

LA DOPPIA ELICA

CINQUANT'ANNI CON IL DNA

di Giorgio Semenza*

In occasione del cinquantesimo anniversario dell'identificazione della struttura a doppia elica del DNA, l'autore ripropone e commenta passi originali di Watson e Crick, come tappe del complesso cammino di ricerca, sperimentale e teorico, a cui, nella prima metà del XX secolo, diedero contributi significativi molti scienziati operanti in diversi campi. Un quadro complessivo che offre elementi storici inediti, riflessioni mirate e ricordi personali che costituiscono un «valore aggiunto» rispetto alle numerose recenti ricostruzioni divulgative.

«La natura chimica dei geni è sconosciuta. Essi sono probabilmente proteine, perché gli acidi nucleici consistono di (pochi) blocchi di tetranucleotidi (Levene 1930). Questa struttura semplice li rende improbabili candidati come portatori della grande quantità di informazioni necessarie per agire come geni.»

Questo punto di vista, che oggi sembra così strano, era condiviso dalla maggior parte dei biologi quando, nel 1946, stavo preparando l'esame di biologia alla facoltà di Medicina. A partire dal 1906, in una serie di lavori classici, il gruppo di Levene e altri ricercatori avevano identificato il D-ribosio e il 2-deossi-D-ribosio come gli zuccheri presenti rispettivamente nell'RNA e nel DNA. Avevano anche identificato le purine e le pirimidine, localizzato il legame fosfodiesterico tra gli zuccheri e classificato il legame tra zucchero e la purina (o pirimidina) come glicosidico. Il lavoro di Levene terminava suggerendo una struttura a tetranucleotidi sia per l'RNA che per il DNA: ipotizzava che gli acidi nucleici fossero costituiti da un (ignoto) numero di blocchi costruttivi, i tetranucleotidi, ognuno costituito da quattro zuccheri, quattro fosfati e da una per ciascuna delle quattro basi. Usando le sue parole: «la teoria del tetranucleotide è il minimo peso molecolare e l'acido nucleico può essere un multiplo di questa unità.» (Levene e Bass, 1931, p. 289 [8]).

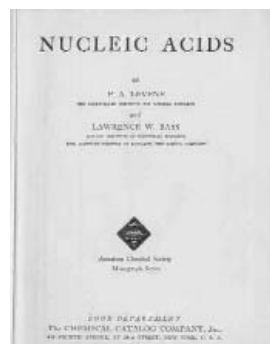
Curiosamente, i dati analitici non indicavano rapporti uguali tra le quattro basi (per esempio 1:0,6:1,2:0,8); la deviazione dai rapporti 1:1:1:1 era attribuita alla mancanza di precisione nelle procedure di precipitazione usate per isolare le singole basi.

*Dipartimento di Chimica, Biochimica e Tecnologie per la Medicina presso l'Università degli Studi di Milano.

*Swiss Institute of Technology di Zurigo.

L'articolo è pubblicato nella versione inglese su *FEBS Letters* 544; 1-3 (2003).

Frontespizio del testo di P.A. Levene e L.W. Bass (1931) sullo stato delle conoscenze relative agli acidi nucleici





Phoebus A. T. Levene
(1869-1940)

Colin MacLeod, Maclyn McCarty e Detlev Wulf Bronk all'inaugurazione dell'Avery Memorial nel settembre 1965



In effetti, l'ingannevole «meravigliosa semplicità» della struttura tetranucleotidica e l'autorevolezza di Levene bloccarono la ricerca di strutture alternative per gli acidi nucleici e, ciò che è peggio, rappresentarono un ostacolo ulteriore a che il lavoro (ora «classico») di Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod e Maclyn McCarty (1944) [1] fosse accettato rapidamente e universalmente.

Come la maggior parte dei lettori sa, Avery e i suoi collaboratori purificarono dal *Diplococcus pneumoniae* una sostanza molto viscosa, che trasformava un ceppo di batteri in altri con capsule polisaccaridiche immunologicamente differenti. Il ceppo trasformato era geneticamente stabile. Il fattore trasformante, altamente viscoso, quando era purificato per mezzo di una procedura molto accurata e non distruttiva, presentava le caratteristiche del DNA: a parte le prove delle analisi chimiche, non era attaccato dalle ribonucleasi, dalla tripsina o chimotripsina, ma era inattivato dalla DNasi grezza. Quattro anni più tardi, questo fu confermato con l'uso della DNasi cristallizzata messa a loro disposizione da Moses Kunitz (1887-1978). I risultati di Avery e dei suoi collaboratori furono in breve tempo confermati da altri gruppi, ed estesi alle trasformazioni di altri batteri. I genetisti più importanti non ebbero difficoltà ad accettare l'idea che queste trasformazioni fossero dovute all'isolamento chimico e al trasferimento di geni e non all'induzione di una mutazione.



Oswald T. Avery (1887-1955)

Le osservazioni di Avery e dei suoi collaboratori fornirono una notevole spinta alla genetica batterica, un campo di ricerca allora ancora all'inizio.

Molti ricercatori, tra cui l'autorevole Alfred E. Mirsky (1900-1974), per lungo tempo considerarono insufficienti le prove di Avery: l'attività trasformante avrebbe potuto ancora essere attribuita a un componente di secondaria importanza nella preparazione di DNA.

Tuttavia, dal 1952 erano

state ottenute preparazioni attive in cui il contenuto proteico era minore dello 0,02%. A questo si aggiunsero le ricerche sui batteriofagi di Salvador Luria, di Max Delbrück e di altri e,



Martha Chase (1930-...) e Alfred Hershey (1908-1997) nel 1953

soprattutto, l'esperimento di Alfred Hershey e Marta Chase che dimostrava che i batteriofagi iniettavano il loro DNA, ma non il loro rivestimento proteico nei batteri che infettavano, fornendo la prova finale che in effetti i geni sono costituiti da DNA. Tale conclusione, perciò, gettò seri dubbi sulla correttezza della struttura a tetranucleotidi del DNA ipotizzata da Levene.

Alla fine degli anni Quaranta, Erwin Chargaff, lavorando poche miglia a Nord del laboratorio di Avery, identificò correttamente il punto più debole nella struttura tetranucleotidica: le quattro basi sono realmente presenti in rapporti 1:1:1:1 nel DNA e nell'RNA? Per chiarire questo punto decisivo, il gruppo di Chargaff riuscì a mettere a punto ciò che era mancato fino ad allora: una procedura quantitativa per misurare le basi puriniche e pirimidiniche. Procedure di preparazione non distruttive (paragonabili a quelle di F. Mischer, E. Hammarsten, R. Signer e altri) che portavano a un DNA altamente viscoso; una idrolisi acida affidabile e la cromatografia su carta; l'eluizione delle bande che assorbono nelle lunghezze d'onda della luce ultravioletta (UV) e la loro determinazione spettrofotometrica, resero possibili determinazioni quantitative affidabili della composizione in basi degli RNA e dei DNA. Tra il 1950 e il 1951 Chargaff [2, 3] poteva presentare una grande quantità di dati analitici sulla composizione in basi dei DNA ottenuti da molti organi (per esempio timo, fegato, milza), dallo sperma umano, dal lievito e da una varietà di batteri. Nella maggior parte dei DNA le quattro basi «classiche» (adenina, guanina, citosina, timina) erano presenti in

Erwin Chargaff (1905-2002)



rapporti chiaramente differenti da 1:1:1:1 (Chargaff 1950 [2]). Così veniva a cadere definitivamente l'ipotesi della struttura tetranucleotidica di Levene.

Naturalmente, Chargaff aveva compreso l'importanza degli appena scoperti rapporti tra le basi puriniche e pirimidiniche nei DNA: i rapporti A:T e G:C non erano significativamente diversi da 1, mentre i rapporti A:G e T:C variavano ampiamente da DNA a DNA. Poco tempo dopo, Linus Pauling e Robert Corey (1953) [11] suggerirono che il DNA fosse costituito da tre catene polinucleotidiche avvolte e intrecciate a elica, con i gruppi impacchettati intorno all'asse della colonna e le basi azotate che si proiettano radialmente.

Ci si può meravigliare del fatto che Chargaff stesso non abbia proposto una struttura del DNA che tenesse conto in qualche



Linus Pauling (1901-1994),
il secondo da destra,
con alcuni collaboratori

modo dei rapporti così sorprendentemente costanti (1:1) tra A:T e G:C. Senza dubbio egli si risentì del fatto che «estranei» come Watson e Crick presentassero improvvisamente una struttura (1953) [15] che, fin dall'inizio, manifestava una «pericolosa» probabilità di essere giusta. Mi è capitato di essere presente ad alcuni insoliti e memorabili scontri verbali («La ricerca vera è fatta al banco di laboratorio, non giocando con modelli di metallo.»): troppo spesso per

Chargaff la profonda padronanza della lingua inglese e il suo uso tagliente venivano prima di qualsiasi altra considerazione. Ma, in tutta onestà, dal momento che egli stesso era stato testimone di quanto fosse stata paralizzante una struttura sbagliata (quella di Levene) per lo sviluppo della ricerca durante l'arco di quasi due decenni, si può forse capire perché Chargaff non gradiva l'idea di qualche struttura che non nascesse «spontaneamente», quasi da sola, da dati sperimentali grezzi.

Non ho bisogno di ripetere qui ciò che è stato scritto sulle circostanze che hanno portato Watson e Crick a pubblicare *A structure for deoxyribose nucleic acid* (il titolo del loro articolo del 1953 lungo una pagina [15]) che era seguito immediatamente, uno dopo l'altro, da due articoli, uno di Maurice H.F. Wilkins e altri (1953) [17] e uno di Rosalind E. Franklin e G.R. Gosling (1953) [5]. Pochi biologi non hanno letto *The Double Helix* di Watson (1968) [14] e i lavori che lo hanno seguito

(per esempio il più recente, scritto da Brenda Maddox nel 2002 [9]) e ciò che è stato scritto o riportato in numerosi simposi e convegni, e anche su quotidiani, ma in modo estremamente significativo da Horace F. Judson (1996) [7].

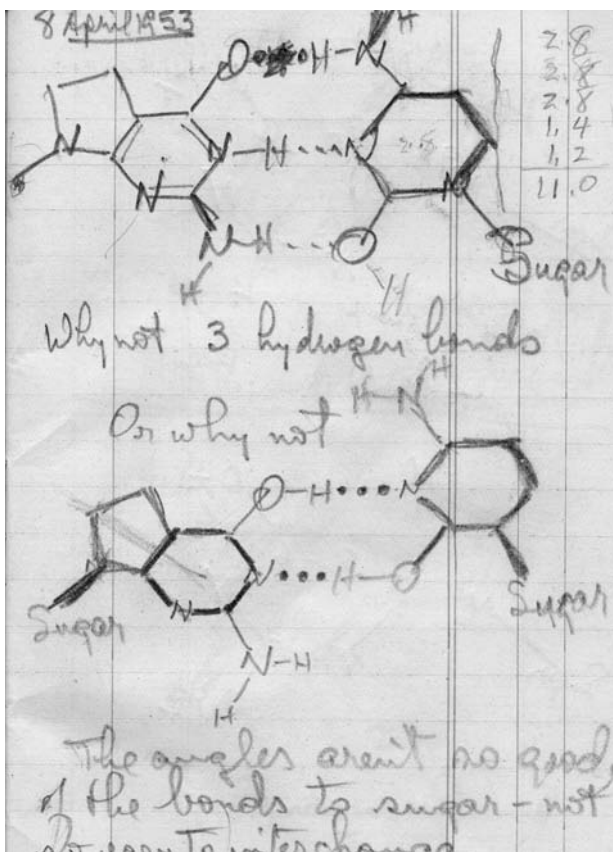
Non ci sono dubbi che l'articolo di Watson e Crick dell'aprile del 1953 [15], e forse ancora di più quello del maggio 1953 [16], si ergono nelle scienze biologiche del XX secolo allo stesso modo di come *Origin of Species* di Charles Darwin si era posto nel XIX secolo.

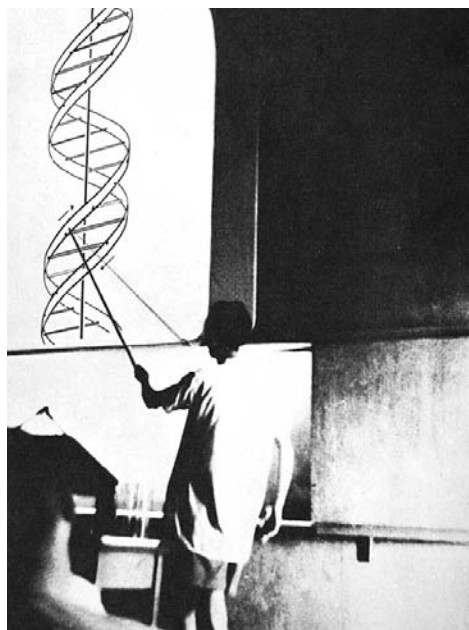
Come il libro di Darwin, gli articoli di Watson e Crick produssero una svolta fondamentale nel pensiero biologico. Darwin fece piazza pulita dell'interpretazione letterale della Bibbia in relazione alla comparsa della vita sulla Terra e alle sue trasformazioni e anche dei tentativi sbagliati di spiegare questi cambiamenti. Quando Watson e Crick presentarono la loro doppia elica del DNA, la struttura a blocchi di tetranucleotidi di Levene era stata già stata sepolta da qualche anno, mentre la struttura a tre eliche di Pauling e Corey era appena stata proposta (1953) [11].

Curiosamente, il paragone tra le pubblicazioni di Darwin e quelle di Watson e Crick si estende ad alcune delle circostanze nelle quali questi lavori vennero pubblicati. Senza le idee quasi identiche di un concorrente e amico come Alfred Wallace e l'incoraggiamento di alcuni autorevoli scienziati, Darwin, probabilmente, avrebbe esitato più a lungo prima di pubblicare *Origin of Species*. Nella situazione di Watson e Crick, il ruolo di Wallace fu assunto da Wilkins, dalla Franklin e dai loro collaboratori. Naturalmente, in eventi di così grande portata, si possono trovare alcuni dettagli non perfettamente esatti. In effetti, la struttura originale di Watson e Crick (1953) [15] era «costruita» con solo due legami idrogeno tra citosina e guanina: il terzo legame sarebbe stato suggerito tre anni dopo, nel 1956 [12], da Pauling e Corey.

Inoltre, Watson e Crick non consideravano le basi di importanza secondaria, metilate o idrossimetilate

Dal catalogo degli scritti di Pauling: appunti sui legami tra le basi azotate del DNA





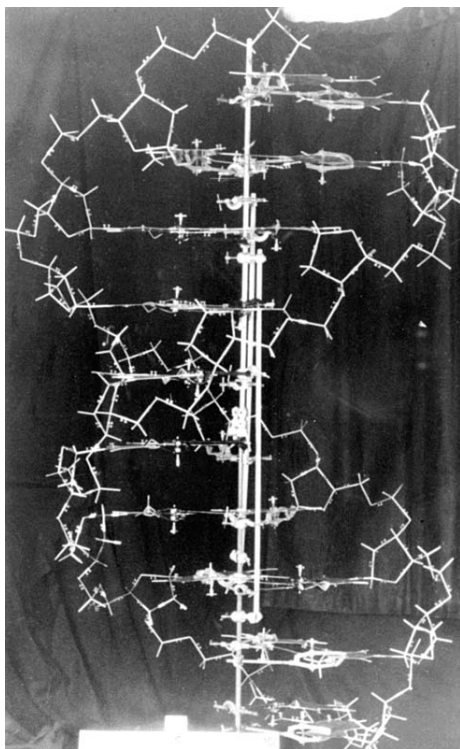
James Watson spiega la struttura della doppia elica durante una conferenza (Dagli archivi del Cold Spring Harbor Laboratory)

(che sarebbero state scoperte poco dopo, ma questi gruppi aggiuntivi non interferiscono con l'appaiamento delle basi previsto da Watson e Crick. Alla teoria originale di Darwin sulla sopravvivenza del più adatto, i decenni successivi aggiunsero concetti ulteriori (si veda per esempio [4, 6] e altri), ma la validità del Caso e della Necessità non è stata mai messa in dubbio.

Era chiaro agli stessi Watson e Crick che il loro DNA a doppia elica apriva una nuova era. Nell'articolo dell'aprile (1953) [15] uno degli ultimi paragrafi è un classico esempio di «modestia» scientifica: «non ci è sfuggito che l'appaiamento specifico che noi abbiamo postulato suggerisce immediatamente un possibile meccanismo di copiatura del materiale genetico». Questo è il tema dell'articolo di Watson e Crick pubblicato un mese dopo (1953) [16]; esso presentava una serie di

«speculazioni» che negli anni seguenti si dimostrarono tutte straordinariamente vere.

«In una lunga molecola (di DNA) sono possibili molte differenti permutazioni e sembra perciò probabile che l'esatta sequenza delle basi sia il codice che veicola l'informazione genetica. Se si potesse conoscere l'effettivo ordine delle basi di una delle catene della coppia, si potrebbe scrivere l'esatto ordine delle basi nell'altra catena, grazie alla specifica modalità di appaiamento. Quindi una catena è come se fosse il complemento dell'altra ed è questa caratteristica che suggerisce come la molecola di acido deossiribonucleico possa riprodurre se stessa.» Il DNA è «in effetti



Modello originale del DNA (Dagli archivi del CSHL)



Matthew Meselson (1930-)
e Franklin Stahl (1929-)
al convegno *Genetics after Genome*
(Brno 2002)

una coppia di stampi, ciascuno dei quali è complementare all'altro.» (Meselson e Stahl lo avrebbero dimostrato elegantemente nel 1958 [10])

«Immaginiamo che prima della duplicazione i legami idrogeno si spezzino e che le due catene si svolgano e si separino». La doppia elica è in effetti un bellissimo esempio di quanto la natura possa essere astuta: le due catene polinucleotidiche sono tenute insieme da legami idrogeno tra le coppie di basi, mentre le cariche negative dei fosfati tenderebbero a spingerle una lontano dall'altra.

«Il nostro modello suggerisce [...] che la mutazione spontanea può essere dovuta a una base che occasionalmente si trovi in una delle forme tautomeriche meno probabili». Di nuovo questo suggerimento è oggi un fatto accertato.

«La nostra struttura [...] è una struttura aperta. Tra le coppie di catene polinucleotidiche c'è lo spazio perché una catena polipeptidica si avvolga attorno allo stesso asse dell'elica. Può essere significativo che la distanza tra atomi di fosforo adiacenti, 7,1 Å, sia simile alla minima unità ripetitiva di una catena polipeptidica completamente estesa.» Solo a questo non arrivarono Watson e Crick, a suggerire che proteine come repressori, fattori di trascrizione o proteine incaricate di metilare il DNA, possano interagire con le basi nel DNA a doppia elica intatto.

Mi sono preso la libertà di citare alla lettera brani di Watson e Crick, perché pubblicazioni vecchie di cinquant'anni sono raramente accessibili nelle nostre biblioteche sovraffollate. Ancora più importante è il fatto che le loro due pubblicazioni del 1953 hanno indicato a uno stadio così precoce della ricerca quale direzione avrebbero preso la biologia molecolare e la biochimica per un buon numero di decenni.

Crick e Watson nel quarantesimo anniversario della scoperta della struttura del DNA



Mi è stato raccontato che il giorno in cui si era finalmente elaborata definitivamente la struttura a doppia elica del DNA, Watson e Crick andarono in un *pub* vicino al *Cavendish Laboratory* e annunciarono «oggi abbiamo scoperto il segreto della vita», penso che non fossero lontani dalla verità. L'attuale gestore del *pub*, ignora del tutto questo episodio e non ha nessuna conoscenza di biologia molecolare: «Watson e Crick, hai detto? Mai sentiti» (Ch. Tanford, 2003 [13]). In occasione dei festeggiamenti di quest'anno per la scoperta della doppia elica del DNA, è stata però scoperta una targa al *Eagle Pub* alla presenza di Jim Watson.

L'*Eagle Pub*,
situato in Bene't Street,
è uno dei più famosi locali di
Cambridge;
qui si recavano a bere
Watson e Crick
quando uscivano
dal *Cavendish Laboratory*



Infine, desidero ringraziare Ned Mantei, mio collega più giovane (o meno anziano!) per le critiche costruttive che m'ha fornito. Negli anni Sessanta, quand'era studente, Watson e Crick facevano parte del suo olimpo di «eroi scientifici».

v

INDICAZIONI BIBLIOGRAFICHE

- [1] O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty (1944), *J. Exp. Med.* 79, pp. 137-158.
 [2] E. Chargaff (1950), *Experientia* 6, pp. 201-209.
 [3] E. Chargaff (1951), *J. Cell. Comp. Physiol.* 38 (Suppl.1), pp. 41-59.
 [4] R. Dawkins, *The Selfish Gene*, Oxford University Press, New York 1976.
 [5] R.E. Franklin, R.G. Gosling (1953), *Nature* 171, pp. 740-741.
 [6] S.J. Gould, *The Structure of Evolutionary Theory*, Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge (MA) 2002.
 [7] H.F. Judson, *The Eighth Day of Creation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY) 1996.
 [8] P.A. Levene, L.W. Bass, *Nucleic Acids*, Chemical Catalogue Co, New York 1931.
 [9] B. Maddox, *The Dark Lady of DNA*, Harper and Collins, New York 2002.
 [10] M. Meselson, F.W. Stahl (1958), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, pp. 671-682.
 [11] L. Pauling, R.B. Corey (1953), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 39, pp. 84-97.
 [12] L. Pauling, R.B. Corey (1956), *Arch. Biochem. Biophys.* 65, pp. 164-181.
 [13] Ch. Tanford (2003), in: *Personal Recollections, VII*; Compr. Biochem. vol. 42 (G. Semenza, A.J. Turner, Eds.), pp. 1-52, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
 [14] J.D. Watson, *The Double Helix*, Atheneum, New York 1968.
 [15] J.D. Watson, F.H.C. Crick, (1953), *Nature* 171, pp. 737-738.
 [16] J.D. Watson, F.H.C. Crick, (1953), *Nature* 171, pp. 964-967.
 [17] M.H.F. Wilkins, A.R. Stokes, H.R. Wilson, (1953), *Nature* 171, pp. 738-740.