

NATURALMENTE

bollettino di informazione degli insegnanti di Scienze Naturali

anno 19 • numero 3 • settembre 2006

trimestrale

1906-2006 Cent'anni di Neuroscienze

Marco Piccolino

Teoria del neurone, reti nervose e retina

nell'opera di Santiago Ramòn y Cajal

Marco Piccolino, Elena Laurenzi, Enrica Strettoi

Scienza, storia della scienza, storia delle idee

Brunella Danesi, Maria Bellucci

La rivoluzione degli RNA 2: I ribozimi

Luciano Cozzi

La candela

Elio Fabri

Gazebo

Fabrizia Gianni

Educazione e comunicazione nei musei

Marcello Sala

I prioni, proteine eretiche

Isabella Marini

Quello che i libri non spiegano

Carlo Bauer, Andrea Spanedda, Ahmed Mohamud

Osman, Paolo Toti, Valerio Pelaia

romammirabile

Rosalba Conserva, Laura Scarino

Spazio *in affitto*

Stefano Dalla Casa

Il verziere di Melusina

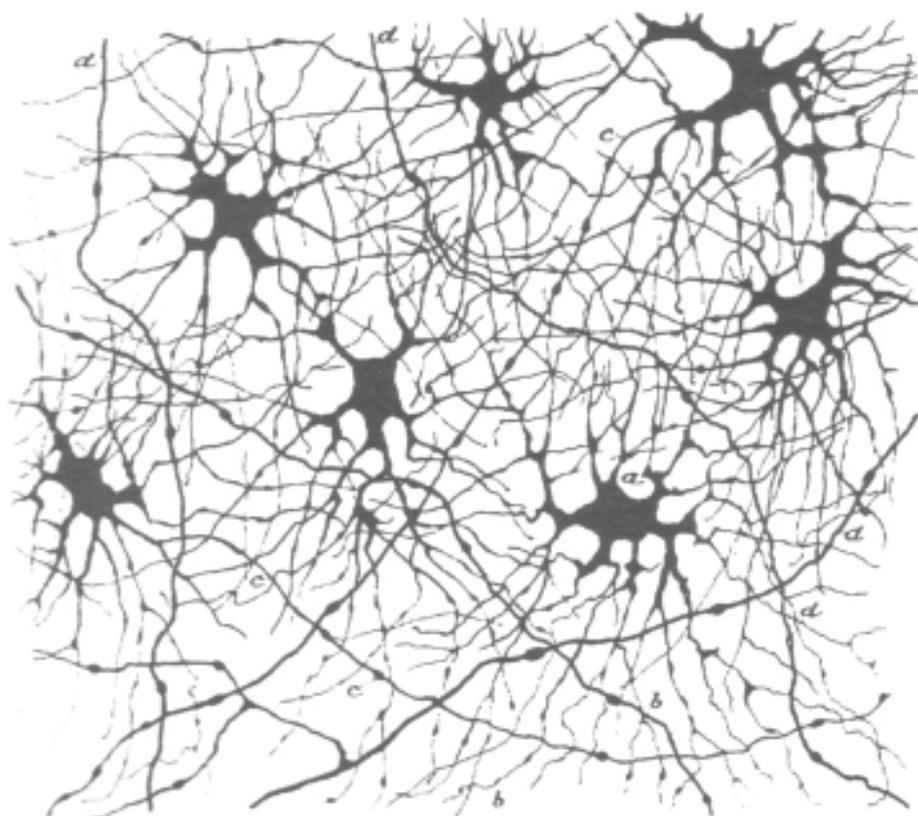
Laura Sbrana

Recensioni

Il mestiere più bello del mondo

Vincenzo Terreni

Premio Nazionale "Mario Rippa"



NATURALMENTE

anno 19 • numero 3 • settembre 2006 trimestrale

pedizione Poste Italiane SpA - Spedizione in Abbonamento Postale - D. L. 353/2003 conv. in L. 27/02/2004 n. 46 art. 1, comma 2, DCB PISA - tassa pagata - taxe percue

Segretario di redazione: Enrico Pappalettere
(epappalettere@sirius.pisa.it)

Direttore responsabile: Daniele Negri

Redazione: via Niccolini, 4 cap 56017 S. Giuliano Terme (Pi)
Sandra Bocelli, Francesca Civile, Raffaello Corsi, Brunella Danesi, Tomaso Di Fraia, Nori Domenichini, Fabio Fantini, Luciano Luciani, Isabella Marini, Catia Pardini, Lucia Stelli, Vincenzo Terreni

Proprietà: ANISN sezione di Pisa

Impaginazione: Vincenzo Terreni (terreni@anisn.it)

Amministrazione: Accademia Editoriale®, via S. Bibbiana, 28
56127 Pisa tel. 050/542332 Fax 050/878732; E-mail iepi@iepi.it

Stampa: Stamperia e Legatoria Pisana via delle Sorgenti, 87
56010 Agnano Pisano tel. 050/939023

Abbonamenti: Accademia Editoriale®, ccp n. 17154550;
ordinario 18,00 •, sostenitore 30,00 •, Scuole, Associazioni,
Musei, Enti ecc.. 24,00 •, biennale 32,00, • estero 35,00 •.

Prezzo singolo numero 8,00 •; numeri arretrati 10,00 •; copie
saggio su richiesta previo invio di 4 • in francobolli per rimborso
spese postali.

Registrato il 25 febbraio 1989 presso il Tribunale di Pisa al n. 6/
89

Informazioni: 050/818717-571060-544428; 0587/645369; fax:
06/233 238 204

Un ringraziamento particolare alle case editrici
ZANICHELLI e **BOVOLENTA**
per l'aiuto alla realizzazione di questo numero.

Collaboratori

Maria Bellucci doc. St. Fil. L. Sc. *Copernico* Prato

Claudia Binelli doc. Sc. Nat. Torino

Luciana Bussotti doc. Sc. Nat. Livorno

Stefania Consigliere dip. Antropologia Univ. Genova

Luciano Cozzi doc. Sc. Nat. Milano

Elio Fabri doc. Astronomia Università di Pisa

Fabrizia Gianni doc. Sc. Nat. Ist. *S. Carlo* Milano

Salvatore Lazzara dott. Filosofia Roma

Alessandra Magistrelli doc. Sc. Nat. Roma

Fabio Olmi doc. Sc. Nat. SSIS Firenze

Piegiacomo Pagano ENEA Bologna

Marco Piccolino Dip. di Biologia dell'Univ. di Ferrara

Pietro Ramellini doc. Sc. Nat. L. Cl. Velletri

Laura Sbrana doc. Lettere L. Sc. *Dini* Pisa

Roberto Sirtori doc. Fisica ITIS Pisa

Stefano Vallin doc. Biochimica ITFS Badia Pol. (Ro)

Hanno collaborato a questo numero

3. 1906-2006 Cent'anni di Neuroscienze

Marco Piccolino

5. Teoria del neurone, reti nervose e retina nell'opera di Santiago Ramón y Cajal

Marco Piccolino, Elena Laurenzi Dip. Filosofia univ.
Pisa Enrica Strettoi Ist. Neurofisiologia Univ. Pisa

20. Scienza, storia della scienza, storia delle idee

Intervista a Bruno Biavati

Brunella Danesi, Maria Bellucci

27. La rivoluzione degli RNA 2: I ribozimi

Luciano Cozzi

34. La candela

Elio Fabri

39. Gazebo Percezione e risposta delle piante agli stimoli dell'ambiente nel quale vivono (parte seconda)

Fabrizia Gianni

43. Educazione e comunicazione nel contesto museale

Marcello Sala biologo e formatore, Milano

47. I prioni, proteine eretiche

Isabella Marini

54. Quello che i libri non spiegano *Energia libera ed energia legata*

Carlo Bauer, Andrea Spanedda, Ahmed Mohamud
Osman, Paolo Toti, Valerio Pelaia dip. Biochimica Univ.
Pisa

60. romammirabile *Sotto i tigli* (settimana puntata)

Rosalba Conserva doc. Lettere Roma

Laura Scarino ric. INRAN Roma

64. Spazio in affitto *Il mondo perduto*

Stefano Dalla Casa stud. Sc. Nat. Bologna

66. Il verziere di Melusina

Laura Sbrana

69. Recensioni

Luciano Luciani, Claudia Binelli, Lucia Stelli

72. Figliastri d'oltreoceano

Davide Melisi medico MD Anderson Cancer Center,
Huston USA

74. Il mestiere più bello del mondo

Vincenzo Terreni

75. Premio Nazionale "Mario Rippa"

Scuole Medie Superiori, 4a edizione 2005-2006

Degli articoli firmati sono responsabili gli Autori

Fonti delle illustrazioni

I prioni, proteine eretiche

ISABELLA MARINI

Terribili, contagiose e fatali malattie neurodegenerative. Migliaia di mucche britanniche sacrificate. Bistecche proibite. Mucca pazza. Queste sono le cose che ci vengono in mente quando sentiamo pronunciare il termine prione. Ma non è di questo che voglio parlarvi, voglio spostare la vostra attenzione dalle malattie che i prioni causano all'enigmatico "codice informazionale" della conformazione proteica. Anche se dovrò partire da loro, i nostri protagonisti non saranno i prioni dello scrapie o del morbo di Creutzfeld-Jacob, ma quelli molto meno noti del lievito.

Il rivoluzionario concetto di prione

Stanley Prusiner vinse nel 1997 il premio Nobel per le sue solide ricerche che dimostravano la strana idea di una proteina infettiva o prione (prion, acronimo di *proteinaceous infective only particle*, particella infettiva unicamente proteica) come agente eziologico delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE).

Già due secoli fa avevamo a che fare con lo scrapie, il prototipo della TSE che colpisce pecore e capre; c'era la rivoluzione industriale col business della tessitura della lana e una malattia delle pecore era quanto mai inopportuna. I primi timidi tentativi di studiare la malattia furono infruttuosi, il lunghissimo tempo di incubazione non consentiva neppure di dimostrare la sua contagiosità. Solo nel 1930 si riuscì, sacrificando qualche gregge e dopo diversi anni di osservazione, ad ottenerne la trasmissione sperimentale; lo scrapie era quindi una malattia infettiva ed avevamo in mano un estratto che conteneva l'agente responsabile, ma la strada da percorrere era ancora lunga. Le cose cominciarono a cambiare quando si scoprì che i criceti, dopo inoculazione intracerebrale dell'estratto scrapie, svilupparono la malattia solo in 60 giorni. Nel 1972 fu una paziente che morì di morbo di Creutzfeld-Jacob (una versione umana di TSE) a sollevare l'interesse di Prusiner per questa malattia capace di uccidere una persona in due mesi distruggendone il cervello, lasciando perfettamente integro il resto del corpo e senza provocare alcun tipo di risposta immunitaria. Prusiner usando il saggio sui criceti riuscì, con non poche difficoltà tanto da definire il suo lavoro un *biochemical nightmare* (incubo biochimico), a purificare l'agente responsabile dell'infettività; la sua caratterizzazione si rivelò una miniera di sorprese. Prima sorpresa: si trattava di una singola proteina costituita da residui prevalentemente idrofobici che aggregava originando fibre amiloidi (1); l'agente era inattivato da tutti i trattamenti proteotossici, ma non da quelli che alteravano gli acidi nucleici.

Un agente infettivo senza acidi nucleici! Questa fu la prima e non l'unica sorpresa. Il successivo passo fu l'identificazione del gene (*PRNP* (2)) coinvolto ed arrivò puntuale anche la seconda sorpresa: si trattava di un normalissimo gene cellulare, presente in tutti i vertebrati e anche in invertebrati come *Drosophila*, trascritto a livelli simili sia nei cervelli sani che in quelli infetti. *PRNP* codificava per una proteina (dalla funzione tuttora ignota), posizionata sulla superficie neuronale ed ancorata alla membrana mediante gruppi di glicosilfosfatidilinositolo. Terza sorpresa: topi *knockout* (3) per *PRNP* erano normali, davano una normale progenie e soprattutto non si ammalavano dopo inoculazione intracerebrale dell'agente infettivo.

Arriviamo all'interpretazione di Prusiner. Il prione è una proteina endogena (Prion Protein o PrP) di cui esistono due isoforme stabili, ma con proprietà fisico-chimiche profondamente diverse: quella normale (PrP^c sta per cellulare) e quella patologica (PrP^{Sc} sta per scrapie) che vengono convertite l'una nell'altra. Ma cosa rende PrP^c così diversa da PrP^{Sc}? La sequenza non ci aiuta: è identica. Potrebbero differire nelle strutture superiori. L'analisi NMR (4) della PrP^c umana rivela una struttura costituita da una coda N-terminale flessibile e disordinata ed un dominio C-terminale con 3 alfa-eliche e un corto beta-foglietto antiparallelo. Purtroppo non è possibile l'analisi NMR di PrP^{Sc}. E' stato invece il dicroismo circolare (5) che ci ha mostrato la diversità delle due forme. PrP^c ha un alto (40%) contenuto di alfa-elica e solo il 3% di beta-foglietto (in accordo con l'NMR); mentre PrP^{Sc} ha meno (30%) alfa-elica ed un alto (43%) contenuto di beta-foglietto. Probabilmente la sua regione N-terminale si ripiega per formare un beta-foglietto a 4 filamenti e solo due eliche di PrP^c mantengono la conformazione originaria (Fig. 1).

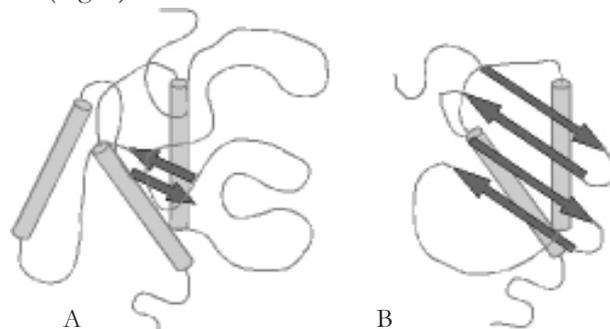


Figura 1. A) Modello strutturale di PrP^c. B) Modello strutturale di PrP^{Sc}, da notare la parziale transizione da alfa-elica a beta-foglietto. I cilindri grigio chiaro indicano l'alfa-elica, le frecce grigio scuro il beta-foglietto, le linee indicano la parte non organizzata della struttura primaria

La transizione tra le due forme è autocatalitica: la conformazione di PrP^c, stabile in assenza di PrP^{Sc}, viene destabilizzata e convertita in PrP^{Sc} non appena questo “stampo” è presente nella cellula; quindi la propagazione del prione deriva dalla capacità di PrP^{Sc} di interagire con PrP^c e catalizzarne il cambiamento conformazionale (Fig. 2). L'ipotesi di Prusiner è stata sperimentalmente confermata; PrP^{Sc} *in vitro* ed *in vivo* catalizza la conversione di PrP^c.

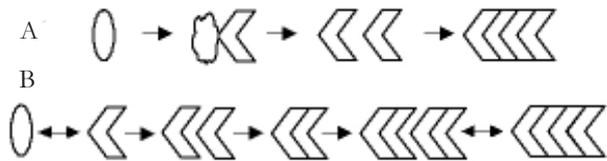


Figura 2. I due modelli che spiegano il *contagio strutturale prionico*. A) Il modello dell'eterodimero. La conversione del prione dalla forma cellulare a quella infettiva avviene in un dimero misto in cui la forma patologica induce la trasformazione di quella cellulare grazie ad un intermedio instabile parzialmente ripiegato: una sorta di ruolo *istruttivo* di PrP^{Sc} nei confronti di PrP^c. B) Il modello della polimerizzazione-nucleazione. La forma infettiva è un polimero insolubile che catalizza la polimerizzazione della proteina cellulare solubile. PrP^c e PrP^{Sc} sono in equilibrio termodinamico reversibile. Quando diverse PrP^{Sc} si organizzano in una struttura ordinata, vengono reclutate nuove PrP^{Sc}; a questo punto si formano le strutture amiloidi. Queste ultime, se frammentate, fanno da nuclei di polimerizzazione nei confronti di altre PrP^{Sc}. E' plausibile che i due modelli descrivano aspetti diversi di uno stesso processo.

Non siamo invece per ora riusciti a produrre *de novo* e *in vitro* prioni infettivi purificati; probabilmente la conversione è mediata da uno sconosciuto chaperone, la fantomatica proteina X. PrP^{Sc}, resa appiccicosa dall'alto contenuto di beta-foglietto, aggrega producendo le placche amiloidi responsabili della degenerazione neuronale caratteristica delle malattie da prioni. Entrambe le forme possono essere soggette alla proteolisi, ma mentre PrP^c viene completamente degradata, PrP^{Sc} perde solo i residui terminali e ciò che rimane è un nucleo da 27-30 KDa resistente alla proteolisi che ha ancora un alto contenuto di beta-foglietto ed una intatta potenzialità autoaggregante. Con una metafora piuttosto efficace questa forma di contagio strutturale è stata paragonata a quello che succede mettendo una mela marcia in un cesto di mele sane. Da musicista mi sembra molto più calzante paragonarlo al fenomeno della risonanza per simpatia. Quando due distinte sorgenti sonore sono in grado di produrre suoni della stessa frequenza e una delle due è messa in vibrazione, quella a riposo comincerà a vibrare per simpatia emettendo lo stesso suono. Nel passato c'era uno strumento, la viola d'amore, che sotto le normali corde in budello aveva delle corde simpatiche in metallo opportunamente accordate; sfregando con l'archetto le corde in budello le altre risuonavano spontaneamente;

questo arricchiva l'espressività dei passaggi melodici lenti di un timbro dolce e argentino.

Ma cosa c'è di tanto rivoluzionario nel concetto di prione? A parte l'idea di un agente infettivo interamente proteico, la rivoluzione è soprattutto nel concetto di riproduzione per contatto che viola il dogma centrale secondo cui l'informazione va da DNA a proteina e non da proteina a proteina. Il DNA è sempre all'origine del materiale primario per la conversione: la sequenza amminoacidica di PrP^c viene trascritta e tradotta dal gene PRNP, ma il DNA non va oltre, non controlla la differenza dei tratti fenotipici; in altre parole PrP^{Sc} e PrP^c derivano dalla stessa sequenza nucleotidica ma generano fenotipi molto diversi che si autopropagano. L'attenzione di genetisti, biochimici e biologi molecolari ovviamente è stata prevalentemente rivolta alla relazione prione-malattia piuttosto che all'enigma dell'*eredità proteica*, lo scomodo fardello che i prioni portano con sé.

Quanto il concetto di prione possa mettere a disagio emerge chiaramente anche dalla bella Nobel Lecture di Prusiner, nel passo in cui parla degli ostacoli che ha dovuto superare per contrastare i suoi detrattori: *....da diversi punti di vista, l'iniziale sviluppo del concetto di prione somiglia agli inizi della storia del DNA. Il pregiudizio degli scienziati di allora era più o meno lo stesso di quelli che contrastavano il concetto di prione. Con una differenza: gli scienziati che si opponevano all'idea che il DNA fosse il materiale genetico non avevano alternative certe e ritenevano che i geni fossero costituiti da proteine solo in base a delle sensazioni derivate da dei dati sperimentali approssimativi. Invece coloro che si opponevano all'idea che i prioni fossero entità unicamente proteiche avevano più di trenta anni di conferme sperimentali a dimostrazione del fatto che l'informazione genetica di tutti gli organismi del pianeta è codificata nel DNA (o RNA nel caso di alcuni virus).*

Malattie prioniche e malattie da errato ripiegamento

Le TSE sono estremamente rare nell'uomo, anche se i mass-media ne hanno drammaticamente aumentato l'impatto emotivo, invece gli aggregati amiloidi simili a quelli dei prioni sono strettamente correlati a molte malattie non trasmissibili molto più comuni fra cui la sclerosi laterale amiotrofica, il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson ed il morbo di Huntington. Ogni malattia è caratterizzata dall'aggregazione di un particolare tipo di proteina e dalla conseguente formazione di fibre amiloidi, che hanno tipicamente la capacità prionica di provocare la conversione delle normali forme cellulari della proteina. La tendenza a formare fibre amiloidi stabili ed altamente organizzate interessa essenzialmente lo scheletro carbonioso delle proteine e non gli specifici gruppi laterali degli amminoacidi, per cui in questo fenomeno sono potenzialmente coinvolti

tutti i tipi di proteine e non solo quelle identificate come responsabili di specifiche patologie. Il fatto che parecchie proteine di diversa struttura, funzione ed origine abbiano la capacità di formare prioni suggerisce che la prionizzazione sia piuttosto diffusa in natura. Le amiloidosi sono di solito caratterizzate da una tarda comparsa, sono cioè malattie da invecchiamento che compaiono quando il sistema del controllo di qualità delle proteine (chaperone e proteasi) comincia a perdere i colpi, provocando l'accumulo e la successiva aggregazione delle proteine danneggiate. La principale differenza fra le malattie da amiloide e da prioni è la mancanza di infettività delle prime. L'infettività di PrP^{Sc} resta un mistero ed è probabilmente legata alla sua insolitamente alta resistenza alle proteasi.

I sorprendenti prioni di lievito

Nel 1971 Francois Lacroute descrisse delle misteriose caratteristiche del lievito che si propagavano apparentemente violando la genetica mendeliana. Per più di venti anni queste scomode osservazioni non ebbero seguito finché Reed Wickner non estese il concetto di prione a due enigmatici elementi non-mendeliani del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, [Ure3] e [PSI⁺] (6). Da allora la definizione di prione è stata allargata a tutte le varianti conformazionali stabili delle proteine in grado di catalizzare la propria formazione a partire dalle corrispondenti forme "selvatiche". Mentre il ruolo fisiologico di PrP^c è ancora sconosciuto, le funzioni dei prioni di lievito sono note e, come vedremo, non sono assolutamente eccezionali; ciò che li rende così particolari ed importanti sono le loro proprietà epigenetiche (7): vengono ereditati da tutta la progenie meiotica delle cellule diploidi e possono essere trasmessi per trasferimento di citoplasma da una cellula all'altra senza scambio di materiale genetico. I prioni di lievito potrebbero essere considerati elementi genetici discreti responsabili di alcuni tratti fenotipici; formalmente parlando, ciò concorda con la definizione di gene del periodo pre-DNA.

La proteina di riferimento del fenotipo prionico [Ure3], ure2, esercita una funzione regolatoria del metabolismo azotato e sembra che sia presente solo nei funghi. Sup35 è un fattore proteico di terminazione della traduzione nella sintesi proteica. Nelle cellule [psi⁻] sup35 è solubile e funzionante; nelle [PSI⁺], dove sup35 è insolubile e sequestrata nelle fibre amiloidi, la terminazione della traduzione è alterata ed anche le triplette successive al codon non senso possono essere tradotte in amminoacidi (Fig. 3). Questo fenotipo è ereditabile; sup35 allo stato [PSI⁺] provoca il cambiamento conformazionale della sup35 selvatica; tale variazione passa dalla cellula madre alla figlia perpetuando il ciclo di conversione. Ignorare un segnale di stop, così come nel traffico stradale, non è generalmente un comportamento consigliabile, ma Susan Lindquist ha

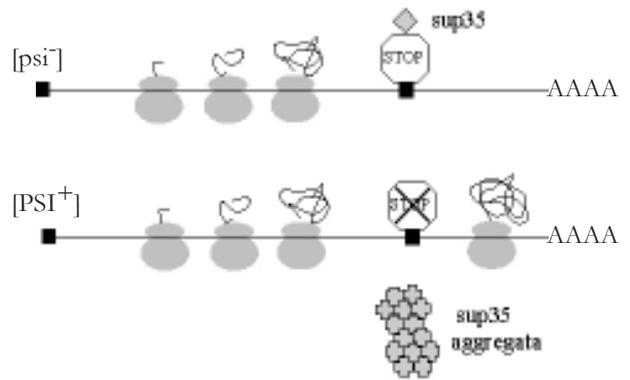


Figura 3. Il prione di lievito sup35. Nello stato [psi⁻] sup35 interviene nella terminazione della traduzione. Nello stato [PSI⁺] sup35 è sequestrata nell'aggregato e non può svolgere la propria funzione.

osservato che queste trasgressioni possono giocare un ruolo decisivo nel fornire ulteriori livelli di variabilità all'evoluzione.

La sup35 di lievito è costituita da tre regioni con diverse funzioni:

- 1) il dominio C-terminale è essenziale per la terminazione della traduzione ed è molto conservato dal lievito all'uomo;
 - 2) il dominio N-terminale è responsabile del potenziale di trasformazione prionico; in organismi diversi la sequenza non è conservata, ma le dimensioni sono simili ed è ricco di Asn e Gln;
 - 3) il dominio centrale, non conservato, ha probabilmente una funzione di solubilizzazione e/o spaziatura.
- Nonostante PrP, ure2 e sup35 non siano omologhe (8), sono molte le somiglianze delle relative forme prioniche: la resistenza alle proteasi, l'aggregazione *in vivo* ed *in vitro*, la formazione di polimeri simil-amiloidi e la regione N-terminale non strutturata. Contrariamente a quello che succede nei mammiferi, questi prioni non fanno diventare pazzi i lieviti, né ne provocano la morte, producono solo degli evidenti cambiamenti fenotipici, rendendoli così degli ideali modelli di ricerca, anche per le TSE. Com'era prevedibile, mentre i loro colleghi stavano combattendo con i recalcitranti sistemi di mammifero, gli studiosi dei prioni di lievito hanno fatto rapidi progressi, confermando in pieno l'ipotesi prionica di Prusiner e la natura unicamente proteica dell'ereditarietà prionica (9). Sono poi riusciti a dare risposta a due fondamentali questioni irrisolte: la generazione *de novo* e *in vitro* di prioni infettivi purificati e la controintuitiva esistenza di ceppi prionici. Utilizzando la parte N-terminale di sup35 è stato confermato che *in vivo* il fenotipo [PSI⁺] contagia le sup35 selvatiche, ma soprattutto che *in vitro* questo dominio assume facilmente una struttura amiloide che risulta infettiva. L'idea dei ceppi prionici è emersa dall'osservazione che esistono nei mammiferi versioni distinte delle malattie da prioni (più di 30 nella pecora, 20 nel topo e almeno 4 nell'uomo) che differiscono sia

a livello biochimico che patologico. Questo è sempre stato un cavallo di battaglia degli scettici dei prioni. Sempre grazie a sup35 è stato possibile isolare due distinti ceppi generati dalla stessa sequenza amminoacidica, che si propagano stabilmente con le stesse caratteristiche del ceppo di provenienza. I prioni quindi possono esistere in una varietà di conformazioni infettive distinte, ciascuna delle quali può fedelmente riprodurre la propria struttura venendo in contatto con le proteine selvatiche (Fig. 4). Insomma, il prione è una specie di camaleonte conformazionale.

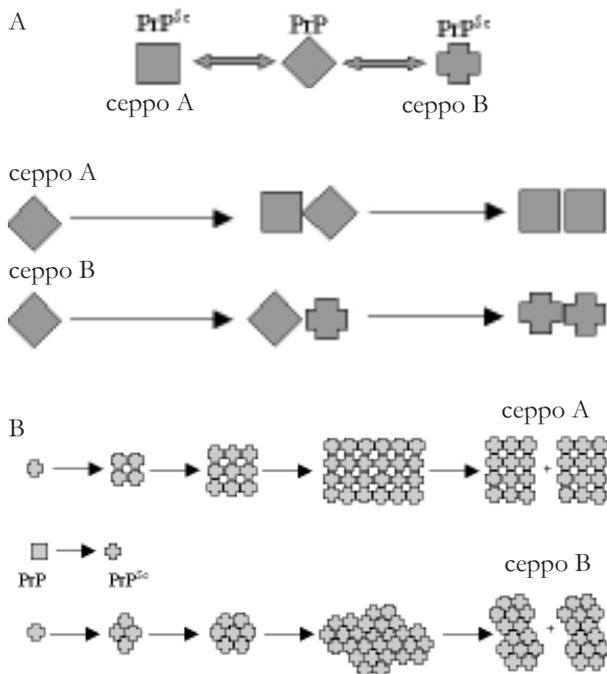


Figura 4. Modelli dei ceppi prionici. A) Il ripiegamento guidato dallo stampo: una proteina monomerica adotta molte strutture terziarie infettive, ciascuna delle quali guida la riproduzione della sua conformazione sulla sua controparte nativa. In questo caso è la struttura del monomero che comanda. B) La polimerizzazione guidata dalla nucleazione. Uno stesso ceppo di proteina prionica purificata può dare origine a diverse strutture quaternarie, ognuna delle quali assembla *in vitro* ed è in grado di propagarsi. In questo caso è la struttura dell'aggregato che comanda.

Chaperone e conversione prionica

L'eredità proteica fa pensare che il problema dei prioni non sia altro che quello della struttura delle proteine; il collegamento con gli chaperone è quindi ovvio. Gli chaperone molecolari sono proteine che assistono, facilitano ed accelerano il folding proteico sia nei confronti di polipeptidi nascenti che di proteine mature danneggiate. Quando le proteine non soddisfano i requisiti di stabilità e funzionalità vengono indirizzate verso le proteasi per l'eliminazione. Il sistema chaperone-proteasi consente quindi alla cellula di avere sempre proteine di altissima qualità.

I prioni di lievito si sono rivelati preziosi anche nello studio dell'interazione con gli chaperone. Il primo chaperone interessante a questo proposito è hsp104

(10), un'ATPasi tipica del lievito coinvolta nella risposta agli stress ambientali, dotata di un'azione disaggregante che promuove la solubilizzazione, cooperando con altri chaperone, delle proteine danneggiate ed aggregate *in vivo* e *in vitro*. Hsp104 è probabilmente necessaria sia per la generazione dell'intermedio parzialmente ripiegato di sup35 (Fig. 2A) che per il relativo processo di propagazione; infatti grazie al suo effetto disaggregante genera, a partire da grossi aggregati, dei nuclei oligomerici che danno inizio ad altri cicli riproduttivi (Fig. 5). E' critica la sua concentrazione intracellulare; a livelli molto bassi o molto alti hsp104 ha un effetto anti-prione, altrimenti promuove la prionizzazione. Poiché i livelli di hsp104 sono influenzati dagli stress ambientali, è logico supporre che certi "mutageni proteici" agiscano indirettamente sui prioni, alterando in realtà i livelli di hsp104. Quindi l'effetto dei mutageni proteici sarebbe mediato dagli chaperone nello stesso modo in cui l'effetto dei mutageni sul DNA è mediato dai suoi sistemi di riparazione.

Ma anche altri chaperone hanno a che fare con i prioni. Ssa appartiene alla principale subfamiglia citosolica delle hsp70 di lievito ed è indotta dagli stress ambientali. Una grossa quantità di Ssa favorisce [PSI+] e previene la reversione a [psi-] dovuta all'eccessiva produzione di hsp104. E' stato ipotizzato un modello di bichaperone: le hsp104 sarebbero responsabili del passaggio iniziale della propagazione prionica *in vivo* (generazione dell'intermedio instabile o dei nuclei di aggregazione), mentre hsp70-Ssa opererebbe sul passaggio successivo (conversione degli intermedi in prioni) (Fig. 5). Ssb appartiene ad un'altra subfamiglia citosolica di hsp70, è espressa costitutivamente e non è indotta da stress. Agisce sui polipeptidi nascenti e, potendo influenzare la proteolisi ubiquitina-dipendente, è considerata il "correttore di bozze" del folding proteico. Ssb contrasta la formazione e la riproduzione dei prioni; la doppia delezione di Ssb è il primo esempio di un "mutageno proteico" che favorisce la prionizzazione. Sembra che i prioni di lievito abbiano imparato ad usare la risposta allo stress a loro vantaggio, nello stesso modo in cui virus e trasposoni utilizzano la replicazione ed il meccanismo di riparazione del DNA per la loro riproduzione.

Gli studi sul lievito hanno dimostrato che i prioni possono sfruttare la rete chaperone assistita per assicurare la propagazione stabile della forma infettiva. Quanto gli studi sui lieviti possono essere indicativi di meccanismi che riguardano PrP? Come ho già accennato, nei mammiferi la conversione prionica *in vivo* sembra che sia mediata da uno chaperone non ancora identificato. Gli chaperone, come hsp104 o hsp70, sono proteine molto antiche, conservate e con un vasto spettro d'azione, per cui è ovvio pensare che il loro bersaglio non sia soltanto sup35. Le hsp70 sono molto conser-

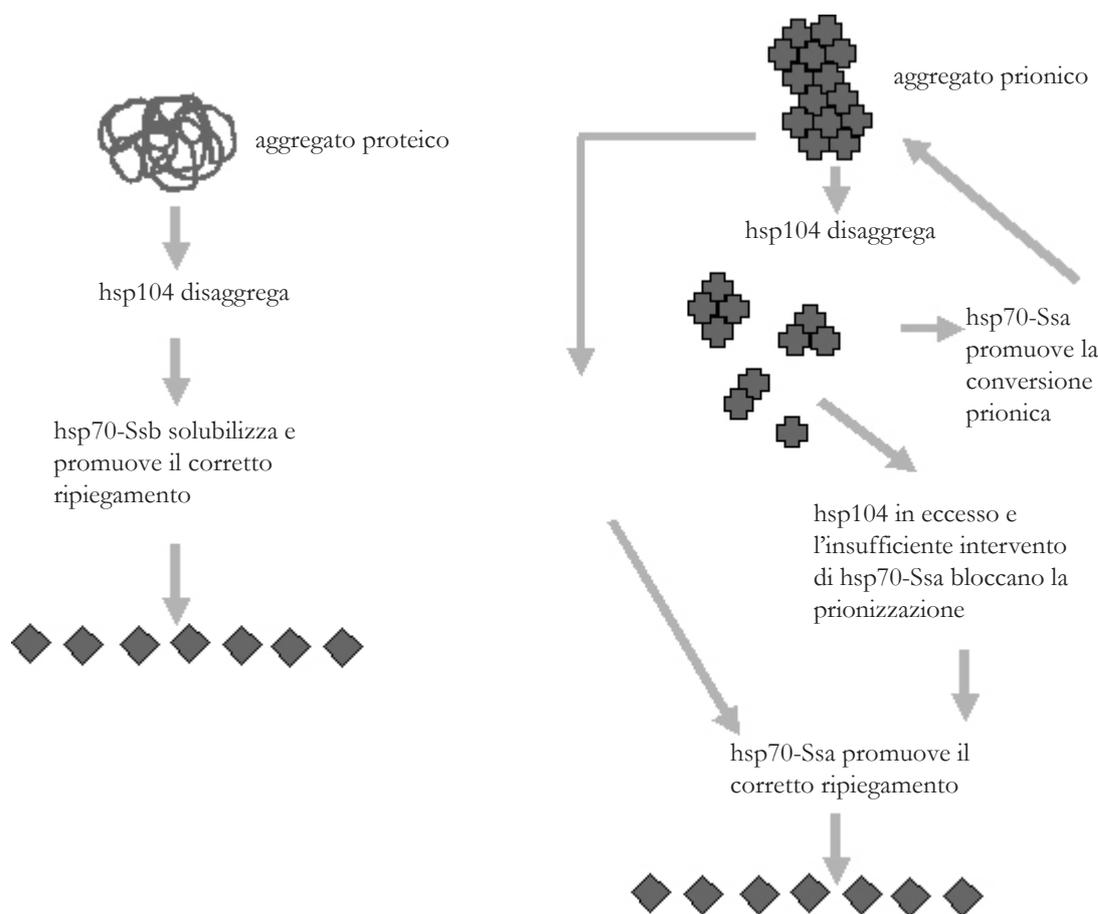


Figura 5. Paragone dell'effetto chaperone su aggregati da shock termico e prionici nel lievito. L'azione disaggregante di hsp104 è responsabile della formazione dei nuclei prionici; hsp70-Ssa promuove la prionizzazione, hsp70-Ssb la contrasta promuovendo il corretto ripiegamento delle proteine danneggiate, substrato della conversione.

vate e presenti anche nei mammiferi per cui è plausibile che svolgano lo stesso ruolo anche nella propagazione della forma prionica di PrP. Invece le hsp104 non sono presenti nei mammiferi, dove si trovano però proteine del tipo AAA+ che appartengono alla stessa famiglia. Per ora non possiamo dire di più, ma il sospetto che anche nei mammiferi siano degli chaperone a modulare la prionizzazione è ancora più fondato dopo le scoperte fatte nel lievito.

La definizione di gene

I geni sono unità strutturali e funzionali di informazione ereditabile.

Stati alternativi dei geni (alleli) controllano le differenze fra fenotipi alternativi.

Le mutazioni sono cambiamenti ereditabili a livello fenotipico.

Queste sono le definizioni di geni, alleli e mutazioni della genetica classica; come si può facilmente notare non c'è alcun riferimento alla specie molecolare depositaria dell'informazione genetica. Fino al 1944 si pensava che fossero le proteine a costituire il materiale genetico. A titolo di esempio Phoebus Levene, uno dei padri degli acidi nucleici, nel 1930 scriveva: "La natura chimica dei geni è sconosciuta. Essi sono probabilmente proteine, perché gli acidi nucleici consistono di

pochi blocchi di tetranucleotidi. Questa struttura semplice li rende improbabili candidati come portatori della grande quantità di informazioni necessarie per agire come geni". La doppia elica e gli sviluppi successivi hanno cambiato il paradigma; i manuali odierni definiscono il gene come una sequenza di DNA; la mutazione è un'alterazione di questa sequenza.

I ruoli sembravano assegnati una volta e per sempre: ruolo genetico agli acidi nucleici ed enzimatico alle proteine. Il primo scossone a questo principio di separazione dei poteri è arrivato dai ribozimi, RNA con proprietà enzimatiche. Al DNA rimaneva il monopolio del ruolo genetico. Curiosamente la prima evidenza di eredità non legata agli acidi nucleici è più vecchia della doppia elica; nel 1937 Tracy Sonneborn, studiando la genetica del paramecio, ha scoperto che parecchi dei caratteri esaminati, fra cui la struttura corticale ed i tipi sessuali, non seguono affatto le leggi di Mendel, ma un'ereditarietà di tipo citoplasmatico. Se una cellula selvatica di paramecio riceve un piccolo trapianto corticale inserito con polarità inversa, le unità corticali trapiantate si duplicano conservando la polarità inversa e formano, dopo qualche divisione, delle strutture a polarità inversa da un polo all'altro della cellula, parallele alle strutture normali, una sorta di *situs inversus* cellulare. Questa modificazione dell'architettura

ra corticale si può mantenere mediante centinaia di divisioni cellulari e si eredita negli incroci. L'eredità di struttura rivela dei meccanismi generali che stabiliscono una *memoria strutturale* svincolata dal DNA; l'architettura complessiva non sarebbe quindi geneticamente programmata in dettaglio. Nel corso della divisione della cellula, per localizzare organizzare ed orientare complessi sopramolecolari e strutture subcellulari, utilizza degli elementi strutturali e dei marcatori di polarità già presenti, come i sassolini bianchi di Pollicino. A livello molecolare la variazione ereditaria osservata nell'eredità corticale riguarda l'organizzazione spaziale delle strutture proteiche, proprio come nel caso dei prioni. Gli studi di Sonneborn sono stati accantonati per tanti anni a causa dell'eterodossia dei fenomeni mostrati dal paramecio, questo simpatico e bizzarro protozoo dotato di un'architettura bizantina e dimorfismo nucleare, Eric Meyer li sta riportando alla luce.

E poi è arrivato Stanley Prusiner con i prioni, entità di natura proteica autoreplicanti, infettive e mancanti di qualsiasi tipo di acido nucleico...

Mutazioni geniche e mutazioni proteiche: un arduo paragone.

Come per PrP anche i prioni di lievito non sono completamente svincolati dal genoma cellulare, infatti i geni nucleari sono indispensabili per le proteine prioniche, ma i tratti fenotipici non sono determinati dalla sequenza del DNA; sia le proteine selvatiche che quelle mutate hanno la stessa sequenza genica ed amminoacidica ed i tratti fenotipici alternativi vengono ereditati dalle generazioni successive. A questo punto possiamo considerare l'isoforma cellulare e quella prionica come "alleli" alternativi degli elementi genetici basati sulle proteine. La conversione di un allele in un altro sarebbe analogo ad una "mutazione" a livello proteico. L'uso della parola mutazione in questo contesto scandalizzerà un odierno genetista, ma inizialmente il termine mutazione non significava altro che cambiamento ereditario di fenotipo. Esaminando il ruolo degli chaperone nella propagazione prionica abbiamo parlato di mutageni ed antimutageni proteici. Ma possiamo andare ancora avanti. C'è un interessante parallelo tra il meccanismo di "replicazione del DNA" e "replicazione dei prioni". I componenti della replicazione/riparazione del DNA controllano il DNA, cioè il materiale codificante dell'ereditarietà basata sugli acidi nucleici. In modo simile, i componenti del meccanismo della replicazione prionica controllano i processi di ripiegamento proteico e assemblaggio dei complessi oligomerici ovvero la generazione e la riproduzione della conformazione proteica, il "materiale codificante" dell'ereditarietà di struttura. Inoltre il sistema di "correzione di bozze" del folding della cellula è generalmente capace di tenere la prionizzazione a

livelli molto bassi nello stesso modo in cui il sistema di correzione del DNA contrasta la mutabilità spontanea proteggendo il genoma.

I prioni potrebbero essere vantaggiosi?

La maggior parte dei prioni e degli aggregati amiloidi o simil-amiloidi sono svantaggiosi e quindi perchè si sono conservati nell'evoluzione? Se c'è necessità di una rapida ristrutturazione della composizione della popolazione in risposta ai cambiamenti ambientali, le variazioni basate sulle "mutazioni proteiche" fornirebbero uno strumento molto flessibile, efficiente e veloce rispetto alla variazione genetica basata sul DNA. Oppure si potrebbe pensare che i prioni rappresentino degli elementi genetici egoisti che hanno imparato ad evadere i processi di ricambio proteico usando il sistema di difesa cellulare dallo stress per il loro unico vantaggio. In molti casi le isoforme prioniche sono molto più proteasi-resistenti rispetto alle isoforme solubili; alcuni domini sono particolarmente efficaci nell'induzione prionica rispetto alla proteina intera, quindi proprio i frammenti derivati da una prima proteolisi sarebbero quelli che la eviterebbero ulteriormente. L'estensione del modello del DNA egoista al mondo proteico potrebbe avere interessanti implicazioni, anche da un punto di vista evolutivo.

Ma allora se la distinzione tra geni (responsabili dell'immagazzinamento dell'informazione genetica) e proteine (responsabili dell'espressione fenotipica) non è più valida, allora siamo stati troppo sbrigativi a rifiutare l'ereditarietà dei caratteri acquisiti? Il meccanismo epigenetico più noto è la metilazione del DNA, ma la memoria corticale del paramecio ed il concetto di prione lo estendono ulteriormente. Per recuperare completamente Lamarck dovrebbe essere provato che le variazioni genetiche basate sulle proteine possono generare nuovi tratti vantaggiosi, acquisiti, ereditabili ed adeguati al fattore inducente; questa prova per ora non c'è. Si potrebbe anche obiettare che i prioni descritti finora siano esempi isolati ed eccezionali, che poco probabilmente potrebbero influenzare il generale disegno dell'evoluzione; ma questa conclusione è prematura; la scoperta dei prioni ha richiesto degli strumenti molto sofisticati che solo recentemente sono stati messi a punto. Quanto ho descritto indica complessivamente che la capacità di formare strutture stabili alternative che si riproducono grazie ad uno stampo è diffusa in natura ed è possibile quindi che la prionizzazione sia responsabile di alcuni tratti non mendeliani di piante ed animali.

Conclusione

La cellula, oltre alle informazioni lineari codificate nel DNA, dispone di un altro fondamentale codice, quello delle informazioni tridimensionali spaziali i cui depo-

sitari sono le proteine. In altre parole, oltre al genoma c'è anche lo "strutturoma", che forse trasmette tanta informazione quanto il DNA. Siamo molto lontani da quello scenario che vedeva il DNA unico ed incontrastato padrone della complessità della vita; sicuramente è uno degli attori principali, ma non il solo protagonista (11). Allora i concetti tradizionali dell'evoluzione che non prendono in considerazione l'ereditarietà non contemplata dal DNA vanno rivisti ed integrati? Le tecniche di clonazione i cui protocolli prevedono solo il trasferimento del DNA producono organismi geneticamente identici? Il sequenziamento del genoma ci dà realmente l'intero quadro sulla composizione genetica dell'organismo? La ricaduta dei progetti di genomica su larga scala va ridimensionata? A questo punto suona profetica la frase conclusiva della Nobel Lecture di Prusiner: *...il futuro di questa nuova tematica biologica si rivelerà ancora più interessante e produttivo non appena emergeranno nuove ed imprevedibili scoperte.*

In questa digressione forse mi sono lasciata un po' prendere la mano da queste piccole proteine eretiche, ma l'idea che fra il "me" fenotipico ed i miei geni non ci sia un abisso di incomunicabilità e che la vita sia infinitamente più complessa di quanto il paradigma DNA-centrico facesse pensare mi fa tirare un sospiro di sollievo!

Isabella Marini

Bibliografia essenziale

- Marini, I. (2005) Evoluzione e risposta cellulare allo stress. *Le Scienze Naturali nella Scuola*. 14: 135-157.
- Levene P.A., Bass L.W. (1931) *Nucleic Acids*. Chemical Catalogue Co, New York.
- Prusiner, S.J. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 13363-83.
- King, C.Y., Diaz-Avalos, R. (2004) Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428: 319-23.
5. Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., Weissman, J.S. (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428: 323-28.
- Jones, G.W., Tuite, M.F. (2005) Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays*. 27: 823-32.
- Aguzzi, A., Polymenidou, M. (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116: 313-27.
- Tuite, M.F., Cox, B.S. (2006) The [PSI+] prion of yeast. A problem of inheritance. *Methods* 39: 9-22.
- Chernoff, Y.O. (2001) Mutation processes at the protein level: is Lamarck back? *Mutat Res*. 2001488:39-64.
- Chernoff, Y.O. (2004) Amyloidogenic domains, prions and structural inheritance: rudiments of early life or recent acquisition? *Curr Opin Chem Biol*. 8: 665-71.
- Li, L., Lindquist, S. (2000) Creating a protein-based element of inheritance. *Science* 287: 661-4.
- Meyer, E., Garnier, O. (2002) Non-mendelian inheritance and holomogy-dependent effects in ciliates. *Adv. Genet*. 46: 305-337.
- Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence for a prion analog in *S. cerevisiae*. *Science* 264: 566-569.

Note

- (1) Si dicono amiloidi vari tipi di aggregati proteici fibrosi insolubili.
- (2) Convenzionalmente per indicare un gene si utilizza il corsivo; la proteina corrispondente è indicata più o meno con la stessa sigla ma con caratteri normali; un fenotipo è indicato invece fra parentesi quadre.
- (3) Utilizzando la tecnica del DNA ricombinante è possibile incorporare nel genoma di un organismo geni (transgeni) di un altro. Perché il cambiamento sia permanente ed ereditabile, il transgene deve essere stabilmente integrato nelle cellule germinali dell'organismo ricevente. Se il transgene è alterato e difettoso e rimpiazza la sua normale controparte per ricombinazione, il gene normale può essere "knocked out" ovvero inattivato permanentemente.
- (4) Risonanza magnetica nucleare.
- (5) Il dicroismo circolare è una tecnica spettroscopica che misura l'assorbimento differenziale fra la luce circolarmente polarizzata a destra ed a sinistra, dovuto ad asimmetrie strutturali. Nella determinazione della struttura secondaria delle proteine il cromoforo è il legame peptidico; il segnale fra 190 e 240 nm indica la regolarità del contesto in cui è inserito.
- (6) Sup35 è il gene che codifica per la proteina Sup35; quest'ultima dà un fenotipo normale [psi-] ed uno prionico [PSI+]. Vedi anche nota 2.
- (7) L'ereditarietà epigenetica (epi significa sovrapposizione, aggiunta) generalmente comprende tutti i processi in cui la trasmissione di caratteri ereditari non è direttamente attribuibile alla sequenza di DNA.
- (8) Anche dimensionalmente sono diverse, la PrP umana è costituita da 253 amminoacidi, ure2 da 354 e sup35 da 453.
- (9) Susan Lindquist ha sintetizzato delle proteine chimeriche costituite dai domini NM di sup35 fusi con una proteina di mammifero, il recettore per i glicocorticoidi di ratto. Le proteine di fusione avevano diversi fenotipi ereditabili e conservavano a vari livelli l'attività del recettore.
- (10) L'acronimo significa heat shock protein e 104 si riferisce ai 104 KDa della molecola.
- (11) Anche gli RNA stanno svelando dei ruoli finora insospettati.