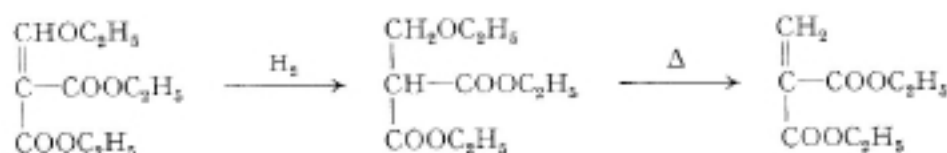


stato finora ottenuto solo sotto forma di estere; anche gli omologhi che da esso derivano per sostituzione di uno o di ambedue gli atomi di idrogeno del gruppo metilenico con radicali alchilici sono in genere assai poco stabili e, per azione del calore, eliminano facilmente uno dei due carbossili. Essi si formano quali intermedi nella sintesi di Knoevenagel-Doebner degli acidi monocarbossilici alifatici insaturi dalla condensazione tra le aldeidi od i chetoni (*vedi*) e l'acido malonico, ma già nelle condizioni di reazione eliminano uno dei due carbossili sotto forma di biossido di carbonio trasformandosi in acidi monocarbossilici. Assai più stabili sono invece gli esteri corrispondenti, che si ottengono condensando sugli esteri malonici le aldeidi o i chetoni in anidride acetica a caldo, ovvero per azione dell'etossido di sodio o di basi organiche come la piperidina o la trietilammina.

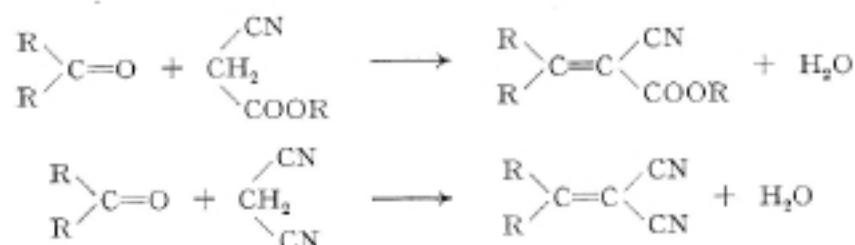


Oltre che per condensazione della formaldeide sugli esteri malonici, gli esteri metilenmalonici possono venir preparati per pirolisi degli esteri etossimetilmalonici i quali, a loro volta, si ottengono per riduzione degli esteri etossimetilenmalonici.

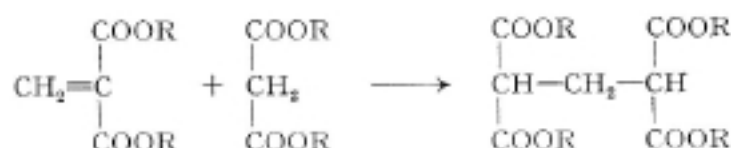


I suddetti esteri possono venir conservati solo in presenza di inibitori di polimerizzazione.

Gli esteri-nitrili ed i dinitrili degli acidi alchilidenmalonici possono venir preparati condensando con i catalizzatori basici prima descritti le aldeidi od i chetoni sugli esteri cianacetici o sul dinitrile malonico.



Il doppio legame di tutti questi composti è molto reattivo e dà facilmente luogo a reazioni di addizione nucleofila. Così nella condensazione tra formaldeide ed esteri malonici in mezzo alcalino gli esteri metilenmalonici inizialmente formati si trasformano facilmente in esteri dicarbossigliutarici aggiungendo una seconda molecola di estere malonico attraverso una reazione di Michael.

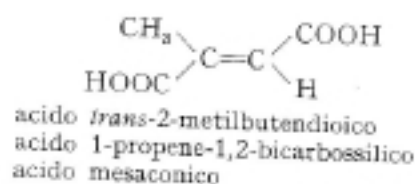
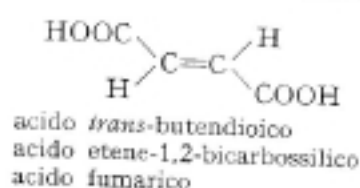


plato, ma affidata al caso; la frequenza con cui le diverse basi compaiono nel polimero è funzione delle concentrazioni dei rispettivi ribonucleotidi-trifosfati. La possibilità di preparare *in vitro* molecole di RNA di composizione nota è stata sfruttata per affrontare il problema del codice genetico. È stato così possibile dimostrare, ad es., che l'acido poliuridilico, usato come RNA messaggero in un sistema di sintesi proteica *in vitro*, promuove solo l'incorporazione della fenilalanina nelle proteine.

[5-28]

ACIDI POLICARBOSSILICI ALIFATICI INSATURI

La molecola di questi composti contiene, oltre a due o più carbossili, uno o più legami etilenici o acetilenici. Nella nomenclatura ufficiale il loro nome si deriva da quello dell'idrocarburo non saturo corrispondente con la desinenza *-dioico*, *-trioico* ecc. Assai usata è anche la nomenclatura nella quale i carbossili si considerano come sostituenti introdotti in un alchene o in un alchino indicando, ad es., l'acido $\text{HOOC}\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{COOH}$ come acido etene-1,2-bicarbossilico, l'acido $\text{HOOC}\cdot\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}\cdot\text{COOH}$ come acido 1-propene-1,2-bicarbossilico ecc. Per i termini a catena ramificata si considera quale catena principale quella che unisce i due gruppi carbossilici negli acidi bicarbossilici o, negli acidi policarbossilici, i due carbossili più lontani. I termini più importanti del gruppo vengono però abitualmente indicati con nomi tradizionali come, ad es., quelli di acido fumarico e di acido mesaconico.



Data la varietà di struttura degli acidi di questo gruppo, non si hanno in pratica metodi di preparazione di validità generale, ma tutt'al più metodi che consentono la sintesi degli acidi di una determinata serie. Alcuni termini vengono poi ottenuti con metodi particolari, come l'acido maleico che viene preparato industrialmente dall'anidride, a sua volta ottenuta dal benzene per ossidazione catalitica, o gli acidi citraconico, mesaconico ed itaconico, che vengono preparati dall'acido citrico.

Tutti gli acidi policarbossilici alifatici insaturi sono solidi alla temp. amb.; le altre proprietà fisiche e quelle chimiche sono determinate in gran parte dalla posizione reciproca dei carbossili e dei legami non saturi nonché dalla configurazione *cis* o *trans* di questi, in modo analogo a quello che si riscontra negli acidi monocarbossilici alifatici insaturi (*vedi*). La tabella 1 riassume i nomi d'uso e i punti di fusione dei termini più importanti.

Acidi alchilidenmalonici

Mentre gli acidi malonici che presentano un doppio legame non coniugato con i due carbossili, come ad es. l'acido allilmalonico $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2(\text{COOH})_2$, presentano la normale stabilità degli acidi alchilmalonici e si ottengono con i metodi di preparazione di questi, l'acido metilenmalonico $\text{CH}_2=\text{C}(\text{COOH})_2$ è

REPLICA DELL'RNA

Il caso di una replica dell'RNA, in cui una molecola di RNA dirige la sintesi di RNA a se stesso complementare, sembra ristretto esclusivamente a quei virus in cui le informazioni genetiche sono contenute nell'RNA anziché nel DNA. I caratteri generali della reazione di autoreplica dell'RNA in sistemi parzialmente purificati risultano, da studi molto recenti, sostanzialmente analoghi a quelli sopra descritti per la duplicazione del DNA, almeno per quanto riguarda i seguenti punti: a) il processo utilizza come substrati ribonucleotiditri-fosfati; b) esso richiede come catalizzatore una pirofosforilasi specifica chiamata RNA-replicasi; c) la reazione non procede se non in presenza di RNA come templatato, e la sequenza delle basi nel prodotto della reazione è determinata da quella del templatato.

SINTESI DELL'RNA IN PRESENZA DI DNA COME TEMPLATO

La sintesi di RNA in presenza di DNA come templatato ripete, nelle linee essenziali, quella del DNA in presenza del DNA. Anche qui i substrati utilizzati per la sintesi sono nucleotidi-trifosfati, che vengono scelti ed ordinati in una determinata sequenza in base alla loro complementarietà riguardo alle basi del filamento di DNA che funziona da templatato; inoltre, anche qui la sintesi avviene per reazione pirofosforilasica, con crescita della molecola di RNA in modo tale che i nucleotidi aggiunti vengono legati all'ossidrile (3') del nucleotide precedente, e il templatato viene «letto» nell'ordine (3') → (5'). L'enzima che catalizza la reazione è una pirofosforilasi specifica da un lato per il DNA, quale templatato, e dall'altro per i ribonucleotidi-trifosfati (UTP, CTP, GTP, ATP), denominata RNA-polimerasi. Anche in questo caso, il fatto che il pirofosfato liberato nella reazione venga rapidamente idrolizzato a ortofosfato dalla pirofosfatasi rende la reazione fortemente esergonica nel senso della sintesi.

Un aspetto singolare della sintesi DNA-diretta dell'RNA è nel fatto che, quando essa si svolge *in vivo*, soltanto uno dei due filamenti, complementari ed antiparalleli, del DNA a doppia elica viene «letto» o, in altri termini, funziona da templatato: «trascrizione asimmetrica». Dati recenti suggeriscono che, almeno in certi casi ed anche *in vitro*, in sistemi ricostruiti contenenti RNA-polimerasi e DNA altamente purificati, soltanto uno dei due filamenti del DNA venga trascritto, e precisamente quello stesso che è trascritto *in vivo*. Ciò ha suggerito che determinate sequenze di basi nel DNA possano essere «riconosciute» dall'enzima, e funzionino quindi quali «segnali di inizio» per la reazione polimerasica.

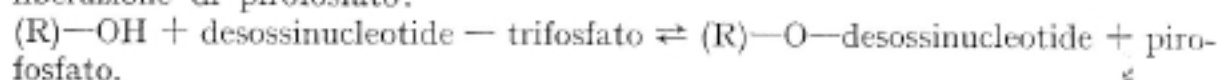
SINTESI «IN VITRO» DI RNA IN ASSENZA DI TEMPLATO

La sintesi di poliribonucleotidi in assenza di templatato è stata ottenuta *in vitro* ad opera di un enzima, la polinucleotide-fosforilasi, che catalizza la seguente reazione:

n ribonucleotidi — difosfati \rightleftharpoons poliribonucleotide + n fosfato.

I ribonucleotidi possono essere uguali tra loro o diversi; nel primo caso si ottengono degli omopolimeri: ad es. acido poliuridilico partendo da UDP o acido poliadenilico partendo da ADP; nel secondo caso degli eteropolimeri. La sequenza delle basi nelle molecole di RNA così ottenute non è fissata da un tem-

tano a postulare il seguente meccanismo generale: l'allungamento della catena neofornata avviene per attacco nucleofilo dell'ossidrile in 3' del desossiribosio di un nucleotide sul fosforo legato in 5' al desossiribosio nel nucleotide-trifosfato libero, con formazione di legame internucleotidico (3')-(P)-(5') e liberazione di pirofosfato:



L'andamento termodinamico della reazione è tale che essa sarebbe abbastanza facilmente reversibile; peraltro, nella cellula, la forte attività di enzimi che idrolizzano il pirofosfato a dare due molecole di fosfato fa sì che l'equilibrio sia fortemente spostato nel senso della sintesi dei legami internucleotidici. Perché la reazione di polimerizzazione si svolga è assolutamente necessaria la presenza di DNA, che funziona da template. Nei sistemi *in vitro*, questo può essere somministrato sia come filamento unico che come struttura a doppia elica. Nel primo caso il prodotto della reazione forma con il template un complesso a doppia elica secondo ogni evidenza identico al DNA a doppia elica quale si può estrarre dalle cellule; questo fatto, nonché i risultati di analisi della composizione in basi e della frequenza di adiacenza delle medesime dimostrano che la sequenza delle basi nel filamento sintetizzato deve essere complementare a quella del filamento che funge da template. Se ne conclude: a) che la polimerasi agisce in stretta associazione con il DNA template, oltre che con i desossinucleotidi-trifosfati liberi; b) che la polimerasi di per se stessa «riconosce» soltanto la porzione desossiribosio-fosfato dei medesimi, ed affida al DNA il loro ordinamento in una sequenza specifica. Si può inoltre dimostrare che la polimerasi purificata (da *Escherichia coli* come da altre fonti) inizia la sintesi del filamento complementare a quello del template partendo dall'estremità di quest'ultimo in cui è libero l'ossidrile in 3', e il P in 5' è esterificato con il desossinucleotide seguente. In altri termini il filamento template è «letto» dalla polimerasi nell'ordine (3') → (5'); mentre la catena neofornata ha una disposizione antiparallela, iniziando con il P in 5' libero e l'ossidrile in 3' legato al desossinucleotide successivamente apposto. Questa modalità della «lettura» dei template spiega in parte le complicazioni che insorgono quando in un sistema isolato si fornisca come template DNA nativo nella forma a doppia elica; la polimerasi in questo caso inizia simultaneamente la lettura del template alle due estremità, dissociando le due eliche, ma utilizzandone, ad ogni estremità, solo il filamento che termina con l'ossidrile (3') libero: filamento (3'). Questa ed altre complicazioni fanno sì che non si sia ancora riusciti ad ottenere in sistemi purificati la duplicazione esatta del DNA nativo a doppia elica. Studi al microscopio elettronico, nonché molti dati meno diretti, dimostrano d'altra parte che nelle cellule integre la replicazione del DNA avviene simultaneamente per entrambi i filamenti, partendo da un punto ben definito del cromosoma. Sembra quindi che il processo di replicazione del DNA *in vivo* debba coinvolgere fattori o condizioni ancora non identificate. La polimerasi purificata da una data fonte è largamente aspecifica, in quanto è capace di utilizzare come template DNA delle fonti più diverse. È d'altra parte stato suggerito che uno stesso organismo possa presentare più di una specie di polimerasi. Alcuni virus con DNA contrassegnato da particolari caratteristiche portano nel proprio genoma l'informazione per la sintesi di polimerasi specifiche.

b) Risolto il problema della formazione del legame internucleotidico, resta quello del far sì che il polinucleotide prodotto presenti una sequenza non casuale, bensì ben definita e predeterminata, di nucleotidi caratterizzati dalle diverse basi. Infatti, come già descritto, gli acidi nucleici sono presenti in ogni organismo come diverse specie molecolari, strettamente caratterizzate dal numero e dalla sequenza dei nucleotidi che le compongono. Occorre quindi che la sintesi di ogni singolo tipo di molecola di acido nucleico avvenga sotto l'influenza di un fattore specifico, che determini l'ordine in cui i nucleotidi vengono legati l'uno all'altro. Questo fattore, nella cellula, è rappresentato da un'altra molecola (o, eventualmente, parte di molecola) di acido nucleico, che assolve la funzione di « template » o stampo, o, più semplicemente, modello. Il principio che sta alla base della capacità degli acidi nucleici di dirigere la sintesi di nuovo acido nucleico, determinandone la sequenza, deriva dal diverso rapporto di affinità tra le varie basi, rapporto per cui l'adenina tende, come prima descritto, ad unirsi con la timina o con l'uracile (tramite due legami di idrogeno) e la guanina con la citosina e la metilcitosina (tramite tre legami di idrogeno). Questa corrispondenza specifica di base a base fa sì che, in un sistema contenente un acido nucleico e le varie specie di nucleotidi-trifosfati liberi, questi si dispongano lungo il filamento nucleotidico secondo un ordine dipendente dalla sequenza delle basi nel medesimo; quindi, con l'adenina di fronte alla timina (o uracile) e viceversa, e la guanina di fronte alla citosina (o metilcitosina) e viceversa. La sintesi enzimatica dei legami internucleotidici potrà allora svolgersi per opera di un singolo meccanismo enzimatico, aspecifico per quanto riguarda la natura dei singoli nucleotidi di cui viene catalizzata l'unione.

BIOSINTESI DEL DNA

Ricerche condotte negli ultimi anni soprattutto su virus e batteri, ma anche su organismi superiori animali e vegetali, portano a concludere che un meccanismo fondamentalmente universale sia responsabile della duplicazione del DNA.

Questo meccanismo comporta le seguenti tappe: a) separazione dei due filamenti della struttura a doppia elica; b) disposizione, di fronte alle basi di ognuno, dei due filamenti di desossinucleotidi-(5')-trifosfati, secondo le regole di accoppiamento tra le basi (adenina con timina, citosina con guanina); c) formazioni di legami internucleotidici e quindi crescita delle nuove molecole di DNA per una reazione pirofosforilasi, catalizzata da un enzima, la DNA-polimerasi. Esperienze in cui batteri prima coltivati in un mezzo normale sono stati portati e indotti a moltiplicarsi in un mezzo addizionato di basi contenenti un'alta percentuale dell'isotopo pesante dell'azoto ^{15}N , dimostrano che la replicazione del DNA è semiconservativa, nel senso che dopo la prima divisione cellulare, corrispondente alla prima duplicazione del DNA, le molecole di DNA risultano formate da un filamento con ^{15}N (rappresentante uno dei due filamenti del DNA iniziale) unito in doppia elica con un filamento di DNA ricco di ^{14}N (filamento neoformato). In altri termini, ogni replica del DNA porta alla formazione di due molecole di DNA, in ognuna delle quali uno dei due filamenti della doppia elica è quello parentale che viene conservato intatto e l'altro è quello sintetizzato *ex novo*. Per quanto riguarda la natura della reazione enzimatica fondamentale in questo processo, ricerche condotte su sistemi altamente purificati, ad opera soprattutto del gruppo di Kornberg, por-

cofattori e dei substrati richiesti, risultano capaci di effettuare la sintesi di proteine. In tutte le cellule, una larga frazione di m-RNA si ritrova legata ai ribosomi: di regola, diversi ribosomi sono legati ad un unico m-RNA. Ciò dipende dal fatto che, come detto sopra, l'm-RNA nella sintesi proteica scorre sul ribosoma; dopo la sintesi di un certo numero di legami peptidici, viene a lasciar libera, e quindi disposta ad accettare un altro ribosoma, l'estremità dell'm-RNA in cui si trova il « segnale d'inizio », ossia la sequenza che permette l'unione iniziale tra m-RNA e ribosoma. Questi aggregati tra m-RNA e più ribosomi prendono, come prima descritto, il nome di polisomi. I polisomi sono di regola tanto più abbondanti, in una cellula, quanto più attiva è in essa la sintesi proteica.

Nelle cellule con nucleo differenziato, una quantità spesso rilevante di m-RNA è presente nei nuclei. Presumibilmente, solo parte di questo m-RNA è direttamente impegnato nella sintesi proteica, il rimanente permanendo in uno stato di attesa. Numerose osservazioni dimostrano l'esistenza nelle cellule degli organismi superiori di forme provvisoriamente inattive o « mascherate » di m-RNA. L'RNA ribosomico si trova, il più delle volte, associato a proteine basiche formando i ribosomi prima descritti. Negli organismi nucleati i ribosomi sono abbondanti sia nel nucleo (soprattutto nella regione del cosiddetto nucleolo), che nel citoplasma, ove appaiono sia liberi che associati a membrane, e sia come ribosomi isolati (monosomi) che come polisomi. I ribosomi sono inoltre presenti anche nei mitocondri e nei cloroplasti. I ribosomi del citoplasma, dei mitocondri e dei cloroplasti risultano distinguibili tra loro per diversi caratteri, tra i quali il più appariscente è il coefficiente di sedimentazione (nel fegato, 78 S per i ribosomi del citoplasma, 55 S per quelli dei mitocondri; nelle piante 77 S nel citoplasma). È presumibile che a queste differenze corrispondano differenze di struttura dell'r-RNA, oltre che delle proteine costituenti i ribosomi, il che implica che geni diversi presiedano alla sintesi dei rispettivi r-RNA. È a questo riguardo interessante notare come la quantità di DNA che, in base a esperienze di ibridazione, risulta adibita alla sintesi di r-RNA sia di gran lunga maggiore della quantità richiesta per contenere le informazioni (o geni) corrispondenti a poche specie di r-RNA. Ciò suggerisce la possibilità di un'eterogeneità nell'ambito anche di quelle classi di ribosomi che risultano omogenei in base a criteri quali la velocità di sedimentazione.

Biosintesi degli acidi nucleici

La sintesi degli acidi nucleici, nelle condizioni in cui essa ha luogo nella cellula vivente, richiede la soluzione di due problemi principali:

a) Formazione dei legami internucleotidici. La sintesi degli acidi nucleici non può partire dai nucleotidi-monofosfati, in quanto la formazione diretta dei legami internucleotidici (3')-(P)-(5') dai nucleotidi-monofosfati sarebbe fortemente esergonica. È quindi necessario che la sintesi utilizzi come substrati i nucleotidi in una forma tale che la loro unione sia nettamente esergonica. Le forme reattive utilizzate nella biosintesi sono i nucleotidi-trifosfati, in cui due fosfati sono esterificati in serie con il fosfato terminale (in 5') dei mononucleotidi (abbreviazioni: dATP, dGTP, dCTP, dTTP, ATP, GTP, CTP, UTP). I nucleotidi-trifosfati, da soli, non interagiscono *in vitro*; la loro interazione *in vivo* comporta quindi la presenza di catalizzatori, cioè di enzimi specifici.

Nelle cellule degli organismi superiori ai batteri dotati di nucleo o eucarioti, la quantità di DNA per cellula è di circa mille volte maggiore che nei batteri; inoltre, il DNA è rappresentato da diverse molecole (anziché una sola) per un peso complessivo di oltre 10^{12} , avendo ogni molecola di DNA in questi organismi p. mol. molto elevato (fino a 10^8). Nelle cellule degli eucarioti (animali come piante) la frazione più importante del DNA è contenuta nel nucleo, ove, a differenza di quanto avviene nei batteri, esso appare strettamente legato a proteine fortemente basiche ed a p. mol. relativamente modesto, gli istoni. I cromosomi, strutture che si fanno ben visibili al microscopio ottico al momento della divisione cellulare e che da tempo erano state identificate come sede del materiale genetico, constano appunto di fibrille costituite dall'associazione di molte lunghe molecole di DNA a doppio filamento, di istoni, e di quantità variabili di proteine diverse dagli istoni, spesso ricche di amminoacidi fosforilati. Nella struttura del cromosoma i legami (prevalentemente ionici, nonché legami deboli di varia natura) tra DNA, istoni e altre proteine, apparentemente determinano una torsione della struttura dell'aggregato molecolare su se stesso. Ogni cromosoma comprende, secondo le vedute oggi generalmente accettate, molte molecole di DNA diverse tra loro e linearmente susseguentesi lungo l'asse maggiore del cromosoma. In certi casi uno stesso cromosoma contiene molte copie, disposte parallelamente tra loro, di molecole identiche di DNA, come ad es. si verifica nei cromosomi giganti delle ghiandole salivari dei ditteri. Cromosomi di questo tipo diconsi politelici. Nelle cellule degli organismi a nucleo differenziato una frazione non trascurabile di DNA è extranucleare. Negli animali la frazione extranucleare meglio nota è quella presente nei mitocondri, con un p. mol. di circa 10^7 . Nelle piante verdi, oltre che nei mitocondri, quantità apprezzabili di DNA sono presenti nei plastidi, ed in particolare nei cloroplasti. Il DNA dei mitocondri e dei cloroplasti è chiaramente distinguibile da quello nucleare per la diversa densità, per il diverso rapporto tra le basi che lo costituiscono, e per altri caratteri chimici: ad es., il DNA dei cloroplasti appare molto povero di metilcitosina, per contro abbondante nel DNA dei nuclei di tutte le piante. Anche se poco si sa circa lo stato del DNA degli organuli extranucleari, molti dati indicano che esso, come quello nucleare, ha una funzione genetica e contiene presumibilmente una parte dei geni che dirigono la sintesi delle proteine specificamente presenti negli organuli cui è associato.

STATO IN NATURA DELL'RNA

L'RNA è presente in tutti gli organismi, ad eccezione che nella forma adulta delle specie più semplici di virus a DNA, che sintetizzano il loro o i loro m-RNA solo quando, entrati nelle cellule dell'ospite, si moltiplicano. In tutti gli organismi superiori ai virus sono presenti, come si è già detto, tre principali categorie di RNA: m-RNA, r-RNA e t-RNA (o s-RNA). Tutte le specie di RNA appartenenti a questa categoria vengono formate a livello dei tratti di DNA, nucleare o citoplasmatico, che ne dirigono la sintesi determinandone la sequenza delle basi; quindi migrano, nel caso più generale, verso altre regioni della cellula. Poiché vi sono validi motivi per ritenere che la sintesi proteica richieda sempre la presenza di tutte e tre le categorie di RNA, ne consegue che queste debbono essere presenti nel nucleo, nel citoplasma, nei mitocondri, e nei plastidi delle piante. Infatti tutte queste frazioni cellulari, isolate e provviste dei

uno dei siti accettori di amminoacil-t-RNA. A questo punto si ha uno scorrimento dell'm-RNA sul ribosoma, per uno spazio corrispondente ad una tripletta di basi; un nuovo amminoacil-t-RNA si dispone di fronte alla nuova tripletta di m-RNA venuta a disporsi nel sito attivo e si ha quindi formazione di un nuovo legame peptidico. Il processo continua a ripetersi, con il progressivo scorrimento dell'm-RNA sul ribosoma, la liberazione di RNA e la formazione di una catena polipeptidica, che rimane legata solamente tramite l'amminoacil-t-RNA terminale al complesso m-RNA-ribosoma. Progredendo lo scorrimento dell'm-RNA, questo finisce per portare sul sito attivo del ribosoma una tripletta caratterizzata dall'incapacità di fissare amminoacil-t-RNA, e definita come segnale di termine. Quando ciò accade, il polipeptide formato si stacca dal ribosoma, e il processo di sintesi del polipeptide è terminato. Le trasformazioni successive dei polipeptidi fino a dare le proteine o gli enzimi nella loro forma finale non interessano più, almeno direttamente, il sistema ribosoma-acidi nucleici, e riguardano più propriamente lo studio della sintesi proteica, che esamina anche le condizioni richieste per l'interazione fra triplette caratteristiche dell'm-RNA (codoni) e triplette caratteristiche dei t-RNA (anticodoni). Lo studio di queste interazioni, e del rapporto tra sequenza di basi nel DNA, sequenza di basi nell'm-RNA, riconoscimento dagli amminoacil-t-RNA, e quindi determinazione della sequenza degli amminoacidi nelle proteine, viene definito come il problema del codice genetico. Il processo per cui i vari m-RNA dirigono la sintesi di polipeptidi specifici è definito come «traduzione» delle medesime informazioni.

Nei virus, il cui genoma è costituito da una molecola di DNA, questa sovrintende, oltre che alla propria duplicazione, alla sintesi di un numero in genere ristretto di m-RNA, che a loro volta dirigono la sintesi di proteine specifiche del virus (proteine strutturali, alcuni enzimi e proteine regolatrici della sintesi di acidi nucleici del virus stesso o della cellula ospite). Questi m-RNA del virus utilizzano per la sintesi proteica i ribosomi e, di regola, anche i t-RNA della cellula ospite. Nei virus a RNA la situazione è sostanzialmente analoga, salvo tutte le complicazioni inerenti al fatto che qui, mancando il DNA, l'RNA adempie, oltre alla normale funzione nel dirigere la sintesi proteica, anche quella di materiale genetico primario e cioè quella dell'autoduplicazione. Ulteriori informazioni circa il meccanismo di duplicazione del DNA e dell'RNA, e della sintesi dell'RNA diretta dal DNA, vengono riferite nei paragrafi che seguono.

Stato degli acidi nucleici in natura

STATO IN NATURA DEL DNA

Il DNA è presente in tutti gli organismi, eccetto i virus a RNA. Come prima descritto, nei virus e probabilmente nei batteri esso è presente come unica molecola, con p. mol. dell'ordine di 10^6 - 10^8 nei virus e di 10^9 nei batteri. La molecola del DNA nei batteri è a doppio filamento, mentre quella dei virus, nella forma adulta infettante, può essere a doppio filamento o, in alcune specie, a filamento semplice. In questo caso, la forma a filamento semplice, allorché il virus è penetrato nell'ospite, dirige la sintesi di un filamento con sequenza di basi complementare, riformandosi così, durante il processo e per un periodo sia pur breve di tempo, la struttura a doppio filamento caratteristica del DNA.

delle proteine, o meglio dei polipeptidi che ne costituiscono la parte essenziale, viene esplicitata attraverso una divisione di compiti tra le principali categorie di acidi nucleici: m-RNA (messaggeri), r-RNA (ribosomici), t-RNA (o di trasferimento). È possibile che oltre a queste categorie altre ne siano presenti, con funzione di controllo sulla sintesi delle specie di RNA precedentemente descritte.

Una descrizione sintetica della funzione dei diversi acidi nucleici, in tutti gli organismi superiori ai virus, può essere tracciata come segue:

a) Il DNA presente nella cellula, caratterizzato da una ben definita struttura primaria e da una struttura secondaria a doppia elica e comprendente l'insieme dei geni (genoma), provvede, in presenza di adeguati substrati e cofattori, alla propria duplicazione. In questo processo ognuno dei due filamenti del DNA dirige la sintesi di un filamento, a sé complementare per la sequenza di basi e quindi identico all'altro dei due filamenti del DNA originario.

b) In momenti e in condizioni distinte da quelle in cui avviene il processo di autoduplicazione, uno ed uno solo dei due filamenti del DNA dirige la sintesi delle varie specie di RNA (m-RNA, t-RNA e r-RNA). In questo processo sono interessati, in ogni determinato momento della vita della cellula, solo alcuni tratti ben definiti del DNA (cistroni). Le sequenze di basi nelle varie molecole di RNA formate vengono determinate per complementarietà dalle sequenze delle basi dei tratti di DNA che fungono da informatori. Questo processo prende il nome di «trascrizione».

c) Tra le diverse categorie di RNA così sintetizzati, gli m-RNA possono considerarsi già pronti alla loro funzione, anche se risulta che essi possono essere temporaneamente immagazzinati nella cellula in forme inattive, tuttora assai poco note. I diversi t-RNA vengono legati al gruppo carbossilico degli amminoacidi per cui sono specifici, dando luogo alla sintesi dei vari amminoacil-t-RNA o amminoacidi attivati. Gli r-RNA si legano con un numero elevato di proteine basiche a p. mol. di circa 20 000 dando luogo a dei complessi r-RNA-proteine, che costituiscono i ribosomi. Un sito del ribosoma è caratterizzato da una affinità preferenziale per determinate sequenze di basi (segnali di inizio) presenti negli m-RNA naturali; l'm-RNA viene così legato da un ribosoma (nel caso più semplice) con formazione del complesso m-RNA-ribosoma.

d) I ribosomi presentano inoltre almeno altri due siti dotati di affinità particolare per gli amminoacil-t-RNA. Le specie di amminoacil-t-RNA che vanno ad occupare questi siti sono determinate dalla sequenza di basi del tratto di m-RNA precedentemente legato sul ribosoma. Infatti ogni t-RNA contiene un tratto in cui una specifica tripletta di basi, quando il t-RNA stesso è fissato sul sito attivo del ribosoma, si presenta nella posizione adatta per interagire formando legami di idrogeno con una tripletta di basi dell'm-RNA legato al ribosoma. La possibilità di unione fra la tripletta dell'RNA che sopraggiunge e la tripletta dell'RNA fissato dipende dalla possibilità di formazione dei legami di idrogeno, e quindi dalla complementarietà delle sequenze delle basi nelle due triplette. In altri termini, viene scelto, per la fissazione sul ribosoma di fronte ad una data tripletta dell'm-RNA, quell'amminoacil-t-RNA la cui sequenza di basi è complementare alla tripletta «esposta» dell'm-RNA.

e) Dopo che due molecole di amminoacil-t-RNA sono state disposte sul ribosoma in posizione adeguata, il carbonile dell'amminoacido di uno degli amminoacil-t-RNA interagisce con il gruppo amminico dell'altro con la formazione di un legame peptidico, accompagnata da liberazione di un t-RNA e quindi di

delle proprietà fisiche del DNA provocate dalla transizione sono rilevanti, e ad es., tra le proprietà idrodinamiche, la viscosità subisce una diminuzione di oltre dieci volte; questa enorme caduta della viscosità è dovuta al passaggio della molecola dalla configurazione a gomitolo rigido ed espanso a quella molto più compatta a gomitolo statistico. Anche le proprietà ottiche presentano variazioni importanti al punto di transizione (fig. 7); queste variazioni sembrano essere principalmente dovute alla perdita della struttura regolarmente «impilata» delle basi. Infine la densità di flottazione delle molecole denaturate in gradiente di densità di cloruro di cesio è più elevata di quella delle molecole native; questa variazione della densità di flottazione sembra essere legata principalmente ad una differente idratazione delle molecole denaturate rispetto a quelle native.

ASPETTI BIOCHIMICI

Gli aspetti più propriamente chimici degli acidi nucleici sono stati illustrati nella prima parte di questa voce. La fondamentale importanza biologica degli acidi nucleici tuttavia richiede una breve descrizione di alcuni punti fondamentali della biochimica di questi composti: la funzione biologica, lo stato in natura ed il meccanismo di biosintesi.

Funzione biologica

È generalmente accettato che gli acidi nucleici costituiscano l'unico materiale genetico presente nella cellula; in altri termini, che solo in questi composti siano immagazzinate, sotto forma di strutture chimiche definite, le informazioni, trasmissibili attraverso la moltiplicazione cellulare e la riproduzione dell'organismo, che sono responsabili dell'ereditarietà dei caratteri distintivi delle varie specie e varietà. È parimenti accettato che le mutazioni, naturali o sperimentalmente indotte, siano la conseguenza di variazioni di struttura chimica a livello degli acidi nucleici.

Queste conclusioni si basano su di una serie di considerazioni, tra le quali decisivo è il riconoscimento che: *a)* solo gli acidi nucleici, tra le varie macromolecole presenti nei viventi, sono finora risultati capaci di autoduplicarsi o, più precisamente, di catalizzare la sintesi di molecole identiche a quella che serve da modello; *b)* solo gli acidi nucleici presentano, oltre a questa capacità di autoduplicazione, quella di dirigere in modo specifico la sintesi di macromolecole di altra natura, le proteine, la cui struttura chimica determina le caratteristiche dei catalizzatori specifici (enzimi) delle reazioni che si svolgono negli organismi viventi.

Queste due funzioni, di autoriproduzione e di direzione della sintesi di proteine specifiche, non sono comune attributo di tutti gli acidi nucleici. In tutti gli organismi superiori ai virus, la capacità di autoduplicazione sembra ristretta al DNA, che assolve, oltre a questa funzione, anche quella di dirigere la sintesi dei vari tipi di RNA, che a loro volta dirigono quella delle proteine. Tra i virus, alcuni presentano una situazione del tipo di quella sopra descritta (DNA con funzione sia di autoduplicazione che di direzione della sintesi di RNA), altri, soprattutto virus di vegetali, non contengono DNA. In questi ultimi la funzione di autoduplicazione è devoluta all'RNA, che viene così a concentrare i due caratteri di materiale genetico e di diretto informatore per la sintesi di proteine specifiche. La funzione universale degli RNA nel dirigere la sintesi

lizzazione, sono principalmente la temperatura, la forza ionica, i solventi organici, gli alcali o gli acidi. La transizione elica-gomitolo statistico può essere seguita studiando la variazione in una o più delle proprietà fisiche del DNA che vengono modificate dalla transizione: assorbimento UV, potere rotatorio, viscosità, densità di flottazione in un gradiente di densità di cloruro di cesio. In ogni caso il fenomeno assume la forma di una transizione con fenomeni cooperativi importanti: esso è stato paragonato al fenomeno della fusione di un solido cristallino (transizione stato cristallino - stato amorfo).

La fig. 7 mostra il fenomeno di fusione del DNA, quale può esser messo in evidenza studiando l'aumento di assorbimento UV a 260 m μ che accompagna l'aumento di temperatura della soluzione di DNA. La temperatura di fusione è notevolmente diversa per DNA aventi composizione in basi diversa; ad es. il DNA del batterio *Pneumococcus*, che contiene circa il 40% dei nucleotidi come G e C, fonde ad una temperatura nettamente inferiore a quella del DNA del batterio *Serratia*, che contiene circa il 60% di G e C (fig. 7). In effetti,

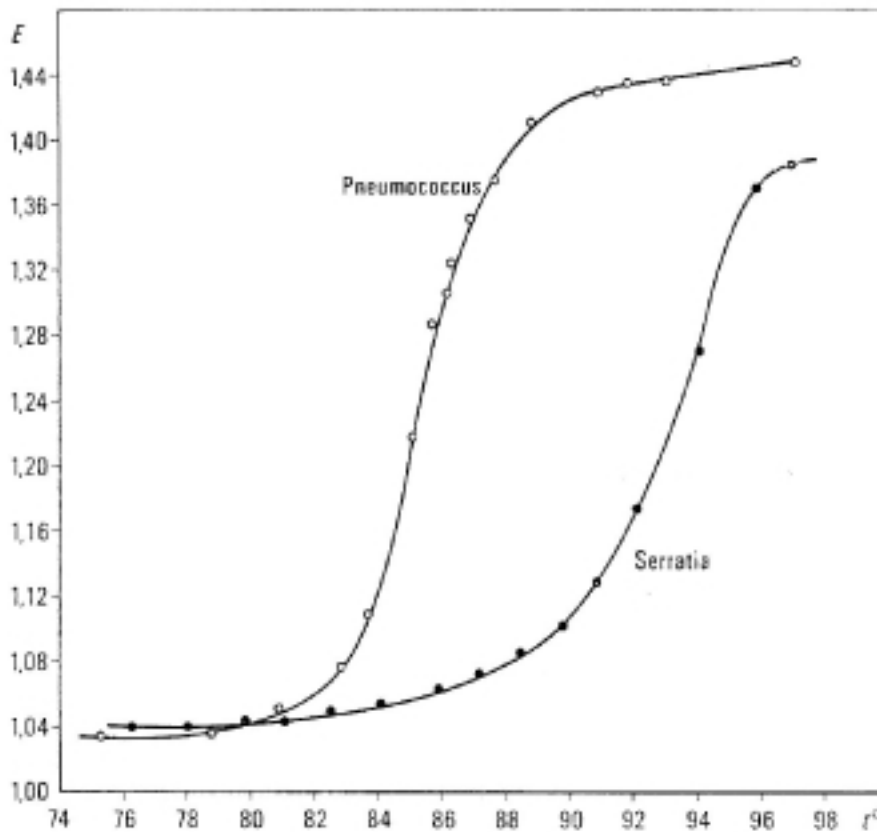


Fig. 7. Fusione di DNA di origine diversa (da *Pneumococcus* e da *Serratia*).

se si studiano le temperature di fusione di molti DNA a diversa composizione media in basi, si trova una relazione lineare tra il contenuto in G e C e la temperatura di fusione. A temperature più elevate di quella di fusione le due catene del DNA si separano: se a questo punto la soluzione di DNA viene raffreddata rapidamente, le due catene restano separate, assumendo una struttura del tipo presentato, ad es., dall'RNA ribosomico (fig. 4), cioè una struttura con segmenti ad elica semplice e segmenti in cui la catena ripiegata su se stessa presenta una struttura a doppia elica irregolare. Se, viceversa, il raffreddamento è lento, può aver luogo una ricombinazione specifica delle due catene. Le modificazioni

dei gruppi amminici) che aggiungono dei protoni al di sotto di pH 4,5, e gli ossidrili enolici, che si ionizzano al di sopra di pH 9,0 spostando verso le forme enoliche l'equilibrio cheto-enolico, nel quale ai pH più bassi prevalgono i tautomeri chetonici. Inoltre, al di sopra di pH 3 ogni gruppo fosforico è ionizzato e presenta una carica negativa: nella zona di pH compresa tra 5 e 9 il DNA è perciò polielettrolita anionico.

Il raggio di Debye-Huckel degli ioni fosforici varia inversamente alla radice quadrata della forza ionica: nel caso del DNA a doppia elica la repulsione tra le cariche diventa importante solo a forze ioniche inferiori a 0,1; a bassissime forze ioniche (10^{-4} , 10^{-5}) e basse concentrazioni in DNA ($< 10 \mu g/ml$) si ha il collasso della struttura a doppia elica. Al di fuori della zona di pH 5-9, la ionizzazione delle basi diventa importante perché le cariche che su esse si localizzano provocano la scomparsa delle forze di impilamento delle basi e dei legami di idrogeno e quindi impediscono la formazione della struttura a doppia elica.

b) *Forze di impilamento delle basi (base-stacking forces)*. Queste sono costituite dalle forze elettrostatiche dipolo-dipolo e dipolo-dipolo indotto e dalle forze di London, che risultano dalle interazioni delle basi eterocicliche del DNA quando queste sono impilate verticalmente in una struttura ad elica. Queste forze sono importanti nel mantenere l'integrità di segmenti a conformazione elicoidale nel DNA a catena singola come anche nella struttura secondaria del DNA nativo a doppia elica. La stabilizzazione conferita alla struttura da queste forze dipende dalla composizione in basi e dalla sequenza di queste nel DNA, essendo diversa l'energia di interazione per le diverse coppie di basi.

c) *Legami di idrogeno*. Per quanto il contributo quantitativo dei legami di idrogeno alla stabilizzazione delle strutture a doppia elica non abbia probabilmente l'importanza che gli si attribuiva un tempo, pur tuttavia queste forze rimangono le sole responsabili dell'appaiamento specifico delle basi. Inoltre, poggiano su di esse il principale meccanismo attraverso il quale il DNA esercita le sue funzioni biologiche, attraverso la sintesi su modello di specifiche sequenze polinucleotidiche (duplicazione del DNA o sintesi dell'RNA messaggero). La correlazione che è stata stabilita tra il contenuto in guanina-citosina e la stabilità della doppia elica, misurata dalle temperature di fusione di DNA di origine diversa, sembra mostrare il più alto potenziale di legami di idrogeno di questa coppia di basi, che presenta tre legami di idrogeno contro i due della coppia timina-adenina.

d) *Forze idrofobiche*. Si riferiscono alla stabilità conferita alla struttura dall'architettura di un polinucleotide a elica, in cui i gruppi fosforici polari sono alla superficie in un ambiente acquoso mentre gli anelli delle basi eterocicliche sono all'interno dove la solvatazione è minore. L'importanza di queste forze è stata suggerita da una correlazione tra gli effetti che certi elettroliti esplicano sulla struttura dell'acqua e sulla stabilità della doppia elica del DNA.

DENATURAZIONE DEL DNA

La struttura a doppia elica del DNA nativo può essere distrutta da una serie di agenti che incidono sulle forze di stabilizzazione della doppia elica. Questi agenti, che possono modificare prevalentemente un dato tipo di forze di stabi-

interessante è l'esistenza di due solchi, uno grande ed uno piccolo, sulla superficie della macromolecola. Il diametro della molecola di DNA (struttura B) è uguale a 20 Å, il suo passo è uguale a 34 Å. Il piano delle basi è perpendicolare all'asse della molecola, quello degli zuccheri è parallelo a tale asse.

PROPRIETÀ FISICHE

Il p. mol. dei preparati di DNA ottenuti con i comuni metodi di estrazione da virus, batteri e cellule animali o vegetali è molto elevato, dell'ordine di alcuni milioni. È facile dimostrare che questo p. mol. è notevolmente più basso di quello che si può ottenere se nella preparazione si evitano accuratamente le forze di taglio idrodinamiche dovute all'impiego di omogeneizzatori, siringhe, pipette ecc. Così, ad es., è stato possibile ottenere da virus preparati di DNA in cui tutto il DNA della particella virale si trova sotto forma di un unico filamento; ad es. il DNA del batteriofago T-2 è stato ottenuto in una forma di p. mol. uguale a $130 \cdot 10^6$. Nel caso dei batteri e delle cellule animali e vegetali sono stati ugualmente ottenuti, operando con speciali precauzioni, filamenti con p. mol. dell'ordine di diverse centinaia di milioni. Questi ordini di grandezza si avvicinano, nel caso di alcuni batteri, al « peso molecolare » corrispondente alla totalità del DNA in essi contenuto, mentre sono ancora lontani da tale valore per le cellule degli organismi superiori. Per fissare le idee, sarà bene ricordare che la quantità totale presente nel più piccolo virus contenente DNA finora descritto, il fago Ψ X174, corrisponderebbe ad un p. mol. di $1,6 \cdot 10^6$; questa stessa quantità corrisponderebbe ad un p. mol. di $130 \cdot 10^6$ per il fago T-2, di $800 \cdot 10^6$ per il batterio *Haemophilus influenzae*, di $2200 \cdot 10^6$ per il batterio *Escherichia coli* e di oltre un milione di milioni per una cellula di mammifero.

Mentre il concetto di cromosoma come singola molecola di DNA appare corretto per i virus ed è probabilmente valido anche per i batteri, appare evidente che esso non può applicarsi alle cellule degli organismi superiori. I cromosomi batterici si replicano come strutture singole provviste di un solo punto di crescita, e la velocità di duplicazione calcolata per una simile struttura è in accordo col tempo di duplicazione del cromosoma osservato sperimentalmente. Viceversa, il tempo calcolato per la duplicazione di un cromosoma di un organismo superiore, concepito come un'unica molecola di DNA, è di gran lunga superiore al tempo di duplicazione osservato; d'altro canto, si è anche dimostrato attraverso studi autoradiografici che in questi cromosomi la sintesi avviene simultaneamente in più punti di accrescimento. È dunque probabile che esista, nelle cellule degli organismi superiori, una molteplicità di sub-unità di DNA che si replicano indipendentemente l'una dall'altra. Una grave complicazione nello studio del DNA di organismi superiori è costituita dal fatto che il DNA è presente nei cromosomi sotto forma di complesso con proteine basiche, le protamine nel caso degli spermatozoi e gli istoni negli altri casi.

La conformazione del DNA nativo in soluzione è quella di un polimero con flessibilità limitata, il che significa che dal punto di vista delle proprietà idrodinamiche le molecole di DNA hanno un comportamento di gomitol rigidi e fortemente espansi; questo fatto è dovuto all'esistenza di varie forze che stabilizzano la struttura del DNA. Queste forze sono:

a) *Forze elettrostatiche attribuibili alla ionizzazione.* Come già accennato, i gruppi ionizzabili presenti sulle basi comprendono atomi d'azoto dell'anello (e forse

catene polinucleotidiche avvolte a spirale attorno ad uno stesso asse. Mediante la costruzione di modelli molecolari, essi poterono mettere in evidenza che le basi puriniche e pirimidiniche potevano essere inserite in questa struttura qualora esse fossero disposte in coppie formate da una purina ed una pirimidina collegate da legami di idrogeno. Le sole coppie di basi permesse dalla struttura proposta erano le coppie adenina-timina e guanina-citosina.

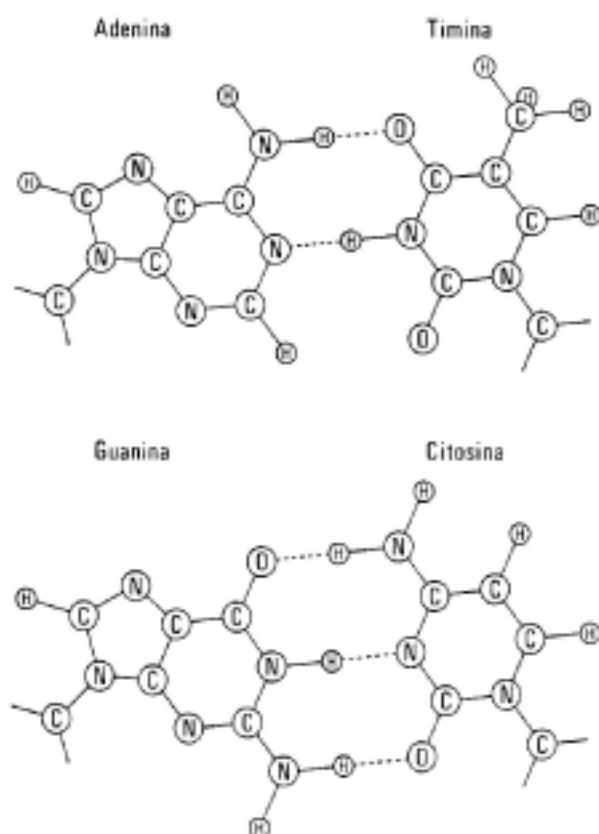


Fig. 5. Coppie di basi nella struttura di Crick e Watson.

La fig. 5 mostra queste due coppie di basi con i legami di idrogeno che le collegano. È qui importante ricordare che lavori precedenti avevano dimostrato che i gruppi amminici delle basi del DNA nativo non presentano curve di titolazioni «normali»; ciò faceva pensare che questi gruppi fossero impegnati in legami di idrogeno. Inoltre, come si è prima descritto, Chargaff aveva messo in evidenza come, in DNA di origine diversa, l'adenina e la timina erano presenti in quantità equimolecolari e così pure la citosina e la guanina.

Una rappresentazione schematica del modello di Crick e Watson è quella data nella fig. 6; i due nastri rappresentano le catene ribofosforiche, mentre le coppie di basi che le uniscono sono indicate da sbarre orizzontali formanti, per così dire, i gradini di una scala a chiocciola. Un dettaglio importante della struttura è l'antiparallelismo delle due catene: alla direzione $3' \rightarrow 5'$ in una catena, corrisponde la direzione $5' \rightarrow 3'$ nell'altra catena. Un altro dettaglio



Fig. 6. Modello di Crick e Watson.

quella delle molecole di RNA. Questa conclusione è confermata dal fatto che per degradazione del DNA con enzimi appropriati si possono ottenere nucleosidi-3'-fosfati o nucleosidi-5'-fosfati. L'assenza di un ossidrile in C'₂ rende impossibile la formazione di fosfati ciclici, e perciò il DNA, a differenza dell'RNA, è resistente agli alcali. La composizione in basi di preparati di DNA di origine diversa presenta notevoli differenze a seconda che essi provengano da specie animali, vegetali, batteriche o virali diverse, mentre si ottengono risultati identici se si confrontano DNA provenienti da organi e tessuti diversi di una stessa specie. La tabella 3 riassume la composizione in basi di preparati di diversa origine.

Fonte	A	G	C	T	5-MC (*)
timo di vitello	28,2	21,5	21,2	27,8	1,3
milza di bue	27,9	22,7	20,8	27,3	1,3
spermatozoi di toro	28,7	22,2	20,7	27,2	1,3
midollo osseo di ratto	28,6	21,4	20,4	28,4	1,1
testicoli di aringa	27,9	19,5	21,5	28,2	2,8
<i>Paracentrotus lividus</i>	32,8	17,7	17,3	32,1	1,1
germe di grano	27,3	22,7	16,8	27,1	6,0
lievito	31,3	18,7	17,1	32,9	—
<i>Escherichia coli</i>	26,0	24,9	25,2	23,9	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15,1	34,9	35,4	14,6	—
ΨX174	24,3	24,5	18,2	32,3	—

(*) 5-metilcitosina

Tab. 3. Proporzioni molari delle basi in DNA diversi.

Considerando i dati presentati si possono osservare delle regolarità di composizione che furono sottolineate per primo da Chargaff: la somma delle purine è uguale alla somma delle pirimidine, mentre la somma delle basi amminiche (adenina e citosina) è uguale alla somma delle basi chetoniche (guanina e timina), ed infine l'adenina e la timina sono presenti in quantità equimolecolari, come d'altra parte la guanina e la citosina. Questa equivalenza quantitativa di A e T e di G e C è di importanza fondamentale nella struttura secondaria del DNA.

STRUTTURA SECONDARIA

Dopo gli studi iniziali di Astbury e quelli successivi di Franklin e Gosling, Wilkins e il suo gruppo effettuarono estese ricerche strutturali sull'architettura molecolare del DNA utilizzando i diagrammi di diffrazione dei raggi X ottenuti da fibre di DNA. Questi diagrammi sono di due tipi diversi, indipendentemente dall'origine del DNA usato. Quando il contenuto in acqua delle fibre è prossimo al 40%, il diagramma è quello di una struttura cristallina (struttura A); quando il contenuto in acqua è maggiore si ha invece un diagramma di struttura paracristallina (struttura B) con un impacchettamento meno regolare delle macromolecole. La periodicità lungo l'asse della fibra è uguale a 28 Å nella struttura A, mentre è uguale a 34 Å nella struttura B. Essendo la massima distanza tra due gruppi fosforici successivi nella catena completamente estesa uguale a 7 Å, ciascun « periodo » comprende più gruppi fosforici. Per spiegare queste ed altre osservazioni, Watson e Crick immaginarono che la molecola di DNA avesse la struttura di una doppia elica destrorsa, formata da due

luite i due RNA consistono di catene polinucleotidiche contenenti brevi tratti a doppia elica più o meno perfetta nei quali l'appaiamento delle basi avviene tra A e U e tra G e C; queste regioni a elica costituiscono dal 40 al 70% dell'RNA; il resto è formato da regioni disordinate con catena estesa (fig. 4).

b) *RNA solubile o RNA di transfer*. Questo tipo di RNA è costituito da un numero piuttosto grande di specie molecolari diverse, ciascuna delle quali può specificamente legare in modo reversibile un determinato amminoacido. Gli s-RNA costituiscono circa il 15% dell'RNA totale della cellula. Essi hanno una costante di sedimentazione di circa 4 S ed un p. mol. compreso tra 25 000 e 30 000.

Come si è prima descritto, è attualmente nota la sequenza dei nucleotidi di un certo numero di s-RNA; molto meno si sa circa la struttura secondaria di queste macromolecole, che tuttavia risultano costituite da regioni a doppia elica e da regioni disordinate.



Fig. 4. *Struttura ad elica dell'RNA ribosomico.*

giallo della rapa) la loro struttura in soluzione è simile a quella dell'RNA ribosomico, cioè presenta un alternarsi irregolare di strutture a doppia elica e di catene semplici (fig. 4).

c) *RNA messaggero*. È un tipo di RNA che, almeno nei batteri, si rinnova molto rapidamente. La sua composizione in basi è simile a quella del DNA della specie da cui proviene. L'RNA messaggero costituisce meno del 5% dell'RNA totale; il suo p. mol. sembra essere molto elevato, superiore a 500 000. Gli RNA virali hanno in alcuni casi (*Reovirus*, *wound tumor virus* ecc.) strutture secondarie a doppia elica del tipo che si trova nel DNA; in altri casi (virus del mosaico del tabacco, virus del mosaico

Struttura e proprietà del DNA

STRUTTURA PRIMARIA

Il legame internucleotidico presente nel DNA è un legame fosfodiesterico, come nel caso dell'RNA. Poiché il C₄ dello zucchero dei nucleotidi partecipa alla formazione dell'anello furanoso e il C₂ non porta un ossidrile, sono disponibili per la formazione dei legami internucleotidici solo gli ossidrili in C₃ e C₅; inoltre, non essendo alcun ossidrile del desossiribosio del DNA titolabile tra pH 12,0 e 13,5, si deve dedurre che nella struttura del DNA tutti questi gruppi sono bloccati. D'altra parte, i gruppi amminici e i gruppi ossidrilici delle basi non sono sostituiti e la dissociazione fosforica secondaria è praticamente assente. Tutti questi dati indicano chiaramente che le molecole di DNA hanno una struttura a catena non ramificata con legami fosfodiesterici 3' → 5' come

Composizione in nucleotidi. Questa è stata determinata per i vari tipi di RNA utilizzando campioni di diversa origine. Pur trattandosi, come già sottolineato, di miscele di specie molecolari diverse, l'analisi globale (tab. 2) ha messo in evidenza differenze legate ai tipi di RNA quando questi siano estratti da uno stesso organismo, o alle specie biologiche quando si consideri lo stesso tipo di RNA.

Due risultati importanti ottenuti dalle analisi in nucleotidi sono il fatto che la composizione dell'RNA messaggero è molto vicina a quella del DNA della stessa specie biologica, e l'equivalenza A : U, e G : C presentata da alcuni RNA virali.

Fonte	A	G	C	U	ψ U (*)	B. M. (**)
s-RNA di lievito	19,4	26,6	25,1	20,1	4,6	3,1
s-RNA di fegato di coniglio	16,6	31,1	27,8	15,9	4,3	3,5
s-RNA di <i>Escherichia coli</i>	18,3	30,3	30,3	15,9	2,4	2,2
r-RNA di <i>Escherichia coli</i>	25,2	31,5	21,6	21,7	—	—
m-RNA di <i>Escherichia coli</i>	25,1	27,1	24,1	23,7	—	—
virus del mosaico del tabacco	29,8	25,4	18,5	26,5	—	—
virus della poliomielite	28,6	24,0	22,0	25,4	—	—
Raovirus tipo 3	28,0	22,3	22,0	27,9	—	—

(*) *Pseudouracile* (**) *Basi metilate*

Tab. 2. *Proporzioni molari delle basi in RNA diversi.*

Sequenza dei nucleotidi. Questo problema, estremamente difficile, è stato risolto per la prima volta nel 1965, dopo sette anni di lavoro, da Holley per l'RNA di transfer dell'alanina. Attualmente è nota la sequenza in nucleotidi di cinque altri t-RNA.

Nelle ricerche di Holley, superata la grossa difficoltà preliminare della preparazione in quantità sufficiente dell'alanil-s-RNA, l'analisi dimostrò che questa molecola conteneva circa ottanta nucleotidi.

La sua catena fu spezzata in frammenti di una certa grandezza con due enzimi aventi diversa specificità e cioè la ribonucleasi pancreatica e la ribonucleasi T1: la prima scinde la catena dell'RNA a destra dei nucleotidi pirimidinici (nella notazione convenzionale già indicata) producendo frammenti che terminano con una citidina-3'-fosfato o un'uridina-3'-fosfato; la ribonucleasi T1 scinde invece l'RNA a destra dell'acido guanilico, producendo frammenti che terminano con una guanosina-3'-fosfato. I diversi oligonucleotidi di differente lunghezza furono quindi separati fra di loro mediante cromatografia su colonne di DEAE, (diethylaminoetil) cellulosa. La composizione di ciascun oligonucleotide fu successivamente determinata mediante idrolisi alcalina e analisi dei nucleotidi secondo le tecniche abituali; in questo modo si otteneva automaticamente la sequenza dei dinucleotidi, poiché il nucleotide di destra era determinato dal particolare enzima utilizzato. Per i frammenti più grandi la sequenza fu determinata mediante attacco con esonucleasi (fosfodiesterasi) di veleno di serpente, un enzima che stacca i nucleotidi uno alla volta dando una miscela di frammenti più piccoli con tutte le lunghezze intermedie possibili. La miscela può essere risolta in frazioni di lunghezza omogenea mediante frazionamento su colonne di cellulosa. La determinazione del nucleotide terminale all'estremità destra di ciascuna frazione di lunghezza omogenea è ottenibile con un metodo

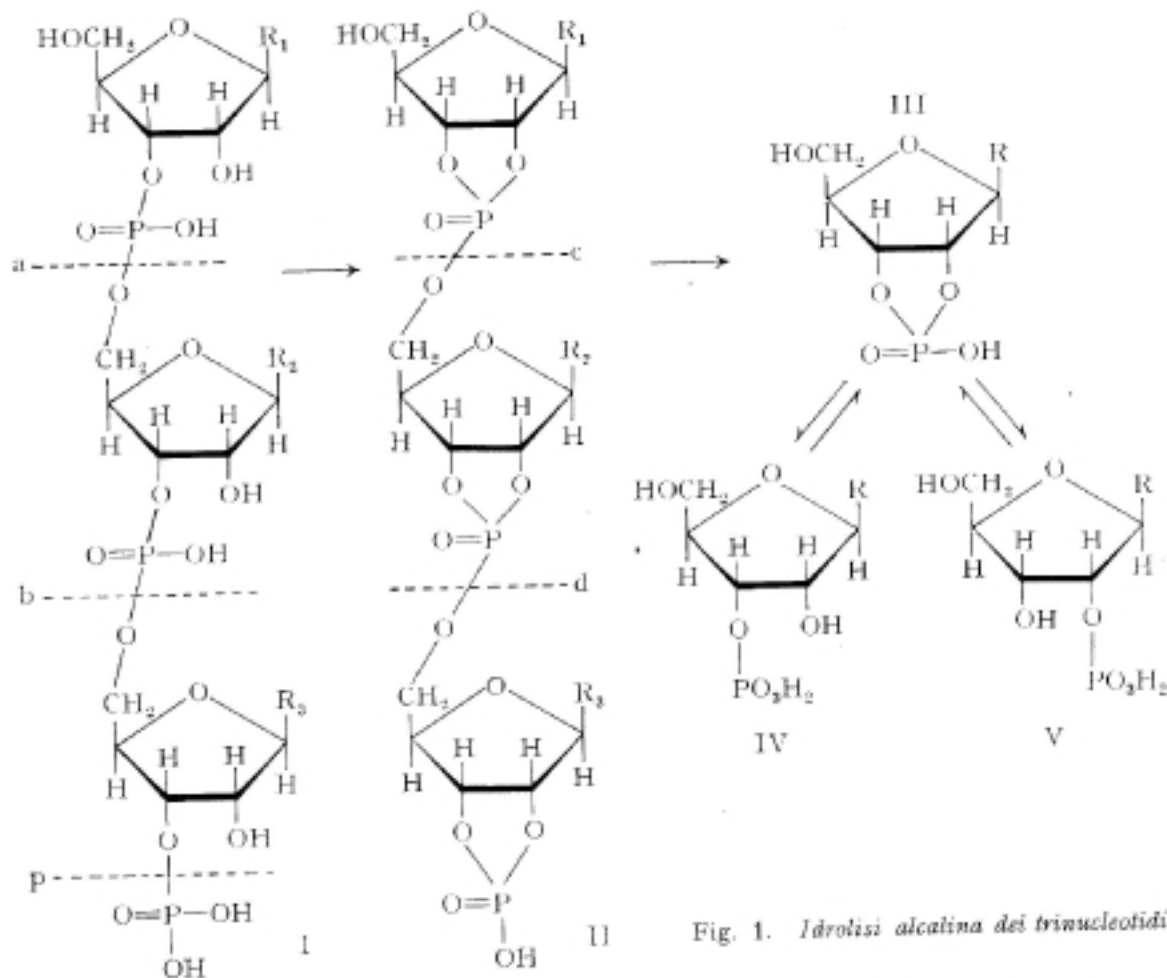


Fig. 1. *Idrolisi alcalina dei trinucleotidi.*

2', 3'-fosfati ciclici(III) che successivamente danno luogo ad una miscela di nucleosidi 2'- e 3'-fosfati (IV e V).

La rappresentazione delle catene polinucleotidiche con formule del tipo mostrato nella fig. 1 è poco pratica e viene convenientemente sostituita dalla notazione schematica (fig. 2 a), in cui la sbarra verticale indica la catena di atomi di carbonio dello zucchero con la base unita al C'₁, il punto di mezzo della sbarra corrisponde al C'₃, e l'estremità inferiore al C'₅; la linea diagonale corrisponde ad un legame C'₃ → C'₅. Nella notazione ulteriormente semplificata (fig. 2 b), il gruppo fosforico è indicato da p; quando questo viene scritto a destra del nucleoside, rappresentato dall'iniziale maiuscola della base corrispondente, ciò significa che il residuo fosforico è legato al C'₃; quando esso viene invece scritto a sinistra ciò significa che tale residuo è legato al C'₅. I nucleotidi ciclici vengono indicati con un punto esclamativo: così C! è un citidin-2',3'-fosfato ciclico.

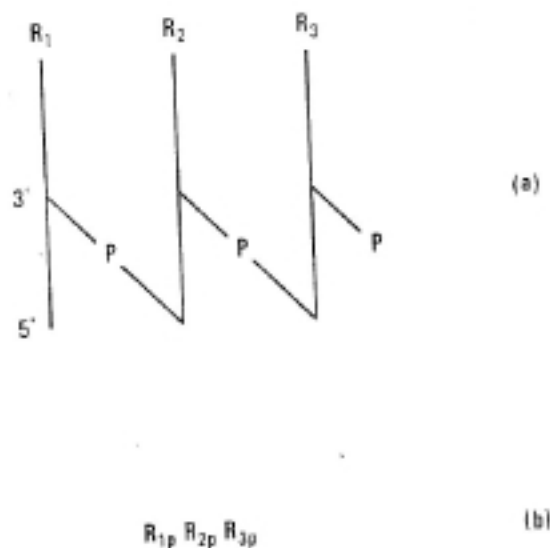


Fig. 2. *Rappresentazione schematica delle catene polinucleotidiche.*

identiche tra di loro. Inoltre, un gran numero di virus contiene come acido nucleico l'RNA ma, a differenza dei casi precedenti, le macromolecole di RNA provenienti da un determinato virus sono identiche tra di loro. Le diverse specie di RNA summenzionate hanno una funzione fondamentale nella biosintesi delle proteine (*vedi*). I diversi RNA presentano notevoli differenze sia al livello della struttura primaria, cioè della composizione e della sequenza dei nucleotidi, sia al livello della struttura secondaria che essi presentano *in vivo* e *in vitro*. Qui di seguito verrà successivamente considerato quanto è noto circa questi due livelli di organizzazione macromolecolare presentati dagli RNA.

STRUTTURA PRIMARIA

Tre sono i punti che interessano al riguardo e cioè: 1) la natura del legame internucleotidico; questo è stato dimostrato essere lo stesso in tutte le specie di RNA considerate; 2) la composizione in nucleotidi, che è diversa per gli RNA appartenenti ai tre tipi principali e per le diverse specie molecolari che li costituiscono; 3) la sequenza dei nucleotidi nella macromolecola dell'RNA; questa è stata finora determinata soltanto per alcuni RNA appartenenti al gruppo degli s-RNA.

Legame internucleotidico. L'idrolisi alcalina dell'RNA è accompagnata dalla parziale neutralizzazione dell'alcali impiegato e ciò suggerisce l'ipotesi che alcuni o tutti i gruppi fosforici partecipino al legame internucleotidico. Poiché l'RNA intatto può essere privato dei gruppi amminici per trattamento con l'acido nitroso, è chiaro che i gruppi amminici non partecipano al legame; del pari, i gruppi ossidrilici della guanina e dell'uracile non intervengono nella formazione del legame internucleotidico poiché la titolazione elettrometrica mostra che essi nell'RNA non sono sostituiti. Mentre gli studi di Levene e Harris avevano condotto alla conclusione che i nucleotidi provenienti dall'RNA erano sempre dei nucleosidi-3'-fosfati, fu in seguito possibile dimostrare mediante cromatografia su resine a scambio ionico che l'idrolizzato alcalino di RNA era formato da una miscela di ribonucleosidi-2'- e 3'-fosfati. D'altro canto, per digestione dell'RNA con fosfodiesterasi (esonucleasi) di veleno di serpente, Cohn e Volkin ottennero ribonucleosidi-5'-fosfati [oltre a piccole quantità di ribonucleosidi-2'-(3'),5'-difosfati]. Questi risultati indicavano che l'ossidrilico in 5' partecipava certamente al legame internucleotidico; inoltre, questo ossidrilico doveva essere legato dal fosfato all'ossidrilico in 2', 3' o 5' di un'altra molecola di ribonucleoside: la possibilità di un legame 5' → 5' era infatti esclusa dalla stabilità in ambiente alcalino dei dinucleotidi (5' → 5') sintetici. La possibilità di un legame 2' → 5' era ugualmente esclusa dal fatto che la fosfodiesterasi di milza idrolizzava l'RNA a nucleosidi-3'-fosfati. Quindi il legame internucleotidico doveva essere quello 3' → 5'. La presenza simultanea di 2'- e di 3'-fosfati tra i prodotti di idrolisi alcalina dell'RNA fu spiegata da Brown e Todd ammettendo che il trattamento alcalino scinde il legame internucleotidico per dare dei ribonucleosidi-2',3'-fosfati ciclici; questi fosfati ciclici sono poi ulteriormente trasformati dagli alcali in una miscela di 2'- e 3'-fosfati.

Ad esempio il trinucleotide I della fig. 1 dà l'intermedio ciclico (II); questo viene ulteriormente degradato attraverso l'immediata scissione dei gruppi triesterici che ha luogo esclusivamente sui legami P-O-C_{5'}, con formazione dei nucleosidi

DNA	acido desossiribonucleico	Pi	fosfato inorganico
RNA	acido ribonucleico	PPi	pirofosfato inorganico
s-RNA	acido ribonucleico solubile		
m-RNA	acido ribonucleico messaggero		
r-RNA	acido ribonucleico ribosomico		
AMP	adenosin-5'-monofosfato		
ADP	adenosin-5'-difosfato		
ATP	adenosin-5'-trifosfato		
GMP	guanosin-5'-monofosfato		
GDP	guanosin-5'-difosfato		
GTP	guanosin-5'-trifosfato		
CMP	citidin-5'-monofosfato		
CDP	citidin-5'-difosfato		
CTP	citidin-5'-trifosfato		
UMP	uridin-5'-monofosfato		
UDP	uridin-5'-difosfato		
UTP	uridin-5'-trifosfato		
2'-AMP	adenosin-2'-monofosfato		
3'-AMP	adenosin-3'-monofosfato		
5'-AMP	adenosin-5'-monofosfato		
dAMP	desossiadenosin-5'-monofosfato		
dADP	desossiadenosin-5'-difosfato		
dATP	desossiadenosin-5'-trifosfato		
dGMP	desossiguanosin-5'-monofosfato		
dCMP	desossicitidin-5'-monofosfato		
TMP	timidin-5'-fosfato		
		POLIMERI	
		poli X, poli d X	polimero lineare 3'-5' formato dal ribonucleotide X o dal desossiribonucleotide d X
		poli (X—Y) o poli r(X—Y)	copolimero lineare 3'-5' formato da X—Y—X—Y (sequenza nota alternante)
		poli d(X—Y)	copolimero lineare 3'-5' formato da dX—dY—dX—dY (sequenza nota alternante)
		poli (X, Y)	copolimero lineare 3'-5' formato da X e Y in sequenza a caso
		poli (A): poli (B)	due catene unite da legami di idrogeno per la maggior parte della loro lunghezza
		poli (A), poli (B)	due catene con legami di idrogeno non precisati o ignoti

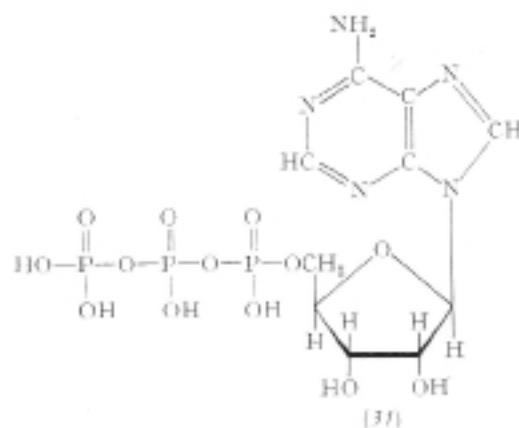
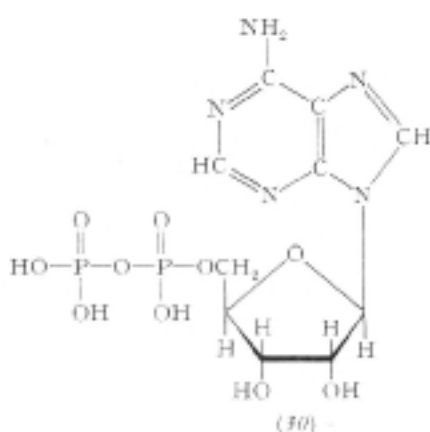
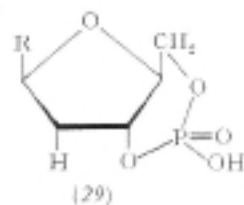
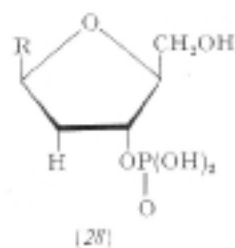
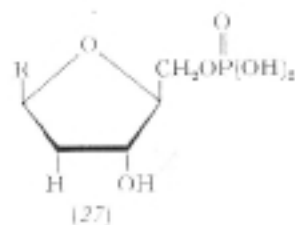
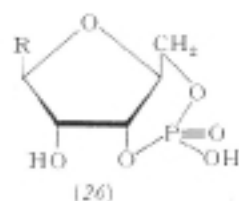
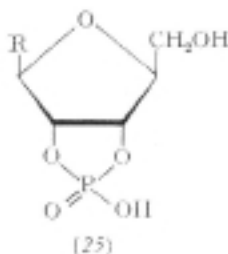
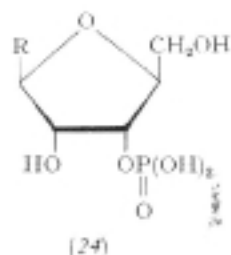
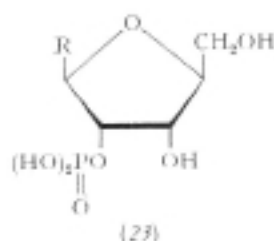
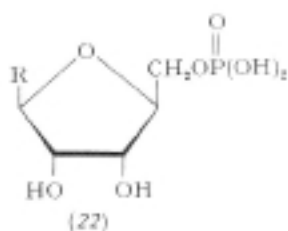
Tab. 1. Abbreviazioni usate nella chimica degli acidi nucleici.

Il primo nucleotide scoperto, l'acido inosinico, fu isolato nel 1847 da Liebig, che però non avvertì la presenza del fosforo nel composto; fu solo nel 1911 che Levene e Jacobs identificarono l'acido inosinico come il 5'-fosfato del riboside dell'ipoxantina o inosina. Levene mise anche in evidenza l'esistenza di due tipi di adenosin-monofosfato. L'acido adenilico presente allo stato libero nel muscolo fu identificato come adenosin-5'-fosfato nel modo seguente: il composto fu desamminato ad acido inosinico trattandolo con acido nitroso; per idrolisi l'acido inosinico diede il ribosio-5'-fosfato che fu identificato per ossidazione a fosfato dell'acido ribonico. Il prodotto così ottenuto fu trovato identico ad un campione sintetico ottenuto dal ribosio-5'-fosfato; inoltre, l'acido adenilico del muscolo consumava un equivalente di periodato, a causa della presenza nel residuo del ribosio dei due ossidrili liberi in 2 e 3 e doveva quindi identificarsi con l'adenosin-5'-fosfato.

Attraverso uno schema analogo, dall'acido adenilico proveniente dall'RNA di lievito si ottiene invece un ribosio-fosfato diverso dal 5'-fosfato, che fu identificato come ribosio-3'-fosfato. In realtà, fu visto più tardi che l'acido adenilico del lievito è una miscela di due isomeri, il 2'- e il 3'-fosfato, rapidamente interconvertibili in ambiente acido.

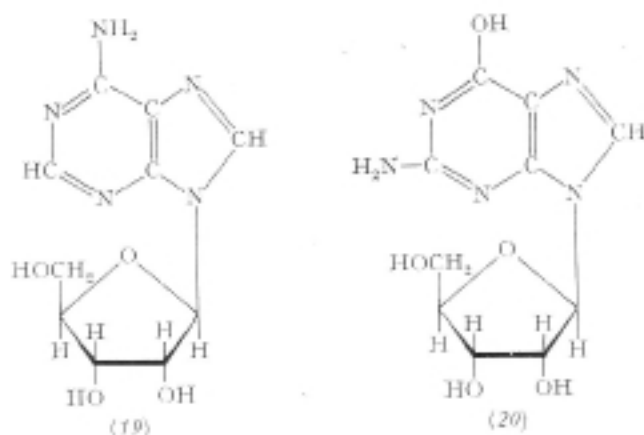
Struttura e proprietà degli acidi ribonucleici

Gli acidi ribonucleici (RNA) sono macromolecole formate da un grande numero di ribonucleosidi monofosfati. Le cellule animali e vegetali e le cellule batteriche contengono tre tipi principali di RNA, ossia gli RNA ribosomici (r-RNA), gli RNA solubili o RNA di transfer (s-RNA, o t-RNA), e gli RNA messaggeri (m-RNA). È subito da rilevare che ciascuno di questi tipi di RNA comprende specie molecolari diverse, e cioè che ogni tipo di RNA costituisce una famiglia di macromolecole con numerose proprietà comuni, ma non

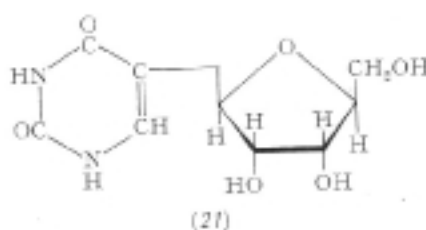


Molti coenzimi contengono strutture nucleotidiche; tra questi ricordiamo i nicotammide-nucleotidi, il flavin-adenin-dinucleotide e il coenzima A che sono derivati complessi dell'AMP; i coenzimi uridinnucleotidici hanno una funzione importante nel metabolismo degli zuccheri; il CTP è importante nella biosintesi dei fosfolipidi, e il GTP nella biosintesi delle proteine. La tabella 1 chiarisce il significato delle abbreviazioni ora usate e di quelle comunemente in uso nella chimica degli acidi nucleici.

concluse che lo zucchero era legato all' N_9 . Questa conclusione fu confermata dalla sintesi dell'adenosina e da studi cristallografici che dimostrarono che lo zucchero era in forma furanosica e situato in posizione perpendicolare al piano della purina. Ne derivano in tal modo strutture come quella (19) dell'adenosina o 9- β -D-ribofuranosidoadenina e quella (20) della guanosina o 9- β -D-ribofuranosidoguanina.



Le strutture dei desossiribonucleosidi sono identiche a quelle ora descritte per i ribonucleosidi. Un nucleoside anomalo presente in piccola quantità nell'RNA solubile è la pseudouridina, per la quale studi recenti hanno dimostrato la struttura (21) di 5- β -D-ribofuranosidouracile.



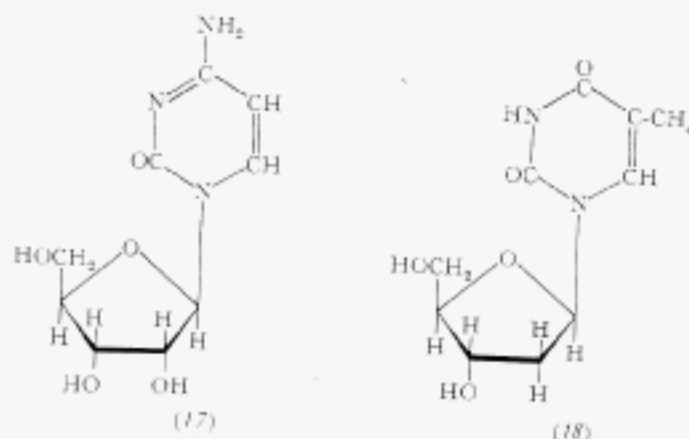
NUCLEOTIDI

I nucleotidi sono esteri fosforici dei nucleosidi, nei quali il residuo dell'acido fosforico è legato ad almeno uno degli ossidrili dello zucchero. Così, i ribonucleosidi possono essere fosforilati nelle posizioni 2', 3', o 5'. Questi composti prendono il nome di acidi adenilici, guanilici, citidilici, uridilici, inosinici ecc., o anche, ad es., quelli di adenosin-2'-fosfato, adenosin-3'-fosfato, adenosin-5'-fosfato. Inoltre esistono fosfati ciclici formati per fosforilazione di un secondo ossidrile, con il medesimo residuo dell'acido fosforico, i 2',3'- e i 3',5'-fosfati ciclici. I desossiribonucleosidi possono essere ovviamente fosforilati solo nelle posizioni 3' e 5', ed è anche noto un fosfato ciclico 3',5'. Esempi di questi diversi isomeri sono dati nelle formule (22)-(29) nelle quali R rappresenta il residuo della base pirimidinica o purinica.

Altri composti nucleotidici di grande interesse biologico sono i nucleosidi-5'-polifosfati come l'adenosindifosfato (30), l'adenosintrifosfato (31) ecc. ed i nucleosidi difosfati come l'adenosin-3',5'-difosfato.

cleosidi il D-ribosio è presente in forma furanica, come si è dimostrato con i classici metodi della metilazione e successiva idrolisi, e confermato studiandone il comportamento di fronte al periodato di sodio. I desossiribonucleosidi non reagiscono col periodato, quindi il glicol in *cis* (3', 4') deve essere assente; da questo segue che lo zucchero deve essere in forma furanica, poiché un *cis*-glicol sarebbe presente in forma piranica come si può rilevare dalle formule (13) e (16). Le strutture e le conformazioni degli zuccheri nei nucleosidi e dei nucleotidi sono state poi confermate mediante misure di RMN. La configurazione del centro anomero C_{1'} dei nucleosidi naturali è stata studiata da Todd, il quale ha dimostrato che il legame glicosidico ha la configurazione β.

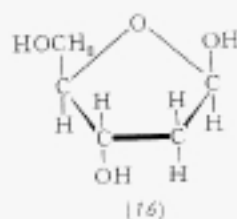
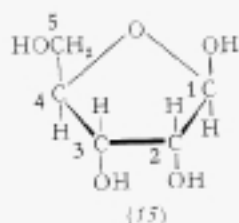
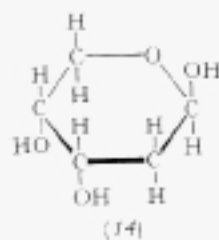
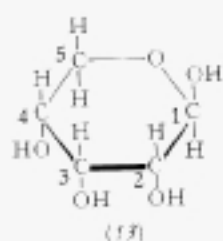
Il punto di attacco dello zucchero alle pirimidine fu individuato dalla scuola di Levene. Dalla possibilità di desamminare la citidina a uridina si concluse che il punto di attacco era lo stesso nei due composti e che questo non era il C₄. La preparazione della 5-bromo- e della 5-nitrouridina escluse anche il C₅; le posizioni C₃ e C₆ furono d'altra parte escluse dalla preparazione della 5,6-fenilidrazinouridina per trattamento successivo dell'uridina con bromo e fenilidrazina. Poiché inoltre l'idrolisi acida della mono-N-metiluridina fornisce il 3-metiluracile, il legame glicosidico deve necessariamente interessare l'N₁. L'attacco dello zucchero all'N₁ dell'anello pirimidinico fu poi confermato dagli studi di spettroscopia UV e da studi cristallografici; questi ultimi mostrarono che l'anello planare pirimidinico giace in un piano perpendicolare a quello in cui si trova l'anello non planare furanico. Le formule della citidina o 1-β-D-ribofuranosidocitosina (17) e della timidina o 1-β-D-2-desossiribofuranosidotimidina (18) rappresentano due tipiche strutture di nucleosidi pirimidinici.



La lability dei nucleosidi purinici in ambiente acido è in accordo col fatto che questi sono degli N-glicosidi. I gruppi amminici primari dell'adenosina e della guanosina non intervengono nella formazione del legame glicosidico, dato che essi possono essere rimossi con l'acido nitroso per dare rispettivamente inosina e xantosina. Questo comportamento limita a quattro le possibili posizioni per l'attacco dello zucchero alle purine, ossia alle posizioni N₁, N₃, N₇, N₉; di esse, le posizioni N₁ e N₉ possono essere escluse poiché la metilazione della xantosina dà il riboside della teofillina o 1,3-dimetilxantina. Considerando infine che gli spettri UV dell'adenosina e della guanosina sono molto simili a quelli della 9-metiladenina ed assai diversi da quelli della 7-metiladenina, si

Il componente zuccherino del DNA di timo fu isolato per la prima volta da Levene e London nel 1929, partendo dai nucleosidi purinici di questo DNA, e identificato come 2-desossi-D-ribosio (14). Questi autori non riuscirono ad isolare uno zucchero dai nucleosidi pirimidinici, poiché le condizioni piuttosto drastiche necessarie per idrolizzare il legame pirimidina-zucchero provocavano la decomposizione dello zucchero ad acido levulinico. La dimostrazione che lo zucchero dei nucleosidi pirimidinici è 2-desossi-D-ribosio fu data molto più tardi (Burke, 1955). Dall'esame cromatografico dei prodotti di idrolisi di DNA di origine diversa, Chargaff concludeva che il 2-desossi-D-ribosio è il solo zucchero presente nel DNA. Bisogna ricordare tuttavia che altri zuccheri, il glucosio e il genziobiosio, sono presenti, legati alla 5-idrossimetilcitosina con un legame glicosidico, nei DNA dei batteriofagi della serie T-pari.

Allo stato solido, sia il D-ribosio che il 2-desossi-D-ribosio presentano le strutture piranosiche (13) e (14) anziché quelle furanosiche (15) e (16).

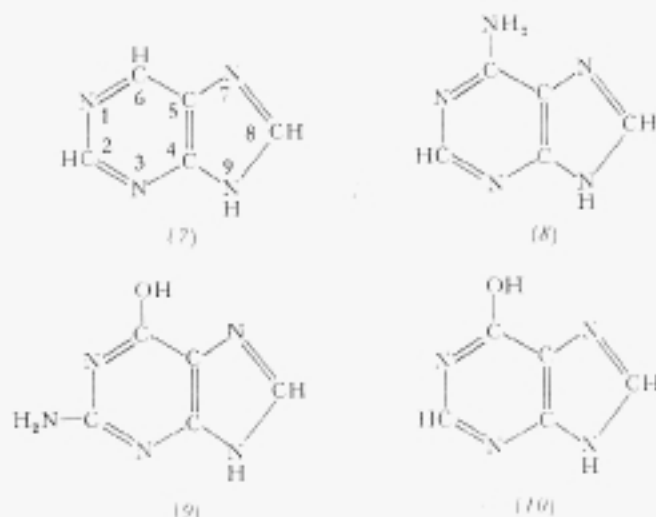


I 2-desossizuccheri sono molto più reattivi dei corrispondenti zuccheri ossigenati e possono venir facilmente trasformati in N- e O-glicosidi; essi sono sensibili agli acidi che, ad es., trasformano il 2-desossi-D-ribosio in acido levulinico.

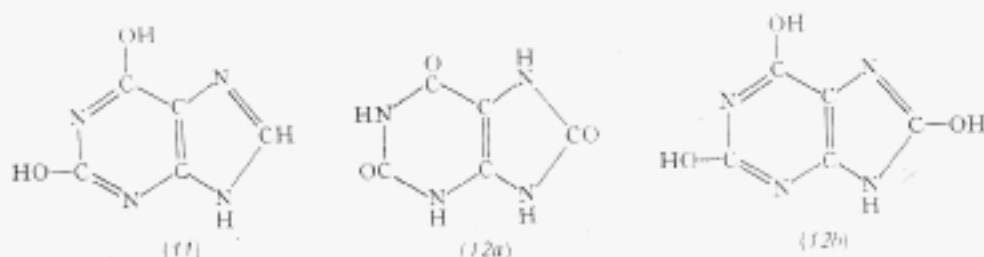
NUCLEOSIDI

Una base purinica o pirimidinica può venir condensata con un pentoso o un desossipentoso per formare rispettivamente un ribo- o un desossiribonucleoside. Così l'adenina condensata col D-ribosio forma l'adenosina, la guanina forma la guanosina, la citosina la citidina e l'uracile l'uridina. Il ribonucleoside dell'ipoxantina prende il nome di inosina, quello della xantina il nome di xantosina. I nucleosidi contenenti il 2-desossi-D-ribosio sono la desossiguanosina, la desossiadenosina, la desossicitidina e la timidina. A rigore quest'ultima dovrebbe denominarsi desossitimidina, ma il nome di timidina è ormai tradizionale, ed il ribonucleoside formato da D-ribosio e timidina, assai raro, viene invece indicato con il nome di ribotimidina.

Levene e collaboratori dimostrarono che i nucleosidi erano glicosidi privi di proprietà riducenti finché non se ne liberava lo zucchero per idrolisi. Nei nu-



e di altri tre derivati purinici naturali, l'ipoxantina o 6-idrossipurina (10), la xantina o 2,6-diidrossipurina (11), e l'acido urico o 2,6,8-triidrossipurina, rappresentato sia in forma chetonica (12 a) che in forma enolica (12 b), indicano le relazioni strutturali tra questi composti.



Un certo numero di purine metilate sono presenti in piccola quantità negli acidi nucleici. La 6-metilamminopurina è stata trovata nel DNA di *Escherichia coli*. Nell'RNA solubile sono presenti diverse purine metilate: la 2-metiladenina, la 6-metilamminopurina, la 6,6-dimetilamminopurina, la 1-metilguanina, la 6-idrossi-2-dimetilamminopurina.

ZUCCHERI

Per idrolisi acida dell'RNA si ottiene un pentoso che fu identificato come D-ribosio (13) da Levene e Jacobs nel 1909. La dimostrazione definitiva che il pentoso dell'RNA è il D-ribosio fu ottenuta molto più tardi da Gulland trasformando l'acido aldonico derivato dallo zucchero nel benzimminazolo corrispondente, facilmente identificabile.

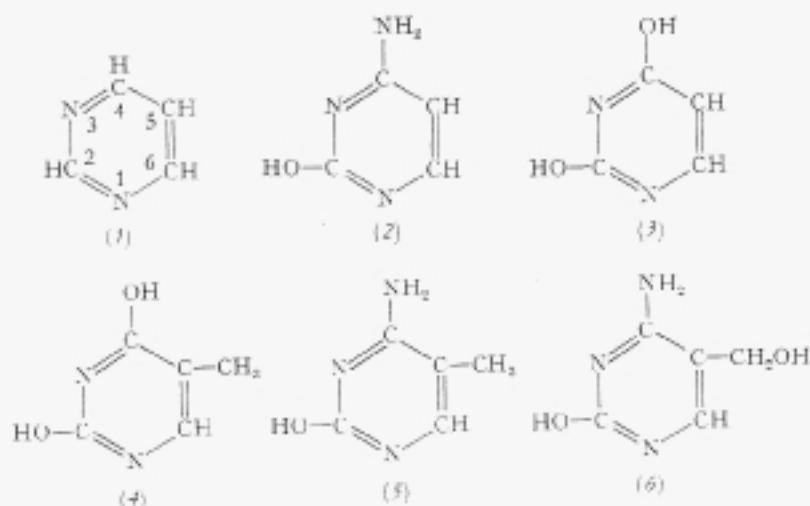
Per idrolisi di campioni di RNA di origine diversa è sempre stato ottenuto soltanto il D-ribosio, il che ha portato a concludere che questo sia il solo zucchero presente nell'RNA. L'RNA solubile contiene tuttavia piccole quantità di 2'(3')-O-metilribosio.

Composizione chimica degli acidi nucleici

Per idrolisi totale degli acidi nucleici si ottengono in ogni caso delle basi pirimidiniche e puriniche, un pentoso, e acido fosforico. Dopo idrolisi parziale si riesce invece ad isolare dei composti denominati rispettivamente nucleosidi e nucleotidi. Una breve descrizione di questi componenti degli acidi nucleici è data qui di seguito.

BASI PIRIMIDINICHE

Le principali basi derivanti dalla pirimidina (7) (vedi) presenti negli acidi nucleici sono la citosina (2) che è contenuta in ambedue i tipi di acidi nucleici, l'uracile (3) che è presente nell'RNA e la timina, o 5-metiluracile (4), che si trova nel DNA. La 5-metilcitosina (5) è presente in diversi DNA e nell'RNA solubile; la 5-idrossimetilcitosina (6) sostituisce la citosina nel DNA dei batteriologi della serie T-pari (T-2, T-4, T-6); la timina è sostituita, nei DNA dei batteriofagi SP-2 e SP-8, rispettivamente dall'uracile e dal 5-idrossimetiluracile; infine nell'RNA solubile sono stati trovati il 5,6-diidrouracile ed una tiopirimidina.



La formula di questi composti qui rappresentata è quella tradizionale, nella quale gli idrossogruppi vengono rappresentati in forma enolica; recenti ricerche sugli spettri UV ed IR di queste basi e di quelle puriniche più avanti descritte hanno invece dimostrato che esse in realtà esistono nella forma tautomera chetonica e che i gruppi amminici si trovano prevalentemente in forma amminica anziché in forma imminica.

BASI PURINICHE

Sia il DNA che l'RNA contengono le stesse basi puriniche, l'adenina e la guanina. Queste sono derivati della purina, composto formato dalla fusione di un anello pirimidinico e di un anello imidazolico. Le formule della purina (7), dell'adenina o 6-amminopurina (8), della guanina o 2-ammino-6-idrossipurina (9),

naftenato di alluminio viene impiegato anche nella produzione di materiali bellici incendiari del tipo del Napalm quale gelatinizzante della benzina o di altri idrocarburi facilmente infiammabili.

[6]

ACIDI NUCLEICI

La scoperta degli acidi nucleici risale a circa un secolo fa. Fu infatti nel 1868 che Miescher isolò, nel laboratorio di Hoppe-Seyler a Tubinga, un materiale con alto contenuto in fosforo dai nuclei di cellule del pus; questo materiale, insolubile nei solventi organici e negli acidi, ma solubile in alcali, equivalente ai composti oggi indicati con il nome di nucleoproteine, fu chiamato « nucleina ». Nel 1872, lavorando a Basilea, Miescher dimostrò che le teste di spermatozoi di salmone contenevano un composto acido, oggi noto come acido nucleico, ed una sostanza basica a cui fu dato il nome di « protamina ». Altmann, che continuò le ricerche di Miescher dopo la morte di quest'ultimo, descrisse nel 1899 un metodo per la preparazione di acidi nucleici da lievito e da tessuti animali ed introdusse il termine, tuttora usato, di « acidi nucleici ». Ricerche effettuate negli anni seguenti in diversi laboratori misero in evidenza che gli acidi nucleici erano costituenti normali di tutte le cellule.

ASPETTI CHIMICI

La composizione chimica degli acidi nucleici fu delucidata all'inizio di questo secolo principalmente nei laboratori di Kossel e di Levene e già nel 1914 si erano identificate tutte le basi puriniche e pirimidiniche e il D-ribosio che, con l'acido fosforico, rappresentano i prodotti di idrolisi degli acidi nucleici. Queste ricerche dimostrarono l'esistenza di due diversi tipi di acidi nucleici; si constatò infatti che, per idrolisi, l'acido nucleico del lievito dava adenina, guanina, citosina, e uracile, oltre all'acido ortofosforico e al D-ribosio, mentre quello del timo dava adenina, guanina, citosina e timina, oltre ad acido ortofosforico e ad un pentoso che fu più tardi identificato come il 2-desossi-D-ribosio. Per un certo numero di anni prevalse l'idea che i due acidi nucleici, denominati rispettivamente acido ribonucleico o RNA e acido desossiribonucleico o DNA, fossero caratteristici rispettivamente dei tessuti vegetali e dei tessuti animali. Successivamente, l'impiego di tecniche più raffinate dimostrò che sia l'RNA che il DNA sono normali costituenti di tutte le cellule; il primo è localizzato prevalentemente nel citoplasma, il secondo esclusivamente, o quasi, nel nucleo. Il rapporto quantitativo RNA/DNA nelle cellule è compreso tra i valori estremi di 15 (lievito) e 0,15 (timo).

Gli anni successivi alla seconda guerra mondiale videro enormi progressi nelle ricerche sugli acidi nucleici. Qui non ne ricorderemo che alcune delle tappe fondamentali: la determinazione rigorosa della composizione chimica degli acidi nucleici, da parte della scuola di Todd; il riconoscimento del carattere macromolecolare degli acidi nucleici; la determinazione della struttura a doppia elica del DNA, dovuta a Crick, Watson e Wilkins (1953); la scoperta di Avery, MacLeod e McCarty (1944) che il DNA estratto da un ceppo di pneumococco può alterare permanentemente le caratteristiche ereditarie di un altro ceppo dello stesso microrganismo (trasformazione genetica); la scoperta dei diversi tipi di RNA e dei meccanismi fondamentali della biosintesi proteica.