

DNA RIPETUTO; DNA ALFOIDE e CENTROMERI

DNA ALTAMENTE RIPETITIVO

Il DNA altamente ripetitivo e' costituito da una serie di sequenze molto brevi ripetute numerose volte in tandem, organizzate in blocchi. La ripetizione in tandem di una breve sequenza crea delle proprieta' fisiche particolari che possono essere sfruttate per l'isolamento. Infatti spesso la sequenza ripetitiva ha una composizione in basi che non rispecchia la composizione media del genoma e quindi le permette di formare una frazione separata per densita' di galleggiamento. A questo proposito e' utile dire che la densita' di galleggiamento di un DNA duplex (d) dipende dal suo contenuto in basi G-C ed e' espressa dalla seguente formula:

$$d=1,660+0,00098(\%GC)g\text{xc}\text{m}^{-3}$$

Questa densita' si determina centrifugando il DNA in un gradiente di densita' di cloruro di cesio (CsCl). In questo modo il DNA forma una banda in corrispondenza della sua densita'. Le frazioni di DNA che differiscono nella densita' di galleggiamento possono cosi' essere separate su gradiente: una differenza di d di circa $0,005g\text{xc}\text{m}^{-3}$ e' sufficiente a separare due frazioni di DNA. Poiche' d dipende dal contenuto in GC, una differenza di d di $0,005$ corrisponde a una differenza di contenuto GC del 5%.

Centrifugando un DNA eucariotico in gradiente di densita', esso forma una serie continua di frammenti che vengono visualizzati da un picco di assorbimento abbastanza ampio, centrato sul valore di d che corrisponde al contenuto medio di GC del genoma. Questo picco e' detto **BANDA PRINCIPALE**. Si osservano anche uno o piu' picchi minori e questo materiale e' detto **DNA SATELLITE**. Ad esempio, centrifugando in gradiente di densita' il DNA di topo, la banda principale corrispondente al 92% del genoma ha una d di $1,701g\text{xc}\text{m}^{-3}$ che corrisponde a un contenuto medio di GC di 42% (tipico dei mammiferi). Il picco minore corrisponde all'8% del genoma e ha una d di $1,690g\text{xc}\text{m}^{-3}$. Esso corrisponde al DNA satellite del topo che ha un contenuto in GC minore (30%).

I satelliti sono presenti in molti genomi eucarioti, rappresentano il 5% dell'intero genoma e possono essere piu' pesanti o piu' leggeri della banda principale. Infatti quando si determina la composizione in basi di un satellite, si vede che essa e' spesso diversa da quanto predetto in base alla d perche' essa dipende anche da altri fattori come la composizione delle coppie di basi piu' vicine e il grado di metilazione.

Centrifugando il DNA umano in gradiente di cloruro di cesio e aggiungendo al gradiente buffers che si intercalano al DNA come etidio bromuro, actinomicina o metalli che si legano ad esso (i quali fanno aumentare il numero di satelliti) risultano 4 picchi di cui:

il SATELLITE I con $d=1,687g\text{xc}\text{m}^{-3}$

il SATELLITE II con $d=1,693g\text{xc}\text{m}^{-3}$

il SATELLITE III con $d=1,696g\text{xc}\text{m}^{-3}$

il SATELLITE IV con $d=1,700g\text{xc}\text{m}^{-3}$

Il totale di questa frazione di DNA corrisponde al 6% del genoma.

Mediante ibridazione di questo DNA satellite su cromosomi umani in metafase si e' visto che esso e' localizzato nell'eterocromatina costitutiva delle regioni centromeriche. Infatti quando un cromosoma viene colorato con composti che reagiscono col DNA, come il reattivo di Feulgen, si distinguono regioni con diverse caratteristiche. Le regioni densamente colorate sono dette **ETEROCROMATINA**, quelle debolmente colorate vengono dette **EUCROMATINA**. Cio' riflette il livello di compattezza del DNA nei cromosomi. L'eterocromatina si distingue in **COSTITUTIVA** e **FACOLTATIVA**.

Un esempio di eterocromatina facoltativa e' costituito dal cromosoma X inattivo, che si presenta eteropicnotico nei tessuti somatici e costituisce il cosiddetto **CORPO DI BARR** o **CROMATINA SESSUALE**.

L'eterocromatina costitutiva e' localizzata a livello di regioni pericentromeriche dei cromosomi umani, a livello di regioni telomeriche e anche lungo i bracci dei cromosomi (come il cromosoma Y) e consiste di DNA satellite.

E' opportuno a tale riguardo trattare della struttura e delle funzioni del centromero.

CENTROMERO

Nei cromosomi dei mammiferi, uomo compreso, da studi citologici in metafase, esso appare essere costituito da una **COSTRIZIONE PRIMARIA**, che forma una specie di strozzatura laddove i due cromatidi fratelli sono uniti.

Concettualmente e' bene fare distinzione tra il **CENTROMERO**, che e' parte integrante del cromosoma, e il **CINETOCORE**, che e' una struttura esterna al cromosoma e che consiste di proteine a funzione specifica complessate col DNA centromerico. E' qui che si attaccano le fibre del fuso mitotico o meiotico. Quindi il cinetocore e' funzionalmente e strutturalmente la porzione del centromero responsabile della segregazione dei cromosomi nelle cellule figlie durante la mitosi e la meiosi.

Al microscopio elettronico il cinetocore appare come una struttura trilaminare, allineata parallelamente su entrambi i lati della costrizione primaria. Su alcuni preparati sono state addirittura visualizzati una dozzina circa di microtubuli del fuso che terminano in corrispondenza della porzione piu' esterna del cinetocore.

L'intero centromero puo' essere diviso in tre domini: in porzione piu' esterna il **DOMINIO DEL CINETOCORE**, un **DOMINIO CENTRALE** costituito da eterocromatina centromerica e un **DOMINIO INTERNO** dove i cromatidi fratelli sono in contatto.

Sono state identificate diverse e specifiche proteine centromeriche (CENPs).

La CENP-A (17-19 KDa) e' una proteina istonica specifica per il centromero. E' prodotta da un unico gene. Non si sa ancora che cosa rende la cenp-A specifica per il centromero e a quali sequenze di DNA si lega.

La CENP-B (80 KDa) e' stata caratterizzata piu' in dettaglio e si trova in corrispondenza del dominio centrale di eterocromatina. Studi in vivo e in vitro hanno mostrato che essa interagisce direttamente con la classe di DNA della regione centromerica dei cromosomi dei primati: l'ALFA SATELLITE. E' stato ipotizzato un suo ruolo nel determinare lo stato di attivita' di un centromero, ma si e' visto che e' presente anche inima il cinetocore cattura le estremita' crescenti (plus) dei microtubuli; dopo di cio' questi ultimi possono continuare ad aggiungere o sottrarre subunita' di tubulina al cinetocore fungendo da "motore" che guida il movimento dei cromosomi lungo le fibre del fuso. Esso genera forze dirette in opposte direzioni: una verso le estremita' crescenti (plus) durante la disposizione dei cromosomi nella zona equatoriale in prometafase, una verso le estremita' eine per la porzione piu' interna del centromero e CLIPs che sono proteine che legano i cromatidi, in modo perpendicolare all'asse longitudinale del cromosoma.

Oltre alle funzioni di tenere uniti i cromatidi fratelli e di interagire con le fibre del fuso mitotico o meiotico, una terza funzione del centromero e' quella di partecipare, attraverso l'azione del cinetocore, al movimento dei cromosomi verso i poli del fuso in anafase. Dapprima il cinetocore cattura le estremita' crescenti (plus) dei microtubuli; dopo di cio' questi ultimi possono continuare ad aggiungere o sottrarre subunita' di tubulina al cinetocore fungendo da "motore" che guida il movimento dei cromosomi lungo le fibre del fuso. Esso genera forze dirette in opposte direzioni: una verso le estremita' crescenti (plus) durante la disposizione dei cromosomi nella zona equatoriale in prometafase, una verso le estremita' dei poli (minus) durante il movimento cromosomico verso i poli opposti in anafase. Questo "motore" puo' essere localizzato nella corona fibrosa che si trova in posizione adiacente alla zona piu' esterna del cinetocore.

DNA SATELLITE

Le famiglie di DNA satellite nei diversi ordini di mammiferi, come roditori e primati, non sembrano essere in relazione considerando le loro sequenze. Tuttavia, somiglianze di organizzazione cromosomale e di brevi sequenze coinvolte nel riconoscimento di proteine centromeriche fanno pensare a un coinvolgimento dei DNA satellite nel definire la struttura e la funzione dei centromeri.

Il primo DNA satellite ad essere isolato e' stato il DNA satellite maggiore del topo. Esso e' localizzato al di fuori della regione che comprende la costrizione primaria dei cromosomi in metafase, ma e' comunque coinvolto nelle funzioni del centromero in quanto una sua digestione distrugge il legame dei cromatidi fratelli. In seguito fu isolato il DNA satellite minore di topo. Esso consiste di una ripetizione in tandem di una sequenza di 120bp. Nella regione centromerica del genoma umano e' presente l'alfa satellite.

ALFA SATELLITE o DNA ALFOIDE

La famiglia di DNA alfa satellite consiste di monomeri ripetuti in tandem, ognuno dei quali e' approssimativamente lungo 171bp. Esso e' localizzato nell'eterocromatina centromerica. Blocchi di alfa satellite, costituiti da monomeri divergenti di alfoidi, possono estendersi per diversi milioni di paia di basi nella regione centromerica di ogni cromosoma.

Oltre a questo PRIMO ORDINE DI RIPETIZIONE (monomeri di 171bp) il DNA alfoide presenta in genere un SECONDO ORDINE DI RIPETIZIONE, formato da blocchi identici di monomeri, come da schema seguente: ove n indica il numero di monomeri che in toto costituiscono un blocco a PIU' ALTO ORDINE DI RIPETIZIONE (higher order repeat unit). I singoli monomeri che costituiscono un PIU' ALTO ORDINE DI RIPETIZIONE hanno una omologia di sequenza intorno al 70%. Invece un monomero di un blocco si presenta praticamente identico al monomero corrispondente degli altri blocchi che costituiscono il PIU' ALTO ORDINE DI RIPETIZIONE. E1 ed E2 rappresentano degli ipotetici enzimi di restrizione che tagliano costantemente nell'unita' di ripetizione.

Questo modello e' valido per l'organizzazione dei diversi alfoidi dei cromosomi umani. Ad es. per quanto riguarda il cromosoma X l'unita' ripetuta consiste di 12 monomeri disposti in tandem, come rivelato operativamente dall'enzima di restrizione BamHI, che taglia ogni 2.0kb (=12n). Questi frammenti di 2.0kb sono ripetuti 5.000 volte circa nel cromosoma X.

Le differenze di sequenza fra alfoidi di cromosomi diversi sono sufficienti a dare ad una sequenza alfoide una alta specificita' per il cromosoma da cui deriva.

FAMIGLIE DI SEQUENZE DI DNA ALFOIDE

Come detto, il DNA alfoide e' costituito da sequenze di DNA ripetute in tandem organizzato in monomeri di 171bp. Inizialmente furono caratterizzati nel genoma umano frammenti di DNA di 340bp tagliati dall'enzima di restrizione EcoRI. Essi consistono di due copie di DNA alfoide disposte in tandem rispettivamente di 169 e 171bp con una divergenza di sequenza del 27%. Questi dimeri sembrano costituire la subunita' base di unita' di sequenze alfoidi piu' lunghe ripetute in tandem. Dal clonaggio di vari membri di unita' dimeriche e tetrameriche EcoRI e' emersa una divergenza che va dal 13-20% per unita' distinte di dimeri fino al 45% per subunita' di monomeri adiacenti. Tetrameri alfoidi ottenuti dalla restrizione con l'enzima XbaI hanno una divergenza del 21% dal tetramero EcoRI. Ogni cromosoma contiene per lo meno

una specifica struttura alfoide, spesso specificata da un sito di restrizione cromosoma-specifico. Famiglie di DNA alfoide cromosoma specifiche possono essere raggruppate in tre famiglie di ordine superiore, alle quali appartengono distinti gruppi di cromosomi.

Sono state descritte e isolate diverse sequenze che contengono DNA alfoide. La loro localizzazione cromosomica e' stata determinata mediante ibridazione in situ. Tutte le sequenze ibridano soltanto nella regione pericentromerica. In condizioni di alta stringenza ogni sequenza ibrida esclusivamente con un solo paio di cromosomi omologhi. In condizioni di bassa stringenza ogni sequenza ibrida in maniera intensa nella regione pericentromerica di diversi cromosomi e con meno intensita' ibrida su tutti gli altri. Sulla base di cio' sono stati definiti tre gruppi di famiglie alfoidi (FAMIGLIE SOPRACROMOSOMICHE).

Il GRUPPO 1 e' costituito da sequenze che ibridano piu' intensamente con i cromosomi 1,3,5,6,7,10,12,16,19.

Il GRUPPO 2 e' costituito da sequenze che ibridano con i cromosomi 2,4,8,9,13,14,15,18,20,21,22.

Il GRUPPO 3 e' costituito da sequenze che ibridano con i cromosomi 11,17,X.

In condizioni non stringenti le sequenze dei gruppi 2 e 3 ibridano corrispondentemente ai cromosomi dei gruppi 2 e 3 in modo piu' intenso rispetto ai cromosomi del gruppo 1. L'unica eccezione e' rappresentata dal cromosoma 1 che lega le sequenze del gruppo 3 piu' debolmente dei cromosomi 11,17,X, ma in modo piu' forte di quanto non facciano gli altri cromosomi. Da questo si evince che molto probabilmente il cromosoma contiene due tipi di sequenze appartenenti al gruppo 1 e 3. L'esistenza di soprafamiglie cromosomiche indica che famiglie alfoidi localizzate su cromosomi appartenenti a un gruppo sono capaci di cross-ibridare intensamente tra di loro, ma non con cromosomi appartenenti a gruppi diversi. Inoltre, una sequenza alfoide specifica per il cromosoma 4 (pYAM11-31), per esempio, ibrida piu' intensamente di ogni altra con i rimanenti cromosomi del gruppo 2; invece sequenze specifiche per alcuni cromosomi cross-ibridano molto debolmente con i cromosomi dello stesso gruppo e questo accade per il gruppo 3. La conclusione che sequenze alfoidi cromosoma-specifiche appartenenti a un gruppo sono strettamente correlate e' derivata da esperimenti di ibridazione di DNA genomico (digerito con diversi enzimi di restrizione) con sonde corrispondenti ad alfoidi cromosoma-specifici. Infatti DNA genomico digerito ad esempio con BamHI e ibridato con sonde di alfoidi specifici per cromosomi appartenenti ai 3 gruppi mostra 2 particolarita':

1) Sequenze di gruppi diversi BAD presentare periodicit  di stessi siti di restrizione.

CARATTERISTICHE DELLE FAMIGLIE DI DNA ALFOIDE

Le sequenze della FAMIGLIA SOPRACROMOSOMICA 1 sono caratterizzate da siti EcoRI di 340bp periodicamente ripetuti. Le sequenze appartenenti a questa famiglia presentano dimeri e tetrameri EcoRI. La famiglia alfoide specifica per il cromosoma 7 consiste di ripetizioni di dimeri EcoRI organizzati in unita' a piu' alto ordine di ripetizione di 2.7Kb individuate dall'enzima di restrizione BamHI. La divergenza tra dimeri contigui nell'unita' di 2.7Kb e' meno del 2%. Anche la famiglia specifica per il cromosoma 10 presenta periodicit  di dimeri EcoRI. Un'organizzazione diversa e' presente nel cromosoma 3. La sua unita' di ripetizione di 3Kb, individuata dall'enzima di restrizione PstI, contiene frammenti EcoRI di 340bp, 510bp, 680bp. Il tetramero di 680bp potrebbe essersi generato per mutazione in un sito di restrizione EcoRI, mentre il trimero di 510bp per crossing-over ineguale tra 2 dimeri EcoRI.

Le sequenze della FAMIGLIA SOPRACROMOSOMICA 2 sono anch'esse caratterizzate da siti EcoRI, ma la unita' di ripetizione piu' corta e' un tetramero (680bp). Possono anche essere presenti doppi tetrameri (1360bp) organizzati in unita' a piu' alto grado di ripetizione individuate dall'enzima di restrizione PstI. Meno frequentemente si osservano pentameri (850bp). I tetrameri risultano essere costituiti da 2 tipi di monomeri organizzati in 2 dimeri con 82% di omologia.

Le sequenze della FAMIGLIA SOPRACROMOSOMICA 3 sono caratterizzate da 5 tipi di monomeri che sono condivisi da tutti e tre i cromosomi appartenenti ad essa (11, 17, X). Anche il cromosoma 1, costituito da due distinte famiglie di DNA alfoide, presenta i cinque tipi di monomeri. La sequenza del cromosoma 11 e' quasi una perfetta ripetizione dei pentameri alfoidi. Il cromosoma X e il cromosoma 17 sono formati rispettivamente da 12 e 16 monomeri. Nel cromosoma X l'ordine monomerico della sequenza pentamerica ancestrale e' stato conservato, mentre nel cromosoma 17 c'e' una triplicazione del monomero 1 (vedi disegno).

E' stata trovata una nuova famiglia di DNA alfoide, la famiglia XbaI, localizzata sui cromosomi 2,4,14,15,18,20,22 (tipici della famiglia 2) che presenta la stessa configurazione a tetrameri con 98% di omologia, composta da dimeri con 84% di omologia. Sono stati fatti studi di comparazione dei monomeri della famiglia XbaI con monomeri derivanti dai dimeri EcoRI e dai pentameri. La sequenza consenso dei dimeri della famiglia XbaI manca di 28 basi che sono caratteristiche dei dimeri EcoRI e mostra 16 basi che sono uniche per questa famiglia. Questi risultati dimostrano che la famiglia XbaI e le sequenze EcoRI non derivano dalla stessa unita' dimerica alfoide e, nonostante abbiano la stessa organizzazione dimerica, rappresentano 2 distinte subfamiglie alfoidi. Gli stessi risultati si sono ottenuti dal confronto di monomeri XbaI con monomeri derivanti dall'alfoido specifico del cromosoma 17 e appartenenti a unita' pentameriche.

RELAZIONI FRA FAMIGLIE CROMOSOMA SPECIFICHE DI DNA ALFOIDE

Da tutte queste considerazioni e' possibile notare 3 tipi di periodicit :

- 1) Il monomero alfoide e' comune a tutte le famiglie sopracromosomiche;
- 2) Le ripetizioni ancestrali sono comuni a tutte le sequenze di una famiglia sopracromosomica;

3) Le unita' a piu' alto ordine di ripetizione sono uniche per ogni cromosoma. Inoltre la sequenza ancestrale della famiglia sopracromosomica 1 era formata da identiche unita' dimeriche EcoRI di 340bp; la sequenza ancestrale della famiglia sopracromosomica 2 aveva una struttura dimerica divergente ed era probabilmente organizzata in tetrameri; la sequenza ancestrale della famiglia 3 era formata da identici pentameri. Nelle famiglie sopracromosomiche 1 e 3 il grado di divergenza tra ripetizioni ancestrali in varie famiglie cromosoma-specifiche va dall'1-2% (per i cromosomi 11 e 17) al 15-20% (per i cromosomi 3 e X). Inoltre le sequenze di un gruppo sopracromosomico sono anche correlate l'un l'altra a diversi gradi. Le sequenze altamente specifiche non hanno copie strettamente correlate, ma quelle meno specifiche possono formare distinte subfamiglie nel loro gruppo. Le divergenze tra gruppi non sono neanche uguali. Infatti le famiglie sopracromosomiche 2 e 3 sono piu' strettamente correlate tra loro e meno correlate rispetto alla 1. Esse possono cosi' considerarsi come 2 branche di una superfamiglia. E' da notare inoltre che non ci sono sequenze alfoidi che cross-ibridano col cromosoma Y. Percio' le sequenze Y specifiche di DNA satellite si sono distinte dalla comune branca prima della formazione di sequenze cromosoma-specifiche.

E' stata definita una sequenza consenso per l'alfa satellite umano basata sull'analisi di piu' di 30 monomeri indipendenti trovati in almeno 14 cromosomi umani. Essa e' utilizzata per comparare nuove sequenze alfoidi, per identificare possibili elementi con sequenze conservate, e per esaminare variazione di sequenze in elementi presenti nello stesso cromosoma o in cromosomi diversi.

Si e' potuto cosi' osservare che la divergenza del 15-20% nella sequenza di monomeri rispetto alla sequenza consenso non e' distribuita a caso, ma e' presente in monomeri appartenenti allo stesso cromosoma o che hanno una comune evoluzione. Ad esempio, mentre solo il 10% circa di tutti i monomeri di un genoma contiene una G in posizione 9 della sequenza consenso, tutti i monomeri sequenziati del cromosoma Y la contengono.

Inoltre solo il 19% di tutti i monomeri contengono una A in posizione 28 e per la maggior parte questi appartengono a un gruppo di monomeri che pare abbiano una comune evoluzione e che riguardano i cromosomi 1, 11, 17 e X.

SEQUENZA p82H DI DNA ALFOIDE

In contrasto con la distribuzione cromosoma specifica di sequenze alfoidi, e' stato isolato un clone (p82H) che cross-ibrida, a bassa stringenza, con quasi tutti i cromosomi umani. Il clone p82H corrisponde ad una regione di 2.4Kb contenuta in un dominio genomico di 35Kb circa. Questo dominio si trova esclusivamente nella regione centromerica del cromosoma 14. Da risultati di ibridazione in situ, si e' dedotto che p82H rappresenta una famiglia conservata di DNA alfoide, detta famiglia 82H, localizzata su ogni cromosoma umano. Essa puo' corrispondere a componenti funzionali dei centromeri umani. Infatti e' stata evidenziata una omologia di sequenza nucleotidica tra una regione di p82H e sequenze centromeriche funzionali di lievito. La presenza di sequenze 82H fa supporre che esista anche una classe piu' omogenea di DNA alfa satellite conservato nell'uomo.

Si sono fatti esperimenti di ibridazione di DNA genomico e DNA di ibridi somatici contenenti uno o piu' cromosomi con la sequenza p82H in condizioni di varia stringenza. Si e' visto che in condizioni di stringenza bassa o moderata, p82H ibrida con la maggior parte di sequenze genomiche, ma questi segnali di ibridazione scompaiono in condizioni di alta stringenza. In questo caso p82H ibrida solo con una banda di 4Kb tagliata con EcoRI localizzata sul cromosoma 14. Comunque, in condizioni di bassa e media stringenza, p82H ibrida con frammenti corrispondenti a sequenze alfoidi specifiche per alcuni cromosomi. Infatti essa ibrida con un frammento di 2Kb tagliato con HindIII specifico per il cromosoma X oppure con un frammento di 2.7Kb tagliato con HaeIII specifico per il cromosoma 7. Questi risultati indicano che il probe p82H cross-ibrida con sequenze alfoidi eterologhe in condizioni di bassa e media stringenza. Inoltre le intensita' dei segnali di cross-ibridazione sono proporzionali al numero di copie di unita' altamente ripetute di sequenze cromosoma-specifiche. Ad es. il segnale sul cromosoma X (che ha 5000 copie dell'unita' di 2Kb individuata da BamHI) e' piu' forte di quello sul cromosoma 7 (che ha 10 copie dell'unita' di 2.7Kb individuata da HaeIII). Inoltre, in condizioni di bassa stringenza, il segnale di ibridazione che corrisponde alle sequenze genomiche 82H (cioe' un frammento di 4Kb prodotto da digestione di DNA genomico con EcoRI) e' meno intenso di quello presente sul frammento di 2.7Kb corrispondente al cromosoma 7. Questo indica che le sequenze 82H sono con molta probabilita' poco rappresentate e presenti in singola copia o in basso numero di copie nel genoma.

POSSIBILI MECCANISMI CHE CREANO E MANTENGONO LA SPECIFICITA' CROMOSOMALE

Abbiamo gia' detto in precedenza che ci sono sequenze alfoidi cromosoma specifiche nel DNA alfa satellite. Questa disposizione puo' essere dovuta a 2 processi principali:

- 1) Omogenizzazione inter e intracromosomica; lm4
- 2) Trasferimenti di DNA intercromosomale accompagnato da multipli eventi di amplificazione.

Il concetto di OMOGENIZZAZIONE (valido sia per famiglie di geni che per sequenze non codificanti) fu introdotto per la prima volta da Dover. Esso afferma che differenze tra famiglie cromosoma-specifiche sono il risultato di recenti mutazioni che si sono omogenizzate solo in quel particolare cromosoma (omogenizzazione intracromosomica). La omogenizzazione intercromosomica, che agisce meno efficientemente della prima, potrebbe portare a trasferimento di queste mutazioni in altri cromosomi. E' possibile fare uno schema che mette in evidenza il pattern cromosoma-specifico di variazione di

sequenza osservato nell'alfa satellite umano. Si considerino tre blocchi in tandem su tre diversi cromosomi (A, B, C). Copie di ripetizioni a piu' alto ordine in ogni blocco sono piu' simili tra loro di quanto non lo siano con copie di ripetizioni correlate su altri cromosomi. Così ogni gruppo di alfa satellite e' caratterizzato da scambi nella sequenza (che nella figura corrispondono ai simboli geometrici) che sono specifici per i monomeri di un cromosoma (vedi cromosoma A) o sono specifici per monomeri di gruppi evolutivamente correlati (vedi cromosomi B e C). Le 3 copie del cromosoma A mostrate in figura rappresentano variazioni in un blocco o in blocchi dello stesso gruppo su differenti copie dello stesso cromosoma in una popolazione (determinando così delle varianti polimorfiche). Da questo schema si può dedurre che ci sono 3 tipi di mutazioni che portano a omogenizzazione: .LM 0.0"

- 1) Mutazioni recenti che sono condivise da una coppia di cromosomi;
- 2) Mutazioni piu' vecchie che sono condivise da una famiglia sopracromosomica;
- 3) Mutazioni ancora piu' vecchie che hanno omogenizzato nell'intero genoma.

Una analisi attenta della struttura e delle unita' a piu' alto grado di ripetizione rende possibile ricostruire la sequenza di eventi evolutivisti nelle famiglie sopracromosomiche e vedere come queste unita' si siano generate da una singola singola ancestrale, in base al concetto che ogni famiglia sopracromosomica e' il risultato di una evoluzione di una semplice sequenza ancestrale. Col tempo questa sequenza si e' modificata per mezzo di mutazioni e di crossing-over ineguale. Così unita' ancestrali contigue hanno iniziato a divergere. Se un segmento contenente ripetizioni non identiche e' stato trasferito ad altri cromosomi e ha subito qui processi di amplificazione, si e' formata un'unita' a piu' alto grado di ripetizione. Questa può a sua volta essere trasferita ripetutamente ad altri cromosomi e subire amplificazioni di ordine superiore. La possibilita' che un cromosoma possa partecipare a diversi trasferimenti e' bassa ed e' ancor piu' bassa la probabilita' che due sequenze possano essersi amplificate in uno stesso posto. E' vero che i cromosomi contengono una sequenza alfoide specifica, ma talvolta ci possono essere due o piu' domini specifici. Alcuni cromosomi, come il cromosoma 1, contengono due domini cromosoma-specifici formati da sequenze di due famiglie sopracromosomiche. Inoltre e' stato notato che nel genoma coesistono sequenze che sono molto vicine alla sequenza ancestrale e sequenze che divergono da essa. Una risposta a ciò potrebbe essere data da una combinazione di schemi di omogenizzazione e di trasferimenti/amplificazione. Si possono presentare 2 possibilita':

- 1) E' possibile che una parte delle sequenze di una famiglia cromosoma-specifica abbia subito omogenizzazione e che quindi diverga poco dalla sequenza ancestrale, mentre l'altra parte abbia collezionato mutazioni e che diverga maggiormente. Poi le sequenze divergenti, comparando su un altro cromosoma, possono subire amplificazione formando una nuova famiglia cromosoma-specifica.
- 2) La sequenza tipica di una famiglia cromosoma-specifica e' trasferita su un altro cromosoma ed e' qui che subisce amplificazione. In questo caso due cromosomi avranno famiglie quasi identiche. Ogni famiglia può poi subire una evoluzione cromosoma-specifica portando alla formazione di 2 distinte famiglie cromosoma-specifiche. La differenza tra le due possibilita' e' che nel primo caso le mutazioni sono raccolte prima della secondaria amplificazione, nel secondo caso si verificano dopo.

BASE MOLECOLARE DEI MECCANISMI DI VARIABILITA' NELLE FAMIGLIE DI DNA ALFOIDE

E' opportuno considerare questa variazione di sequenze nel contesto di blocchi ripetuti sia su un singolo cromosoma sia tra tutte le copie di un particolare cromosoma in una popolazione.

Cio' che si e' visto analizzando l'organizzazione dell'alfa satellite usando probes di DNA specifici per diversi alfoidi e' l'alta presenza di polimorfismi di DNA. Infatti e' possibile trovare nello stesso blocco forme multiple di alfa satellite correlate tra di loro ma distinguibili o per la lunghezza dell'unita' ripetitiva o per l'esistenza di siti di restrizione specifici o per entrambi. Analizzando l'alfa satellite del cromosoma 17 si e' evidenziata la presenza contemporanea di distinte forme di ripetizioni in un singolo set aploide. Queste forme differiscono o nella lunghezza dell'unita' ripetitiva (variando da 13 a 16 monomeri) o nella sequenza nucleotidica. Percio' questi polimorfismi di unita' ripetitive si sono estesi nell'intero blocco. Sembra così ragionevole proporre che alcune di queste forme rappresentino dei passi intermedi nell'evoluzione di un apparato piu' o meno omogeneo. Questi polimorfismi hanno un enorme interesse sia da un punto di vista evolutivistico sia pratico. In virtu' della loro presenza nelle regioni centromeriche, possono essere utili nell'analisi di non disgiunzioni di cromosomi nell'uomo e possono fornire marcatori genetici polimorfici per studi di fingerprinting.

E' stata anche investigata la base molecolare dei meccanismi di variabilita' dell'alfa satellite. Esperimenti di Southern blot sul satellite di topo, BAD naria, con il 40% di divergenza). I quarti di ripetizione sono costituiti da due subunita' correlate (1/8 di ripetizione) e vengono indicati sequenze alfa e beta. La divergenza fra gli ottavi di ripetizione e' del 61%. Le sequenze alfa hanno tutte l'inserzione di una C e le sequenze beta hanno tutte un trinucleotide rispetto alla sequenza consenso. All'interno della sequenza di consenso si riconoscono 3 ripetizioni di 9bp. Quindi la sequenza satellite attuale di topo si può ritenere come derivata da una sequenza di 9bp:

Da queste osservazioni si e' ricostruita la possibile evoluzione delle sequenze di DNA satellite. In diversi momenti una certa ripetizione di basi si e' amplificata lateralmente generando un gran numero di copie identiche in tandem. Questo evento e' detto **AMPLIFICAZIONE GENICA** o **REPLICAZIONE SALTATORIA**. La divergenza osservata fra le copie e' dovuta ad accumulo di mutazioni. E' di seguito riportato come esempio uno schema di replicazione saltatoria per una sequenza di 6

paia di basi (AATCCT).

La sequenza di 12bp puo' a sua volta dare replicazione saltatoria e se ha accumulato mutazioni di vario genere come delezioni, mutazioni puntiformi o inserzioni, la sequenza che ne risultera' si differenziera' sempre piu' da quella originale di 6bp. Se si ha amplificazione di una copia genica non mutata si ha una serie identica a quella originale. In questo caso si verifica omogenizzazione.

Inoltre: quando il DNA di un genoma eucariotico e' digerito con un enzima di restrizione, la maggior parte di esso da' una serie di frammenti dovuti alla distribuzione casuale dei siti di taglio. Il DNA satellite invece genera bande nette perche' si producono una serie di frammenti di dimensione identica o quasi dovuti alla presenza di siti di restrizione che giacciono a una distanza regolare l'uno dall'altro. Questi frammenti dovrebbero corrispondere al monomero base (n), ma dal taglio con enzimi di restrizione appropriati si sono generati anche dimeri, trimeri, tetrameri e cosi' via (2n, 3n, 4n). Questi frammenti sono prodotti quando un'unita' ripetitiva ha perso il sito di restrizione in seguito a mutazione, quindi l'enzima non riconosce piu' la sua palindrome specifica e dara' frammenti multipli del monomero base. Un altro meccanismo che porta da un lato alla variabilita' delle sequenze dell'alfa satellite e dall'altro all'omogenizzazione e' dovuta a un CROSSING-OVER ineguale. In una regione di DNA non ripetuto la ricombinazione avviene tra punti corrispondenti di due cromosomi omologhi. Puo' anche avvenire una ricombinazione ineguale quando si hanno copie multiple di geni con esoni correlati che si appaiano scorrettamente. La probabilita' che appaiamenti scorretti avvengano in un gruppo di sequenze identiche o quasi, e ripetute in serie, e' molto piu' alta. Se consideriamo una sequenza con unita' ripetitive AB su un cromatide e ab sull'altro si potrebbero generare due allineamenti: ALLINEAMENTO CORRETTO O IN REGISTRO e ALLINEAMENTO SCORRETTO o FUORI REGISTRO.

Se avviene un evento di ricombinazione all'interno della regione appaiata irregolarmente, i ricombinanti avranno un numero diverso di unita' ripetitive: in un caso il gruppo e' piu' lungo, nell'altro e' piu' corto. Se e' presente una mutazione la ricombinazione avviene cosi' tra serie sfasate con perdita della mutazione nella batteria piu' corta e una diffusione in quella piu' lunga. Cicli successivi di scambi tra cromatidi fratelli possono:

- 1) espandere la batteria piu' corta ma perfetta fino alla lunghezza originale (e dare omogenizzazione);
- 2) possono diffondere la mutazione attraverso la batteria piu' lunga, con produzione di una nuova batteria in tandem che presenta una sequenza leggermente diversa (e dare un polimorfismo).

In questo tipo di appaiamento scorretto le unita' ripetitive sono allineate in REGISTRO, cioe' ogni ripetizione AB corrisponde a una ripetizione ab. Se pero' i singoli componenti dell'unita' ripetitiva sono ben correlati tanto da potersi appaiare, si dice che i due gruppi si potrebbero allineare in 1/2 REGISTRO, con la sequenza A di un gruppo con la b dell'altro. Naturalmente cio' dipende dalla percentuale di omologia tra le due meta' dell'unita' ripetitiva.

Nel gruppo superiore l'unita' AB e' sostituita da un'unita' Aab; nel gruppo inferiore l'unita' ab e' sostituita da un'unita' B. In questo modo si osservano, dopo digestione di alfa satellite, unita' ripetitive con $n+1/2n$ monomeri.

La ricombinazione ineguale e' stata proposta come modello alternativo alla replicazione saltatoria per spiegare l'evoluzione degli alfa satelliti. Inoltre il crossing-over ineguale avviene in siti casuali e piu' eventi casuali potrebbero far espandere un'unita' ripetitiva in tutto il satellite. Questo processo e' detto FISSAZIONE DEL CROSSING-OVER. Se 1, 2, 3, 4, 5 sono unita' ripetitive strettamente correlate tra loro si potrebbe verificare:

Tutti questi eventi di ricombinazione possono avvenire tra singoli monomeri e tra unita' a piu' alto grado di ripetizione. Un terzo meccanismo che contribuisce al mantenimento dell'omogenizzazione e alla variabilita' di sequenze ripetute e' la CONVERSIONE GENICA. Data una serie di monomeri posti in tandem, una copia di un monomero puo' apparirsi con un monomero mutato formando un eteroduplex.

Un evento di scambio generera' una serie di monomeri che avra' perso la mutazione. In seguito ad amplificazione si ripristinera' la serie originale di monomeri. Inoltre si avra' anche una serie di monomeri mutata che diffondera' la mutazione.