

Jordanka Zlatanova
Kensal E. van Holde

Biologia molecolare

Struttura e dinamica di genomi e proteomi

Edizione italiana a cura di Vito De Pinto



BIOLOGIA

ZANICHELLI

Jordanka Zlatanova
Kensal E. van Holde

Biologia molecolare

Struttura e dinamica di genomi e proteomi

Edizione italiana a cura di Vito De Pinto

Se vuoi accedere alle risorse online riservate

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

Se sei già registrato, per accedere ai contenuti riservati di altri volumi ti serve solo la relativa chiave di attivazione.

Prefazione

Lo studio della biologia a livello molecolare svela i principi fondamentali che si celano dietro alla trasmissione e all'espressione dell'informazione genetica in termini di DNA, RNA e proteine.

Negli ultimi anni, avendo sviluppato numerose ricerche in collaborazione con altri colleghi, ci siamo resi conto che il campo della biologia molecolare ha subito dei profondi cambiamenti, diventando una scienza fortemente incentrata sulle informazioni strutturali. Che si tratti dell'elegante e dinamica struttura del ribosoma, e di come essa spieghi i dettagli della sintesi proteica, o della complessa organizzazione del genoma e della sua trascrizione, la conoscenza delle strutture è diventata la chiave per comprendere i meccanismi molecolari. Per oltre un decennio uno degli autori ha insegnato in un corso di biologia molecolare avanzata, sia in aula che online, e non è riuscito a scovare un testo adeguato. Era necessario un libro di testo con un nuovo approccio alla biologia molecolare.

Il nostro libro spiega la stretta interdipendenza fra la struttura molecolare e le dinamiche della trasmissione e dell'espressione dell'informazione genetica. Nuove tecniche, che spaziano dai metodi a singola molecola al sequenziamento dell'intero genoma, hanno approfondito la comprensione dei processi molecolari e hanno ampliato la nostra visuale sulle loro relazioni. Questi importanti avanzamenti rappresentano un nuovo paradigma e devono essere considerati nel contesto quasi esplosivo che questo campo sta al momento attraversando, uno dei più significativi della scienza moderna. Un importante esempio è il nostro frequente riferimento al progetto ENCODE e alle sue implicazioni. All'altra estremità vi sono invece le numerose immagini di interazioni molecolari ottenute con la crio-microscopia elettronica e con i metodi che studiano le dinamiche delle singole molecole.

Dal punto di vista didattico, la biologia molecolare dipende sempre di più dalle rappresentazioni visuali, e uno dei nostri obiettivi è stato quello di creare una serie di illustrazioni dinamiche e coinvolgenti. Infatti il testo contiene circa 700 figure, che costituiscono una parte sostanziale del volume. Abbiamo pensato di produrre delle legende che le completassero il più possibile, in modo che, combinate con le didascalie, diventassero autonome dal punto di vista del contenuto, inserendo a questo scopo degli esaurienti dettagli.

Il libro può essere adatto sia a studenti che hanno seguito un corso introduttivo di biochimica, sia per coloro che non lo abbiano seguito. Numerose caratteristiche lo rendono di utilizzo flessibile: i primi quattro capitoli introduttivi possono essere affrontati molto rapidamente se ci si trova in presenza di un uditorio avanzato, ma allo stesso tempo forniscono gli elementi essenziali di base per gli studenti la cui formazione nelle scienze biologiche è meno avanzata. Con lo stesso intento, abbiamo organizzato gli argomenti più pratici e di contesto nei Box (per esempio il racconto della storia degli esperimenti cruciali, le tecniche, le conoscenze generali di biologia cellulare e le applicazioni o i risvolti clinici). In questo modo il libro può essere utile al più ampio spettro possibile di studenti, grazie anche ai Box *Uno sguardo da vicino* che contengono un'analisi più approfondita di argomenti necessari per qualsiasi corso. Questi approfondimenti possono essere trascurati nello svolgimento di un corso più rapido e compatto, ma possono essere consultati da chi desidera esplorare più in dettaglio l'argomento. Si è posta una grande attenzione nel fornire informazioni che trattino le tecniche d'avanguardia, come i metodi a singola molecola. Sono stati fatti tutti gli sforzi possibili per consultare e citare i lavori più aggiornati prodotti in ogni area.

Grazie a questi strumenti, il testo offre una copertura del campo della biologia molecolare leggibile ed essenziale. Il libro è così organizzato: si inizia con due capitoli introduttivi, che presentano le idee di base e lo sviluppo dei concetti della biologia molecolare e gli elementi della genetica. Seguono altri due capitoli che entrano nel dettaglio delle macromolecole oggetto di studio: le proteine e gli acidi nucleici. Questi quattro capitoli possono essere utilizzati per un veloce ripasso in un corso avanzato. Il nucleo del libro è costituito dall'analisi dei processi attraverso i quali l'informazione genetica viene espressa, regolata e mantenuta. Viene descritta per prima la trascrizione, poi la traduzione e infine la replicazione. Ogni argomento è trattato in diversi capitoli che coprono gli aspetti strutturali, i meccanismi e la regolazione. Alcuni capitoli di questo nucleo sono dedicati alle tecnologie del DNA ricombinante e alla struttura del genoma. Il libro si chiude con i capitoli sulla ricombinazione genetica e la riparazione del DNA. Infine, una nota dedicata agli studenti: state entrando in una delle aree più dinamiche ed eccitanti della scienza moderna. Divertitevi!

Indice

CAPITOLO 1

Oltre la cellula: il regno della biologia molecolare

1.1 Introduzione

1.2 Il ruolo chiave della microscopia nella biologia

Il microscopio ottico ha portato la prima rivoluzione nella biologia

BOX 1.1 Le radiazioni

BOX 1.2 I regni e i domini dei viventi

La biochimica ha portato alla scoperta dell'importanza delle macromolecole nei vari processi della vita

Il microscopio elettronico: un ulteriore ordine di risoluzione

1.3 La struttura interna di cellule e virus vista al microscopio

1.4 La biologia a livello molecolare: le tecniche ad alta risoluzione

Le tecniche in fluorescenza come primo passo verso l'alta risoluzione

Il microscopio confocale permette la localizzazione della fluorescenza emessa da una particolare sostanza all'interno della cellula

FIONA: la tecnica ultrasensibile più recente nel campo della fluorescenza

FRET: la tecnica che permette di misurare la distanza tra due molecole

La crio-microscopia elettronica per singola molecola è una tecnica nuova e potente

Il microscopio a forza atomica "accarezza" la superficie delle molecole

La diffrazione a raggi X e l'NMR hanno portato alla risoluzione a livello della struttura atomica

1.5 La genetica molecolare: l'altra faccia della biologia molecolare

Concetti chiave

Ulteriori letture

CAPITOLO 2

Dalla genetica classica alla genetica molecolare

2.1 Introduzione

2.2 La genetica classica e le leggi dell'ereditarietà

Gregor Mendel sviluppò le leggi della genetica

BOX 2.1 I due singolari scienziati che definirono le basi della genetica classica

BOX 2.2 Riproduzione sessuale, mitosi e meiosi

Le leggi di Mendel hanno estensioni ed eccezioni
I geni sono disposti linearmente sui cromosomi e possono essere mappati

La natura dei geni e il modo in cui essi possono determinare il fenotipo sono stati a lungo un mistero

BOX 2.3 L'anemia falciforme: la chiave per la genetica molecolare

2.3 Il grande passo avanti verso la genetica molecolare

I batteri e i batteriofagi hanno un comportamento genetico e sono utilizzabili come sistemi modello

La trasformazione e la trasduzione permettono il passaggio dell'informazione genetica

La struttura del DNA di Watson e Crick fornì la chiave finale per l'avvento della genetica molecolare

2.4 Organismi modello

BOX 2.4 Citofluorimetria per la separazione (sorting) e analisi cellulare

Concetti chiave

Ulteriori letture

CAPITOLO 3

Le proteine

3.1 Introduzione

Le proteine sono macromolecole con una grande varietà di dimensioni, strutture e funzioni

Le proteine sono componenti essenziali per la struttura e il funzionamento di tutti gli organismi

3.2 La struttura delle proteine

Gli amminoacidi sono i mattoni per la costruzione delle proteine

Nelle proteine gli amminoacidi sono legati covalentemente e formano polipeptidi

3.3 I livelli di struttura della catena polipeptidica

La struttura primaria di una proteina è una sequenza unica di amminoacidi

BOX 3.1 Svedberg, l'ultracentrifuga e le molecole proteiche giganti

BOX 3.2 Elettroforesi: principi generali

BOX 3.3 Elettroforesi: le tecniche per l'elettroforesi di proteine

BOX 3.4 Metodi immunologici

La struttura secondaria di una proteina è costituita da regioni con ripiegamenti regolari stabilizzati da legami idrogeno

BOX 3.5 Linus Pauling e la struttura delle proteine

Ogni proteina ha una struttura terziaria tridimensionale unica

BOX 3.6 Max Perutz, John Kendrew e la nascita della cristallografia delle proteine

BOX 3.7 Studi di risonanza magnetica nucleare dei biopolimeri

BOX 3.8 L'allosteria

La struttura terziaria della maggior parte delle proteine è divisa in distinti domini strutturali di ripiegamento

1
1
2
2
2
5
6
7
8
9
9
10
10
11
12
12
13
15
15
16
17
17
17
18
18
20
22
24
25

26
27
27
27
27
28
28
29
31
32
33
33
33
33
35
35
36
36
37
37
39
39
40
42
44
45
46
47
48
50
50

5.8 Il sequenziamento di interi genomi	122	Il motivo elica-giro-elica interagisce con il solco maggiore	147
Le librerie genomiche sono insiemi di molecole di DNA ricombinante che contengono l'intero genoma di un organismo	122	Anche il motivo a dita di zinco si inserisce nel solco maggiore	148
Si possono utilizzare due approcci diversi per sequenziare grandi genomi	123	Le cerniere di leucina sono particolarmente adatte per i siti dimerici	148
5.9 La manipolazione del contenuto genico di organismi eucariotici	124	6.3 Le interazioni RNA-proteine	150
La produzione di un topo transgenico richiede numerosi passaggi	124	6.4 Lo studio delle interazioni proteina-acidi nucleici	152
Per inattivare, rimpiazzare o modificare in qualche modo un particolare gene, il vettore deve essere indirizzato verso quel particolare sito con la ricombinazione omologa	125	BOX 6.3 Il saggio di spostamento della banda (band shift)	153
5.10 Le applicazioni pratiche delle tecnologie molecolari ricombinanti	126	BOX 6.4 L'impronta sul DNA (DNA footprinting)	154
Centinaia di composti farmaceutici sono prodotti in batteri ricombinanti	126	BOX 6.5 La curvatura del DNA indotta da proteine	155
BOX 5.5 La produzione di insulina umana ricombinante per uso terapeutico	127	BOX 6.6 Immunoprecipitazione della cromatina	156
BOX 5.6 La diagnosi di HIV si basa su metodi che utilizzano prodotti o procedure ricombinanti	128	Concetti chiave	158
L'ingegnerizzazione industriale delle piante ha risvolti produttivi notevoli ma è molto controversa	128	Ulteriori letture	158
BOX 5.7 Uno sguardo da vicino: Agrobacterium come vettore naturale per l'ingegnerizzazione genetica delle piante	129	CAPITOLO 7	
BOX 5.8 Il riso golden: una soluzione per la carenza nutrizionale di vitamina A e ferro	131	Il codice genetico, i geni e i genomi	159
La terapia genica è una procedura complessa che ha lo scopo di correggere geni difettosi o la funzione di geni responsabili di patologie	132	7.1 Introduzione	159
Trasportare un gene all'interno di una quantità sufficiente di cellule di uno specifico tessuto e garantire la sua espressione a lungo termine è una sfida tecnologico-scientifica molto difficile	133	7.2 I geni come acidi nucleici depositari dell'informazione genetica	159
Grazie al trasferimento nucleare possono essere clonati animali interi	134	Le nostre conoscenze sulla natura dei geni sono in continua evoluzione	159
Concetti chiave	135	Il dogma centrale afferma che l'informazione passa dal DNA alle proteine	161
Ulteriori letture	136	BOX 7.1 Il genio di Francis Crick	162
CAPITOLO 6		Per individuare gli adattatori è stato necessario separare gli RNA cellulari	162
Le interazioni proteine-acidi nucleici	139	L'RNA messaggero, i tRNA e i ribosomi costituiscono la fabbrica delle proteine della cellula	163
6.1 Introduzione	139	7.3 Com'è stata associata la sequenza delle proteine alla sequenza del DNA nel codice genetico	164
BOX 6.1 Legame su filtro	140	Il primo obiettivo è stata la definizione della natura del codice	164
6.2 Le interazioni DNA-proteina	140	BOX 7.2 La decodificazione del codice genetico	165
Il legame DNA-proteina avviene con modalità e meccanismi diversi	140	7.4 Sorprese dalle cellule eucariotiche: introni e splicing	167
BOX 6.2 Cromatografia per affinità al DNA	141	I geni eucariotici sono di norma inframezzati da sequenze non codificanti	167
Il legame sito-specifico è la modalità di legame più utilizzata	142	7.5 I geni visti da una prospettiva nuova e più ampia	168
La maggior parte dei siti di riconoscimento rientra in un numero di classi limitato	143	I geni che codificano le proteine sono complessi	168
La maggior parte dei legami specifici richiede l'inserzione di una proteina in un solco del DNA	145	Il sequenziamento del genoma ha rivoluzionato il concetto di gene	169
Alcune proteine causano la formazione di strutture del DNA ad ansa	146	Le mutazioni, gli pseudogeni e lo splicing alternativo contribuiscono tutti alla diversità genetica	170
Esiste un numero limitato di domini proteici di legame al DNA	147	7.6 Il confronto tra genomi interi e le nuove prospettive sull'evoluzione	172
		Il sequenziamento del genoma rivela aspetti misteriosi dei genomi	172
		BOX 7.3 Uno sguardo da vicino: il cromosoma Y umano e il gene SRY	174
		Come sono distribuite sequenze e funzioni del DNA negli eucarioti?	175

BOX 7.4 I microsattelliti e l'identificazione del DNA (DNA fingerprinting)	176	Aspetti della trascrizione comuni a tutti gli organismi	211
Concetti chiave	177	La trascrizione richiede la partecipazione di molte proteine	212
Ulteriori letture	177		
CAPITOLO 8			
La struttura fisica del genoma			
8.1 Introduzione	179	BOX 9.1 I movimenti molecolari e la seconda legge della termodinamica	213
8.2 I cromosomi di virus e batteri	180	La trascrizione è rapida ma spesso è interrotta da pause	216
I virus sono forniti di genomi minimi	180	La trascrizione può essere visualizzata al microscopio elettronico	217
I cromosomi batterici sono strutture organizzate che si trovano nel citoplasma	181	BOX 9.2 La trascrizione studiata con tecniche a singola molecola	218
Le proteine che piegano il DNA e le proteine che formano ponti nel DNA contribuiscono all'impacchettamento del DNA batterico	182	9.3 Le RNA polimerasi e gli eventi catalitici della trascrizione	220
8.3 La cromatina eucariotica	185	Le RNA polimerasi sono una grande famiglia di enzimi che sintetizzano trascritti di RNA a partire da stampi polinucleotidici	220
I cromosomi eucariotici sono complessi costituiti da DNA e proteine altamente condensati e segregati nel nucleo	185	BOX 9.3 La scoperta della RNA polimerasi	221
Il nucleosoma è l'unità ripetitiva di base della cromatina eucariotica	185	9.4 Il meccanismo della trascrizione nei batteri	223
BOX 8.1 La scoperta della cromatina	186	L'inizio della trascrizione richiede il complesso della polimerasi a subunità multiple, detto oloenzima	223
BOX 8.2 La scoperta della struttura nucleosomale della cromatina	187	La fase d'inizio della trascrizione batterica abortisce di frequente	226
BOX 8.3 Vari metodi per studiare la struttura fisica della cromatina	189	L'allungamento della trascrizione nei batteri deve superare problemi topologici	227
Le varianti non alleliche degli istoni e le modificazioni postsintetiche creano un insieme eterogeneo di nucleosomi	191	Nei batteri ci sono due meccanismi di terminazione della trascrizione	230
La famiglia dei nucleosomi è dinamica	194	La comprensione della trascrizione nei batteri è utile nella pratica clinica	232
In vivo l'assemblaggio dei nucleosomi utilizza gli chaperoni degli istoni	195	BOX 9.4 Gli antibiotici che inibiscono la trascrizione batterica	232
8.4 La struttura di ordine superiore della cromatina	196	Concetti chiave	233
I nucleosomi lungo il DNA formano una fibra di cromatina	196	Ulteriori letture	233
La fibra di cromatina è ripiegata ma la sua struttura rimane controversa	196		
L'organizzazione dei cromosomi nel nucleo in interfase è ancora sconosciuta	199	CAPITOLO 10	
8.5 I cromosomi mitotici	201	La trascrizione negli eucarioti	
I cromosomi si condensano e si separano durante la mitosi	201	10.1 Introduzione	235
Per la formazione e il mantenimento dei cromosomi mitotici sono necessarie alcune proteine specifiche	202	La trascrizione negli eucarioti è un processo complesso e altamente regolato	235
I centromeri e i telomeri sono regioni del cromosoma con funzioni speciali	203	Le cellule eucariotiche contengono diverse RNA polimerasi, ciascuna specifica per distinti gruppi funzionali di geni	236
Esistono diversi modelli della struttura del cromosoma mitotico	206	10.2 La trascrizione operata dalla polimerasi II	237
BOX 8.4 Il cromosoma mitotico: il lavoro di Ulrich Laemmli	207	La struttura della Pol II di lievito fornisce informazioni sui meccanismi della trascrizione	237
Concetti chiave	209	BOX 10.1 La scoperta delle basi molecolari della trascrizione negli eucarioti: la storia della RNA polimerasi II di lievito	238
Ulteriori letture	210	Nel corso dell'evoluzione la struttura della Pol II si è conservata più della sua sequenza	239
		L'aggiunta dei nucleotidi durante l'allungamento della trascrizione avviene ciclicamente	241
		L'inizio della trascrizione dipende da complessi proteici contenenti molte subunità che si assemblano sulla sequenza core del promotore	243
		Per collegare la Pol II alle proteine regolatrici è necessario un complesso aggiuntivo di proteine	246

La terminazione della trascrizione negli eucarioti è associata alla poliadenilazione del trascritto	247		
10.3 La trascrizione effettuata dalla polimerasi I	247		
10.4 La trascrizione effettuata dalla RNA polimerasi III	250		
La RNA polimerasi III è specializzata nella trascrizione di geni piccoli	250		
10.5 La trascrizione negli eucarioti è generalizzata e organizzata spazialmente	251		
La maggior parte del genoma eucariotico è trascritta	251		
BOX 10.2 Che cosa abbiamo imparato sul funzionamento del genoma umano dal progetto ENCODE	252		
La trascrizione negli eucarioti non avviene in modo uniforme nel nucleo	254		
Nel nucleo geni attivi e inattivi sono spazialmente separati	255		
10.6 I metodi per lo studio della trascrizione negli eucarioti	256		
Una vasta gamma di metodiche è disponibile per lo studio della trascrizione	256		
BOX 10.3 I metodi utilizzati per mappare i siti d'inizio della trascrizione	257		
BOX 10.4 I metodi utilizzati per identificare le estremità 5' e 3' dei geni eucariotici	258		
BOX 10.5 L'analisi del trascrittoma di tutto il genoma: mappatura dei trascritti di RNA su scala genomica	260		
Concetti chiave	261		
Ulteriori letture	262		
CAPITOLO 11			
La regolazione della trascrizione nei batteri			
11.1 Introduzione	265		
11.2 Modelli generali di regolazione della trascrizione	266		
La regolazione può avvenire mediante l'uso di promotori di forza differente o di fattori σ alternativi	266		
La regolazione attraverso il legame di un ligando alla polimerasi viene definita controllo stringente	267		
11.3 La regolazione specifica della trascrizione	268		
La regolazione di geni specifici si ottiene mediante interazioni <i>cis-trans</i> con i fattori di trascrizione	268		
I fattori di trascrizione sono attivatori o repressori la cui attività è regolata in molti modi	268		
Diversi fattori di trascrizione possono agire di concerto o in opposizione per attivare o reprimere la trascrizione	269		
11.4 La regolazione trascrizionale di operoni importanti nella fisiologia batterica	271		
L'operone del lattosio <i>lac</i> è controllato da un repressore dissociabile e da un attivatore	271		
BOX 11.1 La scoperta del repressore del lattosio: l'importanza di risultati inaspettati	272		
BOX 11.2 Logotipi (o loghi) di sequenza	276		
Il controllo dell'operone del triptofano (<i>trp</i>) coinvolge sia la repressione che l'attenuazione	276		
La stessa proteina può funzionare sia come attivatore che come repressore: l'operone dell'arabinosio <i>ara</i>	278		
11.5 Le altre modalità di regolazione genica nei batteri	280		
Il superavvolgimento del DNA è coinvolto sia nella regolazione globale che in quella locale della trascrizione	280		
La metilazione del DNA può essere utilizzata per una regolazione specifica	281		
11.6 Il coordinamento dell'espressione genica nei batteri	282		
BOX 11.3 La regolazione della patogenicità batterica dovuta a variazione di fase	283		
I network di fattori di trascrizione costituiscono la base per il coordinamento dell'espressione genica	283		
Concetti chiave	284		
Ulteriori letture	285		
CAPITOLO 12			
La regolazione della trascrizione negli eucarioti			
12.1 Introduzione	287		
12.2 La regolazione dell'inizio della trascrizione: regioni di regolazione e fattori di trascrizione	288		
Il nucleo del promotore e il promotore prossimale sono indispensabili sia per la trascrizione basale che per quella regolata	288		
Enhancer, silenziatori, isolatori e sequenze di controllo del locus sono elementi di regolazione distali	289		
Alcuni fattori di trascrizione eucariotici sono attivatori, altri repressori e altri entrambe le cose, a seconda del contesto	292		
La regolazione può usare componenti alternativi del macchinario di trascrizione basale	294		
Mutazioni nelle regioni di regolazione dei geni e nei componenti dell'apparato di trascrizione provocano malattie nell'uomo	294		
12.3 La regolazione dell'allungamento della trascrizione	295		
La polimerasi può andare in stallo nei pressi del promotore	295		
La velocità di allungamento della trascrizione può essere regolata da fattori di allungamento	296		
12.4 La regolazione della trascrizione e la struttura della cromatina	296		
Che cosa succede ai nucleosomi durante la trascrizione?	296		
12.5 La regolazione della trascrizione dovuta a modificazioni istoniche e a sue varianti	298		

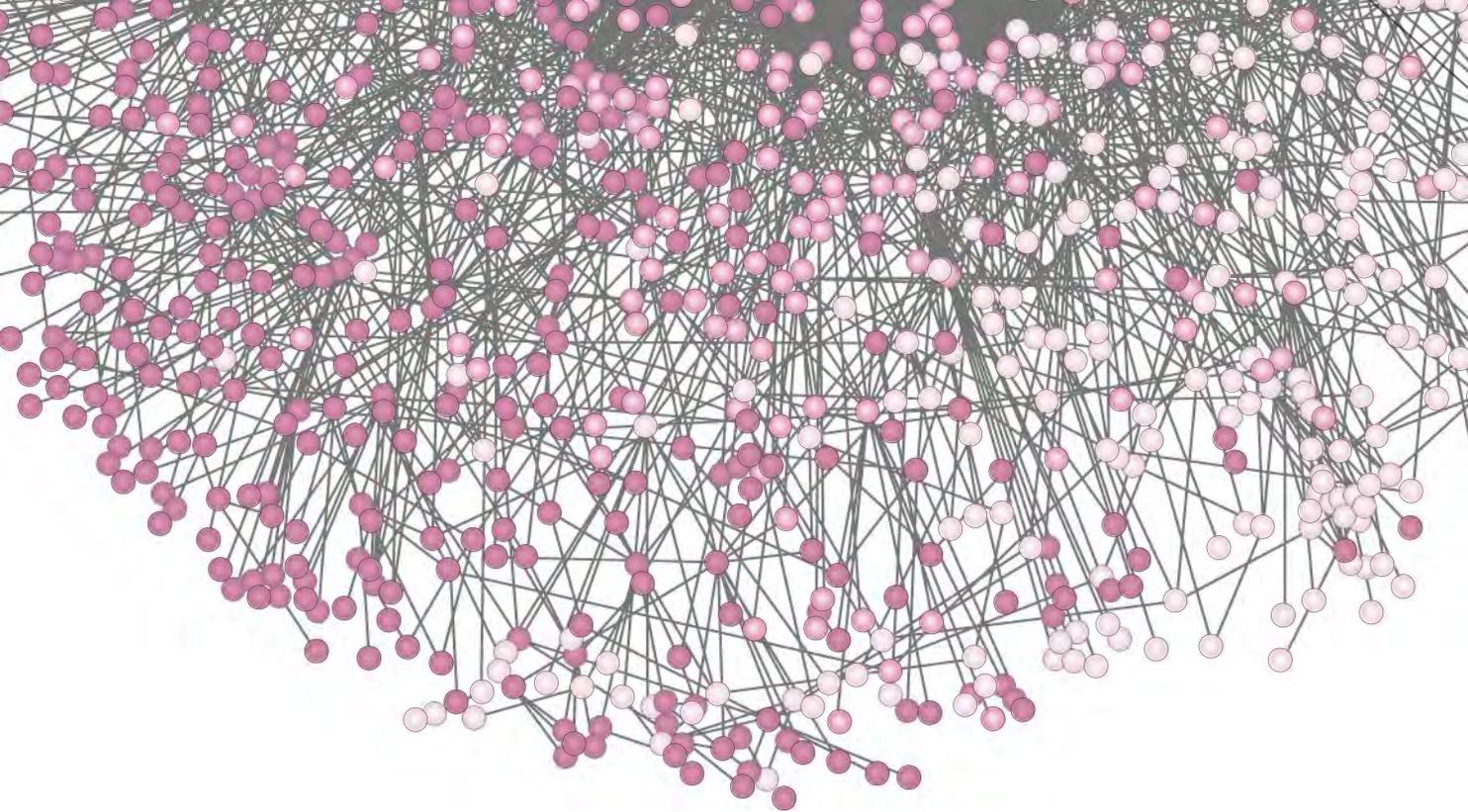
Le modificazioni istoniche permettono il controllo epigenetico della trascrizione	298		
L'espressione genica è spesso regolata da modificazioni post-traduzionali degli istoni	299		
L'effetto delle modificazioni istoniche post-traduzionali richiede il coinvolgimento di molecole proteiche specializzate	299		
Le modificazioni istoniche post-traduzionali distinguono regioni cromatiniche trascrizionalmente attive o inattive	302		
In alcune linee cellulari sono stati scoperti geni silenziati in modo specifico da modificazioni post-traduzionali	303		
I complessi delle proteine polycomb silenziano i geni mediante la trimetilazione di H3K27 e l'ubiquitinazione di H2AK119	304		
La formazione dell'eterocromatina a livello dei telomeri di lievito silenzia i geni mediante la deacetilazione di H4K16	305		
La repressione genica mediata da HP-1 coinvolge la metilazione di H3K9 nella maggioranza degli organismi eucariotici	306		
La poli(ADP)ribosilazione delle proteine è coinvolta nella regolazione trascrizionale	306		
Le varianti istoniche H2A.Z, H3.3 e H2A.Bbd sono presenti nella cromatina attiva	308		
macroH2A è una variante istonica prevalente nella cromatina inattiva	310		
I problemi causati dalla struttura della cromatina possono essere superati dal rimodellamento	310		
I metaboliti endogeni possono fungere da reostati della trascrizione	312		
12.6 La metilazione del DNA	313		
I profili di metilazione del DNA a livello genomico possono partecipare alla regolazione della trascrizione	315		
La carcinogenesi altera il profilo di metilazione delle CpG	316		
La metilazione del DNA varia durante lo sviluppo embrionale	317		
La metilazione del DNA è governata da un complesso macchinario enzimatico	317		
Ci sono proteine che leggono il segnale della metilazione del DNA	318		
BOX 12.1 La proteina MeCP2 (metil-CpG-binding protein 2) e la sindrome di Rett	319		
12.7 Gli RNA lunghi non codificanti nella regolazione della trascrizione	320		
Gli RNA non codificanti svolgono ruoli sorprendenti nella regolazione della trascrizione	320		
Le dimensioni e le localizzazioni genomiche dei trascritti non codificanti sono notevolmente diverse tra loro	322		
12.8 I metodi per misurare l'attività trascrizionale degli elementi di regolazione	322		
BOX 12.2 La misurazione dell'attività degli elementi di regolazione trascrizionale in vivo	323		
Concetti chiave	323		
Ulteriori letture	324		
		CAPITOLO 13	
		La regolazione della trascrizione nel genoma umano	327
		13.1 Introduzione	327
		I metodi di sequenziamento rapido dell'intero genoma permettono di eseguirne l'analisi in profondità	328
		13.2 I concetti base di ENCODE	328
		ENCODE si basa sul sequenziamento massivo ad alta produttività e sull'analisi dei dati con sofisticati algoritmi informatici	328
		Il progetto ENCODE integra dati diversi, rilevanti per la trascrizione del genoma umano	328
		BOX 13.1 Uno sguardo da vicino: FAIRE, una procedura per isolare gli elementi regolatori su tutto il genoma	329
		13.3 Elementi di sequenza di DNA con attività di regolazione	330
		Il profilo trascrizionale è costituito da sette classi di elementi di sequenza di DNA con funzione regolatoria	330
		13.4 Alcune scoperte specifiche sulla struttura della cromatina ottenute da ENCODE	331
		Milioni di siti di ipersensibilità alla DNasi I definiscono le regioni accessibili della cromatina	331
		Le firme, ovvero le aree di sensibilità alla DNasi I a livello dei promotori sono asimmetriche e stereotipate	332
		Il posizionamento dei nucleosomi a livello dei promotori e intorno ai siti di legame dei TF è altamente eterogeneo	334
		La cromatina è eterogenea e asimmetrica anche a livello degli elementi di regolazione e nel corpo dei geni	335
		13.5 Le nuove conoscenze sulla regolazione genica ottenute con ENCODE	337
		Gli elementi di controllo distali sono connessi ai promotori in una rete complessa	337
		BOX 13.2 Uno sguardo da vicino: la tecnologia 5C, una metodologia massiva parallela per mappare le interazioni tra elementi genomici di tutto il genoma	338
		Il legame dei fattori di trascrizione definisce la struttura e la funzione delle regioni di regolazione	340
		BOX 13.3 Uno sguardo da vicino: come si studiano i profili di metilazione su scala genomica?	341
		I fattori di trascrizione interagiscono formando un enorme network	342
		I siti di legame e la struttura dei corrispondenti fattori di trascrizione coevolvono	343
		I profili di metilazione del DNA mostrano una complessa relazione con la trascrizione	345
		13.6 Una panoramica del progetto ENCODE	347
		Che cosa abbiamo imparato dal progetto ENCODE e dove ci sta portando?	347
		I metodi essenziali per gli studi del progetto ENCODE	347
		Concetti chiave	348
		Ulteriori letture	349

CAPITOLO 14		
Il processamento dell'RNA	351	
14.1 Introduzione	351	
La maggior parte delle molecole di RNA subisce un processamento post-trascrizionale	351	
Ci sono quattro categorie generali di processamento	351	
Gli RNA eucariotici sono processati in modo molto più esteso degli RNA batterici	351	
14.2 Il processamento dei tRNA e degli rRNA	352	
Il processamento del tRNA è simile in tutti gli organismi	352	
Tutte e tre le molecole di RNA ribosomiale maturo derivano da un singolo, lungo RNA precursore da cui sono via via liberate	353	
BOX 14.1 I ribozimi	353	
14.3 Il processamento dell'mRNA eucariotico: le modificazioni terminali	355	
Il capping eucariotico degli mRNA avviene cotrascrizionalmente	355	
La poliadenilazione all'estremità 3' svolge diverse funzioni	356	
14.4 Il processamento dell'mRNA eucariotico: la rimozione degli introni o splicing	357	
Il processo di splicing è complesso e richiede molta precisione	357	
Lo splicing è effettuato dagli spliceosomi	358	
Lo splicing può produrre mRNA alternativi	360	
BOX 14.2 Lo splicing alternativo e l'evoluzione	361	
BOX 14.3 Uno sguardo da vicino: alcuni esempi di meccanismi ed esiti dello splicing alternativo	362	
BOX 14.4 Collegamenti tra splicing alternativo e cancro	363	
Il chimerismo in tandem unisce esoni di geni differenti	365	
Il trans-splicing combina esoni che si trovano in due filamenti complementari di DNA	366	
14.5 La regolazione dello splicing e dello splicing alternativo	366	
I siti di splicing differiscono nella loro propensione al processo	366	
L'architettura esone-introne influenza l'utilizzazione del sito di splicing	366	
Le interazioni cis-trans possono stimolare o inibire lo splicing	367	
BOX 14.5 Stress cellulare, splicing dell'RNA e ruolo delle modificazioni post-traduzionali delle proteine SR	369	
La struttura secondaria dell'mRNA può regolare lo splicing alternativo	369	
Talvolta la regolazione dello splicing alternativo non richiede regolatori ausiliari	370	
La velocità di trascrizione e la struttura della cromatina possono contribuire alla regolazione dello splicing	370	
14.6 Autosplicing: introni e ribozimi	371	
Una parte degli introni viene escissa tramite autosplicing dell'RNA	371	
Ci sono due classi di introni autocatalitici	372	
14.7 Una visione d'insieme: la storia di una molecola di mRNA	373	
La trasformazione del trascritto primario in un mRNA funzionale richiede un certo numero di fasi	373	
L'mRNA è trasportato dal nucleo nel citoplasma attraverso i complessi del poro nucleare	374	
BOX 14.6 I complessi dei pori nucleari	375	
La sequenza dell'RNA può subire editing enzimatico anche dopo la trascrizione	377	
14.8 Il controllo di qualità dell'RNA e la sua degradazione	378	
Batteri, archea ed eucarioti dispongono di meccanismi per il controllo di qualità dell'RNA	378	
Gli archea e gli eucarioti utilizzano specifiche vie per correggere i differenti errori degli RNA	380	
14.9 La biogenesi e le funzioni dei piccoli RNA silenziatori	380	
Tutti gli ssRNA derivano dal processamento di precursori più lunghi	380	
Concetti chiave	383	
Ulteriori letture	385	
CAPITOLO 15		
La traduzione: i protagonisti	387	
15.1 Introduzione	387	
15.2 Una visione d'insieme della traduzione	387	
Sono necessari tre diversi partecipanti per effettuare la traduzione	387	
15.3 L'RNA transfer (o di trasferimento o adattatore)	389	
Le molecole di tRNA si ripiegano in una struttura con quattro bracci, simile a un trifoglio	389	
BOX 15.1 L'RNA Tie Club e l'ipotesi dell'adattatore	390	
I tRNA vengono amminoacilati da un gruppo di enzimi specifici chiamati amminoacil-tRNA sintetasi	392	
L'amminoacilazione del tRNA è un processo in due passaggi	392	
Il controllo di qualità, o correzione delle bozze, durante la reazione di amminoacilazione	395	
BOX 15.2 Il meccanismo del doppio setaccio per la correzione delle bozze effettuata dalle amminoacil-tRNA sintetasi: una storia in continua evoluzione	395	
L'inserimento di amminoacidi non canonici nella catena polipeptidica è guidato dai codoni di stop	398	
BOX 15.3 Uno sguardo da vicino: l'attività di correzione di bozze dell'amminoacil-tRNA sintetasi, la fedeltà della traduzione e le patologie umane	399	
BOX 15.4 L'introduzione di amminoacidi non naturali nelle proteine: l'espansione del codice genetico	400	
15.4 L'RNA messaggero	401	
La sequenza di Shine-Dalgarno dell'mRNA batterico allinea il messaggero al ribosoma	402	
Gli mRNA eucariotici non hanno le sequenze Shine-Dalgarno ma regioni 5' e 3' non tradotte più complesse	402	

L'efficienza della traduzione dipende, nel complesso, da diversi fattori	403	Le strutture dei fattori di allungamento batterici forniscono informazioni utili per la comprensione dei meccanismi	431
15.5 I ribosomi	404	Nel ribosoma c'è un tunnel di uscita per la catena polipeptidica	432
BOX 15.5 La lunga storia del ribosoma	404	Negli eucarioti la fase di allungamento della traduzione coinvolge ancora più fattori	433
Il ribosoma è una struttura a due subunità costituita da rRNA e numerose proteine ribosomiali	405	16.6 La terminazione della traduzione	433
I ribosomi funzionali richiedono la presenza di entrambe le subunità, con l'aggiunta di specifiche molecole di RNA e di proteine	406	RF3 contribuisce a rimuovere RF1 e RF2	434
La subunità minore può legare l'mRNA ma deve associarsi a quella maggiore affinché avvenga la sintesi proteica	407	Alla fine della traduzione i ribosomi vengono riciclati	434
L'assemblaggio del ribosoma è stato studiato sia <i>in vivo</i> che <i>in vitro</i>	408	La ricostruzione della sintesi proteica è in continua evoluzione	436
Concetti chiave	411	Concetti chiave	437
Ulteriori letture	412	Ulteriori letture	438
CAPITOLO 16			
La traduzione: il processo	413	CAPITOLO 17	
16.1 Introduzione	413	La regolazione della traduzione	439
16.2 Una panoramica della traduzione: quanto è veloce e accurata?	413	17.1 Introduzione	439
BOX 16.1 I fattori di inizio e di allungamento della traduzione sono potenziali oncoproteine	414	17.2 La regolazione della traduzione tramite il controllo del numero dei ribosomi	439
16.3 Metodologie avanzate per l'analisi della traduzione	415	Il numero dei ribosomi nei batteri varia in risposta ai segnali ambientali	439
La crio-EM consente la visualizzazione di stati cinetici discreti dei ribosomi	416	Nei batteri la sintesi delle componenti ribosomiali è coordinata	440
BOX 16.2 La funzione del ribosoma e gli antibiotici	417	Negli eucarioti la regolazione della sintesi delle proteine ribosomiali coinvolge la struttura della cromatina	441
La cristallografia a raggi X fornisce dati alla risoluzione più alta	418	BOX 17.1 I legami crociati psoralenici e la struttura cromatinica dell'rDNA	442
Il trasferimento di energia per risonanza a singola coppia permette gli studi di dinamica a livello delle singole particelle	418	BOX 17.2 La metilazione del dinucleotide CpG nelle regioni dei promotori dei geni degli rRNA: il suo collegamento con la trascrizione	443
16.4 L'inizio della traduzione	419	17.3 La regolazione dell'inizio della traduzione	444
L'inizio della traduzione prende il via dalla subunità ribosomiale minore libera	419	La regolazione dell'inizio della traduzione è ubiquitaria e varia notevolmente	444
La crio-EM ha fornito i dettagli dei complessi d'inizio	420	La regolazione potrebbe dipendere da fattori proteici che legano le estremità 3' o 5' dell'mRNA	444
La selezione del sito d'inizio negli eucarioti è un processo complesso	421	La regolazione dipendente dal Cap è la modalità di controllo della fase d'inizio più utilizzata	445
BOX 16.3 Toeprinting: l'inibizione dell'estensione del primer da parte del complesso ribosoma-mRNA	424	L'inizio può utilizzare siti di ingresso interni ai ribosomi	446
16.5 La fase di allungamento nella traduzione	424	Negli eucarioti le interazioni 5'-3'-UTR costituiscono un nuovo meccanismo per regolare la fase d'inizio	448
La decodifica è il processo con cui il codone si appaia all'anticodone dell'amminoacil-tRNA corrispondente	424	I riboswitch sono elementi di sequenza dell'RNA che regolano la fase di inizio in risposta a determinati stimoli	448
L'accomodazione indica un rilassamento del tRNA distorto per permettere la formazione del legame peptidico	426	I microRNA possono legarsi all'mRNA e in tal modo regolare la traduzione	451
La formazione del legame peptidico è accelerata dal ribosoma	426	BOX 17.3 MicroRNA e diabete	454
La formazione degli stati ibridi è parte essenziale della traslocazione	429	17.4 La stabilità e la degradazione degli mRNA negli eucarioti	456
BOX 16.4 Uno sguardo da vicino: studi dettagliati della fase di allungamento, il meccanismo browniano a scatto	430	Le due vie principali di degradazione degli mRNA non difettosi iniziano con la deadenilazione	456
		La via di degradazione 5'→3' è iniziata dalla rimozione del Cap da parte dell'enzima Dcp2	457

La via di degradazione 3'→5' usa l'esosoma, seguito da differenti enzimi per il taglio del Cap, DcpS	458	La proteolisi controllata viene anche utilizzata per distruggere proteine non più necessarie	483
Ulteriori vie per la degradazione dell'mRNA	458	BOX 18.2 L'apoptosi: prospettive fisiologiche, cellulari e molecolari	483
BOX 17.4 Le proteine Sm e le loro simili: la connessione con il lupus eritematoso sistemico	459	18.5 Le modificazioni chimiche post-traduzionali delle catene laterali degli amminoacidi	486
BOX 17.5 Uno sguardo da vicino: l'eliminazione del Cap, il ritardo mentale legato al cromosoma X e l'atrofia muscolare spinale	460	La modificazione delle catene laterali può influenzare la struttura e la funzione proteica	486
Gli mRNA non utilizzati sono sequestrati nei corpuscoli P e nei granuli da stress	461	La fosforilazione svolge un ruolo centrale nella segnalazione	487
Le cellule utilizzano molti meccanismi per distruggere le molecole di mRNA difettose	462	BOX 18.3 La scoperta della fosforilazione delle proteine e delle cascate di fosforilazione: il lavoro di Edmond Fischer e di Edwin Krebs	487
Le molecole di mRNA che contengono codoni di stop prematuri sono degradate con la degradazione mediata da codoni non senso o NMD (<i>nonsense-mediated decay</i>)	463	L'acetilazione modifica in particolare le interazioni tra le macromolecole	489
La degradazione NGD (<i>no-go decay</i>) avviene quando il ribosoma si arresta durante la fase di allungamento	463	Varie classi di proteine glicosilate contengono zuccheri aggiunti	490
La degradazione dipendente dall'assenza del codone di stop o NSD (<i>non-stop decay</i>) avviene quando l'mRNA non contiene un codone di stop	463	I meccanismi della glicosilazione dipendono dal tipo di modificazione	492
17.5 I meccanismi della traduzione	464	BOX 18.4 La glicosilazione delle proteine, i gruppi sanguigni e le trasfusioni di sangue	493
Concetti chiave	465	L'ubiquitinazione attacca una o più molecole di ubiquitina alle proteine grazie a una cascata enzimatica	494
Ulteriori letture	465	BOX 18.5 La scoperta del sistema ubiquitina-proteasoma	494
CAPITOLO 18		La specificità della marcatura con ubiquitina è dovuta a una peculiare classe di enzimi	496
Il processamento e le modificazioni post-traduzionali delle proteine		BOX 18.6 Uno sguardo da vicino: le ligasi E3 e le patologie umane	498
18.1 Introduzione	467	La struttura dei coniugati proteina-ubiquitina determina il ruolo biologico della modificazione	501
18.2 La struttura delle membrane biologiche	468	La poliubiquitina marca le proteine per la degradazione da parte del proteasoma	501
Le membrane biologiche sono doppi strati lipidici ricchi di proteine	468	La sumoilazione aggiunge molecole singole o multiple di SUMO alle proteine	503
Numerose proteine sono associate alle biomembrane	469	18.6 L'origine genomica delle proteine	505
18.3 Il trasporto delle proteine attraverso le membrane biologiche	470	Concetti chiave	505
Il trasporto delle proteine può avvenire durante o dopo la traduzione	470	Ulteriori letture	506
Nei batteri e negli archea la traslocazione attraverso la membrana avviene principalmente tramite secrezione	472	CAPITOLO 19	
Negli eucarioti la traslocazione attraverso le membrane viene utilizzata per molteplici funzioni	472	La replicazione del DNA nei batteri	
BOX 18.1 Uno sguardo da vicino: il complesso di Golgi, un enigma ancora aperto	473	19.1 Introduzione	507
Le proteine integrali di membrana usano dei meccanismi particolari per l'inserzione nella membrana	476	19.2 Le caratteristiche della replicazione del DNA condivise da tutti gli organismi	507
Le vescicole trasportano le proteine tra i compartimenti delle cellule eucariotiche	477	La replicazione su entrambi i filamenti crea una forca di replicazione	507
18.4 Il processamento proteolitico delle proteine: taglio, splicing e degradazione	479	BOX 19.1 L'esperimento di Meselson-Stahl	508
In alcuni casi viene usato un taglio proteolitico per produrre le proteine mature a partire dai precursori	479	Il meccanismo della sintesi delle nuove catene di DNA richiede uno stampo, una polimerasi e un primer	509
Alcune proteasi possono catalizzare lo splicing delle proteine	480	La replicazione del DNA richiede l'azione simultanea di due DNA polimerasi	510
		BOX 19.2 I frammenti di Okazaki e la replicazione del DNA	510
		Per il funzionamento della forca di replicazione sono necessarie proteine aggiuntive	511
		19.3 La replicazione del DNA nei batteri	512

La riduzione delle estremità avviene grazie al complesso RecBCD	577	22.2 I tipi di lesione del DNA	613
Sia l'invasione del filamento che lo scambio del filamento dipendono da RecA	578	Agenti naturali, sia interni che esterni alla cellula, possono modificare l'informazione contenuta nel DNA	613
Ci sono molti aspetti della ricombinazione omologa non ancora compresi	579	BOX 22.2 I difetti nei meccanismi di risposta ai danni al DNA contribuiscono all'invecchiamento?	614
BOX 21.2 L'organizzazione di livello superiore del nucleo in interfase: può essere d'aiuto a trovare un ago nel pagliaio?	580	22.3 Le vie e i meccanismi di riparazione del DNA	615
Le giunzioni di Holliday sono le strutture intermedie della ricombinazione omologa	583	Numerosi meccanismi di riparazione contrastano le lesioni al DNA	615
BOX 21.3 Che cos'è la giunzione di Holliday e come avviene la sua risoluzione?	583	I dimeri di timina sono riparati direttamente dalla DNA fotoliasi	617
21.4 La ricombinazione omologa negli eucarioti	585	L'enzima O ⁶ -alchilguanina alchiltransferasi è coinvolto nella riparazione delle basi alchilate	618
Le proteine eucariotiche coinvolte nella ricombinazione ricordano le controparti batteriche	585	La riparazione per escissione del nucleotide è attiva sulle lesioni che distorcono l'elica	619
Il malfunzionamento della ricombinazione omologa è collegato a molte patologie umane	588	La riparazione per escissione della base corregge le basi danneggiate	622
BOX 21.4 L'emofilia A e la ricombinazione genetica	588	La riparazione del mismatch corregge gli errori dell'accoppiamento delle basi	623
La ricombinazione meiotica permette lo scambio di informazioni genetiche fra i cromosomi omologhi in meiosi	590	Nei batteri la riparazione del mismatch diretta dalla metilazione utilizza come guida la metilazione delle adenine	623
21.5 La ricombinazione non omologa	593	Negli eucarioti le vie di riparazione del mismatch possono essere guidate dalle rotture del filamento durante la replicazione del DNA	625
Gli elementi trasponibili o trasposoni sono sequenze mobili di DNA che cambiano posizione nel genoma	593	La riparazione delle rotture a doppio filamento può essere priva di errore o soggetta a errore	626
BOX 21.5 Barbara McClintock e i geni saltatori	594	La ricombinazione omologa ripara fedelmente le rotture del doppio filamento	628
Molti trasposoni sono trascritti ma soltanto alcuni di essi hanno funzioni conosciute	595	BOX 22.3 Uno sguardo da vicino: le mutazioni nei geni del complesso MRE11-RAD50-NBS1 sono associate a malattie genetiche	628
Esistono vari tipi di trasposoni	596	La giunzione delle estremità a doppio filamento non omologhe, NHEJ, ripristina l'integrità della doppia elica del DNA con un processo soggetto a errore	630
I trasposoni a DNA di classe II possono usare due meccanismi alternativi per trasporre	599	22.4 La sintesi translesione	633
I retrotrasposoni, o trasposoni di classe I, richiedono un intermedio a RNA	600	Molte vie di riparazione utilizzano le elicasi RecQ	636
21.6 La ricombinazione sito-specifica	601	BOX 22.4 Le elicasi RecQ, la riparazione del DNA e le patologie umane	637
Il batteriofago λ si integra nel genoma batterico mediante la ricombinazione sito-specifica	601	BOX 22.5 Le patologie umane dovute a mutazioni nella elicasi RecQ	639
Anche il riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline avviene grazie a eventi di ricombinazione sito-specifica	603	22.5 La cromatina svolge un ruolo attivo nella riparazione del DNA	639
BOX 21.6 Uno sguardo da vicino: le immunoglobuline e gli anticorpi policlonali e monoclonali	603	Alcune varianti istoniche e le loro modificazioni post-traduzionali sono coinvolte in modo specifico nella riparazione del DNA	640
BOX 21.7 Uno sguardo da vicino: le variazioni antigeniche nei parassiti e la malattia del sonno nell'uomo	607	BOX 22.6 Il monitoraggio dei foci γH2A.X nella pratica clinica	644
Concetti chiave	608	22.6 Il ruolo della riparazione del DNA nella vita: una panoramica	644
Ulteriori letture	609	Concetti chiave	645
CAPITOLO 22		Ulteriori letture	646
La riparazione del DNA	611	Indice analitico	647
22.1 Introduzione	611		
BOX 22.1 Una breve storia dei primi studi della riparazione del DNA	612		



CAPITOLO 1

Oltre la cellula: il regno della biologia molecolare

1.1 Introduzione

Ogni scienza ha il suo obiettivo. Così come l'astronomia cerca di capire l'universo su larga scala, la biologia è la scienza che studia le strutture più microscopiche degli esseri viventi (Tabella 1.1). I primi biologi, per necessità, dipendevano da quello che poteva essere visto dall'occhio umano, che quindi era acquisito come dato. Per questo, inizialmente, i biologi studiavano animali e vegetali nella loro totalità: la loro crescita, il loro comportamento, e la loro anatomia macroscopica. Ciò nonostante, gli scienziati nell'antichità erano influenzati da superstizioni, fantasie, mostri immaginari e surreali strutture interne. Leonardo Da Vinci fu il primo ad affrontare lo studio dell'anatomia umana e animale in maniera scientifica. Nel 1487 Leonardo iniziò i suoi studi combinando il suo talento artistico con l'accurata osservazione delle dissezioni anatomiche che lo portò a produrre dati che non avevano pari all'epoca. Un sostanziale progresso nel campo della biologia si è avuto con il risascimento scientifico del XVII secolo, con gli studi di William Harvey sulla circolazione sanguigna, nel 1628.

In questo capitolo seguiremo lo sviluppo delle tecniche più sofisticate che hanno permesso di studiare la struttura degli esseri viventi sempre più nel dettaglio e di comprendere i processi alla base della vita e delle strutture cellulari che li sostengono. Attualmente quest'obiettivo è stato raggiunto, in ampia misura, anche a livello molecolare; possiamo dire che le strutture più fini alla base della vita sono ora accessibili. Faremo riferimento alle informazioni derivate da questi metodi nei vari capitoli che seguiranno.

Tabella 1.1 I metodi di studio della biologia su scale diverse

Strumento	Limite di risoluzione approssimativo	Entità biologica osservabile
Occhio umano	0,3 mm	Acaro
Microscopio ottico	0,3 μm	Batteri; cellule eucariotiche; alcuni organelli
Microscopio elettronico	0,3 nm	Macromolecole; struttura degli organelli; virus
Microscopio a forza atomica	0,3-1 nm	Macromolecole; struttura degli organelli; virus
Raggi X o risonanza magnetica nucleare	0,1 nm	Piccole molecole; gruppi atomici presenti nelle macromolecole

1.2 Il ruolo chiave della microscopia nella biologia

Il microscopio ottico ha portato la prima rivoluzione nella biologia

La prima grande rivoluzione nella biologia è avvenuta negli ultimi anni del XVII secolo quando Antonie van Leeuwenhoek inventò il microscopio ottico. Questo aumentò di più di mille volte la capacità visiva dell'occhio umano, rivelando così l'esistenza di un insospettabile mondo di microorganismi, come i **batteri** e i protozoi, e permise inoltre di scoprire la natura multicellulare degli organismi animali o metazoi (vedi la Tabella 1.1). Tuttavia, anche il microscopio ottico ha i suoi limiti: i dettagli di dimensioni inferiori alla metà della lunghezza d'onda della luce utilizzata non possono essere rilevati a causa della diffrazione o delle interferenze delle onde a distanze così piccole. La luce visibile ha lunghezze d'onda di 0,4-0,7 micrometri o μm (**Box 1.1**); que-

BOX 1.1 Le radiazioni

In diverse parti di questo libro saranno menzionate le radiazioni elettromagnetiche, sotto vari punti di vista. In questo primo capitolo, per esempio, ci concentreremo sull'utilizzo di varie radiazioni per lo studio della struttura della materia vivente; in seguito discuteremo i danni che alcune radiazioni possono produrre in tessuti, cellule e molecole.

Probabilmente sarete a conoscenza, fin dai primi studi, che la natura delle radiazioni è duplice: onde e particelle. La meccanica quantistica mostra come le radiazioni elettromagnetiche possano essere considerate sia come flussi di particelle, chiamate fotoni, sia come onde elettromagnetiche. L'energia di un fotone è correlata alla frequenza dell'onda, ν , dalla seguente equazione:

$$E = h\nu$$

dove h è la costante di Planck, $6,6 \times 10^{-34}$ J·s, ed E ha come unità di misura il joule (J). Generalmente siamo più abituati a sentir parlare di lunghezza d'onda λ , lambda, anziché di frequenza. Poiché $\nu = c/\lambda$, dove c è la velocità della luce, abbiamo che:

$$E = hc/\lambda$$

Questo ci dice che la lunghezza d'onda è inversamente proporzionale all'energia trasportata dai fotoni: maggiore è la lunghezza d'onda, minore è l'energia trasportata. Possiamo quindi guardare all'intero spettro elettromagnetico (**Figura 1**) da questo punto di vista.

La prima cosa che si rileva è che la regione del visibile, la parte visibile a occhio nudo, è solo una piccolissima finestra dell'intero spettro. Notate che la lunghezza d'onda è riportata in scala logaritmica; le radiazioni elettromagnetiche possono quindi avere lunghezze d'onda anche di vari ordini di grandezza inferiori o superiori a quelle che possiamo vedere a occhio nudo. Fino a qualche centinaio di anni fa gli scienziati erano limitati da questa ristretta visione del mondo. Inoltre, fino a poco tempo fa, si credeva che vi fosse un limite intrinseco nella risoluzione di ogni rilevatore di radiazioni. La risoluzione è definita come la capacità di percepire distintamente due oggetti molto vicini, e, fino a tempi recenti, si riteneva fosse limitata a un valore di circa la metà della lunghezza d'onda della radiazione utilizzata. Su questa base, la miglior risoluzione che poteva essere ottenuta da un microscopio che agisce nello spettro del visibile poteva essere al massimo di 200 nm. Per tale motivo, lo studio delle strutture più piccole degli esseri viventi richiedeva necessariamente l'utilizzo di radiazioni a lunghezze d'onda minori, come i raggi X. Recentemente sono state introdotte metodologie capaci di aggirare questi limiti e la microscopia è rinata.

Una seconda e fondamentale caratteristica delle radiazioni è la variazione dell'energia dei fotoni al variare della lunghezza d'onda. Questo comporta che, qualunque effetto le onde/particelle elettromagnetiche possano produrre sulla materia, compresi gli esseri viventi, può variare enormemente a seconda della zona dello

(continua)

BOX 1.1 (continua)

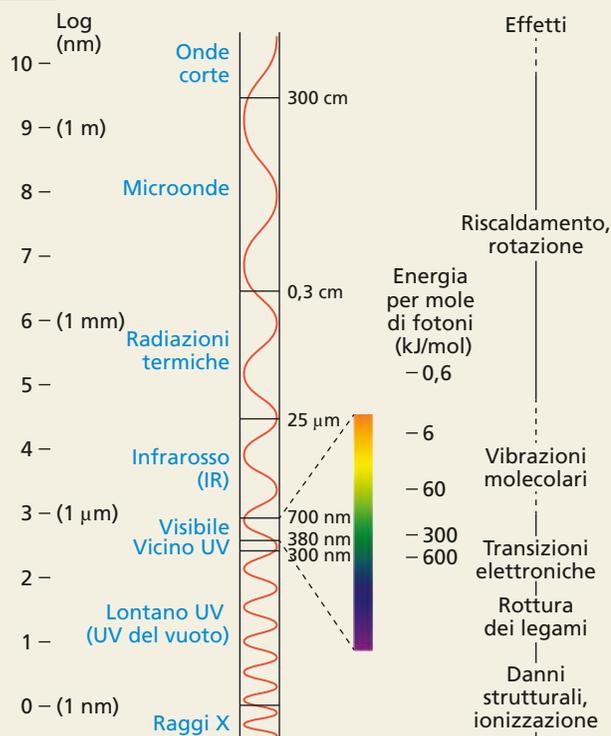


Figura 1 L'intervallo delle radiazioni elettromagnetiche di interesse per chimici e biologi. Lo spettro è riportato in scala logaritmica e si estende anche a lunghezze d'onda maggiori e minori di quelle riportate. I limiti tra le varie regioni sono arbitrari, a eccezione della regione del visibile che viene definita dalla capacità visiva degli occhi umani.

spettro di cui fanno parte. Per cercare di chiarire questo concetto, la **Figura 1** mostra l'energia posseduta da una mole di fotoni, $6,02 \times 10^{23}$ fotoni, al variare della lunghezza d'onda. Non a caso la quantità è indicata in mole, poiché il valore molare la rende paragonabile a molti altri processi molecolari: per esempio l'energia necessaria alla rottura di determinati legami chimici è definita in kilojoule per mole.

Tali comparazioni suggeriscono osservazioni interessanti: per esempio possiamo ben capire che gli occhi umani si sono evoluti per usare solo una minima parte dello spettro elettromagnetico, che però presenta i maggiori vantaggi per i meccanismi della vista. Infatti, l'energia posseduta dai fotoni nella regione del visibile è appena sufficiente a innescare i cambiamenti chimici necessari a indurre un segnale nervoso. Radiazioni con

lunghezze d'onda inferiori sarebbero associate a fotoni con maggiore energia che potrebbero provocare cambiamenti chimici molto più dannosi. Per capirlo, è sufficiente comparare i valori dell'energia dei fotoni nello spettro del visibile, riportati nella **Figura 1**, con l'energia necessaria a rompere un legame chimico, che generalmente si aggira sui 300-600 kJ/mol. Fortunatamente l'atmosfera ci protegge dagli effetti delle radiazioni del lontano ultravioletto (Far-UV), le più dannose. Il fenomeno dell'assorbimento atmosferico delle radiazioni di lunghezza d'onda inferiore, più bassa delle radiazioni nel visibile, ha portato a definire queste radiazioni tra 100 e 200 nm con il nome di "UV del vuoto".

L'esposizione alle radiazioni del vicino UV e dell'UV del vuoto o ancor di più ai raggi X e alle radiazioni cosmiche (tutte radiazioni con lunghezza d'onda più corta) può provocare serie modificazioni chimiche nella materia vivente. Per esempio, l'esposizione alle radiazioni UV può provocare bruciate alla pelle o ancor peggio danneggiare il DNA, provocando tumori cutanei; tuttavia, tali radiazioni non possono penetrare in profondità nell'organismo, quindi non possono provocare alterazioni alle cellule degli organi interni. Al contrario, i raggi X o le radiazioni a lunghezze d'onda ancora inferiori possono penetrare nell'organismo e produrre anche gravi lesioni, principalmente di due tipi: a) modificazioni dirette, per l'azione diretta delle radiazioni su DNA e proteine; b) modificazioni indirette, che sono le più frequenti, per l'azione dei radicali liberi che derivano dalla rottura di legami chimici di molecole come l'acqua. Grazie alla capacità di interagire e rompere i legami chimici, portando alla formazione di ioni, queste radiazioni sono denominate radiazioni ionizzanti.

Così come la diminuzione delle lunghezze d'onda è correlata a un aumento dell'energia dei fotoni, allo stesso modo l'aumento della lunghezza d'onda porta con sé una diminuzione dell'energia dei fotoni. In particolare, le radiazioni infrarosse riescono soltanto a eccitare gli elettroni e provocare vibrazioni intramolecolari. Aumentando ulteriormente la lunghezza d'onda nello spettro troviamo le microonde, che sono capaci di promuovere il movimento delle molecole, con un conseguente aumento di calore. Infine, passiamo alle onde radio, le quali possiedono un'energia così bassa che interagiscono poco con la materia, a eccezione degli apparecchi di ricezione (antenne). La loro bassa energia fa sì che la radio che ascoltiamo possa funzionare, infatti, le onde radio riescono a passare attraverso montagne, palazzi e oggetti senza essere assorbite e senza subire variazioni significative.

sto significa che il potere di risoluzione di un microscopio ottico, cioè la distanza minima a cui due oggetti possono essere rilevati come entità diverse, è di circa 0,3 μm; quindi due oggetti che si trovano a una distanza inferiore a tale valore non possono essere distinti. Il limite di risoluzione può essere ampliato sfruttando l'emissione di luce da parte di particelle utilizzando la **fluorescenza** oppure il light scattering, che si basa sulla capacità della luce di disperdersi quando colpisce una particella. Con queste tecniche anche le strutture di dimensioni minori possono essere mostrate come punti luminosi, senza però poterne rilevare i dettagli interni.

Il microscopio ottico è riuscito, tuttavia, a rivelare che alcuni tipi di cellule, che derivano da animali, piante, funghi e anche protozoi, presentano una

Tabella 1.2 I principali organelli cellulari

Organello	Dove si trova	Funzioni
Nucleo	Tutti gli eucarioti	Deposito del DNA; magazzino di tutte le informazioni cellulari; espressione genica attraverso la trascrizione e il processamento dell'RNA
Mitocondrio	La maggior parte degli eucarioti	Generatori di energia per le cellule (mediante produzione di ATP) attraverso processi di metabolismo ossidativo
Cloroplasto	Piante, alghe eucariotiche	Fotosintesi; produzione di ATP e fissazione del carbonio attraverso l'energia solare
Perossisoma	La maggior parte degli eucarioti	Sede di reazioni ossidative; produzione di calore
Reticolo endoplasmatico	La maggior parte degli eucarioti	Varie funzioni, principalmente modificazioni di proteine di nuova sintesi
Apparato del Golgi	La maggior parte degli eucarioti	Smistamento di proteine e lipidi destinati a specifiche collocazioni cellulari

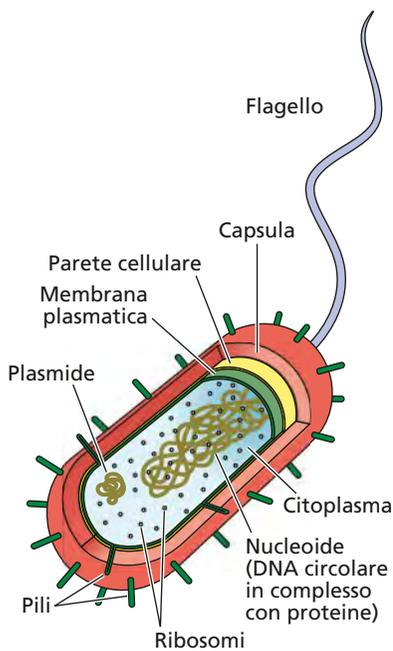


Figura 1.1 La struttura di una cellula batterica. Tra gli elementi che costituiscono una cellula batterica, troviamo: i pili, composti da proteine; il plasmide, costituito da lipidi, proteine e acidi nucleici; i ribosomi, composti da acidi nucleici e proteine; il citoplasma, composto da proteine, piccole molecole e acidi nucleici; la membrana plasmatica, composta da lipidi e proteine; la parete cellulare, composta da polisaccaridi e proteine; la capsula, composta da polisaccaridi; il flagello, composto da proteine; il nucleotide, composto da acidi nucleici e proteine. (Adattata, per gentile concessione di Mariana Ruiz Villareal, Wikimedia.)

complessa struttura interna a compartimenti intracellulari chiamati organelli, che possiedono funzioni specifiche (Tabella 1.2). Tra gli organelli c'è il nucleo, dove si trovano i cromosomi, che sono i depositari delle informazioni genetiche. Tuttavia, non tutte le cellule possiedono il nucleo, come per esempio nel caso dei batteri (Figura 1.1 e Figura 1.2). Gli organismi le cui cellule possiedono il nucleo sono chiamati **eucarioti** (dal greco εὖ, "vero" e κάρυον, "nucleo"), mentre quelli che non lo possiedono sono definiti **procarioti**, così denominati per il fatto che precedono gli eucarioti nella scala evolutiva. Tutti gli organismi sono divisi in cinque regni di cui quattro di eucarioti e uno di procarioti (Box 1.2).

Sebbene alcuni biologi ancora seguano questa classificazione, gli studi di genetica e proteomica degli ultimi anni hanno aperto una nuova prospettiva. In particolare, Carl Woese nei suoi studi ha proposto la classificazione degli esseri viventi in tre grandi domini (Figura 1.3, Tabella 1.3), nati dalla divisione dei procarioti in due domini distinti, sulla base delle differenze riscontrate in vari studi biochimici e di sequenziamento genico. Oltre agli eucarioti, abbiamo

Figure 1.2 La struttura di una cellula eucariotica vegetale. Nella struttura di una cellula vegetale si nota la presenza di vari organelli che sono assenti nei batteri. Molti di questi organelli sono principalmente costituiti da lipidi e proteine; nel nucleo, nel nucleolo, nei cloroplasti e nei mitocondri sono inoltre presenti acidi nucleici. (Adattata per gentile concessione di Mariana Ruiz Villareal, Wikimedia.)

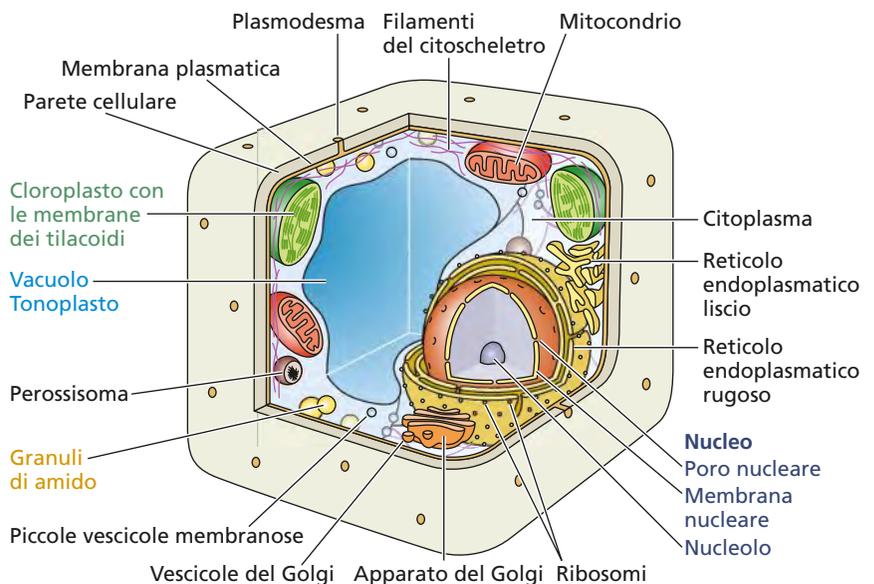


Figura 1.15 La struttura della mioglobina, acquisita tramite i raggi X, a vari livelli di risoluzione. (A) La mioglobina a una risoluzione di 6 Å: questa è la prima struttura di una proteina determinata con la cristallografia a raggi X. (B) La mioglobina a una risoluzione di 2 Å; questa struttura è stata determinata nello stesso laboratorio solo due anni dopo la prima. L'immagine mostra la proteina con un modello a nastro e il gruppo eme con un modello a sfere e bastoncini (*ball-and-stick*). (C) Tutti gli atomi della proteina, con gli atomi del gruppo eme in rosso e una molecola di ossigeno legata a esso in blu. I tre modelli sono visti da angolazioni diverse. [A, da Dill KA e MacCallum JL (2012) *Science* 338:1042-1046. Con l'autorizzazione del MRC Laboratory of Molecular Biology.]

La risonanza magnetica nucleare, NMR (*nuclear magnetic resonance*), è una tecnica ad alta risoluzione, che può essere applicata a molecole in soluzione. Utilizzando vari isotopi, con diversi spin nucleari, e analizzando le interazioni spin-spin, l'NMR permette di ottenere la struttura atomica, evitando la modificazione strutturale che può intervenire nella formazione del cristallo per l'analisi con i raggi X. I raggi X e l'NMR saranno discussi in maniera più dettagliata nei Box 3.6 e 3.7.

1.5 La genetica molecolare: l'altra faccia della biologia molecolare

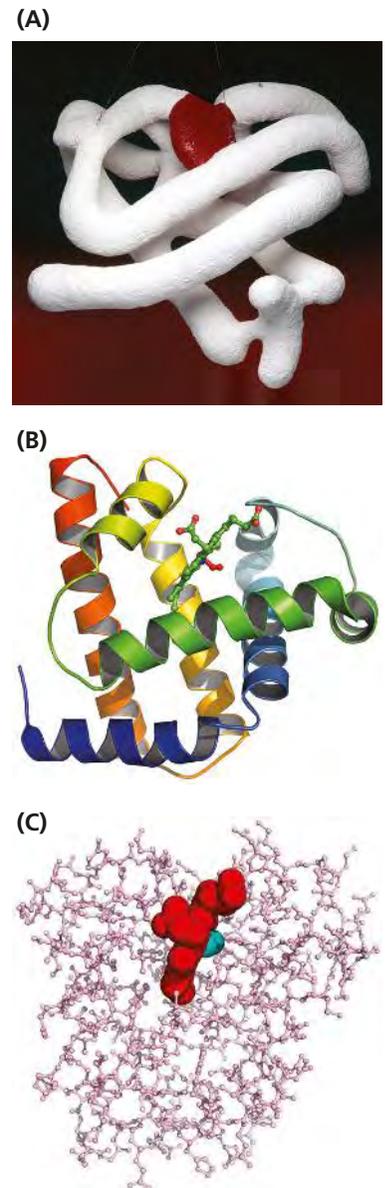
Una pietra miliare nello sviluppo della biologia molecolare è stata la scoperta delle basi molecolari della genetica. Sebbene le leggi di Mendel siano state formulate attorno al 1860 (vedi il Capitolo 2), sono dovuti passare più di cento anni prima di conoscere la base fisica per queste leggi. Un punto cruciale fu rappresentato dalla scoperta che anche i batteri e i virus sottostanno alle stesse leggi degli organismi superiori, fornendoci un rapido e semplice mezzo per studi più approfonditi. Per di più, la grandiosa scoperta della struttura del DNA aprì la strada allo studio fisico della basi molecolari della genetica. Negli stessi anni diventò più chiara anche la struttura delle proteine. Presenteremo una panoramica di questi progressi della genetica nel Capitolo 2.

Un secondo punto cruciale, nel progresso della genetica molecolare, è stata la scoperta di tecniche capaci di tagliare, sequenziare e modificare polimeri come proteine e acidi nucleici. In pochi decenni siamo arrivati dal sequenziamento di un piccolo frammento di acidi nucleici alla capacità di determinare in pochi giorni la sequenza di un intero genoma. Abbiamo imparato a moltiplicare una singola copia di ogni specifica sequenza genica, mutarla a piacimento e inserirla in un organismo. Molte di queste manipolazioni possono essere fatte con tecniche abbastanza semplici in ogni laboratorio, e le descriveremo più in dettaglio al momento opportuno, nei capitoli successivi. Il Capitolo 5 sarà completamente dedicato a questo argomento.

È essenziale ricordare che, in pochi decenni della seconda metà del XX secolo, si è sviluppato un intero campo della scienza; questa disciplina, che è stata chiamata biologia molecolare, ha permesso di spiegare la genetica e la biochimica a partire da una reale base molecolare. La biologia molecolare ha conosciuto un'enorme esplosione in questi decenni ed è ancora in evoluzione. Questo è quello di cui tratta questo testo.

CONCETTI CHIAVE

- La biologia è emersa come la ricerca minuziosa della struttura microscopica dei vari processi della vita, usando strumenti che permettevano un grado di risoluzione sempre maggiore.
- In principio, la biologia si basava sull'occhio umano e perciò era limitata allo studio degli animali e delle piante nella loro anatomia e fisiologia generale.
- Il microscopio ottico, con una risoluzione nell'ordine di 0,3 μm , ha permesso la scoperta dei microorganismi e la struttura cellulare degli eucarioti.



- La biochimica ha rivelato non solo la maggior parte dei meccanismi della cellula ma anche l'esistenza di tre grandi domini in cui possono essere suddivisi gli esseri viventi: Eubacteria, Archaea e Eukaryoteae o eucarioti.
- Il microscopio elettronico, con una risoluzione potenziale di 0,3 nm, ha permesso di analizzare la struttura della cellula e delle macromolecole più grandi.
- Il microscopio confocale in fluorescenza ha permesso di localizzare specifiche macromolecole all'interno della cellula e di studiarne la loro interazione.
- Altre tecniche di microscopia in fluorescenza, come FIONA e FRET, hanno esteso la risoluzione del microscopio ottico a livello di nanometri.
- Il microscopio a forza atomica, AFM, ha permesso lo studio delle macromolecole in ambiente acquoso con un'alta risoluzione e ha aperto la strada alla manipolazione meccanica di tali molecole.
- La diffrazione a raggi X e la risonanza magnetica nucleare, NMR, hanno esteso gli studi a livello atomico e hanno contribuito a creare una reale biologia molecolare.
- Un altro grande input è derivato dallo sviluppo della genetica molecolare, nata con la genetica dei batteri e dei virus.

ULTERIORI LETTURE

Libri

- Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2015) *Molecular Biology of the Cell*, 6^a ed. Garland Science. [Trad. it.: *Biologia molecolare della cellula*, 2016, Zanichelli, Bologna.]
- Egerton RF (2005) *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer.
- Frank J (2006) *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. Oxford University Press.
- Goldman RD, Swedlow JR e Spector DL (2010) *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kuriyan J, Konforti B e Wemmer D (2013) *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles*, Garland Science.
- Margulis L e Chapman MJ (2009) *Kingdoms and Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, 4^a ed. Academic Press.
- van Holde KE, Johnson WC e Ho PS (2006) *Principles of Physical Biochemistry*, 2^a ed. Pearson Prentice Hall.

Review

- Glaeser RM (2008) Macromolecular structures without crystals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1779-1780.
- Huang B, Babcock H e Zhuang X (2010) Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells. *Cell* 143:1047-1058.
- Pace NR (2009) Mapping the tree of life: Progress and prospects. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:565-576.

- Prasad V, Semwogerere D e Weeks ER (2007) Confocal microscopy of colloids. *J Phys Condens Matter* 19:113102.
- Taylor KA e Glaeser RM (2008) Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and prospective on opportunities for the future. *J Struct Biol* 163:214-223.
- Vogel SS, Thaler C e Koushik SV (2006) Fanciful FRET. *Sci STKE* 2006:re2.
- Woese CR (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8392-8396.
- Zlatanova J e Leuba SH (2000) Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol* 74:37-61.
- Zlatanova J e van Holde K (2006) Single-molecule biology: What is it and how does it work? *Mol Cell* 24:317-329.

Lavori sperimentali

- Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM et al. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature* 181:662-666.
- Kendrew J, Dickerson RE, Strandberg BE et al. (1960) Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* 185:422-427.
- Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA et al. (2003) Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300:2061-2065.
- Yildiz A e Selvin PR (2005) Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: Application to molecular motors. *Acc Chem Res* 38:574-582.

Jordanka Zlatanova, Kensal E. van Holde

Biologia molecolare

Struttura e dinamica di genomi e proteomi

Edizione italiana a cura di Vito De Pinto

La biologia molecolare ha subito profondi cambiamenti negli ultimi anni, grazie a nuove tecnologie che hanno permesso di aumentare in modo esponenziale le nostre conoscenze su struttura e funzionamento del DNA. In particolare l'analisi su larga scala dei genomi, lo sviluppo della proteomica, i metodi che studiano le dinamiche delle singole molecole e la criomicroscopia hanno fornito informazioni cruciali per comprendere i meccanismi molecolari alla base di espressione e regolazione genica. Zlatanova e Holde sono partiti dall'esigenza di scrivere un manuale adeguato a questo contesto «quasi esplosivo».

I primi quattro capitoli introducono le idee di base della disciplina: presentano proteine e acidi nucleici con una trattazione sintetica ma dettagliata, adatta sia per un corso di base sia per un veloce ripasso in un corso avanzato. L'argomento al cuore dell'opera è però il **genoma**, visto alla luce della stretta interdipendenza fra

la struttura molecolare e le dinamiche della trasmissione e dell'espressione dell'informazione genetica. Con un approccio originale, gli autori affrontano prima la trascrizione, poi la traduzione e quindi la replicazione. A questi argomenti sono dedicati i capitoli centrali, approfonditi e aggiornati per fornire basi solide su temi di attualità e di rilievo crescente, oltre che fondamentali per chi intenda occuparsi di genomica traslazionale, la disciplina ponte tra ricerca biomolecolare e pratica clinica. Completano la trattazione i capitoli dedicati a DNA ricombinante, struttura del genoma, ricombinazione genica e riparazione del DNA. Sono inserite, dove è utile, anche nozioni di biologia dei sistemi, su organismi modello e RNA regolatori.

In ogni capitolo ci sono inoltre rubriche applicative e di contesto: le descrizioni degli esperimenti più rilevanti, le tecniche, i risvolti clinici e anche veri e propri approfondimenti disciplinari.

Jordanka Zlatanova è professoressa emerita presso il Dipartimento di Biologia molecolare della University of Wyoming.

Kensal E. van Holde è professore emerito presso il Dipartimento di Biochimica e Biofisica dell'Oregon State University.

Le risorse multimediali



online.universita.zanichelli.it/zlatanova

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

Libro con ebook



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