
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ENRICO GINELLI, GIANMARCO CORNEO

Sui DNA satelliti e ripetitivi nel genoma umano

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.6, p. 621–629.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_6_621_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/>

Biologia molecolare. — *Sui DNA satelliti e ripetitivi nel genoma umano* (*). Nota di ENRICO GINELLI e GIANMARCO CORNEO, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — The present work summarizes the isolation and characterization of human satellite and intermediate DNAs.

Satellite DNAs were obtained from native high molecular weight DNA by $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ centrifugation.

Two components of intermediate DNA, called α and β were obtained by preparative CsCl centrifugation of total human DNA renatured to a "Cot" of 20.

The α component was obtained only from low molecular weight DNA, while the β component was obtained also from high molecular weight DNA.

Hypotheses on the function of repeated DNAs are discussed.

La dimostrazione che la cinetica di rinaturazione del DNA è inversamente proporzionale alla sua ripetitività di sequenza ha permesso di evidenziare la presenza di famiglie di sequenze nucleotidiche ripetitive nel genoma degli eucarioti [1, 2].

Nel DNA nucleare di numerose specie animali e vegetali estratto dai tessuti in forma macromolecolare, è stata dimostrata la presenza di DNA satelliti, così denominati perché formano bande distinte rispetto al DNA principale in un gradiente di CsCl neutro all'equilibrio nell'ultracentrifuga analitica [3-5].

Lo studio delle caratteristiche fisico-chimiche dei DNA satelliti isolati (curve di fusione, separazione delle eliche complementari in CsCl alcalino, cinetica di rinaturazione) ha portato alla dimostrazione che i DNA satelliti fanno parte della frazione più altamente ripetitiva del genoma degli eucarioti [6-11].

Altre indagini, condotte prevalentemente mediante frazionamento del DNA, denaturato e rinaturato per vari tempi, su colonne di idrossiapatite, hanno dimostrato famiglie di DNA a ripetitività intermedia (DNA intermedio) [1]. La rimanente parte del genoma è costituita da DNA non ripetitivo.

Nella presente Nota sono brevemente descritte le caratteristiche dei DNA satelliti umani [8, 12-16] da noi isolati mediante ultracentrifugazione all'equilibrio in gradienti di $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$.

Inoltre vengono descritti l'isolamento e la parziale caratterizzazione di altre due componenti di DNA ripetitivo isolate mediante centrifugazione in CsCl ed in $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ da DNA umano riassociato.

(*) Lavoro eseguito nel Centro di Studi di Patologia molecolare applicata alla Clinica, Via Pace 15, Milano, Direttore prof. Luigi Villa, con l'apporto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Contratto n. 71.00802.04.115.2155).

(**) Nella seduta del 9 dicembre 1972.

DNA ad alto peso molecolare (20 milioni di daltons) fu estratto da placenta umana e da cellule HeLa mediante il metodo di Marmur [17].

Le metodiche di ultracentrifugazione del DNA in gradienti di CsCl e di $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ nelle ultracentrifughe analitica e preparativa furono descritte in nostri precedenti lavori [11, 14].

La sonicazione del DNA fu effettuata mediante un apparecchio a ultrasuoni MSE a 10 Amps e 20.000 cicli/sec. per due minuti ad intervalli di 15 secondi. La determinazione della velocità di sedimentazione a pH alcalino e del peso molecolare del DNA furono effettuate secondo Studier [18]. La denaturazione e rinaturazione del DNA furono effettuate come da noi precedentemente descritto [11, 14].

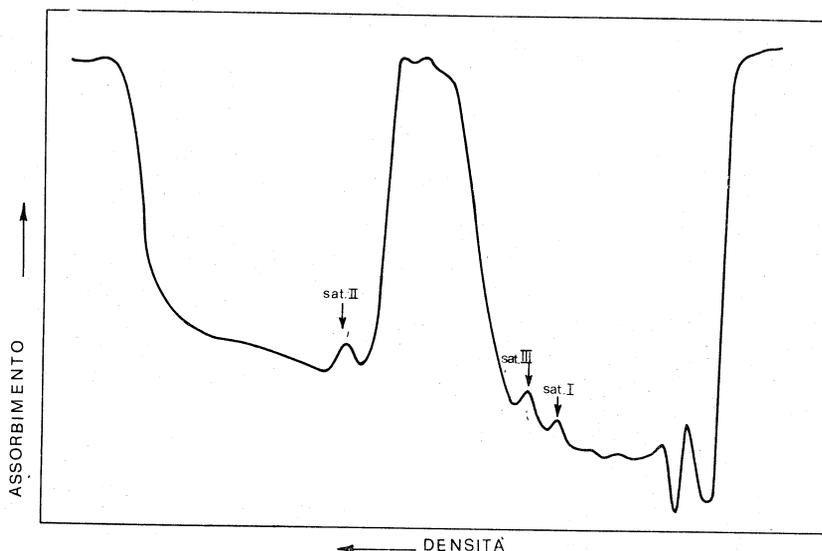


Fig. 1. - Tracciato densitometrico del DNA umano totale di placenta centrifugato all'equilibrio in un gradiente di densità di $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ (rapporto $\text{Ag}^+/\text{DNA}-\text{P} = 0,2$; $70 \mu\text{g DNA/ml}$) nell'ultracentrifuga analitica Spinco Modello E (vedi ref. [15]) (indice di rifrazione = 1,3725, corrispondente a una densità iniziale della soluzione $\rho = 1,478 \text{ g/ml}$).

Nella fig. 1 è riportato il tracciato densitometrico del DNA umano centrifugato all'equilibrio in un gradiente di $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ ($70 \mu\text{g}$ di DNA/ml; rapporto $\text{Ag}^+/\text{DNA}-\text{P} = 0,20$), nell'ultracentrifuga analitica. Sono evidenti, oltre alla banda del DNA principale, tre piccole bande di DNA satelliti. I DNA satelliti I e III sono dalla parte più leggera del gradiente, mentre il DNA satellite II è dalla parte più pesante del gradiente [15].

I vari DNA satelliti furono isolati mediante frazionamento in gradienti preparativi di $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ [15]. Il DNA satellite IV fu ottenuto da una frazione eluita da una colonna di albumina metilata + kieselguhr [16].

Nella Tabella I sono riportate le caratteristiche note dei DNA satelliti umani.

TABELLA I

Densità in CsCl (g/ml) ed altre proprietà dei DNA satelliti umani.

	I	II	III	IV (*)
Nativo in CsCl neutro	1,687	1,693	1,696	1,700
Denaturato col calore in 1×SSC (**)	1,703	1,704	1,715	1,716
Rinaturato ad un Cot = 0,1	1,694	1,696	1,703	1,706
Eliche separate in CsCl alcalino . .	1,707 1,738	1,740 1,750	1,740 1,754	1,730 1,742
Eliche separate in CsCl neutro . . .	1,694 1,712	— —	— —	— —
Ammontare relativo %	0,5	2	1,5	2
Posizione in Ag ⁺ —Cs ₂ SO ₄	leggero	pesante	leggero	leggero
Eluzione da una colonna di MAK (*)	tardiva	precoce	tardiva	precoce
Punto di fusione in 1×SSC (**)	80°	84°	87°	—
Cinetica di rinaturazione	«Cot» fra 10 ⁻⁴ e 10 ⁻² in 0,18 M NaCl			
Peso molecolare	superiore a 20 × 10 ⁶ daltons			
Posizione sui cromosomi, ibridazione <i>in situ</i>	—	centromeri cromosomi 1, 16 (9)	centromeri cromosomi 9	—

(*) CORNEO G. *et al.* (vedi ref. [16]).

(**) 1×SSC = 0,15 M NaCl + 0,015 M Na citrato, pH 7.

Ci soffermeremo brevemente sul fatto che i DNA satelliti sono ottenuti da DNA ad alto peso molecolare, e che quindi devono essere presenti nei cromosomi sotto forma di blocchi di dimensioni notevoli, almeno 15–20 milioni di daltons, e probabilmente anche molto di più.

Esperimenti di ibridazione *in situ* [19] di RNA complementare dei DNA satelliti II e III, ottenuto mediante trascrizione *in vitro*, con i cromosomi umani hanno permesso di dimostrare che il satellite II è prevalentemente localizzato vicino ai centromeri dei cromosomi 1 e 16, ed il satellite III vicino al centromero del cromosoma 9. Questo dato sperimentale ed il fatto che i DNA satelliti sembrano non essere trascritti *in vivo* [9] ha fatto proporre l'ipotesi che essi abbiano solamente una funzione strutturale.

È stata dimostrata la localizzazione dei DNA satelliti nella eterocromatina [15, 20–22]. L'eterocromatina costitutiva appare essere prevalentemente concentrata nelle regioni dei centromeri, degli organizzatori nucleolari ed inoltre nelle regioni telomeriche dei cromosomi. Varie ipotesi sono state proposte

sulle funzioni della eterocromatina e quindi dei DNA satelliti in essa contenuti. Essi potrebbero proteggere alcune zone del genoma da modificazioni evolutive, ad esempio potrebbero costituire i DNA «spaziatori» che proteggono i cistroni dell'RNA ribosomale 18 S e 28 S, dell'RNA 5 S e dell'RNA «transfer». I DNA satelliti potrebbero anche costituire punti di attacco per i cromosomi omologhi durante la meiosi [23]. Essi potrebbero in tali zone del genoma prevenire l'intimo appaiamento necessario per il «crossing over».

Inoltre i DNA satelliti nella zona eterocromatica pericentromerica potrebbero condizionare e preservare l'esatta separazione dei cromosomi durante la divisione cellulare [23], oppure potrebbero proteggere nel centromero i punti di attacco delle fibre del fuso.

Un'altra funzione dei DNA satelliti potrebbe essere quella di impedire la fecondazione fra specie diverse anche strettamente correlate ed essere quindi elementi fondamentali nel mantenere la diversità delle specie.

L'eterocromatina, e quindi i DNA satelliti, potrebbero costituire punti di aggregazione di cromosomi non omologhi, come ad esempio nell'uomo quella dei cromosomi acrocentrici D e G che portano gli organizzatori nucleolari.

Modificazioni della quantità di eterocromatina possono riscontrarsi come tratto polimorfico, senza variazioni fenotipiche.

Ciò appare probabile anche per i DNA satelliti in base ad esperimenti di ibridazione *in situ* [19].

Un'interessante osservazione riguardo al DNA satellite di una linea cellulare di scimmia [24] suggerisce che i DNA satelliti possano essere un punto preferenziale di inserzione di virus carcinogeni nel genoma.

Riguardo alla origine dei DNA satelliti si suppone che essi siano comparsi nella evoluzione mediante un meccanismo di improvvisa replicazione (replicazione saltatoria) [1] di un breve segmento di DNA pericentromerico o perinucleolare.

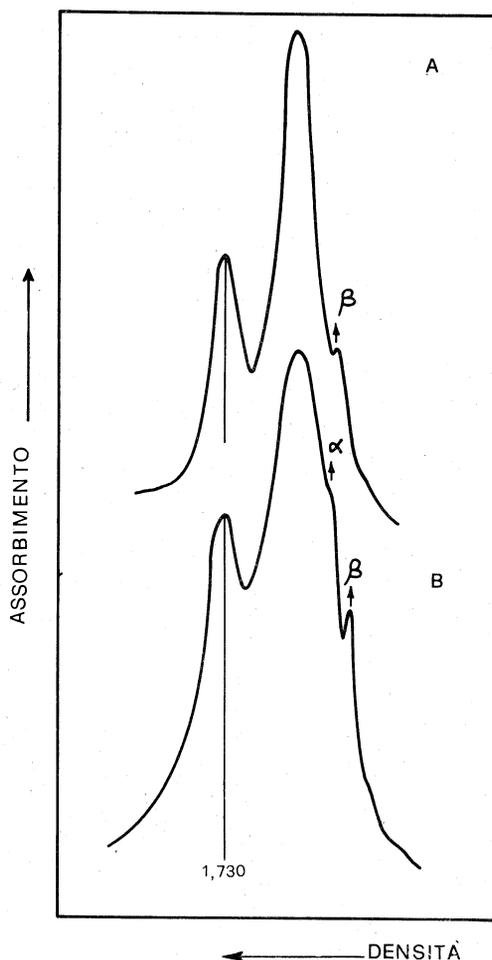
Essi durante l'evoluzione andrebbero incontro a numerose mutazioni, e perderebbero col tempo le loro caratteristiche di alta ripetitività e potrebbero essere intercalati nel genoma costituendo quelle sequenze a minore ripetitività, denominate DNA intermedio. Quest'ultimo potrebbe avere varie funzioni, quali quella di punto d'inizio per l'azione delle polimerasi, punti di attacco alle membrane nucleari, punti di ripiegamento dei cromosomi o avere una funzione di regolazione genica.

Un'altra serie di esperimenti è stata da noi condotta nel tentativo di isolare dal DNA umano totale sequenze nucleotidiche corrispondenti al DNA «intermedio». A tale scopo DNA umano ad alto peso molecolare (dimensioni di 20.000-30.000 paia di nucleotidi) e a basso peso molecolare (dimensioni di 500 paia di nucleotidi) dopo denaturazione termica è stato sottoposto a rinaturazione ad un «Cot» di 20 in $2 \times \text{SSC}$ a 65°. Con il termine di «Cot» si intende il prodotto della concentrazione molare del DNA sottoposto a rinaturazione in soluzione per il tempo di rinaturazione espresso in secondi [1].

Il DNA rinaturato è stato quindi centrifugato in CsCl neutro. Come appare nella fig. 2 (A e B), sono presenti dopo rinaturazione, oltre alla banda di DNA principale ancora denaturata, due bande di DNA rinaturato aventi una densità di 1,707 g/ml e 1,703 g/ml rispettivamente.

Tali due bande denominate α e β sono presenti, rispettivamente, la prima solo nel campione di DNA a basso peso molecolare e la seconda in ambedue i campioni di DNA, a basso ed alto peso molecolare.

Fig. 2. — Tracciati densitometrici di DNA umano totale ad alto peso molecolare (20.000-30.000 paia di nucleotidi) (A) e a basso peso molecolare (500 paia di nucleotidi) (B), rinaturato ad un $Cot = 20$ in $2 \times SSC$ a 65° dopo denaturazione termica, centrifugato all'equilibrio in CsCl nell'ultracentrifuga analitica Spinco E. Il picco sulla sinistra in ciascun tracciato corrisponde al DNA standard di *Streptomyces mediterraneus* (densità = 1,730 g/ml). I componenti di DNA rinaturato sono indicati con le lettere greche α e β .



Tali bande di DNA, α e β , ammontano rispettivamente a circa il 10% e il 7% del genoma totale e corrispondono a DNA rinaturato o parzialmente rinaturato in base alla loro densità in CsCl, inferiore a quella del DNA denaturato. Poiché tali bande di DNA non appaiono nel gradiente di CsCl dopo rinaturazione ad un Cot di 10 e inferiore a 10, si deve presumere che esse facciano parte del DNA « intermedio ».

Il DNA ad alto peso molecolare rinaturato ad un Cot di 20 è stato inoltre centrifugato in un gradiente di $Ag^+ - Cs_2SO_4$ nell'ultracentrifuga ana-

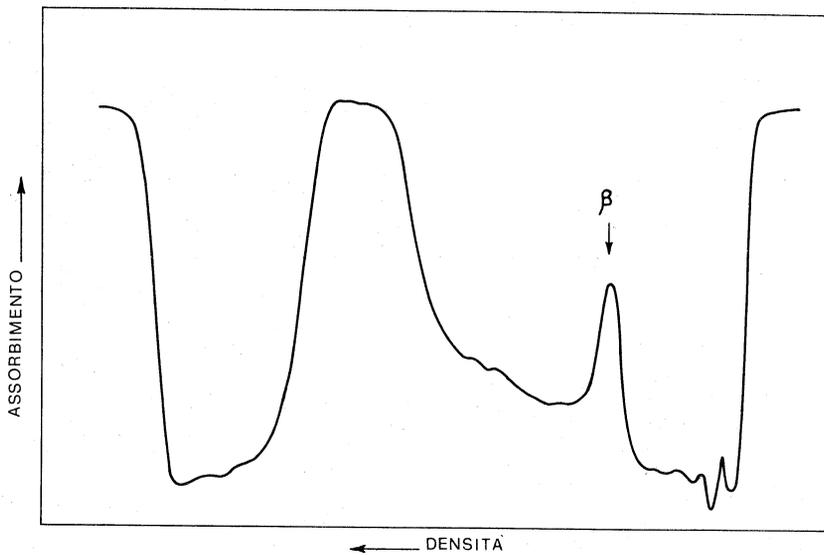


Fig. 3. - Tracciato densitometrico del DNA umano totale di placenta ad alto peso molecolare (circa 20 milioni di daltons) rinaturato ad un Cot di 20 dopo denaturazione termica, centrifugato all'equilibrio in un gradiente di $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ (rapporto $\text{Ag}^+/\text{DNA}-\text{P} = 0,2$; $35 \mu\text{g DNA/ml}$; indice di rifrazione = $1,3727$, corrispondente a una densità iniziale della soluzione $\rho = 1,480 \text{ g/ml}$).

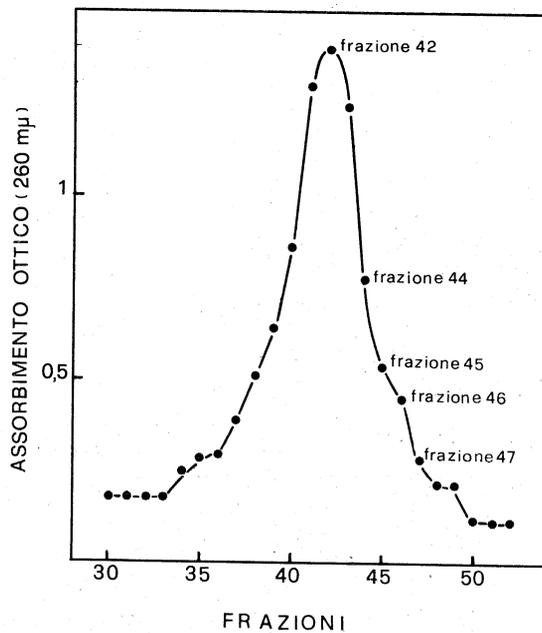


Fig. 4. - Frazionamento del DNA umano totale di placenta della dimensione di 500 paia di nucleotidi rinaturato ad un Cot di 20 dopo denaturazione termica, centrifugato all'equilibrio in un gradiente preparativo di CsCl neutro nell'ultracentrifuga Spinco L2.

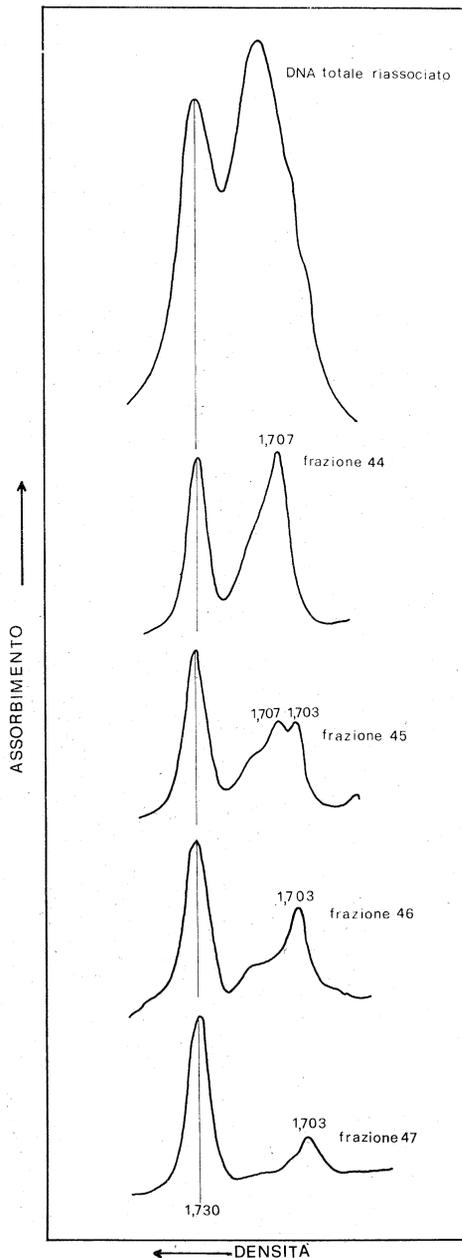
litica. Come mostrato nella fig. 3, in tale gradiente il componente β rinaturato si distanzia nettamente dalla banda di DNA principale non rinaturato. Trattandosi di DNA ad alto peso molecolare, non compare in questo esperimento il componente α .

Quando una quantità più elevata di DNA rinaturato venga centrifugata nel gradiente di CsCl, è pure evidente una piccola banda di DNA rinaturato con densità di 1,698 g/ml; ed un'altra banda di DNA rinaturato con densità di 1,688 g/ml è stata dimostrata nel gradiente preparativo di CsCl. Queste due piccole bande corrispondono verosimilmente a DNA satelliti già noti [12,14-16].

Mediante ultracentrifugazione preparativa in CsCl neutro, i due componenti di DNA intermedio α e β sono stati isolati e purificati (fig. 4). Le frazioni ottenute dal gradiente preparativo di CsCl sono state centrifugate in CsCl neutro nell'ultracentrifuga analitica. Come è mostrato nella fig. 5, i componenti α e β possono essere così isolati. Sono state quindi effettuate le curve di assorbimento-temperatura di alcune di tali frazioni. Come appare dalla fig. 6, il componente β sembra essere riassociato maggiormente rispetto al componente α .

I due componenti α e β aumentano di densità in CsCl neutro dopo denaturazione termica, come è indicato dalla Tabella II ed inoltre non si separano nelle due eliche complementari in CsCl alcalino.

Fig. 5. - Tracciati densitometrici del DNA totale umano di placenta a basso peso molecolare, rinaturato ad un Cot di 20 dopo denaturazione termica e di alcune sue frazioni ottenute mediante l'esperimento di frazionamento in CsCl neutro preparativo riportato nella fig. 4, centrifugate all'equilibrio in CsCl neutro nell'ultracentrifuga analitica. La numerazione delle frazioni corrisponde a quella della fig. 4. Il picco sulla sinistra in ciascun tracciato corrisponde al DNA di *Streptomyces mediterraneus* (densità = 1,730 gr/ml) usato come riferimento.



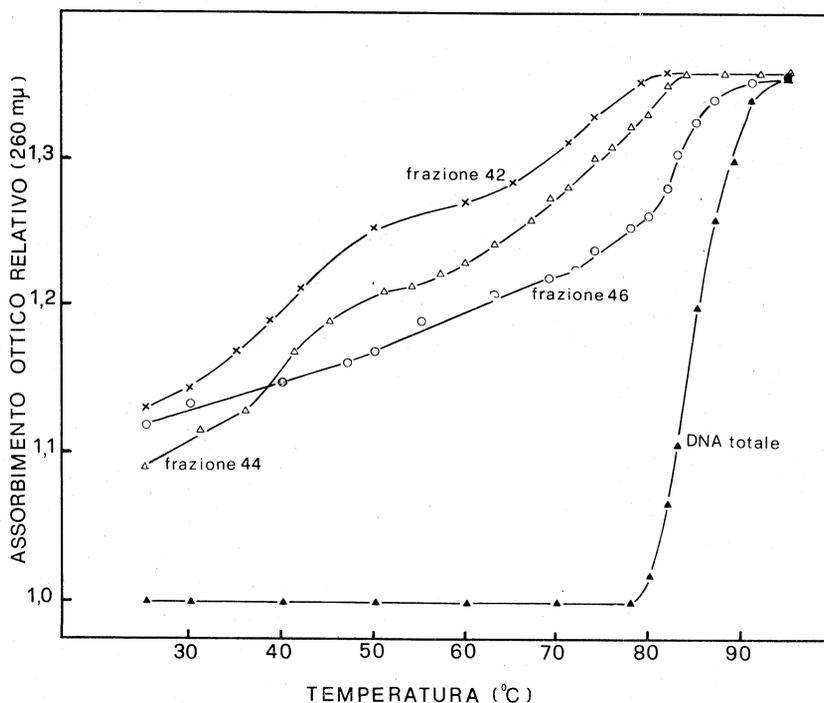


Fig. 6. - Curve di assorbimento ottico-temperatura in SSC del DNA umano totale nativo di placenta, e di alcune sue frazioni rinaturate ottenute dall'esperimento di frazionamento in CsCl neutro, riportato nella fig. 4. La numerazione delle frazioni si riferisce a quella della fig. 4.

L'aspetto più interessante di questi esperimenti è che il componente α è ottenuto solo da DNA a basso peso molecolare, e potrebbe perciò essere distribuito in pezzi di piccole dimensioni lungo il genoma, mentre il componente β è ottenuto anche da DNA ad alto peso molecolare e dovrebbe quindi essere raccolto in blocchi di notevoli dimensioni come i DNA satelliti.

TABELLA II

Densità in CsCl (g/ml) ed altre proprietà dei componenti α e β del DNA umano (ottenuti da DNA totale riassociato).

	Componente α	Componente β
In CsCl, riassociato (Cot = 20)	1,707	1,703
Denaturato con il calore in 1×SSC . . .	1,716	1,714
Ammontare relativo	~ 10%	~ 7%
Ottenuto da DNA di peso molecolare (in paia di nucleotidi)	500	20.000-30.000
Posizione in Ag ⁺ -Cs ₂ SO ₄	leggero	leggero

Il DNA intermedio è stato, in generale, finora studiato meno dei DNA satelliti, in particolare perché non sono ancora state sviluppate metodiche per isolarlo e purificarlo allo stato nativo. Riguardo alla sua origine si ritiene che esso sia formato da sequenze nucleotidiche, inizialmente altamente ripetute come i DNA satelliti, che sono andate incontro durante l'evoluzione ad un elevato numero di mutazioni [1].

Al contrario dei DNA satelliti, il DNA intermedio sembra essere trascritto *in vivo*. Una ipotesi attraente è che esso svolga prevalentemente un ruolo di regolazione della funzione genica [25].

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. J. BRITTEN e D. E. KOHNE, « Science », 161, 529 (1968).
- [2] J. G. WETMUR e N. DAVIDSON, « J. Mol. Biol. », 31, 349 (1968).
- [3] S. KIT, « J. Mol. Biol. », 3, 711 (1961).
- [4] F. E. ARRIGHI, M. MANDEL, J. BERGENDAHL e T. C. HSU, « Biochem. Genet. », 4, 367 (1970).
- [5] Y. COUDRY, F. QUETIER e E. GUILLE, « Biochim. Biophys. Acta », 217, 259 (1970).
- [6] M. WARING e R. J. BRITTEN, « Science », 154, 794 (1966).
- [7] W. G. FLAMM, M. MCCALLUM e P. M. B. WALKER, « Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) », 57, 1729 (1967).
- [8] G. CORNEO, E. GINELLI e E. POLLI, « J. Mol. Biol. », 33, 331 (1968).
- [9] W. G. FLAMM, P. M. B. WALKER e M. MCCALLUM, « J. Mol. Biol. », 40, 423 (1969).
- [10] W. G. FLAMM, P. M. B. WALKER e M. MCCALLUM, « J. Mol. Biol. », 42, 441 (1969).
- [11] G. CORNEO, E. GINELLI e E. POLLI, « Biochemistry », 9, 1565 (1970).
- [12] G. CORNEO, E. GINELLI e E. POLLI, « J. Mol. Biol. », 23, 619 (1967).
- [13] D. GIACOMONI e G. CORNEO, « Biochim. Biophys. Acta », 166, 586 (1968).
- [14] G. CORNEO, E. GINELLI e E. POLLI, « J. Mol. Biol. », 48, 319 (1970).
- [15] G. CORNEO, E. GINELLI e E. POLLI, « Biochim. Biophys. Acta », 247, 528 (1971).
- [16] G. CORNEO, L. ZARDI e E. POLLI, « Biochim. Biophys. Acta », 269, 201 (1972).
- [17] J. MARMUR, « J. Mol. Biol. », 3, 208 (1961).
- [18] F. W. STUDIER, « J. Mol. Biol. », 11, 373 (1965).
- [19] K. W. JONES e G. CORNEO, « Nature, New Biol. », 233, 268 (1971).
- [20] W. G. YASMINEH e J. J. YUNIS, « Exp. Cell Res. », 59, 69 (1970).
- [21] J. J. YUNIS e W. G. YASMINEH, « Science », 168, 263 (1970).
- [22] W. G. YASMINEH e J. J. YUNIS, « Exp. Cell Res. », 64, 41 (1971).
- [23] P. M. B. WALKER, « Nature », 229, 306 (1971).
- [24] J. J. MAIO, « J. Mol. Biol. », 56, 579 (1971).
- [25] R. J. BRITTEN e E. H. DAVIDSON, « Science », 165, 349 (1969).