Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Gianmarco Corneo, Luciano Zardi, Elio Polli

Sul DNA mitocondriale umano e di altre specie di mammifero

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **52** (1972), n.3, p. 431–439.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_3_431_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

Articolo digitalizzato nel quadro del programma bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica) SIMAI & UMI
http://www.bdim.eu/

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Accademia Nazionale dei Lincei, 1972.

Biologia. — *Sul DNA mitocondriale umano e di altre specie di mammifero.* Nota (*) di GIANMARCO CORNEO, LUCIANO ZARDI e ELIO POLLI, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — In the present work some physico-chemical properties of human and guinea pig mitochondrial (mit) DNAs are illustrated. The separation of the complementary strands of guinea pig mit DNA in alkaline CsCl and the reassociation kinetics of human mit DNA have been studied. On the basis of the reassociation kinetics data the genetic complexity of human mit DNA has been evaluated: the low complexity of human mit DNA appears to suggest that it contains repeated nucleotide sequences.

Le proprietà del DNA mitocondriale di numerose specie animali e vegetali sono state descritte da vari Autori [1–3]. Nei mammiferi e in altre specie superiori, come gli uccelli e gli anfibi, le molecole di DNA mitocondriale sono circolari ed hanno una dimensione di 5 micron; nelle specie inferiori, come nei lieviti, funghi e protozoi, esse hanno dimensioni superiori, essendo lunghe fino a 20 micron e più, e sono apparse lineari.

Numerose indagini sono state inoltre rivolte allo studio della funzione del DNA mitocondriale, prevalentemente ibridando il DNA mitocondriale sia con l'RNA totale estratto dai mitocondri, sia con vari tipi di RNA mitocondriale isolati [4–5].

Scopo di questa Nota è di presentare alcuni dati aggiuntivi sulle proprietà chimico–fisiche del DNA mitocondriale umano, e di mammifero in generale. Particolare riferimento viene qui fatto alla determinazione della cinetica di rinaturazione del DNA umano mitocondriale, come mezzo di studio della sua complessità genetica. La funzione genetica del DNA mitocondriale viene quindi considerata alla luce dei dati qui riportati, e dei dati noti dalla letteratura.

Il DNA mitocondriale fu ottenuto da placenta, da leucociti leucemici umani e da fegato di cavia come precedentemente descritto [6–7].

Alcune caratteristiche del DNA mitocondriale umano sono riassunte nella fig. 1, ove è riportato il suo aspetto in diverse condizioni, quando venga centrifugato in gradienti di CsCl neutro all'equilibrio nell'ultracentrifuga analitica [8]. Il DNA mitocondriale umano ha una densità di 1,707 g/ml in CsCl neutro (fig. 1 *b*), superiore alla densità media del DNA nucleare umano (fig. 1 *a*). Quando il DNA mitocondriale viene sottoposto a denaturazione termica in 1×SSC (NaCl 0,15 M + Sodio citrato 0,015 M) seguita da raffreddamento rapido, le molecole di DNA mitocondriale circolari chiuse

(*) Lavoro eseguito con l'apporto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche. (Contratto n. 70.01207.04.115.253).

(**) Nella seduta dell'11 marzo 1972.

[9–10] rinaturano istantaneamente e conservano la densità nativa, mentre le molecole lineari o circolari, che presentino almeno un punto di rottura di una singola elica, aumentano in densità (fig. 1 *c*).

Se il DNA mitocondriale viene sottoposto a trattamento con ultrasuoni e con alcali, in modo da rompere tutte le molecole circolari prima della denaturazione [11], un solo picco di DNA denaturato è presente in CsCl neutro (fig. 1 *d*). Quando il DNA mitocondriale trattato con ultrasuoni e con alcali e quindi denaturato viene sottoposto a rinaturazione termica, esso riacquista molto rapidamente la densità nativa in CsCl neutro (fig. 1 *e*).

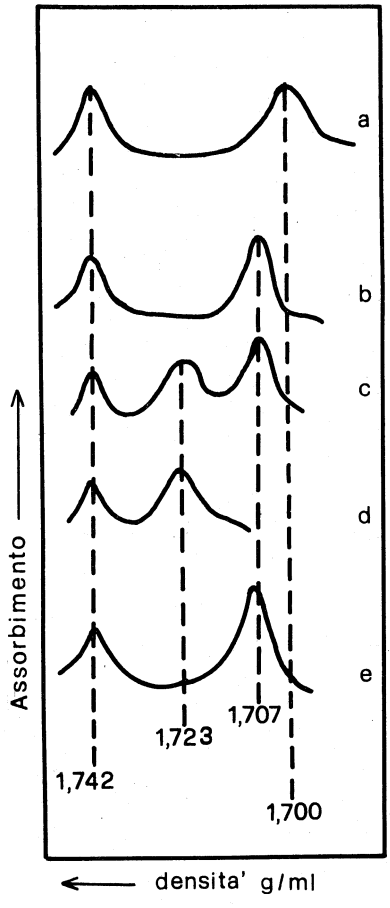

Fig. 1. – Tracciati densitometrici di DNA umano nucleare e mitocondriale centrifugati all'equilibrio in gradienti di CsCl neutro nell'ultracentrifuga analitica Spinco modello E. Il picco sulla sinistra in ciascun tracciato corrisponde al DNA del fago 2 C del *Bacillus subtilis* (densità = 1,742 g/ml), aggiunto ai gradienti come riferimento. DNA nucleare (*a*); DNA mitocondriale nativo (*b*), denaturato col calore (*c*), denaturato col calore dopo trattamento con ultrasuoni e con alcali (*d*), e quindi rinaturato per 30′ in 2×SSC a 60° (*e*).

Nella figura successiva (fig. 2) sono riportate le curve di assorbimento temperatura in 0,1×SSC (NaCl 0,015 M + sodio citrato 0,0015 M) [12] del DNA mitocondriale umano nativo (*a*), in precedenza denaturato (*b*) e sottoposto a rinaturazione termica (*c*). Quest'ultima curva indica che il DNA mitocondriale dopo denaturazione riacquista rapidamente la struttura nativa a doppia elica: il fatto che la curva di fusione del DNA rinaturato corrisponda quasi perfettamente a quella del DNA nativo indica che la riassociazione è specifica e completa.

Come si è accennato in precedenza il DNA mitocondriale umano è costituito da molecole aventi almeno due forme molecolari diverse [9–10]: circolare e lineare o circolare con almeno una rottura di una singola elica.

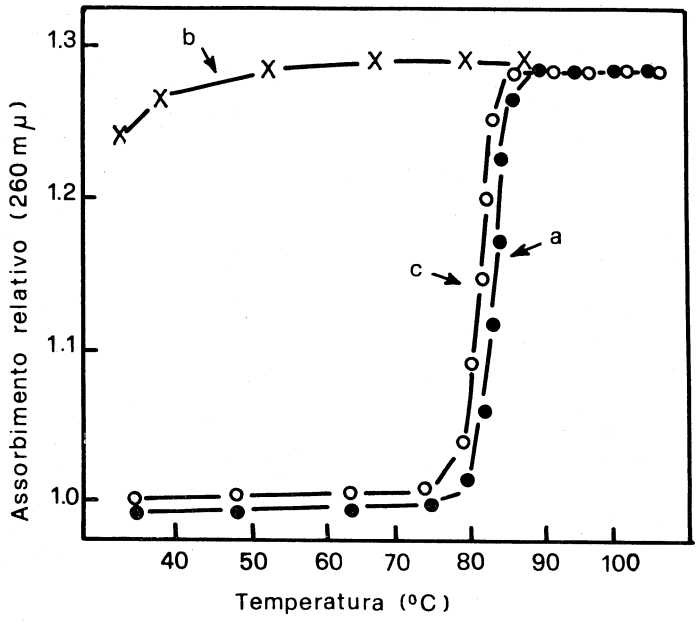

Fig. 2. – Curve di assorbimento–temperatura in 0,1 × SSC del DNA mitocondriale umano nativo (*a*), denaturato e raffreddato rapidamente (*b*) e quindi rinaturato per 2 ore in 2 × SSC a 60° (*c*).

Queste due forme molecolari hanno una velocità di sedimentazione diversa, come appare dalla fig. 3, che riporta esperimenti eseguiti nell'ultracentrifuga analitica secondo una metodica precedentemente descritta [13].

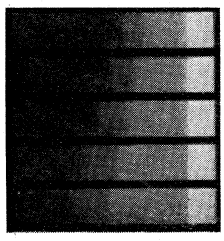

Fig. 3. – Sedimentazione del DNA mitocondriale umano nativo, centrifugato nell'ultracentrifuga analitica Spinco modello E a 35.600 giri/min. in NaCl 0,2 M (pH 7). Le fotografie all'ultravioletto furono prese ad intervalli di 4 minuti.

Un'altra caratteristica del DNA mitocondriale di mammifero è la diversa densità delle due eliche complementari in gradienti di CsCl alcalino all'equilibrio nell'ultracentrifuga analitica [7], come appare dagli esperimenti riportati nella fig. 4, riguardanti il DNA mitocondriale umano e di cavia. Ciò è dovuto ad una differenza di composizione in basi fra le due eliche, ed è

stato riscontrato in altri DNA aventi una sequenza di basi molto semplice, come i DNA satelliti nucleari.

Le due eliche complementari possono essere separate in un gradiente di CsCl alcalino preparativo (fig. 5): esse differiscono in densità anche in CsCl neutro (fig. 6 *a*, *b*). Ciascuna delle due eliche complementari non dimostra alcuna capacità di rinaturare quando sia sottoposta a rinaturazione da sola. Se invece le due eliche complementari sono rinaturate insieme in soluzione in quantità equimolari, si riscontra una rapida e completa rinaturazione, valutata in base alla densità in CsCl del DNA rinaturato ottenuto (fig. 6 *c*).

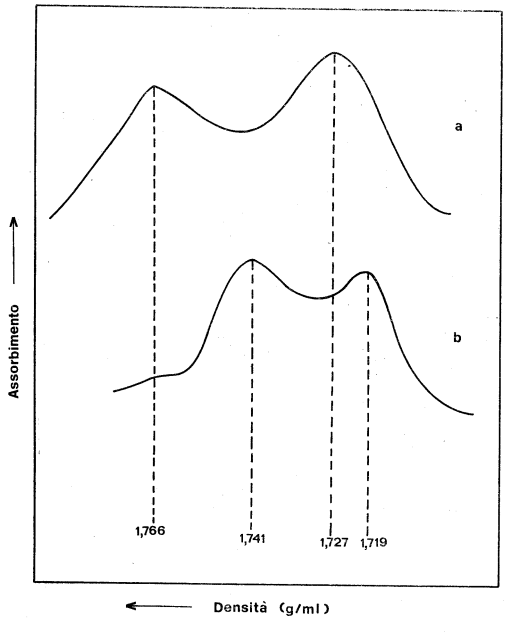

Fig. 4. – Tracciati densitometrici del DNA mitocondriale umano (*a*) e di cavia (*b*), centrifugati in gradienti di CsCl alcalino all'equilibrio nell'ultracentrifuga analitica Spinco modello E. Le densità delle bande di DNA furono determinate in base alla densità iniziale della soluzione e alla distanza dal punto medio del gradiente.

Nella fig. 7 è riportata una curva di riassociazione ottica del DNA mitocondriale umano (*a*), ridotto a forma lineare mediante trattamento con alcali e quindi rinaturato a 60° dopo denaturazione termica [11]. La cinetica di rinaturazione è stata determinata allo scopo di valutare la complessità genetica del DNA mitocondriale umano. La cinetica di rinaturazione di un DNA e la sua complessità genetica sono infatti inversamente correlate. Poiché la circolarità del DNA mitocondriale può interferire nella determinazione della cinetica di rinaturazione, esso è stato ridotto a forma lineare mediante trattamento con alcali per 18 ore in tampone Na_2CO_3—NaOH (pH 12,3). Dopo tale trattamento tutte le molecole circolari del DNA mitocondriale sono sicuramente rotte, come è provato dalla separazione delle eliche complementari in CsCl alcalino e dalla velocità di sedimentazione di 7 S, determinata mediante sedimentazione nell'ultracentrifuga analitica [13].

Come curve di riferimento sono pure riportate nella fig. 7 le curve di riassociazione–temperatura del fago T_7 (*b*) e del DNA satellite di topo (*c*)

la cui complessità genetica è nota. Tali due DNA sono stati scelti come riferimento perché hanno una complessità genetica rispettivamente di poco superiore ed inferiore rispetto a quella presunta del DNA mitocondriale: la complessità genetica è di 20 milioni di dalton per il DNA del fago T_7 e di 180.000 dalton per l'unità ripetitiva del DNA satellite di topo.

La cinetica di riassociazione è espressa mediante un valore denominato «Cot» riportato sulle ascisse, corrispondente al prodotto della concentrazione molare del DNA sottoposto a rinaturazione in soluzione per il tempo di rinaturazione, espresso in secondi. Il Cot 1/2 è il valore di Cot a cui si ha una rinaturazione del 50 % e tale valore è un indice della complessità genetica.

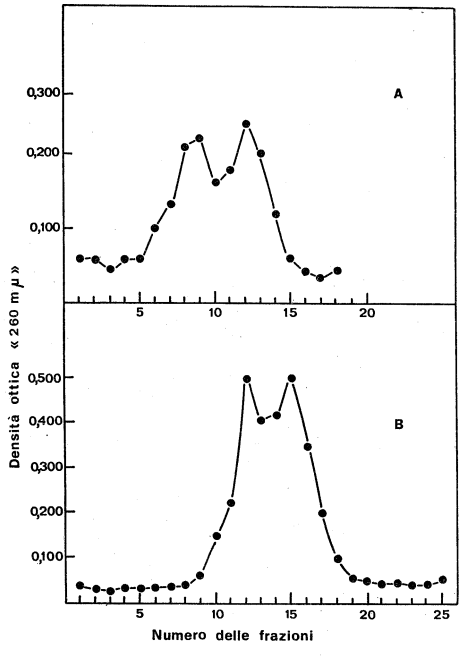

Fig. 5. – Frazionamento del DNA mitocondriale umano (A) e di cavia (B) in gradienti di CsCl alcalino all'equilibrio nell'ultracentrifuga preparativa Spinco L2.

Le curve di riassociazione del DNA mitocondriale umano e del DNA satellite di topo sono state effettuate ad una concentrazione salina delle soluzioni di DNA pari a 0,04M di NaCl, e sono state riferite ad una concentrazione salina di NaCl 0,18M, in base ad una curva di correzione riportata da Britten [14]. È stata usata in tali casi una bassa concentrazione salina, perché la velocità di rinaturazione è per questi DNA così elevata da rendere molto difficile ed imprecisa una determinazione eseguita a concentrazioni saline più elevate. La curva di riassociazione del DNA del fago T_7 è invece stata effettuata ad una concentrazione salina di NaCl 0,18M.

Un altro fattore che influisce sulla determinazione della cinetica di riassociazione è il peso molecolare del DNA. Per uniformare le condizioni sperimentali anche i DNA di riferimento, qui usati, sono stati ridotti mediante ripetuti passaggi attraverso un ago di piccolo calibro e mediante trattamento

con alcali allo stesso peso molecolare del DNA mitocondriale umano. Tuttavia non è possibile escludere che i campioni di DNA usati contengano molecole con un certo grado di eterogeneità di peso molecolare.

Il Cot 1/2 della curva di riassociazione ottica del DNA mitocondriale umano risulta essere 3×10^{-3}, come appare dalla fig. 7. In base ad un confronto con le curve standard pure riportate nella fig. 7, tale valore di Cot 1/2 nelle condizioni sperimentali da noi usate dovrebbe corrispondere ad una lunghezza delle unità ripetitiva di 3000 nucleotidi: tale dovrebbe quindi essere la complessità genetica del DNA mitocondriale umano.

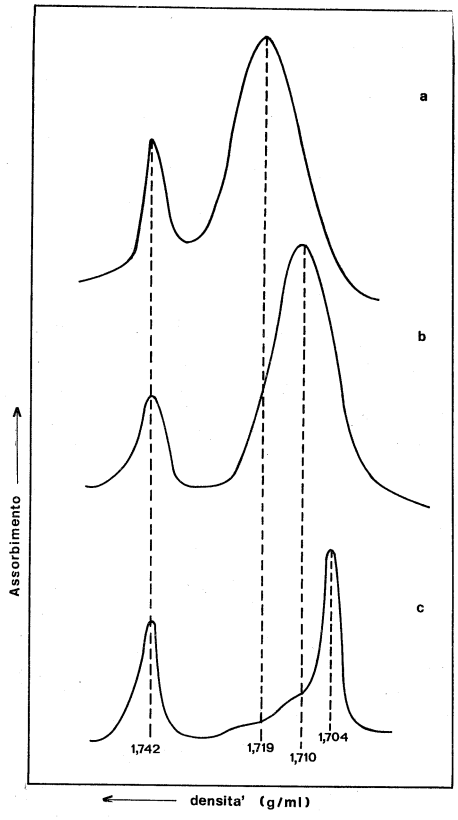

Fig. 6. – Tracciati densitometrici di DNA mitocondriale di cavia, centrifugato all'equilibrio in gradienti di CsCl neutro nell'ultracentrifuga analitica Spinco modello E. Il picco sulla sinistra in ciascun tracciato corrisponde al DNA standard (densità = 1,742 g/ml). Elica pesante (*a*), elica leggera (*b*), ed una miscela equimolare delle due eliche sottoposta a rinaturazione termica (*c*).

Usando differenti concentrazioni molari di DNA, è stato dimostrato che nei nostri esperimenti la velocità di rinaturazione del DNA mitocondriale umano dipende dalla concentrazione del DNA in soluzione. L'inclinazione della curva di riassociazione del DNA mitocondriale umano sembra indicare che esso contenga sequenze con diversa complessità genetica; per tale motivo il valore di complessità genetica sopra riportato potrebbe essere solo un valore medio, e non indica necessariamente che la molecola di DNA mitocondriale, lunga 15.000 paia di nucleotidi, sia costituita da unità di 3000 paia di nucleotidi ripetute in modo identico per cinque volte.

Le considerazioni qui riportate partono dal presupposto, stabilito da Wetmur e Davidson [15], e da Britten e Kohne [16] che esista una relazione matematica fra cinetica di riassociazione del DNA e complessità genetica.

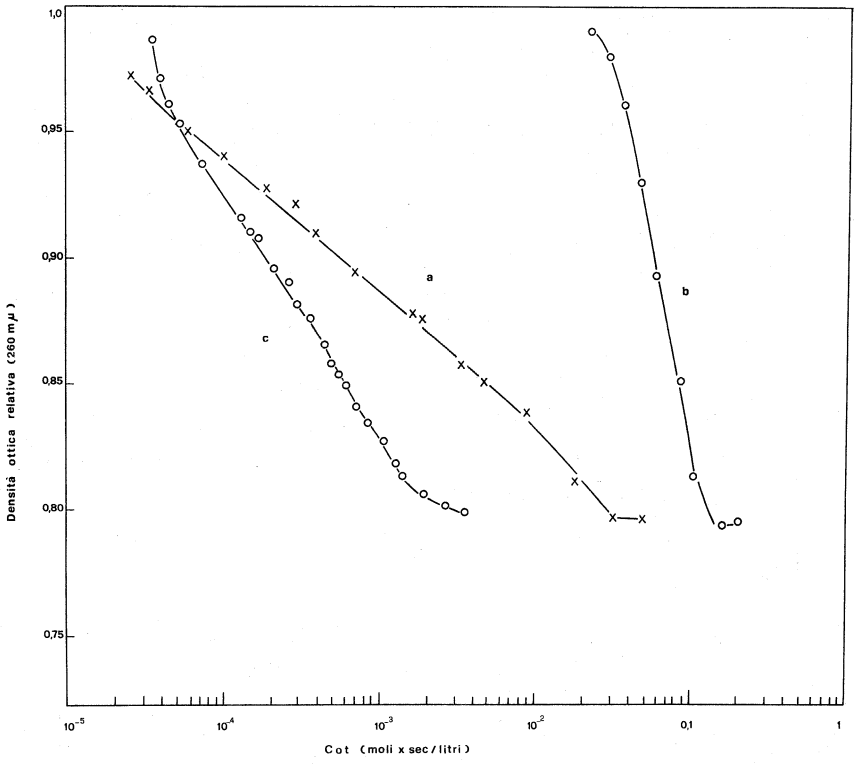

Fig. 7. – Curva di riassociazione ottica del DNA mitocondriale umano: curva di « Cot » del DNA mitocondriale umano dopo trattamento con alcali (pH 12,3) per 18 ore (*a*), curva di « Cot » del DNA del fago T_7 dopo passaggio per 10 volte attraverso un ago n. 27 (*b*), curva di « Cot » del DNA satellite di topo (*c*). Sulle ordinate è riportato il rapporto fra densità ottica a 60° ai vari tempi e valore iniziale misurato a 98°. Sulle ascisse è riportato il « Cot », cioè il prodotto della concentrazione molare del DNA per il tempo di incubazione espresso in secondi. Il DNA mitocondriale umano e il DNA satellite di topo furono riassociati ad una concentrazione salina di 0,04 M NaCl. Il DNA del fago T_7 fu riassociato ad una concentrazione salina di 0,18 M NaCl. Tutte le curve furono normalizzate in modo da ottenere la curva di riassociazione che si sarebbe osservata ad una concentrazione 0,18 M di ioni sodio, secondo la correlazione stabilita da Britten [14].

Oltre alle difficoltà di determinare la cinetica di rinaturazione in DNA altamente ripetuti e di reperire degli standard adeguati, è opportuno considerare che la relazione stabilita fra cinetica di rinaturazione del DNA e complessità genetica potrebbe non essere valida per fattori non ancora chiaramente definiti almeno in alcuni DNA altamente ripetuti quali i DNA satelliti nucleari di mammifero [17].

Pur con le riserve qui riportate noi riteniamo che i dati di cinetica di riassociazione del DNA mitocondriale nelle condizioni sperimentali adottate e con gli standard usati, siano sufficientemente indicativi di una ripetitività di sequenza nucleotidica.

In particolare il DNA mitocondriale umano ha un Cot 1/2 nell'ordine di grandezza di quello di alcuni DNA satelliti nucleari, che sono fra le più semplici specie di polinucleotidi riscontrate negli eucarioti [18].

Altri Autori [19] ritengono di poter affermare che la complessità genetica del DNA mitocondriale nei mammiferi corrisponda alla lunghezza della molecola di DNA mitocondriale. Gli esperimenti riportati, tuttavia, sono stati eseguiti per lo più con concentrazioni saline più elevate rispetto a quelle usate nelle nostre indagini. Ciò potrebbe forse rendere difficile la precisione dei dati ottenuti, particolarmente nella prima parte della curva di riassociazione. Le curve eseguite a più bassa concentrazione salina [20] non sembrano differire sostanzialmente dai dati da noi ottenuti. Sono stati pure usati in tali esperimenti DNA standard diversi rispetto a quelli da noi usati.

Una più precisa determinazione della complessità genetica del DNA mitocondriale sarà possibile mediante uno studio della sequenza nucleotidica. Indagini di tal genere sono già state effettuate con successo nel caso di alcuni DNA satelliti nucleari di mammifero [17].

L'interesse di questi studi sulla complessità genetica del DNA mitocondriale nei mammiferi è in relazione al problema della biogenesi dei mitocondri e della funzione biologica del DNA mitocondriale. La bassa complessità genetica del DNA mitocondriale umano fa supporre che la sua principale funzione sia di fungere da codice per gli RNA ribosomale e transfer mitocondriali con cui esso ibrida specificamente [4, 5, 21].

Gli Autori sono grati al prof. Renzo Dettori della Cattedra di Microbiologia I[a] dell'Università di Milano, che ha gentilmente fornito il fago T_7 usato nelle presenti indagini.

Bibliografia

[1] P. Borst e A. M. Kroon, « Intern. Rev. Cytol. », *26*, 107 (1969).
[2] M. M. K. Nass, « Science », *165*, 25 (1969).
[3] M. Ashwell e T. S. Work, « Annual Rev. Biochem. », *39*, 251 (1970).
[4] Y. Aloni e G. Attardi, « J. Mol. Biol. », *55*, 251 (1971).
[5] Y. Aloni e G. Attardi, « J. Mol. Biol. », *55*, 271 (1971).
[6] G. Corneo, C. Moore, D. R. Sanadi, L. I. Grossman e J. Marmur, « Science », *151*, 687 (1966).
[7] G. Corneo, L. Zardi e E. Polli, « J. Mol. Biol. », *36*, 419 (1968).
[8] C. L. Schildkraut, J. Marmur e P. Doty, « J. Mol. Biol. », *4*, 430 (1962).
[9] B. Hudson e J. Vinograd, « Nature », *216*, 647 (1967).
[10] D. A. Clayton e J. Vinograd, « Nature », *216*, 652 (1967).
[11] G. Corneo, L. Zardi e E. Polli, « FEBS Letters », *18*, 301 (1971).

[12] J. MARMUR e P. DOTY, « J. Mol. Biol. », *5*, 109 (1962).
[13] J. EIGNER e P. DOTY, « J. Mol. Biol. », *12*, 549 (1965).
[14] R. J. BRITTEN, « Carnegie Institution Yearbook », *67*, 332 (1969).
[15] J. G. WETMUR e N. DAVIDSON, « J. Mol. Biol. », *31*, 349 (1968).
[16] R. J. BRITTEN e D. E. KOHNE, « Science », *161*, 529 (1968).
[17] E. M. SOUTHERN, « Nature », *227*, 794 (1970).
[18] G. CORNEO, E. GINELLI e E. POLLI, « Biochemistry », *9*, 1565 (1970).
[19] P. BORST, « Symp. Soc. Experim. Biology », *24*, 201 (1970).
[20] P. BORST, *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*. Ed. North Holland, Amsterdam 1971, pp. 260–266.
[21] I. B. DAWID, « J. Mol. Biol. », *63*, 201 (1972).