

92/2979-23/11/92

Scott F. Gilbert

BIOLOGIA
DELLO SVILUPPO

92/2979



7

LO 10020773
5 IV 6a
15/02/05



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO - BIBLIOTECA	
N. INVENTARIO	2979
N. PROGRESSIVO	
POSIZIONE	ex 1V-159

LO 10020773
Collocato

7000

178 Successivamente i filamenti di DNA vengono separati, mentre sono ancora sulla carta; la carta viene incubata in una soluzione, che contiene l'RNA radioattivo (o la sua copia cDNA) del gene che si desidera clonare. Se un plasmidio contiene quel gene, il suo DNA dovrebbe essere sulla carta e solo quel DNA dovrebbe essere capace di legarsi all'RNA radioattivo o al cDNA. Inoltre solo quelle aree saranno radioattive. La radioattività di queste regioni viene rivelata con l'AUTORADIOGRAFIA. Un film sensibile ai raggi X viene posto sopra la carta trattata. Gli elettroni ad alta energia emessi dall'RNA sensibilizzano i grani d'argento del film, facendoli diventare scuri; quando si sviluppa il film, si forma una macchia nera sopra ciascuna colonia che contiene l'appropriato plasmide ricombinante, che porta quel particolare gene (Figura 3). Questa colonia viene quindi isolata e fatta sviluppare. Queste tecniche consentono di produrre miliardi di batteri, ognuno dei quali contiene centinaia di molecole ricombinanti.

Questi plasmidi ricombinanti possono essere separati dal cromosoma di *E. coli* con la centrifugazione; l'incubazione dei ricombinanti in *EcoRI* stacca il filamento di DNA umano, che contiene il gene. Questo frammento può essere anche separato dal DNA del plasmidio. Così il ricercatore ha picogrammi di sequenze di DNA purificato che contengono un gene specifico.

Sebbene questo procedimento sembri molto logico e facile, il numero di colonie che devono essere selezionate è spesso astronomico. Il numero di frammenti a caso che devono essere clonati per ottenere il gene che si vuole diventa maggiore con l'aumentare della complessità del genoma dell'organismo. Per essere certi al 99% di clonare (1) il gene desiderato di *E. coli*, si deve selezionare qualcosa come 1500 colonie. Con i Mammiferi questo numero cresce a 800 000; invece di far crescere i batteri in capsule di Petri standard, le colonie vengono coltivate in vassoi da bar (Blattner et al., 1978; Slightom et al., 1980).

Per operare la selezione contro i batteri «inutili», che hanno preso su plasmidi che non contengono nessuno dei frammenti del gene estraneo, la maggior parte dei plasmidi viene costruita in modo tale che il sito dell'enzima di restrizione si trovi entro un altro gene resistente verso un altro antibiotico per cui ogni plasmidio che incorpora il nuovo DNA perderà la resistenza a quell'antibiotico. Replicando colonie su agar normale e su agar che contiene ciascuno dei due antibiotici, solo i batteri che hanno preso su i plasmidi ricombinanti (cioè che crescono nel primo antibiotico, ma non nel secondo) devono essere ulteriormente selezionati.

X Espressione differenziale del gene

179 Con l'avvento di queste tecniche biochimiche l'ipotesi dell'espressione differenziale dei geni divenne verificabile a livello molecolare. Quest'ipotesi può venir suddivisa in tre postulati verificabili:

1. Ogni nucleo cellulare contiene il genoma completo fissato nell'uovo fecondato. In termini molecolari, i DNA di tutte le cellule differenziate sono identici.

2. I geni non utilizzati nelle cellule differenziate non vengono distrutti o mutati e conservano il loro potenziale per venir espressi.

(1) Complessità è il termine che indica il numero di tipi differenti di geni nel nucleo.

3. Solo una piccola percentuale del genoma viene espressa in ogni cellula e una parte dell'RNA sintetizzato è specifico per quel tipo di cellula.

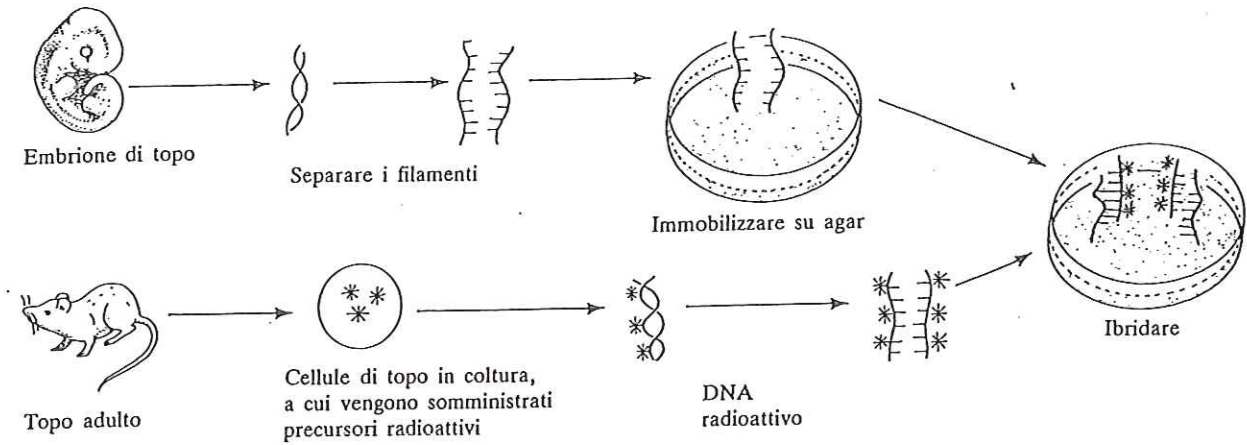
Abbiamo già analizzato qualche prova genetica ed embriologica dell'equivalenza genica. Ora possiamo chiederci se gli studi biochimici danno un supporto a questo punto di vista. Questa conferma è stata data da numerosi studi che riguardano l'ibridazione degli acidi nucleici.

La prima analisi molecolare su larga scala per verificare l'identità del DNA in tutto l'organismo fu data da Brian McCarthy e B. H. Hoyer nel 1964. Somministrando precursori radioattivi a cellule tumorali di topo, riuscirono a estrarre DNA radioattivo di topo. Il DNA venne denaturato nei suoi due filamenti e aggiunto a una piastra di DNA denaturato di embrioni di topo, immobilizzato in agar (Figura 4). Dopo un certo tempo l'agar venne lavato e il DNA rinaturato misurato. Questa quantità di radioattività veniva definita come 100 per cento di legame. McCarthy e Hoyer poi ripeterono questo procedimento, ma aggiunsero anche quantità differenti di DNA non radioattivo. Se il DNA non radioattivo ha sequenze in comune con il DNA marcato, ci si aspetta di avere una competizione e la quantità di DNA radioattivo legato dovrebbe diminuire quanto più DNA non radioattivo viene aggiunto. La Figura 5 mostra i loro risultati. Non fu osservata competizione quando era usato come possibile competitore DNA batterico, un dato che indicava che il DNA batterico aveva poche o nessuna sequenza in comune con il DNA radioattivo di topo. Se però venivano provati i DNA di vari organi di topo veniva effettivamente riscontrata competizione. Inoltre la velocità e l'ampiezza della competizione erano identiche per i DNA di topo di tutte le provenienze e ciò stava ad indicare l'identità (entro l'errore sperimentale) di tutti i DNA. Si sa ora che i DNA misurati rappresentavano solo quelle sequenze di DNA che erano presenti in copie multiple e non quelle dei geni che sintetizzavano le proteine (vedi Capitolo 11), ma ricerche successive hanno dimostrato anche l'identità di geni in singola copia (Davidson, 1976).

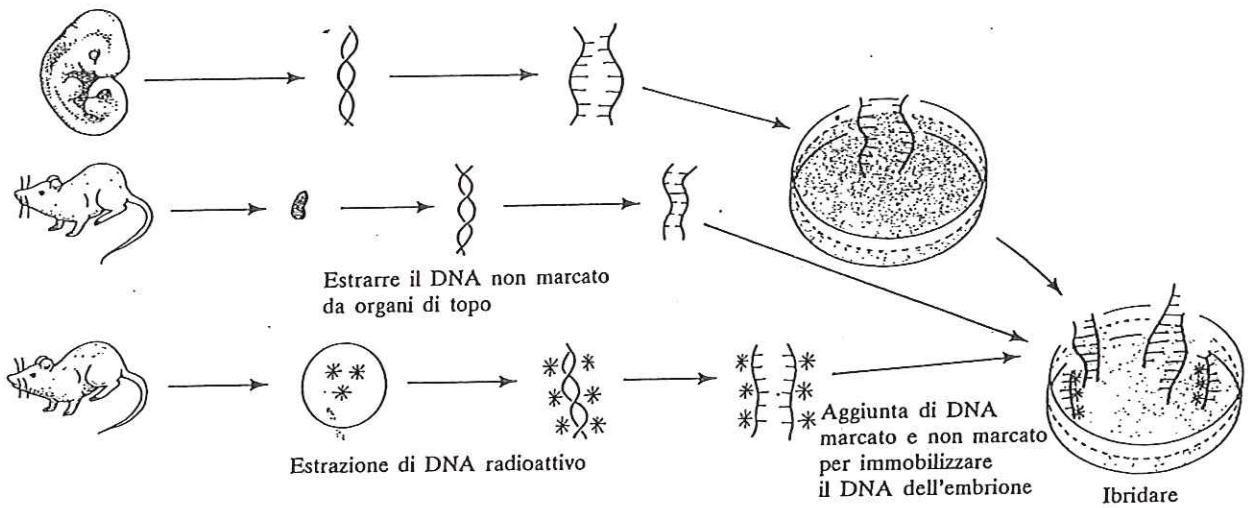
L'ibridazione degli acidi nucleici può essere modificata per studiare geni specifici. Con una tecnica chiamata IBRIDAZIONE IN SITU in geni per proteine specifiche di cellule differenziate possono essere identificati sui cromosomi di cellule che non sintetizzano questi prodotti. Sviluppato da Mary Lou Pardue e Joseph Gall (1970) l'ibridazione in situ consiste nella denaturazione dei cromosomi politenici in modo che i filamenti delle eliche del DNA vengono separati, mentre i cromosomi sono ancora sul vetrino da microscopio. RNA radioattivo o cDNA possono allora essere messi su un vetrino e lavati via dopo un tempo appropriato di incubazione. Durante questa incubazione l'RNA è capace di legarsi alle regioni del DNA che lo codificano. I vetrini vengono poi coperti con un'emulsione fotografica trasparente. La radioattività di ogni RNA legato sensibilizzerà i grani d'argento dell'emulsione, facendo sì che si formi una macchia nera sopra la banda cromosomica, una volta che l'emulsione venga sviluppata. Perciò l'RNA per un prodotto specifico sarebbe capace di rivelare la banda da cui è stato sintetizzato.

180 La Figura 6 mostra un'autoradiografia che localizza i geni per una proteina specifica del tuorlo di *Drosophila*. I geni di *Drosophila* furono clonati e selezionati con l'mRNA delle proteine del tuorlo parzialmente purificato. Si trovò che parecchi di quei cloni, che si legavano con l'mRNA delle proteine del tuorlo, contenevano DNA capace di dirigere la sintesi di una proteina del tuorlo. Questi cloni vennero fatti sviluppare e i geni delle proteine del tuorlo vennero isolati. Un cDNA radioattivo venne fabbricato dall'mRNA di uno di questi cloni e ibridato con

(A) PROCEDIMENTO DI IBRIDAZIONE



(B) PROCEDIMENTO DI COMPETIZIONE-IBRIDAZIONE



(C) MISURA DELLA COMPETIZIONE

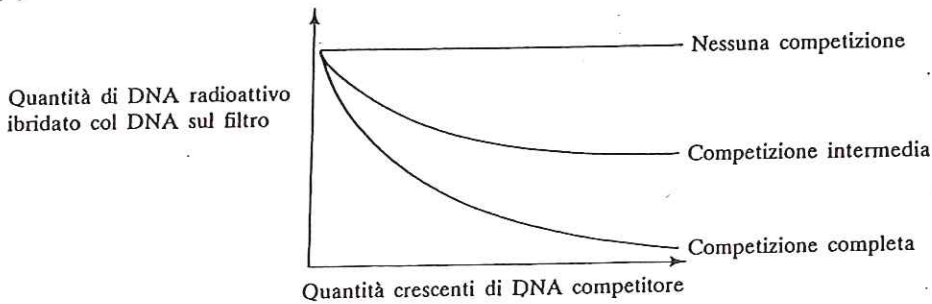


Figura 4. Protocollo per determinare l'identità delle sequenze di DNA di due organi. (A) Legame di DNA radioattivo da cellule di topo coltivate in vitro con DNA denaturato e immobilizzato. (B) Il procedimento di competizione-ibridazione in cui la reazione mostrata in (A) viene modificata dall'aggiunta di DNA competitivo non radioattivo estratto da organi o tessuti specifici. (C) Possibili risultati di un tale procedimento di competizione-ibridazione.

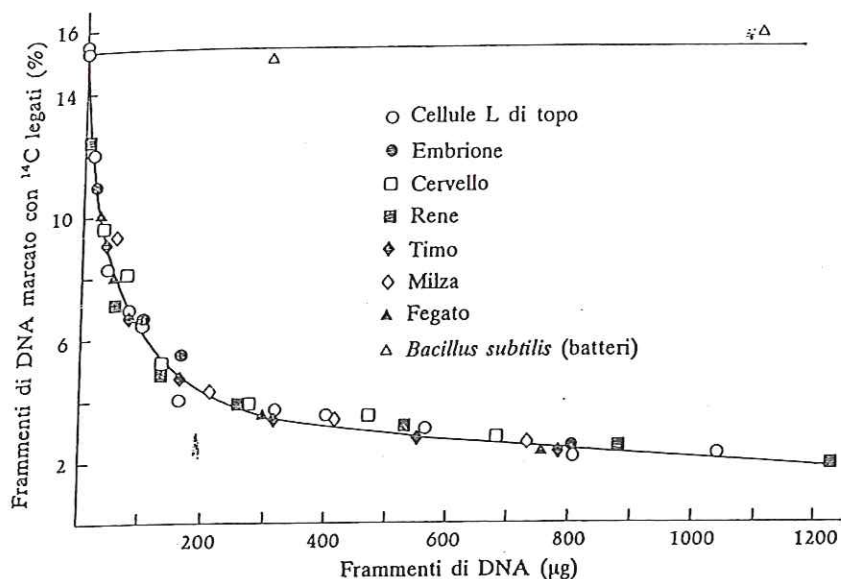


Figura 5. Competizione di DNA non marcato di frammenti di organi di topo per siti di DNA di topo immobilizzato su filtro e che potrebbe legare DNA radioattivo di colture di cellule di topo. Le fonti del DNA competitivo sono indicate con simboli diversi elencati a fianco (Da McCarthy e Hoyer, 1964).

preparati di cromosomi politenici di ghiandole salivari. Come mostra la figura, questo cDNA si lega a una banda specifica. Però le ghiandole salivari non producono questa proteina. Le sole cellule che sintetizzano le proteine del tuorlo sono le cellule dei corpi grassi della femmina adulta. Così un gene, attivo solo nelle cellule dei corpi grassi dell'adulto, venne trovato nei cromosomi delle ghiandole salivari della larva.

È stato anche possibile dimostrare che geni non utilizzati di cellule differenziate in certe condizioni possono essere attivati e produrre proteine specifiche per altri tipi di cellule. Nei Mammiferi la prova più evidente della riattivazione di geni non utilizzati viene dal laboratorio di Mary Weiss (Peterson e Weiss, 1972; Brown e Weiss, 1975), che fusero insieme cellule differenziate di vario tipo. La fusione cellulare può avvenire naturalmente (come nello sviluppo del muscolo) o può essere mediata da agenti, come il virus di Sendai (morbillo del topo) o glicole polietilenico. Questa fusione crea una situazione in cui i due nuclei si trovano in un citoplasma comune (Figura 7). Se le condizioni lo permettono, i nuclei di queste cellule entrano in mitosi e alla fine formano un



Figura 6. Ibridazione in situ di cDNA della proteina del tuorlo sui cromosomi politenici delle ghiandole salivari della larva di *Drosophila*. I granuli scuri indicano dove il cDNA della proteina del tuorlo si è legato ai cromosomi (Da Barnett et al., 1980; fotografia per cortesia di P. C. Wensink).

nucleo ibrido, che contiene i cromosomi di ambedue i tipi di cellule parentali. Nella maggior parte dei casi, quando vengono fusi insieme due tipi differenti di cellule, l'ibrido risultante è privo dei caratteri differenziati, che contraddistinguono le cellule parentali. Fondendo cellule tumorali di fegato di ratto con fibroblasti di topo, Weiss fu capace di isolare ibridi che hanno due corredi di cromosomi, del fegato e dei fibroblasti. Queste cellule conservano la capacità di fabbricare proteine come l'albumina, l'aldolasi e la tirosin-amino-transferasi (TAT). Una cosa che sorprende ancora di più è che esse sintetizzano albumina, aldolasi e TAT di *topo* — tre proteine che i fibroblasti non sintetizzano mai. Il fibroblasto di topo aveva conservato i geni specifici del fegato in una forma, che fu capace di esprimersi in certe condizioni. Questa risulta essere una regola generale nello sviluppo degli animali: non avviene nessun cambiamento genetico irreversibile durante la differenziazione cellulare. Tuttavia le tecniche di biologia molecolare hanno scoperto anche un'eccezione interessante a questa regola: la differenziazione delle plasmacellule.

Cambiamenti nei geni dei linfociti

181 Nella maggior parte dei casi nelle cellule differenziate sono presenti e potenzialmente funzionali geni non utilizzati. Il corredo genetico è lo stesso in tutti i tessuti. C'è un tipo di cellula nei Mammiferi però in cui il genoma di ogni cellula è differente da quello della maggior parte delle altre cellule del corpo. Questo tipo di cellula è rappresentato dal LINFOCITA B, la cellula che sintetizza le molecole degli anticorpi.

Gli anticorpi vengono prodotti quando una sostanza estranea — l'antigene — viene a contatto con i LINFOCITI B, che si trovano nei noduli linfatici e nella milza. Anche prima del contatto con un antigene ognuno di questi linfociti B in riposo fabbrica molecole di anticorpo. Però essi non le secernono. Invece le molecole degli anticorpi sono inserite dentro la membrana cellulare. Ogni linfocita B fabbrica un anticorpo che

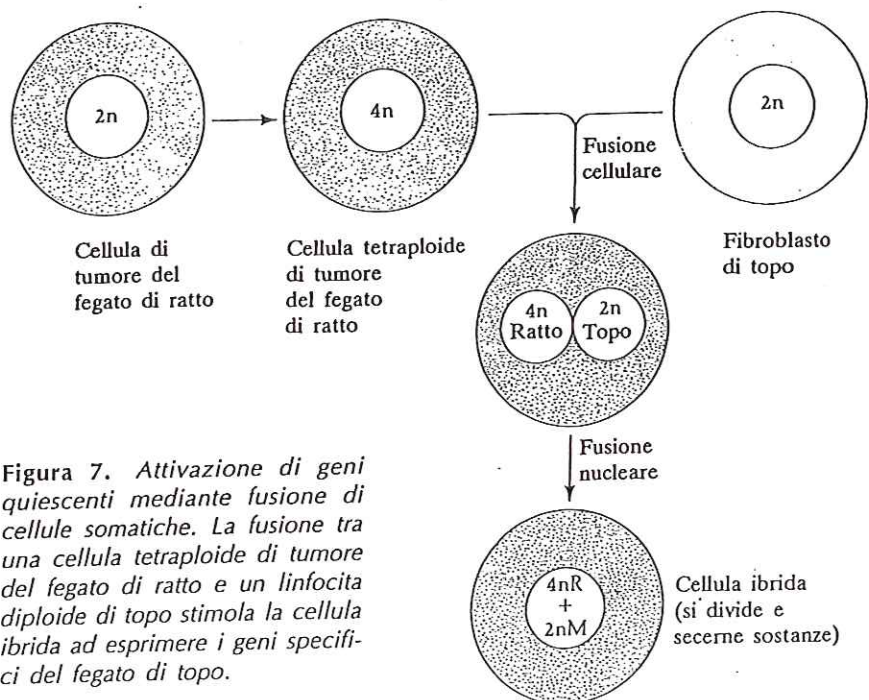


Figura 7. Attivazione di geni quiescenti mediante fusione di cellule somatiche. La fusione tra una cellula tetraploide di tumore del fegato di ratto e un linfocita diploide di topo stimola la cellula ibrida ad esprimere i geni specifici del fegato di topo.