

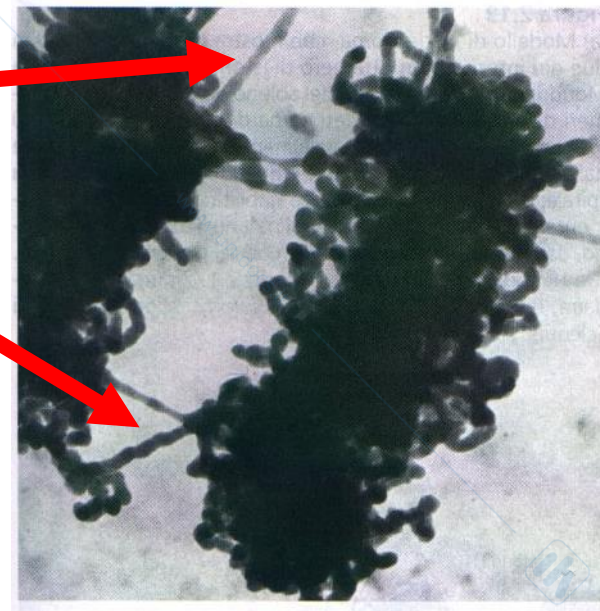
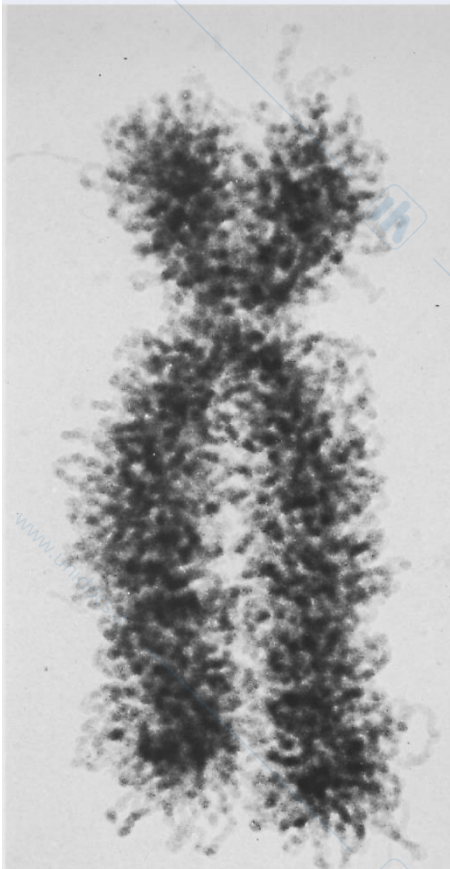
Lezione 4

Uninemia, cromatina, telomeri e centromeri



Un cromosoma è composto da un'unica "fibra" del diametro di circa 30 nanometri

Figure 18.9 The sister chromatids of a mitotic pair each consist of a fiber (~30 nm in diameter) compactly folded into the chromosome. Photograph kindly provided by E. J. DuPraw.



Un tipico cromosoma eucariotico è lungo da 10^4 a $2 \cdot 10^5$ micrometri, cioè da 1 a 20 cm; durante la mitosi viene condensato in una molecola lunga da 1 a 10 μm Avviene cioè un enorme impaccamento del DNA

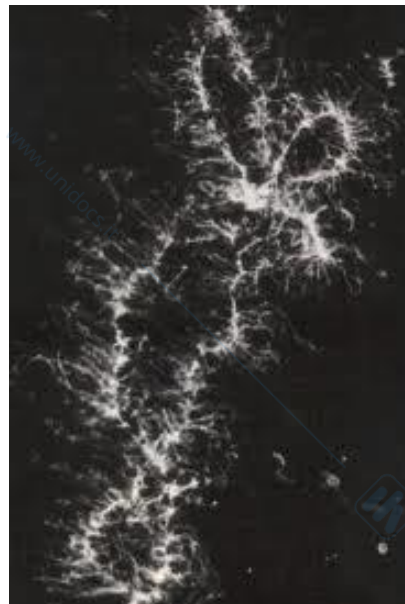
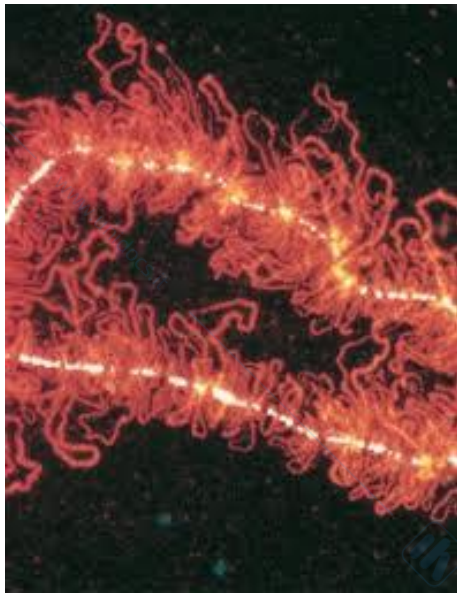
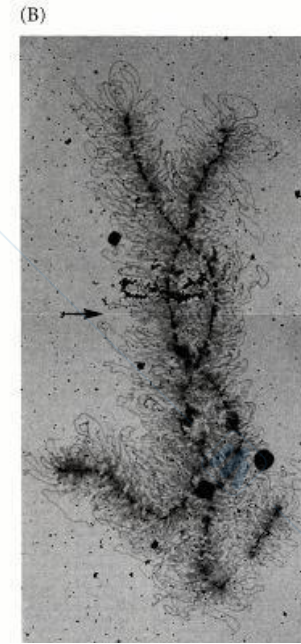
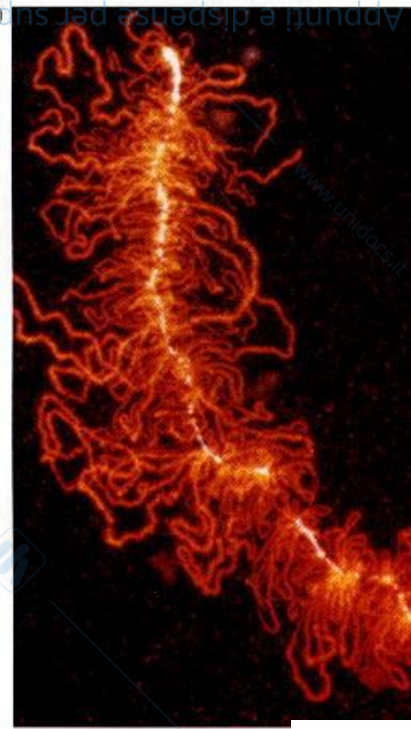
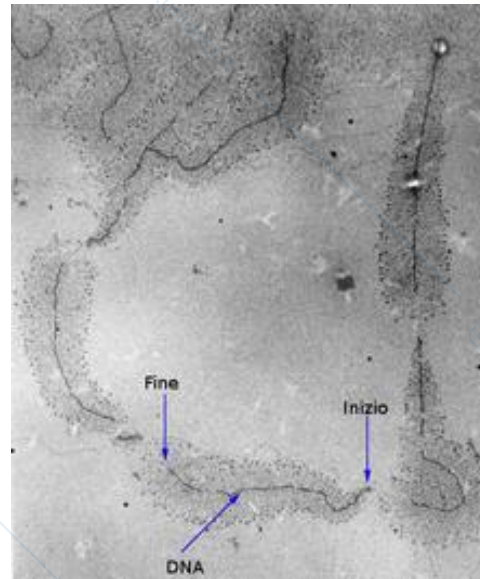
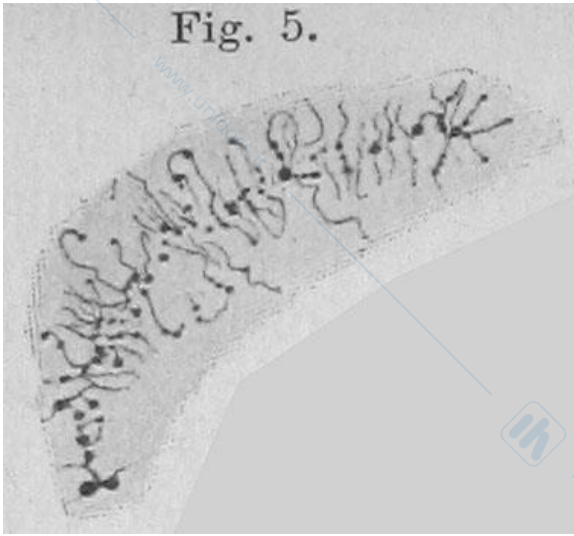
- Si possono osservare i cromosomi per quello che sono?

più specificatamente

- Si può effettivamente “vedere” che un cromosoma è una singola molecola (di DNA)?
 - Modello dell'uninemia?

Cromosomi a spazzola
Elettroforesi a campi pulsati
Autoradiografia
Misurazioni di viscoelasticità

Cromosomi a spazzola (lampbrush chromosomes)



Lampbrush Chromosomes of *Salmonella astenandra* 369



Fig. 5a-c. Camera lucida drawings of the twelve lampbrush chromosomes from oocyte 2-7B. The left and right arms of the chromosomes are marked L and R respectively.

Cromosomi a spazzola – prima descrizione Fleming 1882 nella salamandra *Ambystoma mexicanum*

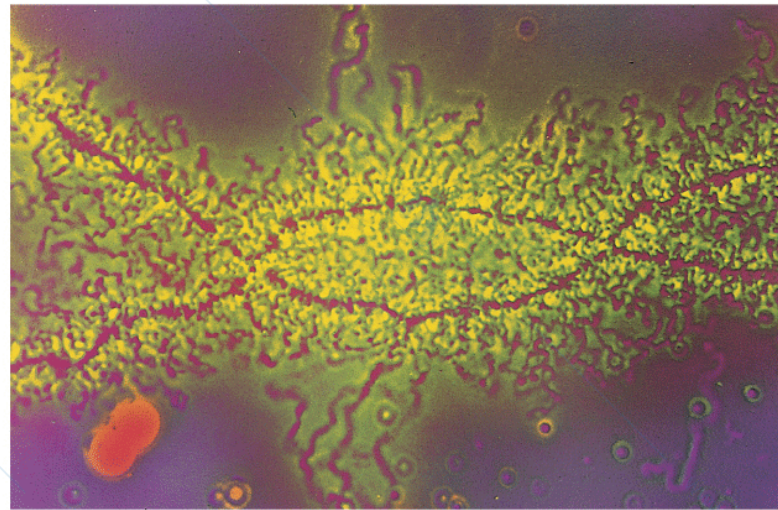
Diplotene della profase I della oogenesi dei Metazoi (ma non Insetti e Rettili), in particolare anfibi

Cromosomi molto decondensati e fortemente allungati (quello in figura è quasi 1 mm, 800 micrometri)

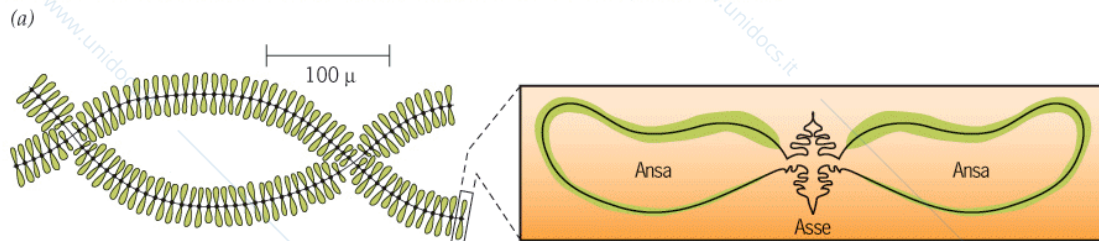
Sono ciascuno una coppia di cromosomi omologhi appaiati ognuno costituito da due cromatidi fratelli

L'asse centrale contiene DNA condensato – le anse rappresentano DNA decondensato e attivamente trascritto

DNAsi distrugge sia l'asse che le anse – RNAsi degrada gli RNA trascritti ma lascia inalterato l'asse e le anse



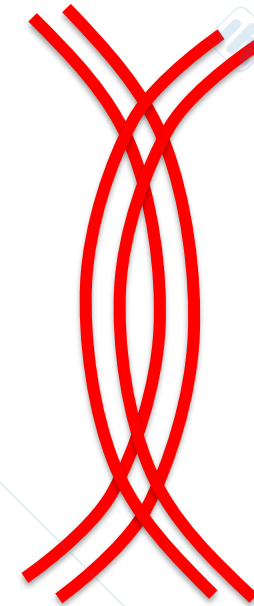
Coppia di cromosomi omologhi



(b) Schema della coppia cromosomica mostrata sopra

(c) Schema dei due cromatidi di un omologo

Figura 9.19 ■ Fotografia al microscopio a contrasto di fase (a) e schema (b) di una coppia di cromosomi a “spazzola” nell’occita del tritone *Triturus viridescens*. Le strutture delle regioni assiali e delle anse dei due cromatidi di un singolo cromosoma a spazzola sono mostrate in (c). L’elemento centrale in ciascun cromatidio (sia le regioni assiali che le anse laterali) è una singola molecola di DNA. Il materiale che circonda il DNA è soprattutto RNA nascente che viene sintetizzato sul DNA esteso nelle regioni delle anse.



Elettroforesi a campi pulsati

Visualizzazione su gel di agarosio di interi cariotipi, in particolare dei cromosomi che li compongono o meglio delle singole molecole di DNA che costituiscono i singoli cromosomi

Presupposto: riuscire a “purificare” il DNA dei cromosomi senza rompere in nessun modo la singola molecola di DNA che li costituisce

Come?

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

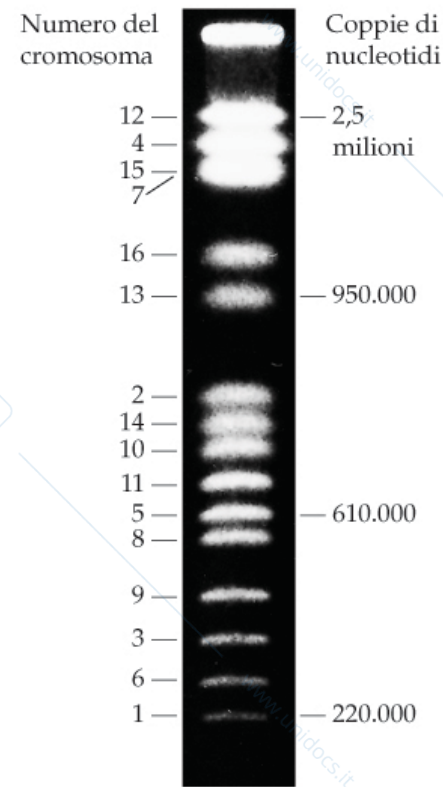


Figura 9.20 ■ Separazione per dimensione del DNA dei cromosomi del lievito *Saccharomyces cerevisiae* mediante gel elettroforesi in campo pulsato. In questo modo, possono essere separate le molecole di DNA presenti nei 16 cromosomi di lievito.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica
EdiSES

- Autoradiografia (DNA marcato con isotopi radioattivi - ad es. ^3H) consente una visualizzazione indiretta delle molecole di DNA grazie alla presenza di un tracciante radioattivo che impressiona una pellicola radiografica sulla quale lascia una “immagine”

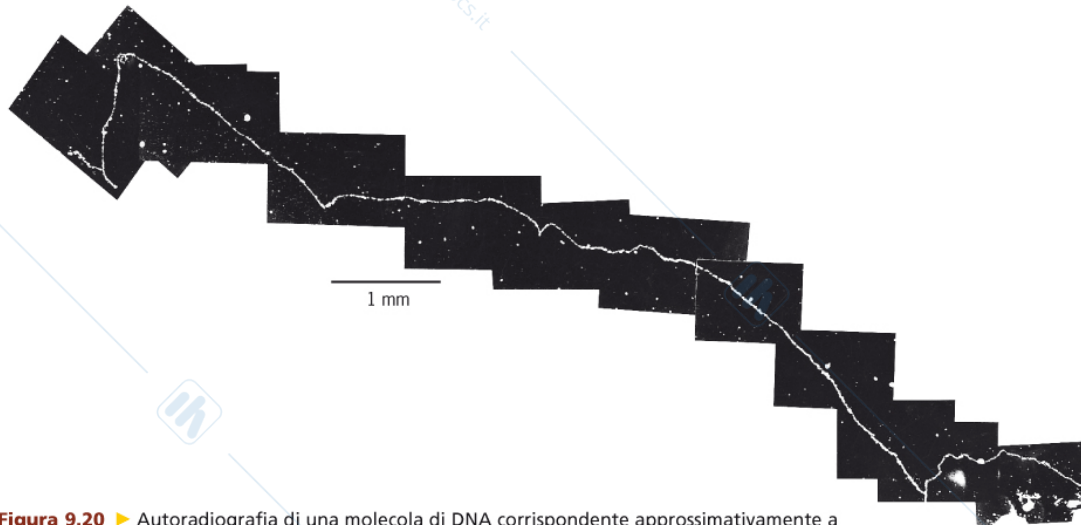


Figura 9.20 ▶ Autoradiografia di una molecola di DNA corrispondente approssimativamente a un intero cromosoma di *Drosophila melanogaster*. Il più grande cromosoma di *Drosophila* contiene $4,3 \times 10^{10}$ dalton di DNA. Tale quantità corrisponde a una molecola lunga 1,8 cm. La molecola mostrata ha una lunghezza di 1,2 cm, pari a due terzi del DNA totale presente nel cromosoma, sia esso costituito da una molecola singola o da più di una molecola.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
 EdISES

- Viscoelastometria: calcolo della massa di un DNA in soluzione ottenuta grazie a misurazioni di variazione di viscosità in funzione di una “torsione” a cui viene assoggettata la molecola in una soluzione. I moti torsionali rotatori applicati al DNA in soluzione inducono la rotazione di un “galleggiante” immerso nella soluzione. La “forza/velocità” della rotazione indotta dipendono dalla viscosità del DNA che a sua volta dipende dalla massa della molecola di DNA stesso

Viscoelastometria:

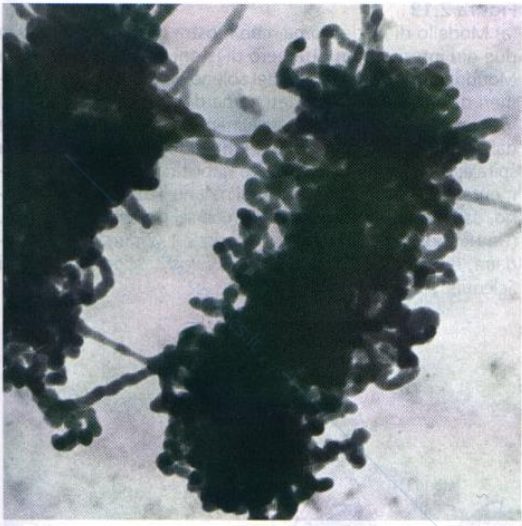
Massa molecole più grandi di DNA in drosophila:

$4,1 \times 10^{10}$ dalton

Misure dirette Biochimiche:

Massa cromosoma più grande in drosophila:

$4,3 \times 10^{10}$ dalton



Cromatina

La “fibra” è DNA associato a strutture proteiche (nucleosomi) che ne garantiscono un elevato grado di impaccamento

Nei cromosomi eucariotici il DNA è praticamente sempre sotto forma di *cromatina* = DNA/istoni (le proteine dei nucleosomi)

DNA + Nucleosomi = Cromatina

Figure 19.17 The 10 nm fiber in partially unwound state can be seen to consist of a string of nucleosomes. Photograph kindly provided by Barbara Hamkalo.

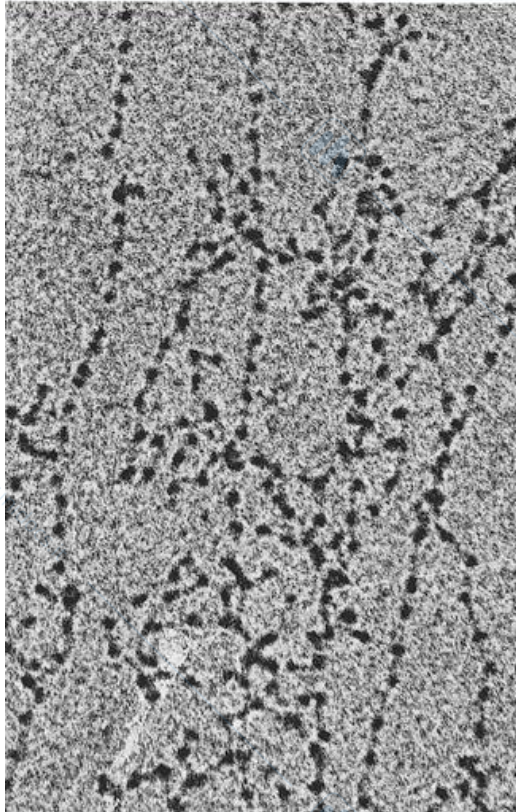
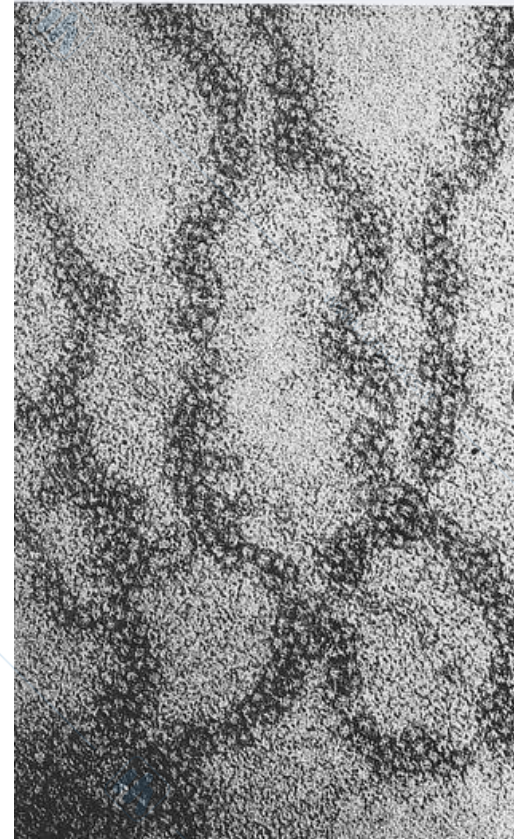


Figure 19.19 The 30 nm fiber has a coiled structure (shown at the same magnification as the 10 nm fiber of Figure 19.17). Photograph kindly provided by Barbara Hamkalo.

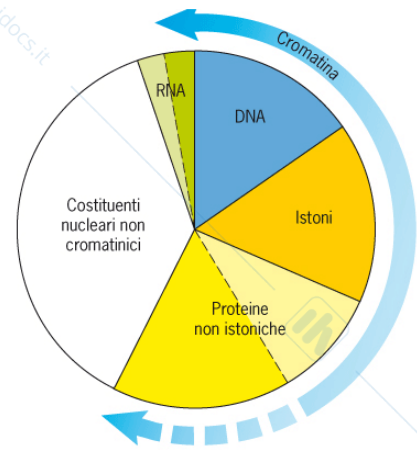


CROMATINA isolata da nuclei interfascici:

DNA
PROTEINE

- * basiche (carica positiva a pH neutro) = ISTONI
- * in gran parte acide (carica negativa a pH neutro) = PROTEINE CROMOSOMICHE NON ISTONICHE

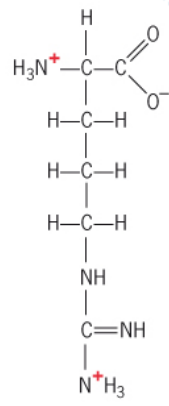
Quantità < di RNA



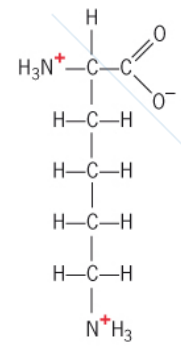
Le proteine più abbondanti nella cromatina sono gli istoni, proteine cariche positivamente, che sono di cinque tipi fondamentali:

H1,
H2A,
H2B,
H3
H4

elevati livelli di arginina
e lisina



Arginina



Lisina

- Un nucleosoma è un ottamero formato da quattro tipi di istoni
- due H2A, due H2B, due H3 e due H4
- Un nucleosoma ha una forma vagamente a disco di 11 nm di diametro per 6.5 nm di altezza

~ TABLE 11.4

Characteristics of Histones from Calf Thymus DNA

HISTONE TYPE	BASIC AMINO ACIDS		NUMBER OF AMINO ACIDS	MOLECULAR WEIGHT (DALTONS)
	LYS	ARG		
H1	29%	1%	215	23,000
H2A	11%	9%	129	13,960
H2B	16%	6%	125	13,775
H3	10%	13%	135	15,340
H4	11%	14%	102	11,280

Source: S. C. R. Elgin and H. Weintraub, 1976, *Annu. Rev. Biochem.* 44:725-776.

Figure 19.21 In a symmetrical model for the nucleosome, the H3₂-H4₂ tetramer provides a kernel for the shape. One H2A-H2B dimer can be seen in the top view; the other is underneath.

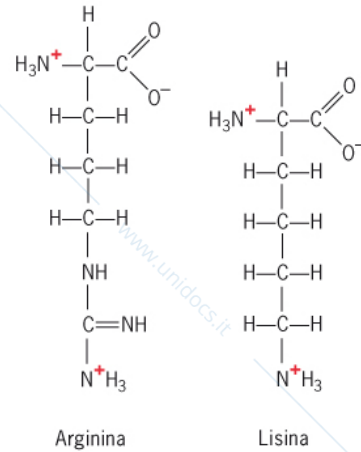
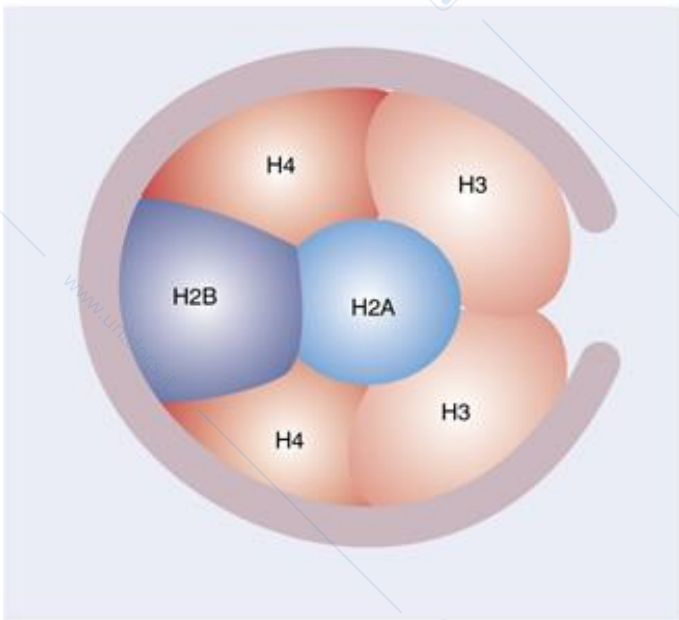


Figura 9.17 ▶ Struttura degli aminoacidi arginina e lisina (a pH 7) che costituiscono, insieme, dal 20% al 30% dei residui aminoacidici degli istoni.

Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
 Edises

- La doppia elica del DNA si avvolge intorno al nucleosoma come un filo sul rocchetto

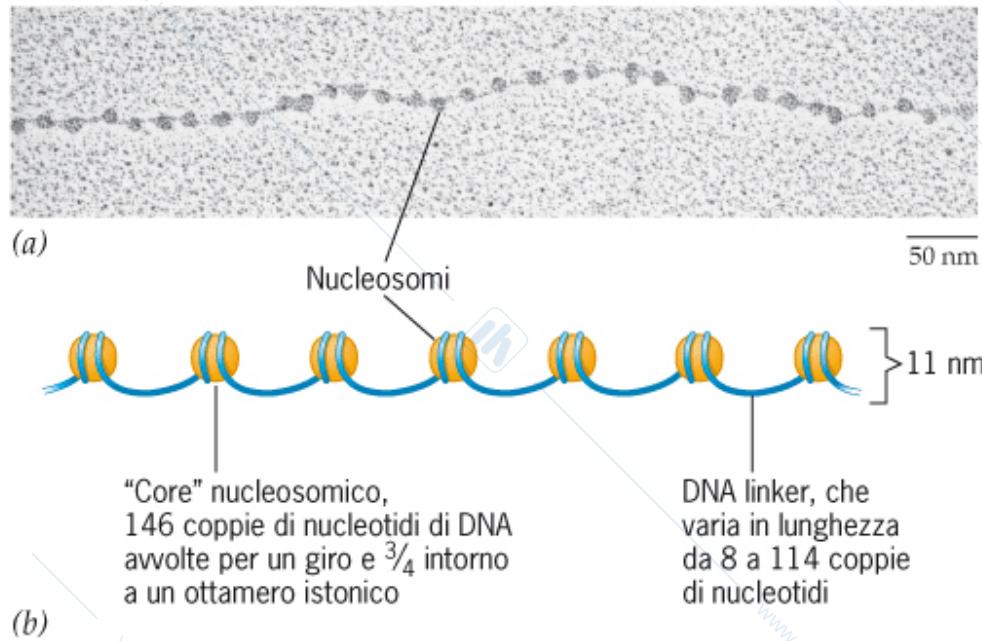


Figura 9.21 ► Fotografia al microscopio elettronico (a) e schema a bassa risoluzione (b) della substruttura nucleosomica a “collana di perle” della cromatina isolata da nuclei interfascici. *In vivo*, i linker di DNA sono probabilmente avvolti tra i nucleosomi a formare una fibra condensata di 11 nm.

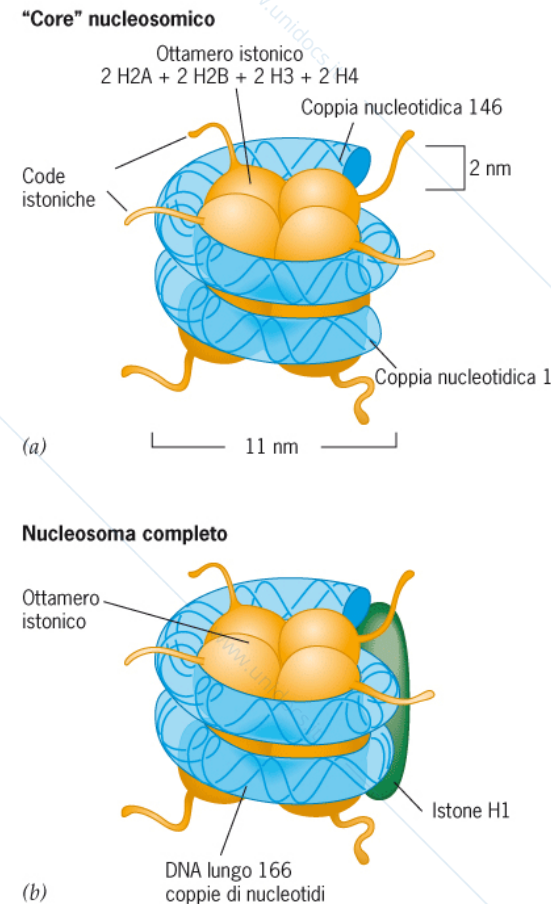


Figura 9.22 ► Schema della struttura grossolana del “core” nucleosomico (a) e di un nucleosoma completo (b). Il “core” nucleosomico contiene 146 paia di nucleotidi, sotto forma di DNA superavvolto negativamente avvolto in 1,65 giri attorno a un ottamero di istoni – due molecole di ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3 e H4. Il nucleosoma completo contiene 166 paia di basi, che formano quasi due giri di DNA superavvolto attorno all’ottamero istonico. Una molecola di istone H1 si pensa stabilizzi il nucleosoma completo.

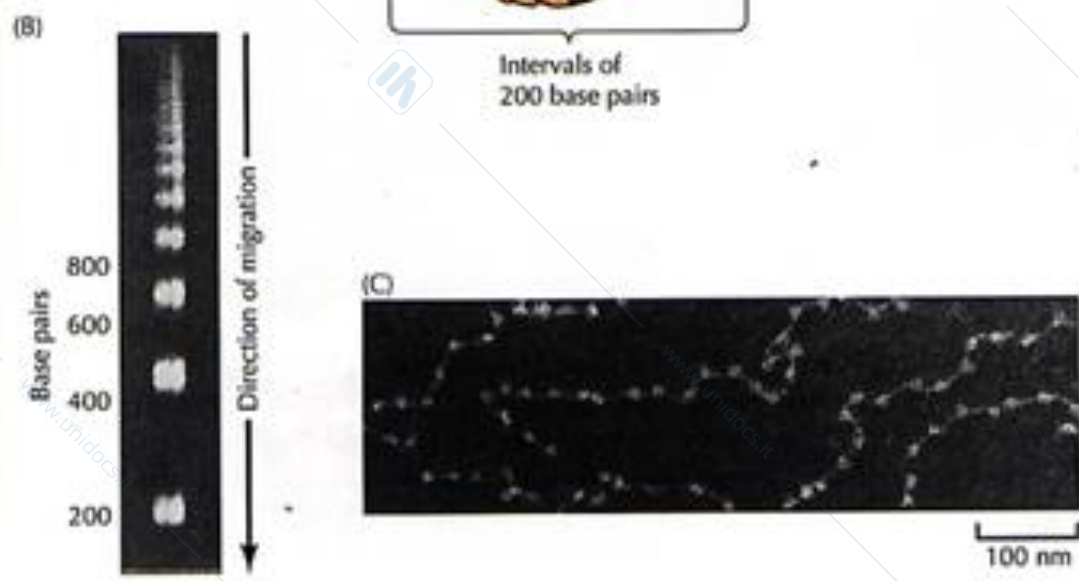
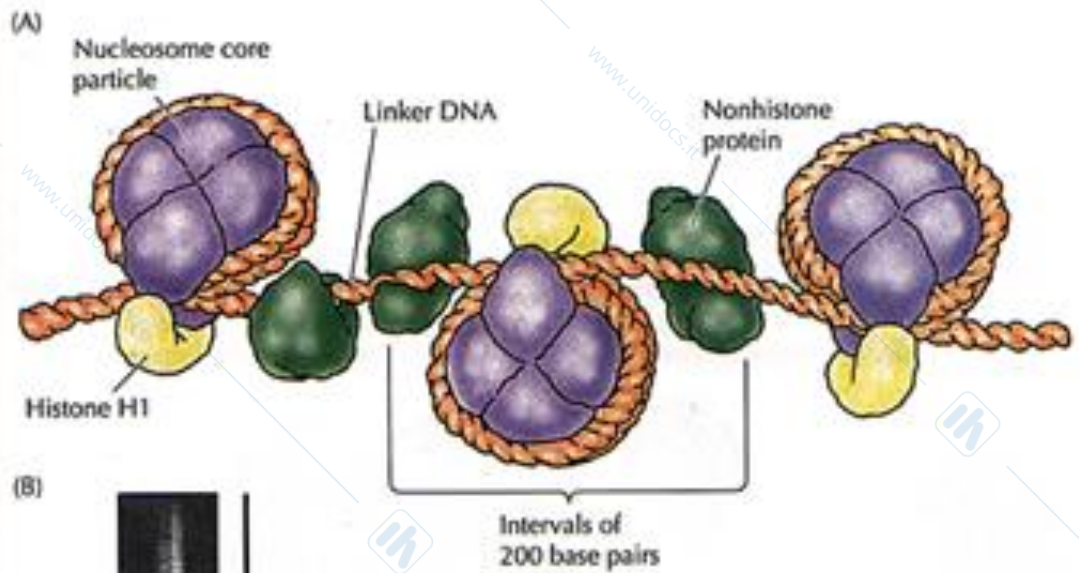


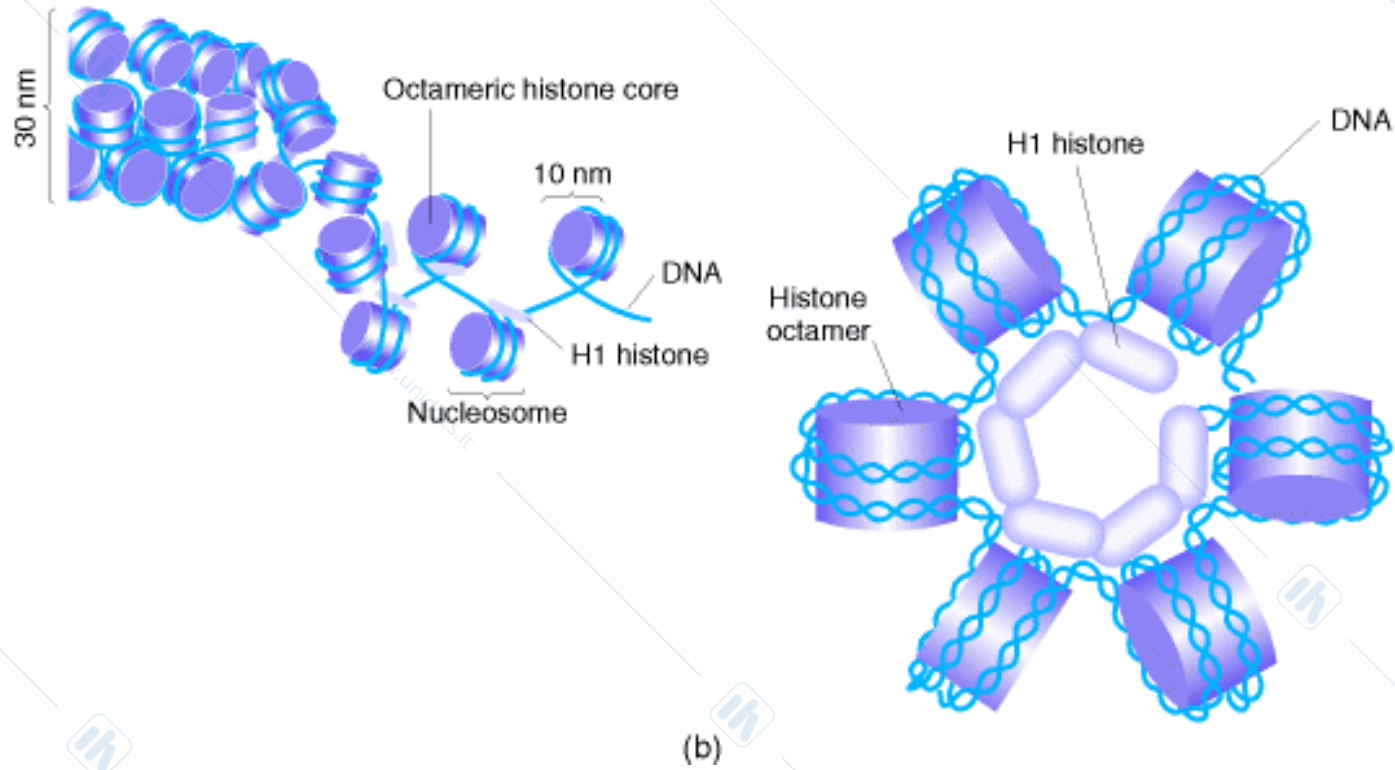
Figure 4.8
The organization of chromatin in nucleosomes (A) The DNA is wrapped around histones in nucleosome core particles and sealed by histone H1. Nonhistone proteins bind to the linker DNA between nucleosome core particles. (B) Gel electrophoresis of DNA fragments obtained by partial digestion of chromatin with micrococcal nuclease. The linker DNA between the nucleosome core particles is preferentially sensitive, so limited digestion of chromatin yields fragments corresponding to multiples of 200 base pairs. (C) An electron micrograph of an extended chromatin fiber, illustrating its beaded appearance. (B courtesy of Roger Kornberg, Stanford University; C courtesy of Ada L. Olins and Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)



(a)

Figura 2.19

(a) Modello di nucleosoma, che mostra il DNA avvolgersi in due giri intorno a un ottamero di istoni. (Alan Wolffe e Van Moudrianakis.) (b) Modello del solenoide da 30 nm; gli ottameri di istoni sono disegnati come dischetti viola. (Sinistra) Visione laterale della fibra parzialmente svolta. (Destra) Visione dall'alto. L'istone aggiuntivo H1 è qui disegnato al centro della spirale; probabilmente conferisce stabilità alla struttura. All'aumentare della concentrazione salina i nucleosomi si addensano, dando origine a un solenoide con sei nucleosomi per giro. (Da H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, e J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3^a ed., © 1995 di Scientific American Books.)



(b)

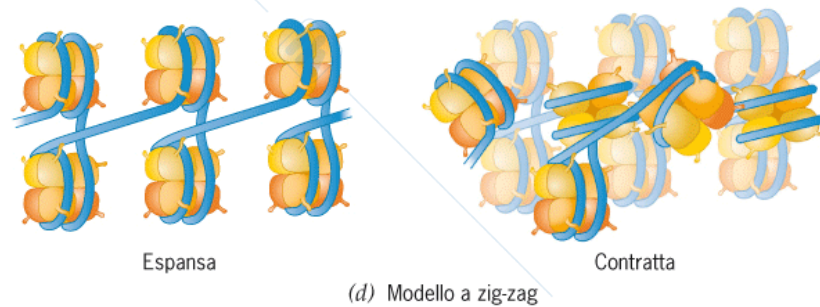
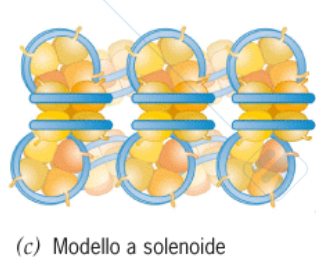
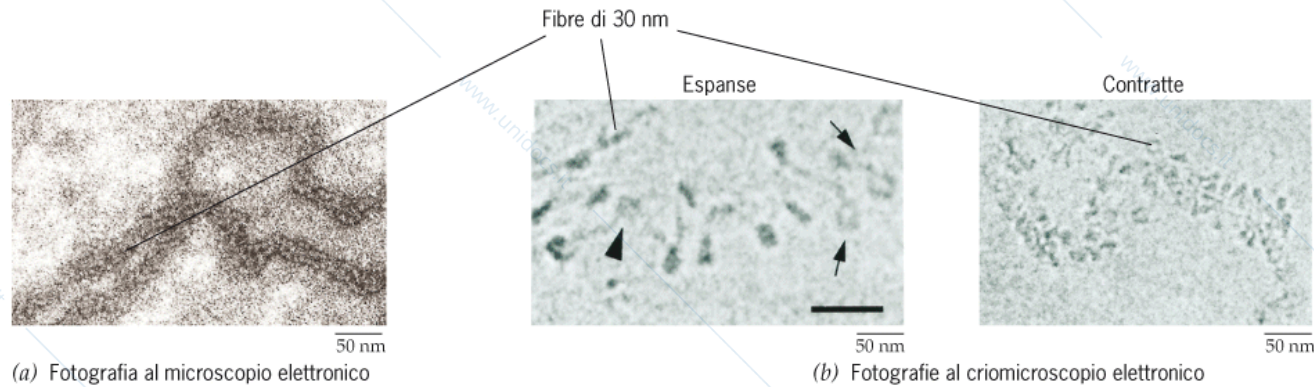


Figura 9.25 ► Fotografie al microscopio elettronico (a) e al criomicroscopio (b) di fibre cromatiniche di 30 nm di cromosomi eucariotici. La struttura delle fibre cromatiniche di 30 nm appare diversa a seconda della procedura utilizzata per isolarle e fotografarle. (c) Secondo il modello piú accreditato, la fibra di 30 nm è generata dal ripiegamento elicoidale della fibra nucleosomica di 11 nm in una struttura a solenoide con 6 nucleosomi per giro. (d) Tuttavia, quando la cromatina è osservata in seguito a criopreservazione (congelamento rapido) in assenza di fissazione, presenta una struttura a zig-zag, la cui densità – espansa o contratta – varia a seconda della forza ionica e delle modificazioni chimiche delle molecole istoniche.



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
 Edises

Condensazioni di ordine superiore

La fibra cromatinica da 30 nm (il solenoide) viene ulteriormente condensata dando origine – nel cromosoma mitotico – a una struttura che ha un diametro di circa 700 nm

Questo avviene per ulteriori spiralizzazioni della fibra su di un' *impalcatura* (scaffold) di proteine non istoniche alle quali il solenoide è attraccato e poi “superavvolto” in grandi anse

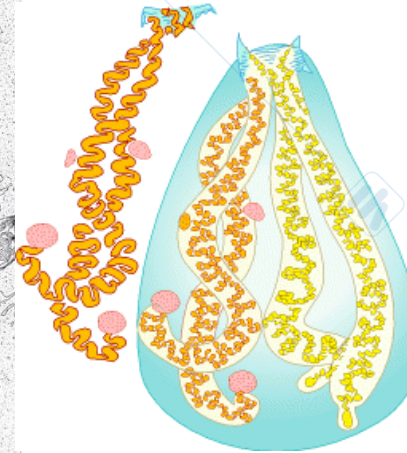
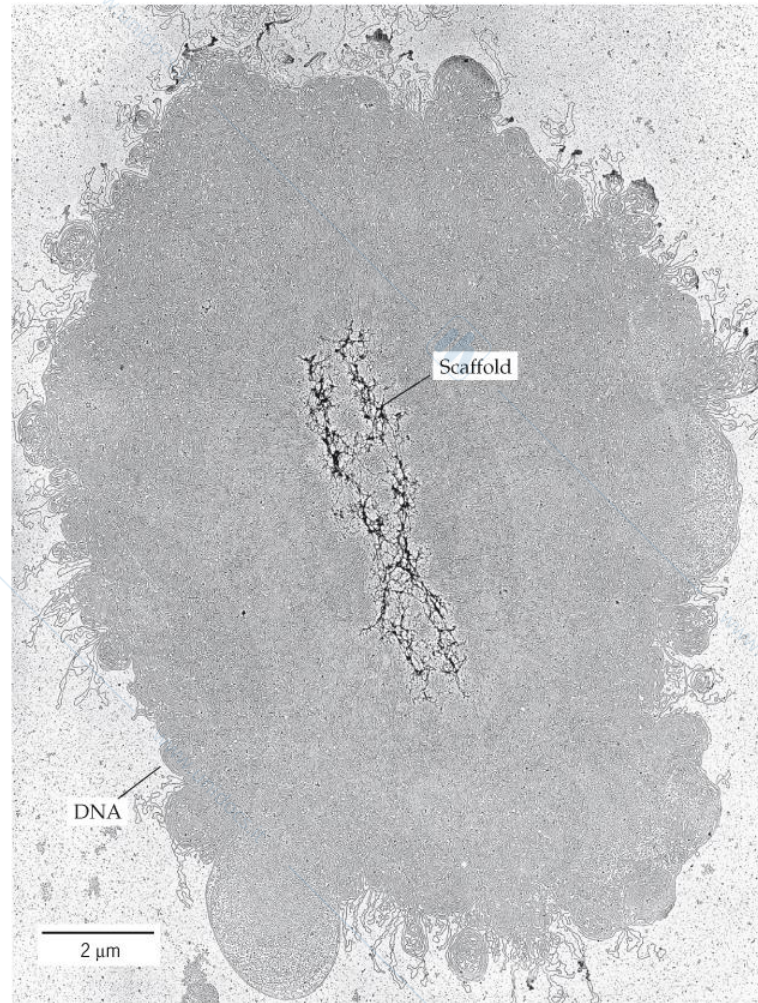


Figura 9.26 ► Fotografia al microscopio elettronico di un cromosoma metafaseico umano dal quale sono stati rimossi gli istoni. Un'enorme quantità di DNA circonda lo scaffold centrale, composto da proteine cromosomiche non istoniche. Da notare che lo scaffold ha circa la stessa forma del cromosoma metafaseico prima della rimozione degli istoni. Inoltre, va notata l'assenza delle estremità delle molecole di DNA nell'alone di DNA che circonda lo scaffold.



Shustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES

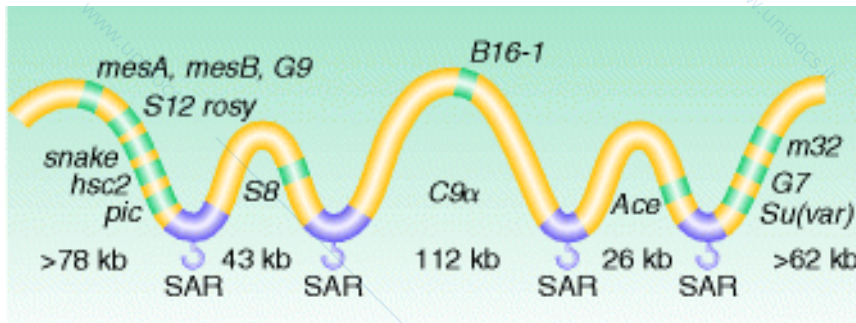
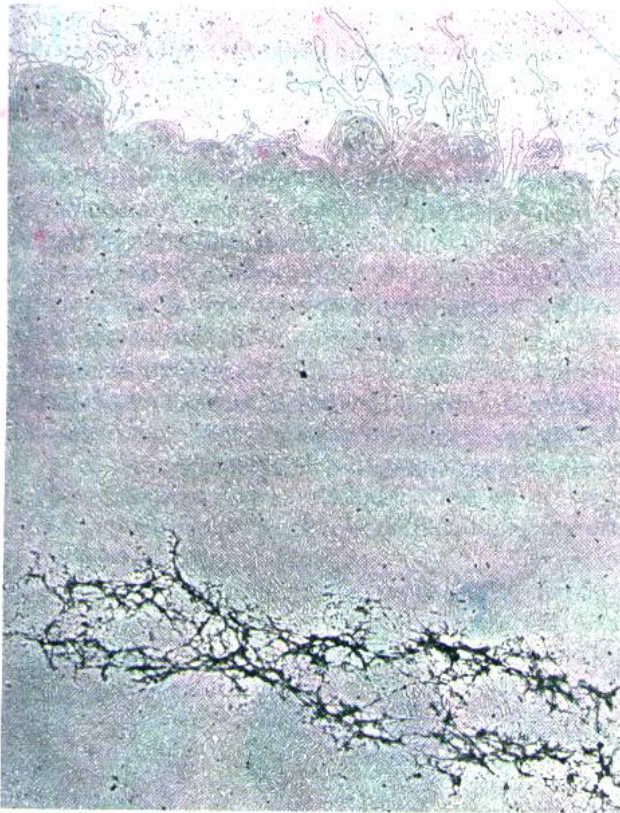
M.A.R.

Le anse della fibra cromatinica si attaccano allo scaffold mediante regioni speciali del DNA che si chiamano MAR* (*Matrix Attachment Regions*) e proteine specifiche che legano le MAR

Tra le proteine che interagiscono con le MAR ci sono (non a caso) proteine che si occupano dell'impaccamento e del superavvolgimento del DNA, come le topoisomerasi II

Le anse cromosomiche sono a tutti gli effetti "domini" di DNA funzionalmente indipendenti

* Dette anche SAR (Scaffold Attachment Regions)



Modello di struttura cromosomica. A destra la spirale è più rilassata a sinistra l'avvolgimento è più pronunciato

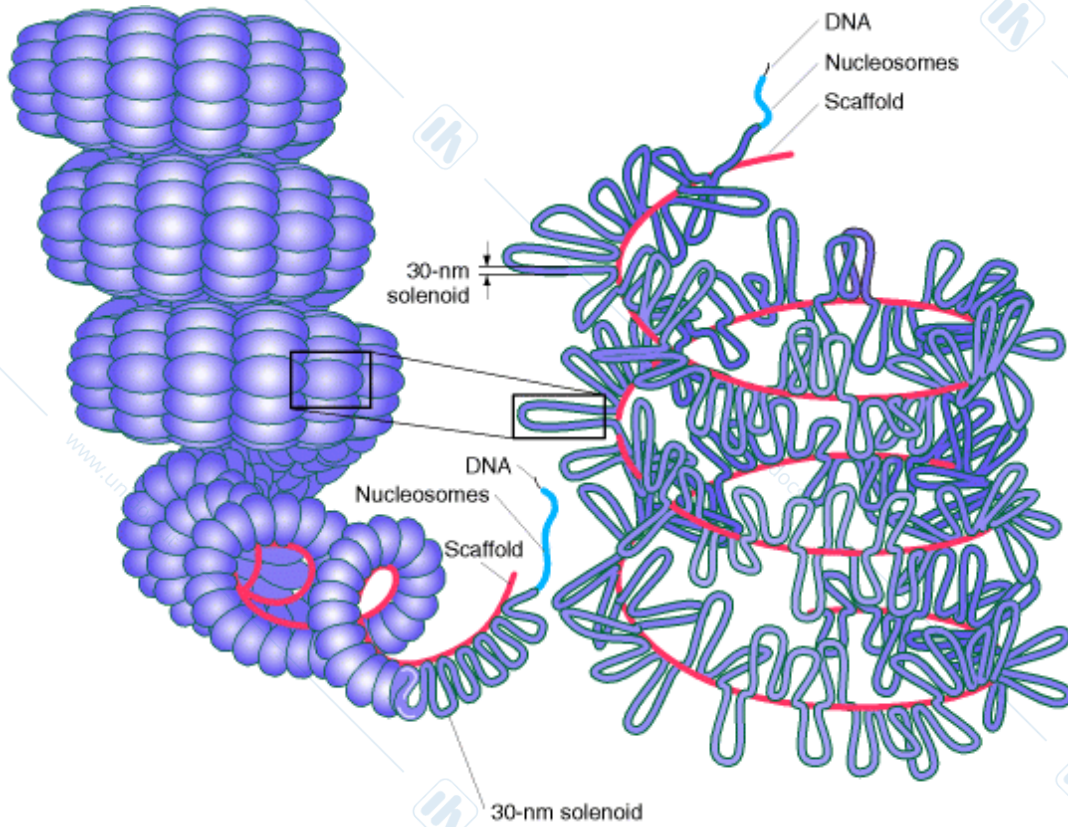
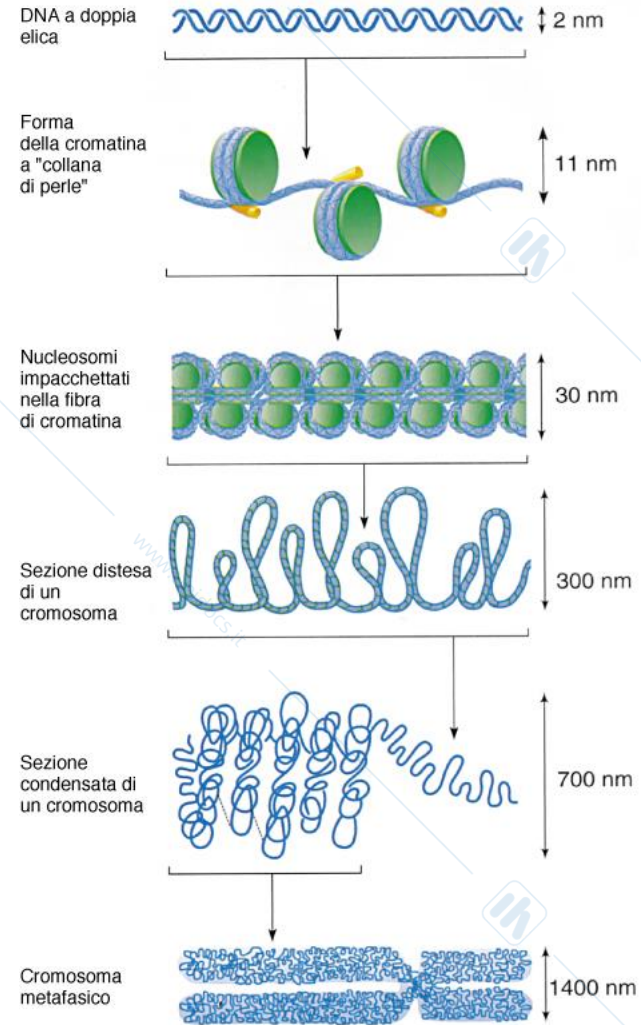


Figura 2.31

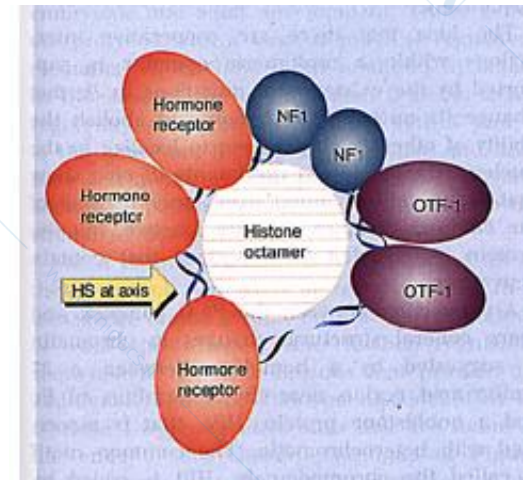
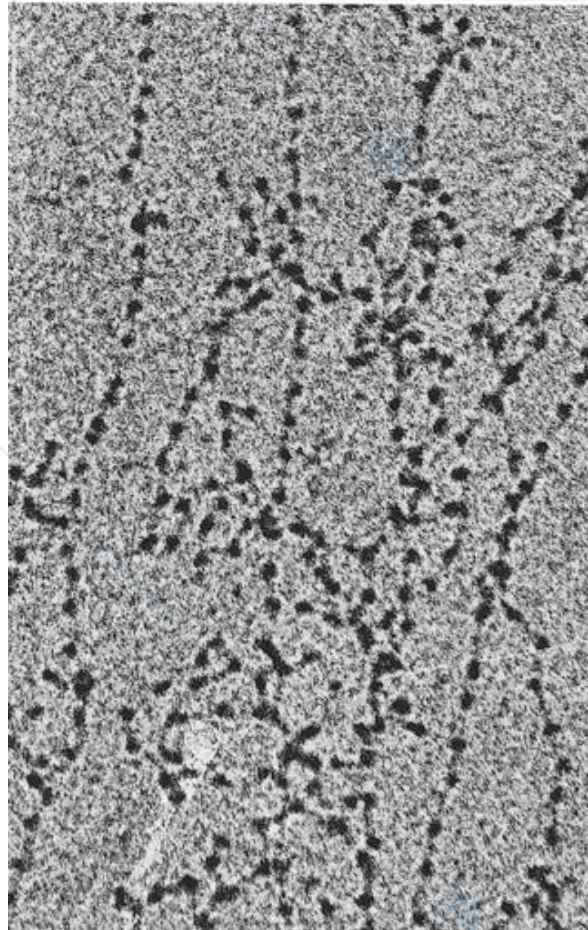
Rappresentazione schematica dei diversi ordini di impacchettamento della cromatina, alla base del cromosoma metafase altamente condensato.



La cromatina è una struttura “aperta”

La fibra cromatinica dei nuclei interfasicci (10 nm) è accessibile da parte delle proteine della replicazione e trascrizione del DNA incluse tutte le proteine che regolano queste attività

Figure 19.17 The 10 nm fiber in partially unwound state can be seen to consist of a string of nucleosomes. Photograph kindly provided by Barbara Hamkalo.



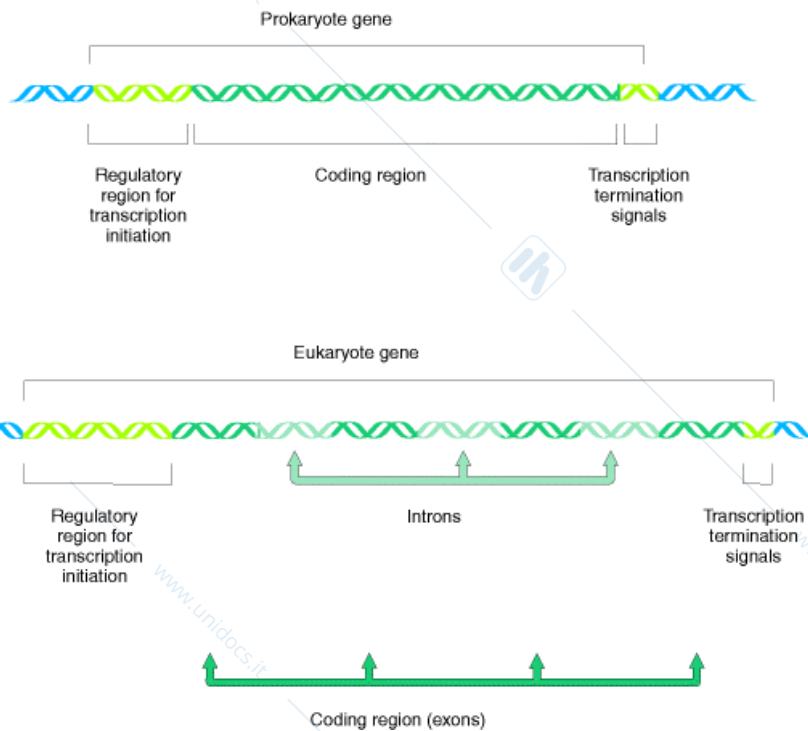
Riassumendo: livelli di impaccamento

- Il DNA si avvolge intorno ai nucleosomi
- La catena di nucleosomi si avvolge nel solenoide
- Il solenoide forma delle anse che si attaccano alla impalcatura centrale
- L'impalcatura e le anse si organizzano in superspiralizzazioni

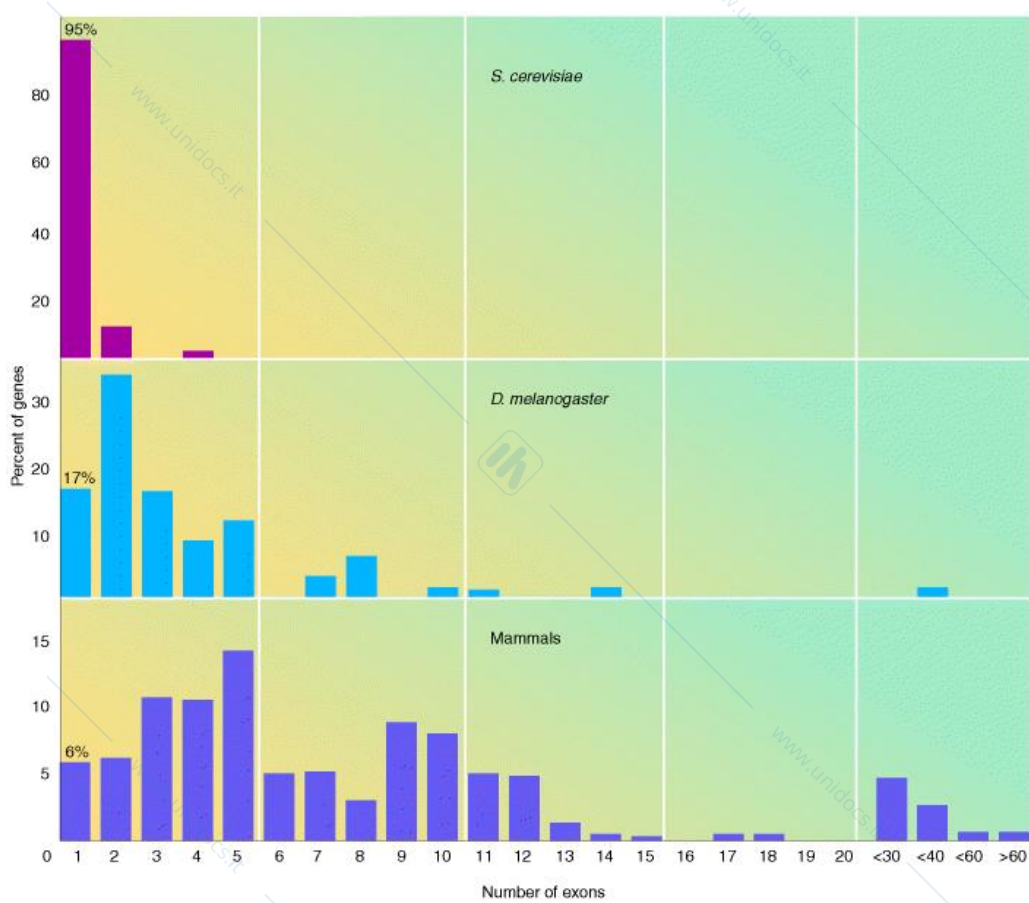
- Questo dà origine a tre livelli di condensazione
 - 1. Assemblaggio dei nucleosomi – fibra cromatinica da 10 - 11 nm**
 - 2. Superavvolgimento della fibra da 10 – 11 nm in un solenoide da 30 nm con il coinvolgimento dell'istone H1**
 - 3. La fibra a 30 nm si spiralizza formando anse o “domini” che sono attraccate a uno scaffold (impalcatura) costituito da proteine non istoniche**

- Nel suo insieme il grado di impaccamento a cui va soggetto un genoma eucariotico a livello dei singoli cromosomi è dell'ordine di grandezza di 1000-10000: cromosomi “lunghi” diversi cm in media vengono ridotti a dimensioni di alcuni micron

Genomi e geni in procarioti ed eucarioti

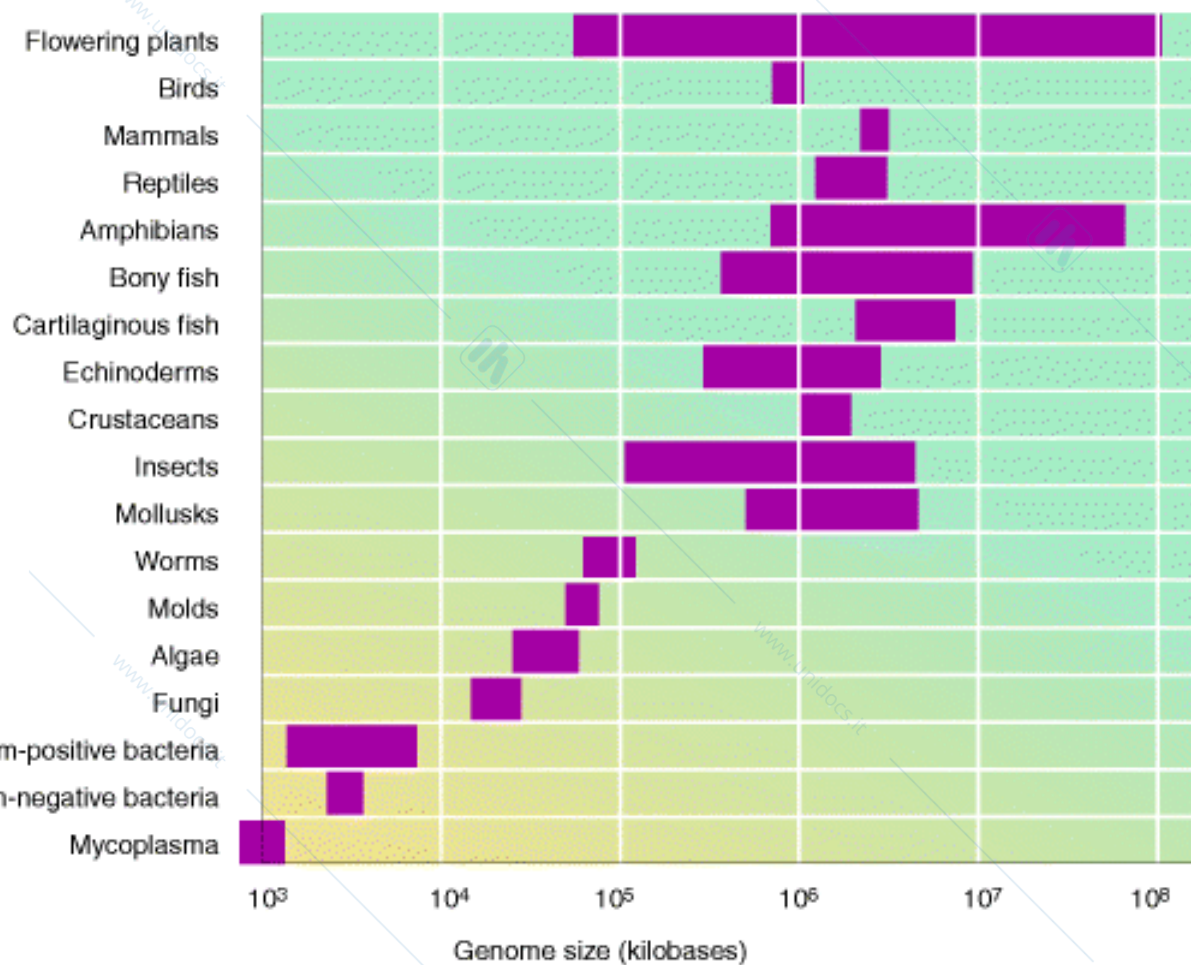


- Un genoma è composto da uno o più cromosomi e un organismo può essere monoploide, diploide ma anche poliploide
- I cromosomi sono composti (nella maggior parte degli organismi) da DNA
- Esistono differenze sulle “**tipologie di DNA**” presenti nei genomi tra procarioti ed eucarioti e anche differenze nella organizzazione dei geni che li compongono
- Le unità funzionali del DNA sono i geni
- I geni vengono trascritti in RNA e questi tradotti in proteine
- **Esistono differenze nella struttura dei geni tra procarioti ed eucarioti**
- **Negli eucarioti i geni sono interrotti da sequenze non codificanti (senza significato funzionale), dette introni. Le parti codificanti dei geni sono gli esoni**
- **Nei procarioti non esistono introni** (con poche eccezioni)
- Negli eucarioti esiste molto DNA NON codificante anche di tipo ripetitivo



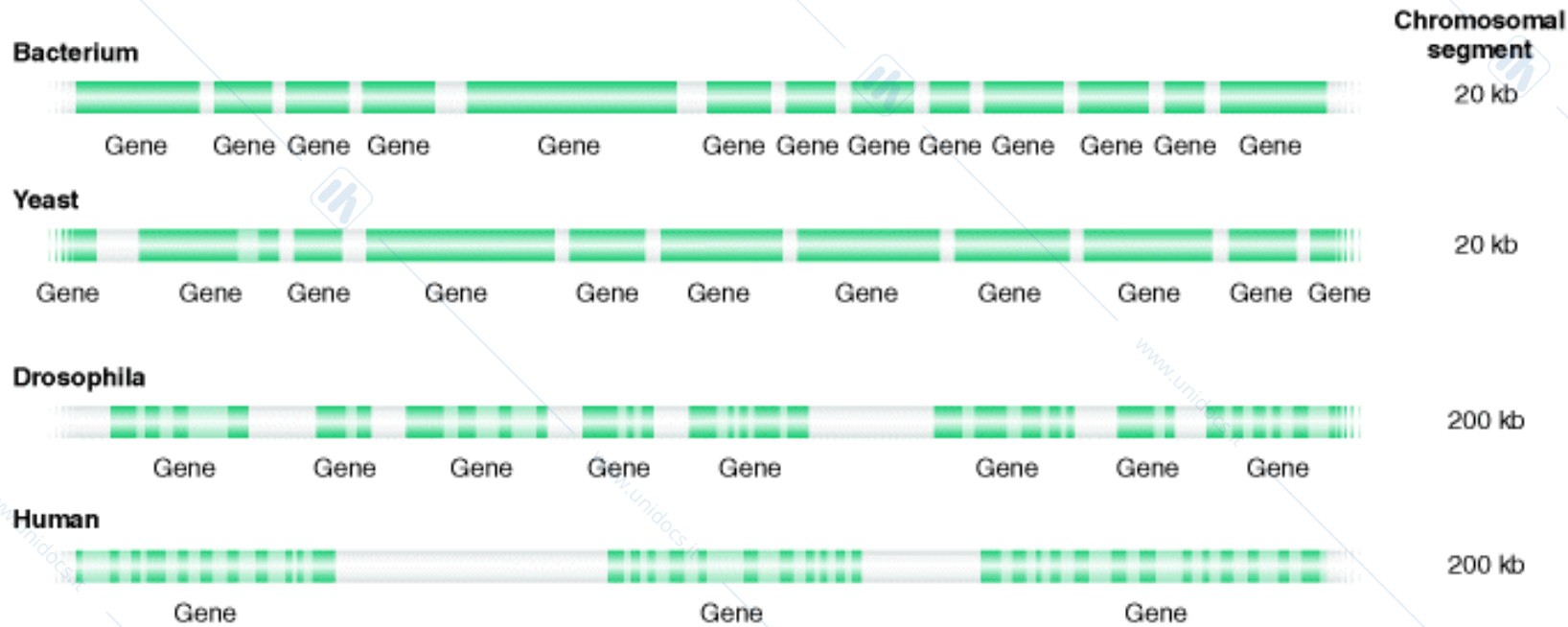
Il numero e la frequenza con cui si trovano esoni nei geni all'interno dei genomi cresce con la complessità degli organismi

Variazione della quantità di DNA genomico (C) in vari organismi: il paradosso del valore C



- Si può dire che organismi complessi hanno più DNA di organismi meno complessi?
- Sì, ma non in modo assoluto.
- L'evoluzione ha portato gli organismi complessi a sviluppare genomi complessi ma la complessità non è solo la "quantità" di DNA, ma se mai il "numero" di geni e anche
- il tipo e il numero di interazioni tra geni diversi e combinazioni funzionali di geni

Organizzazione dei geni in 4 organismi distanti evolutivamente



Genomi: grandezza e numero di geni

Tabella 2.2

Genomi: grandezza e numero dei geni

Genoma	Gruppo	Grandezza (kb)	Numero di geni
<i>Nucleo eucariotico</i>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lieviti	13 500 (L)	6000
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodi	100 000 (L)	13 500
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Piante	120 000 (L)	25 000
<i>Homo sapiens</i>	Uomo	3 000 000 (L)	21000
<i>Procarioti</i>			
<i>Escherichia coli</i>	Batterio	4700 (C)	4000
<i>Hemophilus influenzae</i>	Batterio	1830 (C)	1703
<i>Methanococcus jannaschii</i>	Batterio	1660 (C)	1738
<i>Virus</i>			
T4	Virus batterico	172 (L/C)	300
HCMV (herpesvirus)	Virus umano	229 (L)	200
<i>Organelli eucariotici</i>			
Mitocondri di <i>S. cerevisiae</i>	Lieviti	78 (C)	34
Mitocondri di <i>H. sapiens</i>	Uomo	17 (C)	37
Cloroplasti di <i>Marchantia polymorpha</i>	Epatiche	121 (C)	136
<i>Plasmidi</i>			
Plasmide F	In <i>E. coli</i>	100 (C)	29
Kalilo	Nel fungo <i>Neurospora</i>	9 (L)	2

NOTA: C = circolare; L = lineare; L/C = lineare nei virus liberi, circolare nella cellula.

Il DNA di un genoma eucariotico è composto di varie “*tipologie di sequenze DNA*”

Semplificando si possono distinguere due grandi categorie di DNA:

- **DNA a sequenza unica** (tutti i geni, ma anche DNA che non contiene geni) tipicamente presente come eucromatina
- **DNA ripetitivo** (l'eterocromatina è spesso costituita da DNA ripetitivo o molto ricca in DNA ripetitivo)
 - Eterocromatina costitutiva (DNA sempre eterocromatico per es DNA ripetitivi presenti ai centromeri e ai telomeri dei cromosomi)
 - Eterocromatina facoltativa. Si tratta di eucromatina condensata in condizioni variabili, per es. da un tipo cellulare a un altro.

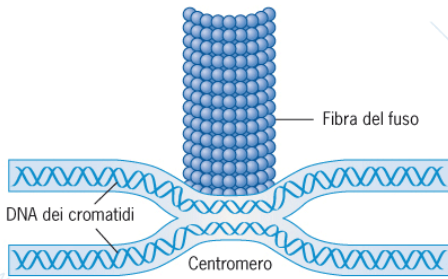


Figura 9.28 ► Modello di struttura del centromero in un cromosoma metafasico. Le fibre del fuso, attaccate al centromero, sono responsabili della separazione dei cromosomi omologhi durante l'anafase I della meiosi e dei cromosomi figli (derivati dai cromatidi) durante l'anafase II della meiosi e l'anafase della mitosi (Capitolo 2).

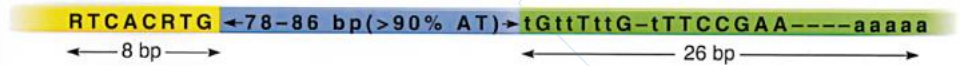


Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

- Sequenze di DNA localizzate al punto di attacco delle fibre del fuso mitotico (meiotico)
 - Lievito, sequenze *CEN*, simili ma non identiche tra diversi cromosomi anche se sono perfettamente interscambiabili
 - Tipicamente ricche in AT nel loro insieme
 - Molto semplici e brevi in lievito *S. cerevisiae* (solo 110 – 120 bp) e composte da tre regioni o “domini” funzionali

Figura 2.32

Sequenza consenso dei centromeri del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. R = purina. Le coppie di basi presenti in 15 su 16 dei 16 centromeri sono altamente conservate e sono indicate con caratteri maiuscoli. Le coppie di basi presenti in 10-13 dei 16 centromeri sono conservate e sono indicate con caratteri minuscoli. Le posizioni non conservate sono indicate da trattini.



- tre regioni o “domini” funzionali (Centromeric DNA Elements, CDE; CDE I, II e III)
- La regione II centrale è importante che sia ricca in AT per poter interagire meglio con le fibre del fuso attraverso la denaturazione della doppia elica a cui si attaccano appunto le proteine del fuso
- Al contrario le regioni I e III hanno sequenze specifiche che servono a legare proteine coinvolte nella interazione con le fibre del fuso

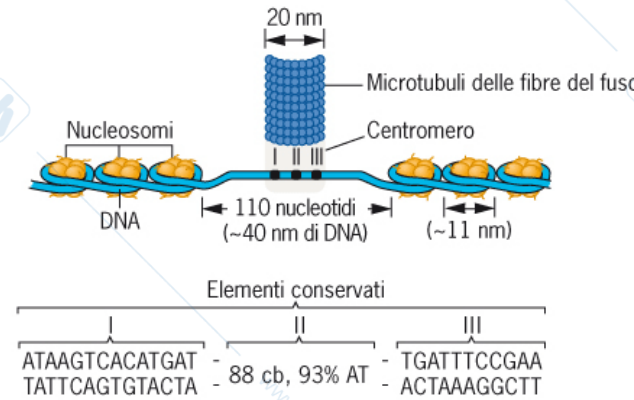


Figura 9.29 ▶ Schema della struttura conservata dei centromeri in *Saccharomyces cerevisiae* (in alto) e sequenza della regione *CEN* del cromosoma 3 di questa specie (in basso).



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
Edises

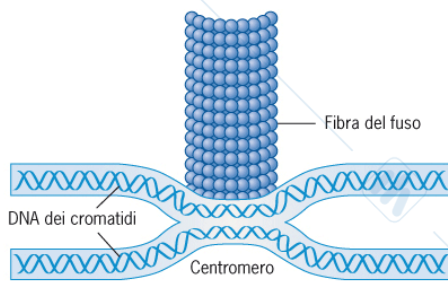


Figura 9.28 ▶ Modello di struttura del centromero in un cromosoma metafase. Le fibre del fuso, attaccate al centromero, sono responsabili della separazione dei cromosomi omologhi durante l'anafase I della meiosi e dei cromosomi figli (derivati dai cromatidi) durante l'anafase II della meiosi e l'anafase della mitosi (Capitolo 2).

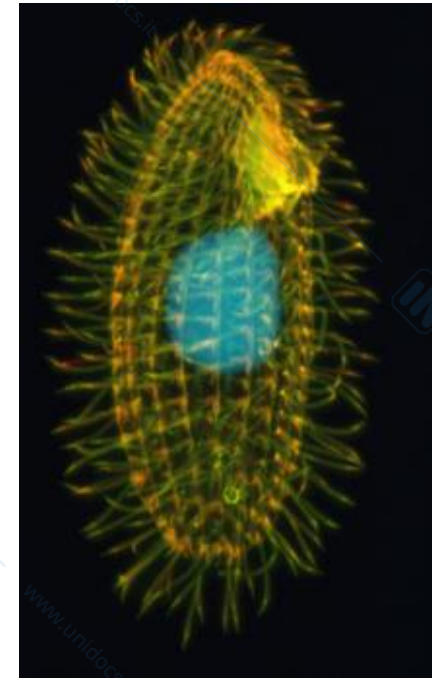


Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES

- Negli eucarioti superiori la struttura è molto più lunga e complessa (già nel lievito *S. pombe* i centromeri sono lunghi 60000-80000 bp e incorporano più tipi di domini-sequenze ripetute
- Nell'uomo più tipi di sequenze ripetute in tandem e molte più ripetizioni
- Sequenza satellite alfa (alfoide) di 171 bp ripetuta 5000-15000 volte
- Famiglie di DNA satellite diverse
- Cromosoma X ha un centromero minimo di ca 450000 bp composto da vari DNA satellite (soprattutto il tipo alfa) e siti di legame per la proteina centromerica CENP (CENP-N boxes)

I TELOMERI: altre strutture contenenti DNA ripetitivo

- Termine introdotto da Muller (1938) per descrivere le estremità dei cromosomi di *Drosophila*
- Privati dei telomeri in seguito a rottura con raggi X i cromosomi non vengono trasmessi correttamente alla progenie
- Descritti anche dalla McClintock nel mais come strutture “stabili” in condizioni naturali ma “appiccicose” se rotte...
- Tutte indicazioni che i telomeri hanno una struttura del DNA particolare. Infatti, così è
- sono DNA ripetitivi a sequenza semplice, molto breve. Descritti per la prima volta nell'unicellulare ciliato *Tetrahymena*, dove l'unità ripetitiva della sequenza telomerica è 5' TTGGGG 3'

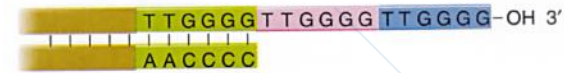


- La sequenza “consenso” dei telomeri è $5' T_{1-4} A_{0-1} G_{1-8} 3'$
- Nell'uomo (e in tutti i vertebrati) è $5' TTAGGG 3'$; nella pianta *Arabidopsis* è $TTTAGGG$
- Le sequenze telomeriche si susseguono in tandem per decine, centinaia di volte, all'estremità dei cromosomi (da 500 a 3000 nelle cellule somatiche umane)
- Le estremità dei cromosomi adottano una particolare struttura per quel che riguarda il DNA ripetitivo di cui sono costituiti (vedi figura)
- A causa della loro struttura i telomeri sono replicati in modo particolare (vedi replicazione)
- Esistono poi - adiacenti ai telomeri - altre sequenze ripetitive più complesse, dette sequenze associate ai telomeri, che si estendono per migliaia/decine di migliaia di coppie di basi. Il loro ruolo non è ancora completamente chiarito

Figura 2.34

Telomeri. (a) Sequenze telomeriche semplici all'estremità dei cromosomi di *Tetrahymena*. (b) Modello di struttura del telomero in cui il DNA telomeric si avvolge all'indietro a formare un'ansa (t-loop). L'estremità a singolo filamento s'insinua tra le sequenze telomeriche a doppio filamento formando un cosiddetto displacement loop (D-loop).

a) Sequenze telomeriche semplici di *Tetrahymena*



b) Modello a t-loop per i telomeri

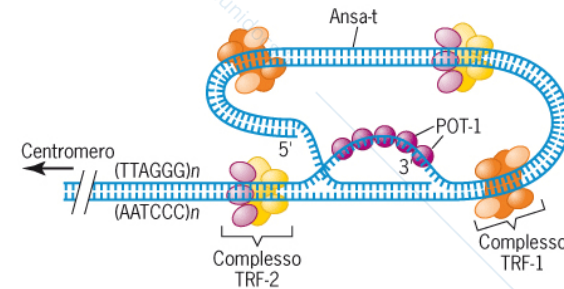
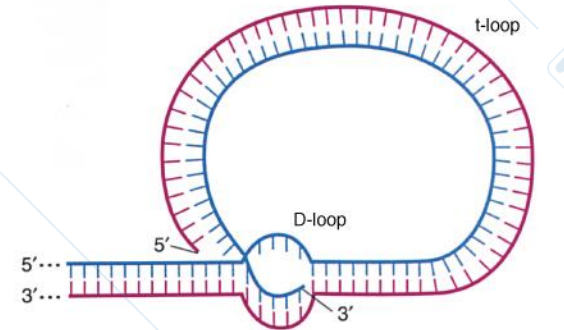
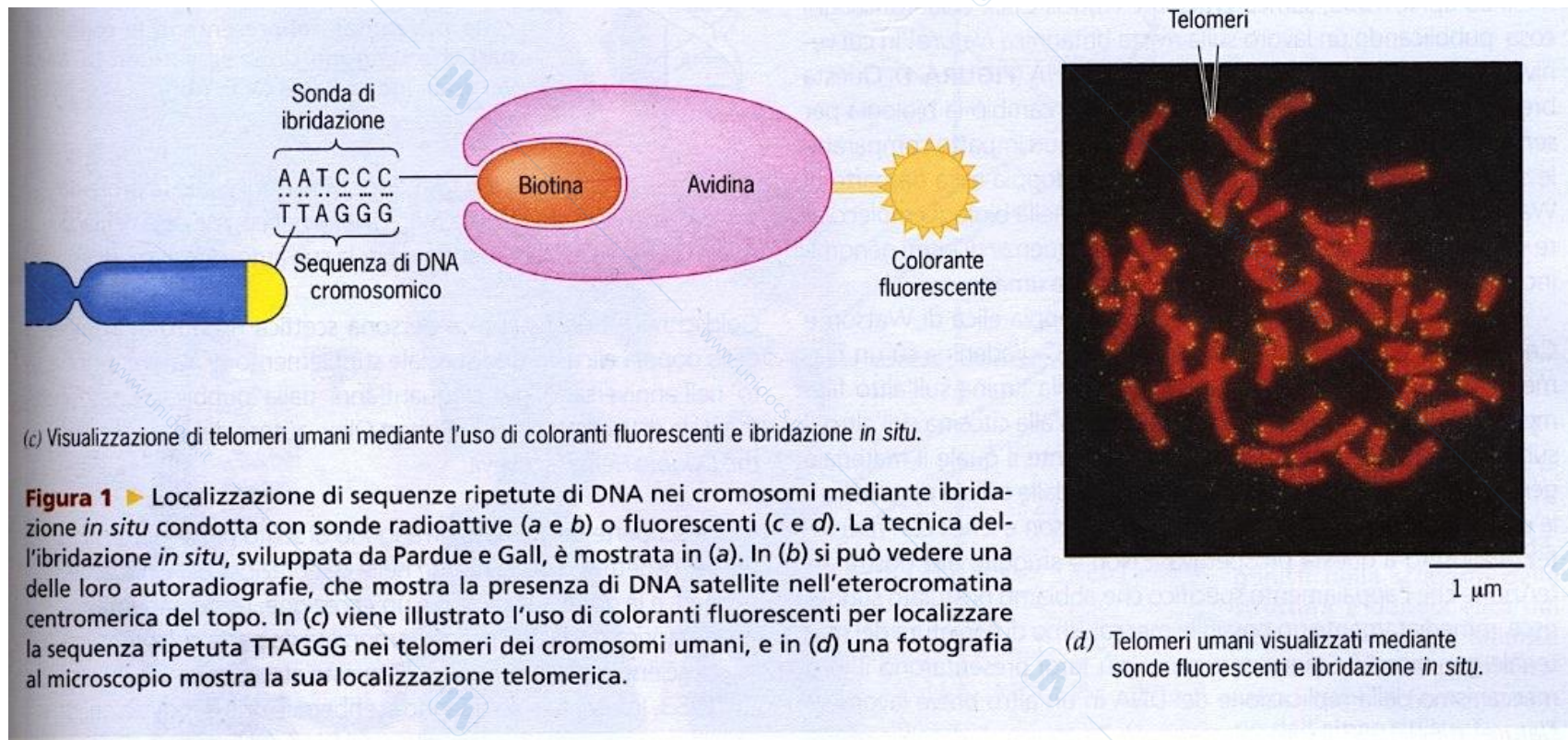


Figura 9.31 ► Modello di telomero umano stabilizzato dalla formazione di un'ansa-t. L'estremità 3' forma un'ansa-t invadendo una ripetizione telomeriche a monte e appaiandosi con il filamento complementare. TRF-1 e TRF-2 sono i fattori 1 e 2 che legano le ripetizioni telomeriche: entrambi i complessi contengono svariate proteine. La proteina POT-1 (**P**rotection **O**f **T**elomeres protein **1**) ricopre il singolo filamento di DNA spazzato dall'estremità 3' del DNA telomeric.

Ibridazione in situ di sequenze telomeriche

- Tecnica che sfrutta la complementarità tra i filamenti di una sonda usata come tracciante (radioattivo o fluorescente) e il filamento complementare sul genoma (cromosoma) a cui questa sonda appunto si “ibrida” in condizioni opportune
- Il risultato dell’ibridazione è che grazie al tracciante incorporato sulla sonda la sua posizione sul cromosoma è chiaramente identificabile



Ibridazione in situ di sequenze centromeriche

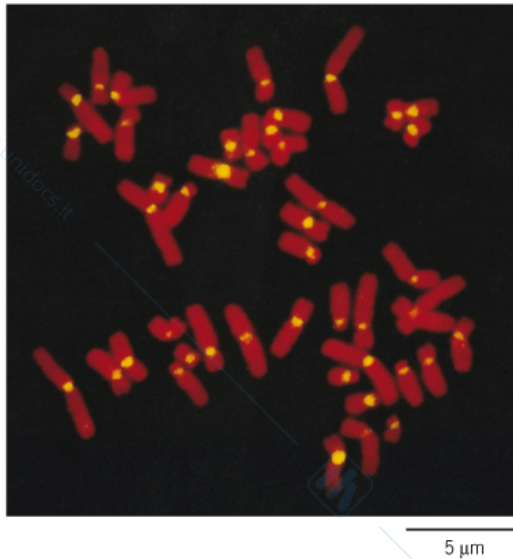


Figura 9.30 ► Localizzazione delle sequenze di DNA satellite alfa (in giallo) nei centromeri dei cromosomi umani (in rosso). Vedi "Approfondimento: Ibridazione *in situ*".

- Nella figura a fianco una sonda fluorescente di DNA ripetitivo centromerico – DNA satellite alfa - si “ibrida” ai centromeri
- L’esperimento dimostra che i centromeri di tutti i cromosomi contengono lo stesso tipo di DNA (quello che corrisponde alla sonda usata)



Snustad, Simmons
Principi di Genetica, IV Ed.
EdiSES

DNA Ripetitivo

- **In tandem** (telomeri, centromeri, DNA associato a telomeri e centromeri (DNA satellite))
- **Intersperse.** Distribuite in molte copie lungo tutto un genoma
 - SINE (Short INterspersed Repeated Elements). Lunghe da 100 a 500 paia di basi. Ripetute da migliaia a centinaia di migliaia di elementi /genoma. Alu family, 200-300 bp, $9 \cdot 10^5$ copie per genoma, una ogni 5000 nucleotidi
 - LINE (Long Interspersed Repeated Elements). Più lunghe e meno frequenti delle SINE
- Elementi genetici trasponibili (= mobili) capaci di spostarsi sul DNA anche tra cromosomi diversi. Le più abbondanti in assoluto e rappresentate da molte “famiglie” (90 addirittura in Drosophila dove ad es. i telomeri sono fatti da 2 elementi trasponibili). Nell’uomo il 40-50% del genoma sono elementi trasponibili e nel mais fino all’80% del genoma.
- Un altro criterio per distinguere tra DNA ripetitivi è il “grado” di ripetitività: esistono DNA altamente ripetuti, mediamente ripetuti e scarsamente ripetuti
- Come sono stati scoperti? Con due tecniche: centrifugazione in gradiente di densità e cinetiche di rinaturazione del DNA