fecero degli esperimenti con gli apici radicali della fava (*Vicia faba*), che sono una fonte eccellente di cellule in divisione. Nella pianta di pisello esistono due regioni dette meristematiche, una dell'apice radicale e una dell'apice vegetativo, dove la riproduzione avviene molto velocemente. Misero la piantina in un'ambiente nutritivo in modo da tenere sotto analisi le regioni attive degli apici. Normalmente una cellula eucariotica durante la duplicazione del proprio DNA acquisisce dall'ambiente intracellulare ed extracellulare i precursori del DNA e li assembla. Il DNA è costituito da due filamenti polinucleotidici avvolti tra loro ad alfa

elica. I precursori della molecola di DNA sono dunque i nucleotidi, in particolare nucleotidi trifosfati che vengono presi dall'ambiente e attaccati alla catena di DNA nascente.

Se mettiamo la cellula a replicarsi in un ambiente ricco di nucleotidi (nutritizio) la cellula acquisisce i nucleotidi durante la fase S del ciclo cellulare per comporre il DNA di neosintesi. Se mettiamo invece una cellula eucariotica in un ambiente nutritizio contenente esclusivamente nucleotidi radioattivi questa userà i nucleotidi trifosfati radioattivi per comporre il DNA di neosintesi, sempre durante la fase S. I tre ricercatori misero la piantina in un ambiente nutritizio contenente timidina radioattiva, per la precisione, timidina triziata: questi nucleotidi dunque contenevano una base azotata (timina) in cui ci fosse l'isotopo ^3H dell'idrogeno (trizio), radioattivo. Ogni qual volta le cellule della piantina acquisivano un nucleotide timidinico dall'ambiente inserivano un atomo radioattivo nella molecola di DNA di neosintesi. Alla fase S segue la fase M di mitosi. Dopo la mitosi (che dura 8 ore circa) da una sola cellula madre si sono formate due cellule figlie: le due cellule figlie contenevano ciascuna una delle due molecole di DNA formate dalla duplicazione della molecola di DNA nativa. Utilizzando un contatore di radioattività e la tecnica dell'autoradiografia i tre ricercatori videro che tutte le cellule figlie possedevano nucleotidi radioattivi. Se la duplicazione fosse stata conservativa, ovvero se da una molecola di DNA si fossero formate per duplicazione una molecola di DNA nativa ed una di DNA di neosintesi, avrebbero avuto 50% di cellule radioattive (con nucleotidi radioattivi) e il 50% di cellule non radioattive. I tre ricercatori misero poi la piantina in un ambiente con nucleotidi normali e la fecero nuovamente riprodurre: ciascuna delle cellule figlie del primo ciclo di duplicazione è andata incontro alla fase S e duplicava il proprio DNA utilizzando stavolta nucleotidi non radioattivi. Alla fase S segue la fase M di mitosi. Dopo la mitosi (che dura 8 ore circa) da ogni cellula si sono formate due cellule figlie. Utilizzando un contatore di radioattività e la tecnica dell'autoradiografia videro che il 50% delle cellule portava solo nucleotidi non radioattivi e il 50% nucleotidi radioattivi. Se la duplicazione fosse stata non conservativa avrebbero avuto radioattività un po' ovunque, in tutte le cellule figlie. Questa esperienza dunque dimostra che la duplicazione è semiconservativa.

