

# **Organizzazione del Genoma**

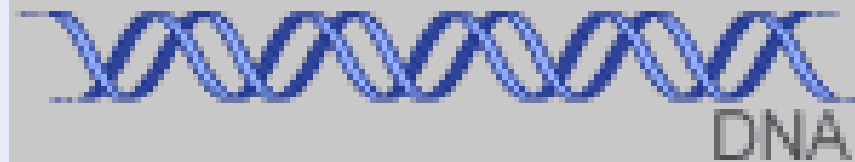
Grazie alla complementarietà delle basi, la doppia elica del DNA ha la capacità di separare (**denaturazione**), e poi riunire (**rinaturazione**), i due filamenti senza rompere i legami covalenti.

La rottura dei legami idrogeno è essenziale per la funzione di una molecola a doppio filamento.

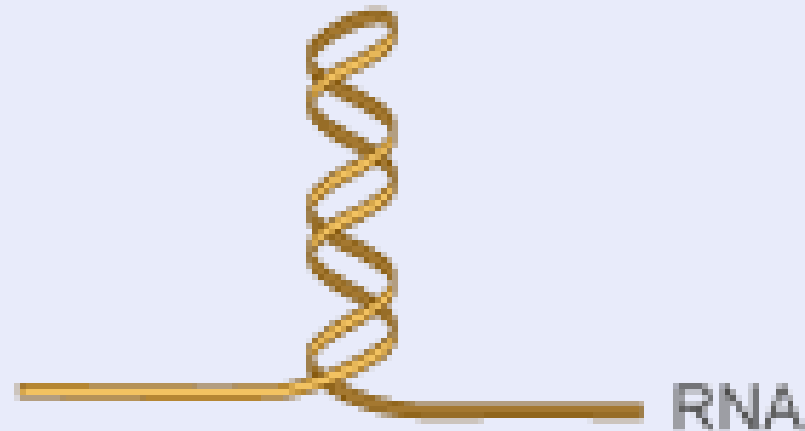
La formazione dei legami idrogeno è essenziale per la funzione di una molecola a singolo filamento.

## Both DNA and RNA may form duplexes

DNA



Intramolecular  
pairing within  
RNA



Intermolecular  
pairing between  
short and long  
RNAs



L'appaiamento delle basi complementari non è ristretto all'interazione DNA – DNA o RNA – RNA, ma interessa anche l'interazione DNA – RNA.

Quando tutti i legami idrogeno di una molecola a doppia elica sono rotti (es: alta temperatura), le due eliche si separano completamente. Questo processo è la **denaturazione**, o melting.

## DNA can be denatured and renatured



Double-stranded DNA

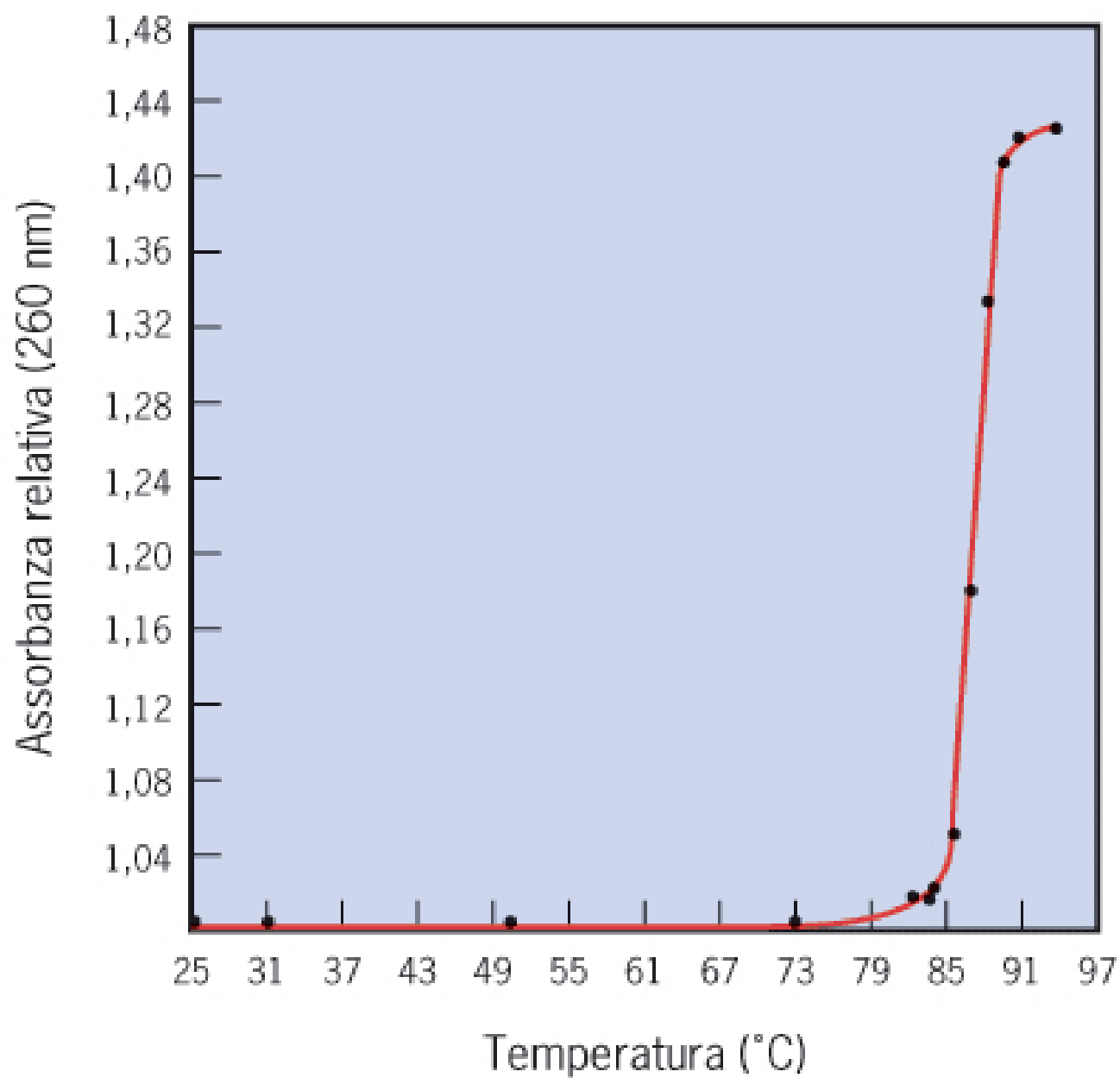


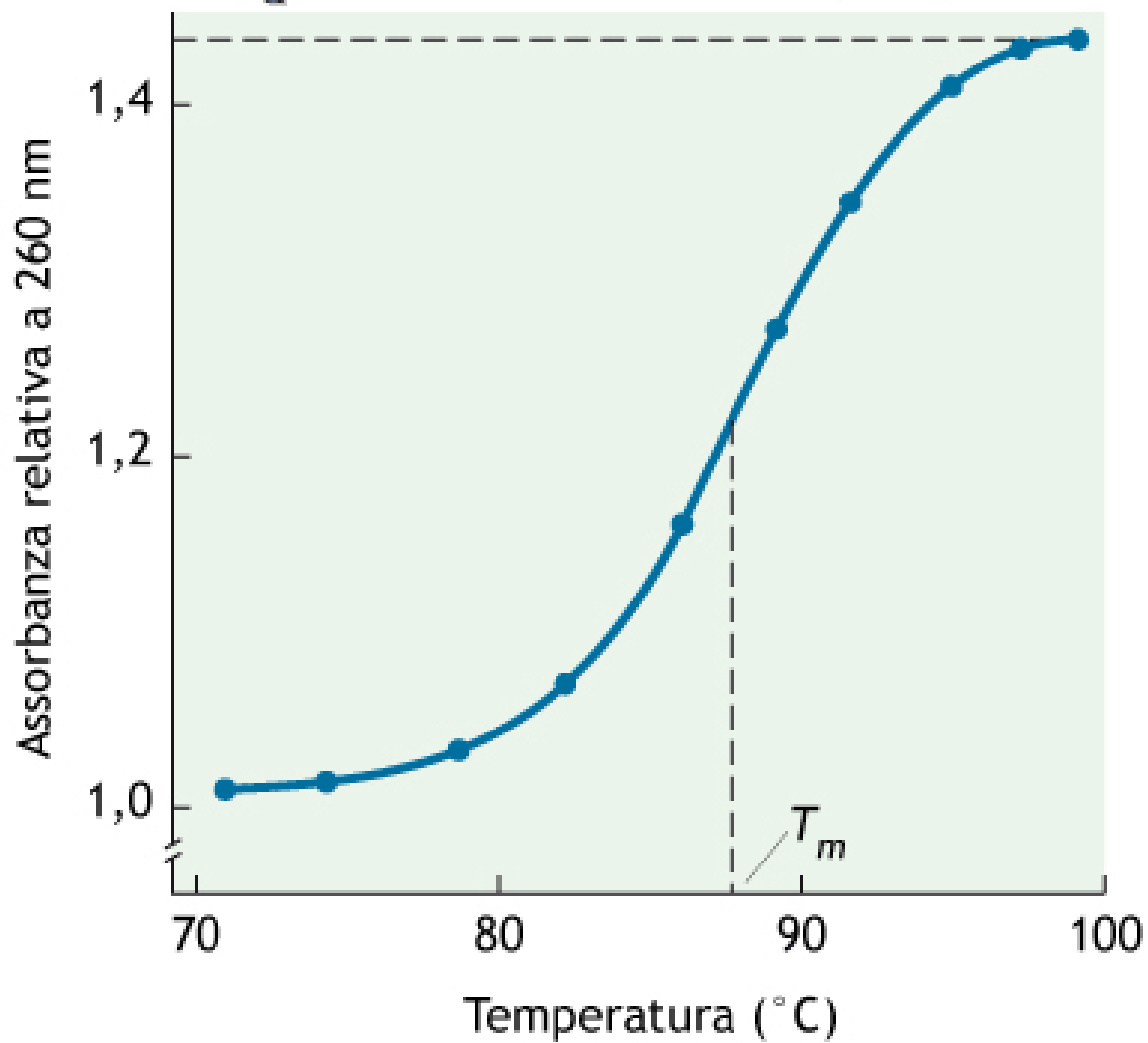
Denaturation



Single-stranded DNA

La denaturazione del DNA avviene in un intervallo di temperatura molto ristretto.

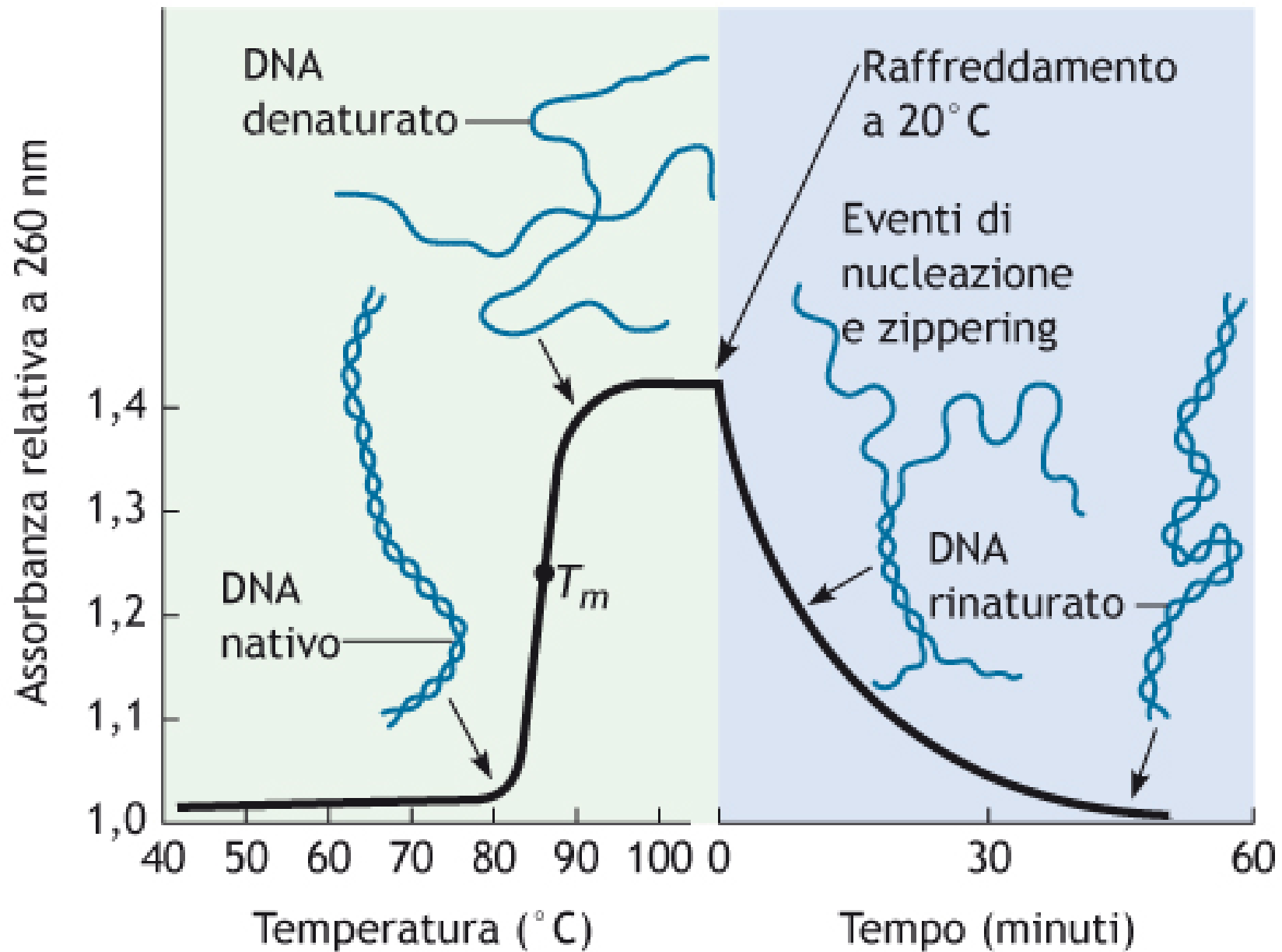




Il punto di mezzo del range di temperatura in cui le due eliche si separano è detto **temperatura di fusione**, o melting point, indicato come  $T_m$ . Tale valore dipende dalla percentuale di coppie di basi G – C.

Un DNA con un contenuto di G – C pari a circa il 40% ha una  $T_m$  di circa 87°C.





La rinaturazione del DNA, che dipende dallo appaiamento delle basi complementari, avviene in due tappe:

- Singoli filamenti di DNA si incontrano casualmente
- Se le sequenze sono complementari, le due eliche si appaiano e formano prima una piccola regione a doppio filamento. Poi tale regione si estende.

## DNA can be denatured and renatured

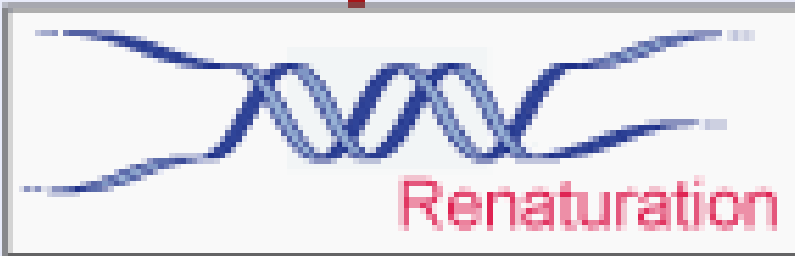


Double-stranded DNA

Denaturation



Single-stranded DNA

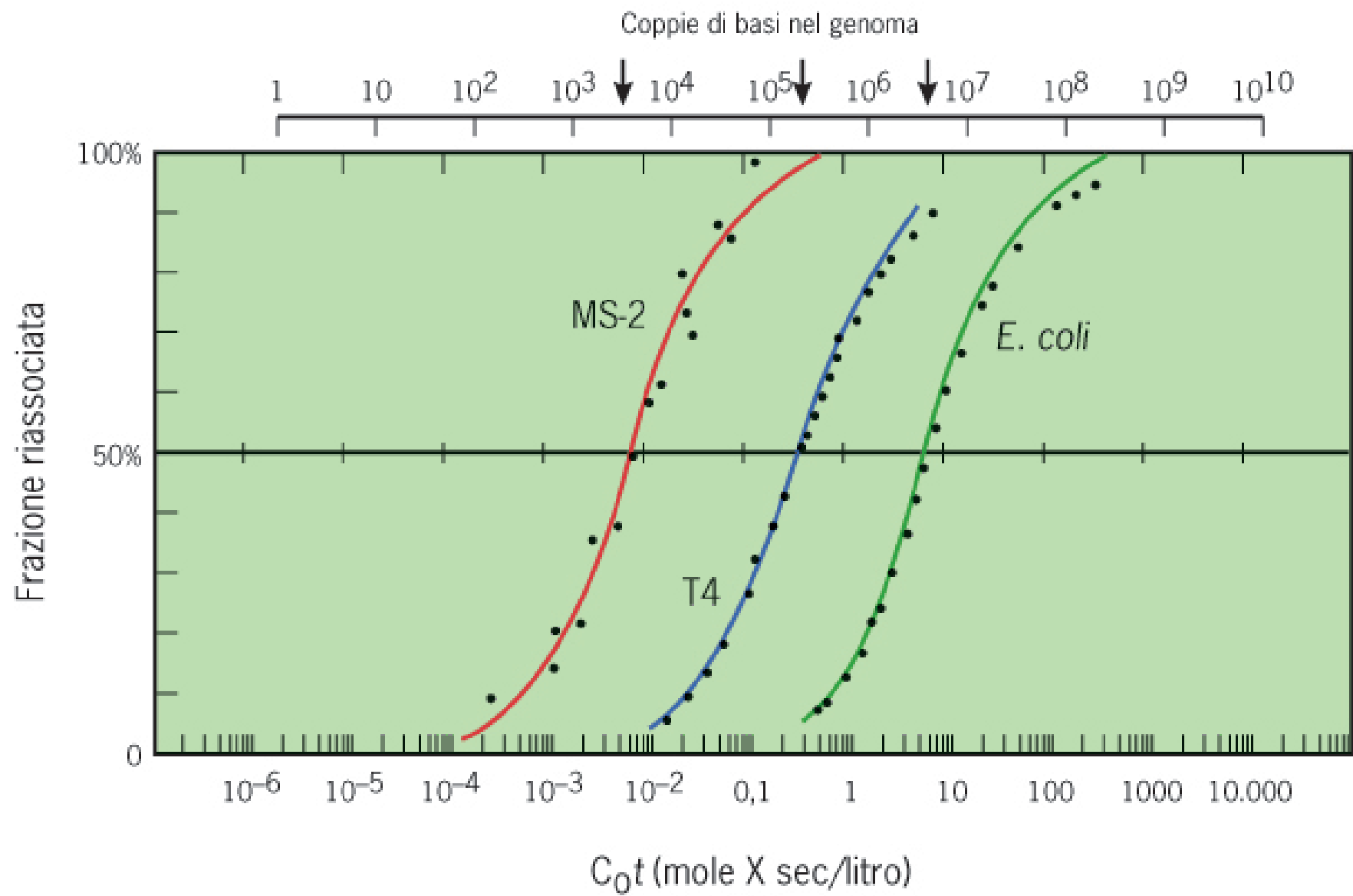


Renaturation



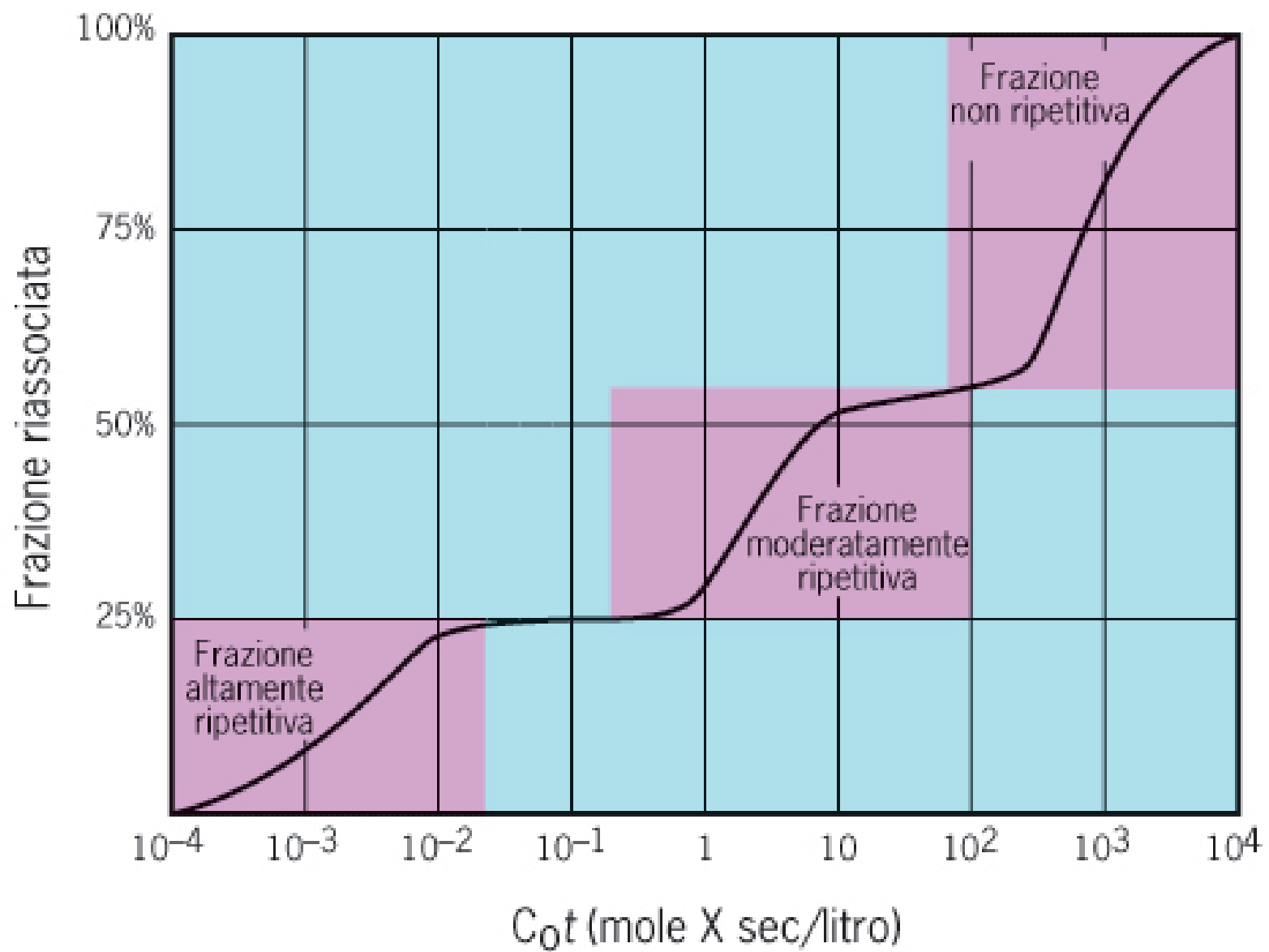
Renatured DNA

La reazione di riassociazione può interessare qualunque acido nucleico che possa interagire per formare una struttura a doppia elica. **Ibridazione.**



Il profilo di rinaturazione di un DNA virale o batterico è rappresentato da una curva lineare.

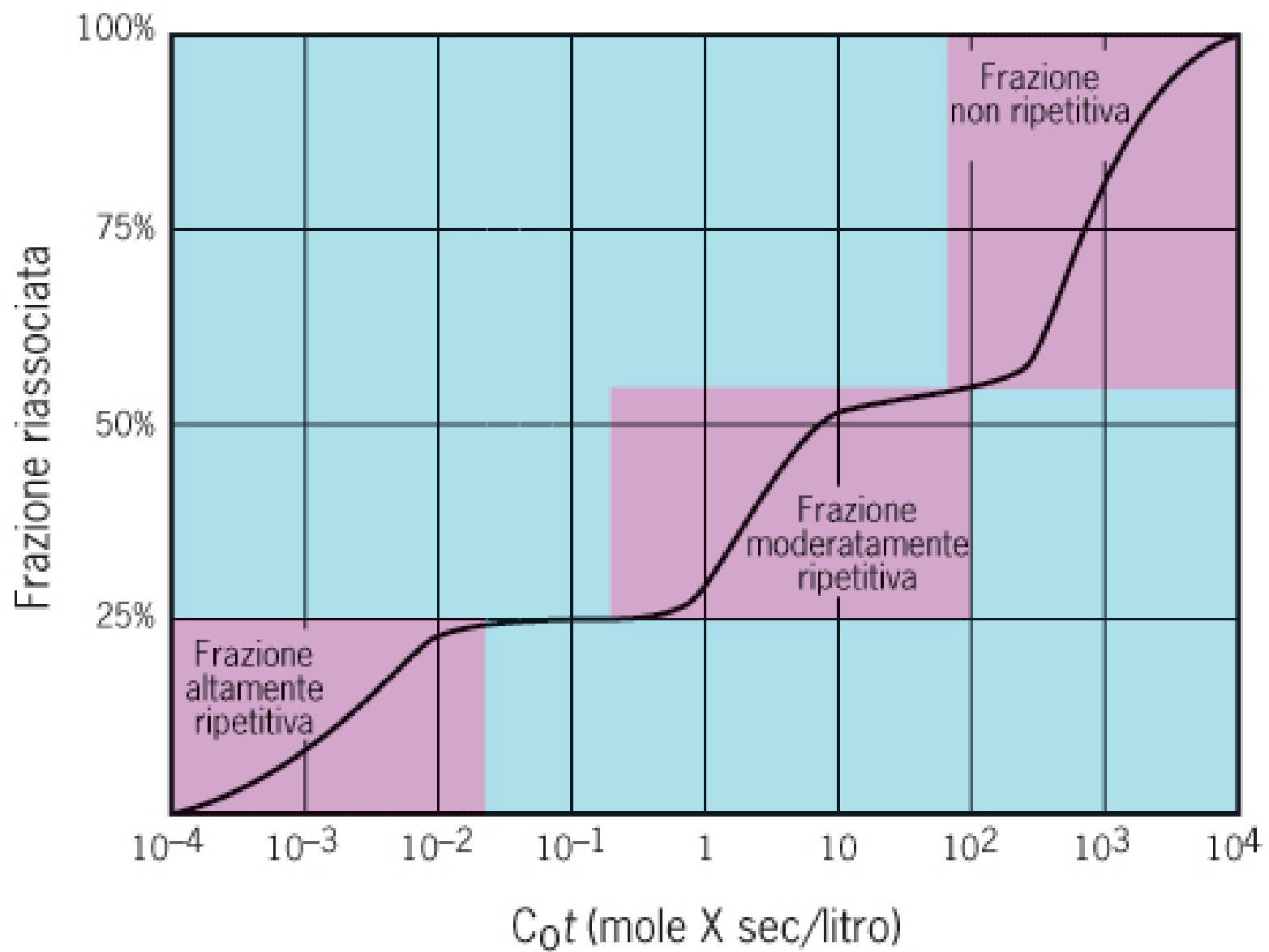
Tale risultato indica che le varie sequenze sono presenti con la stessa concentrazione, e che ogni sequenza ha la stessa probabilità di incontrare, in un determinato tempo, la sequenza complementare.



Il profilo di rinaturazione di un DNA eucariotico è rappresentato da una curva che mostra tre distinti scalini.

Tale risultato indica che ci sono sequenze presenti con diversa concentrazione, e che corrispondono al riappaiamento di tre distinte classi di sequenze.





Un genoma eucariotico presenta:

- Sequenze altamente ripetute
- Sequenze moderatamente ripetute
- Sequenze uniche

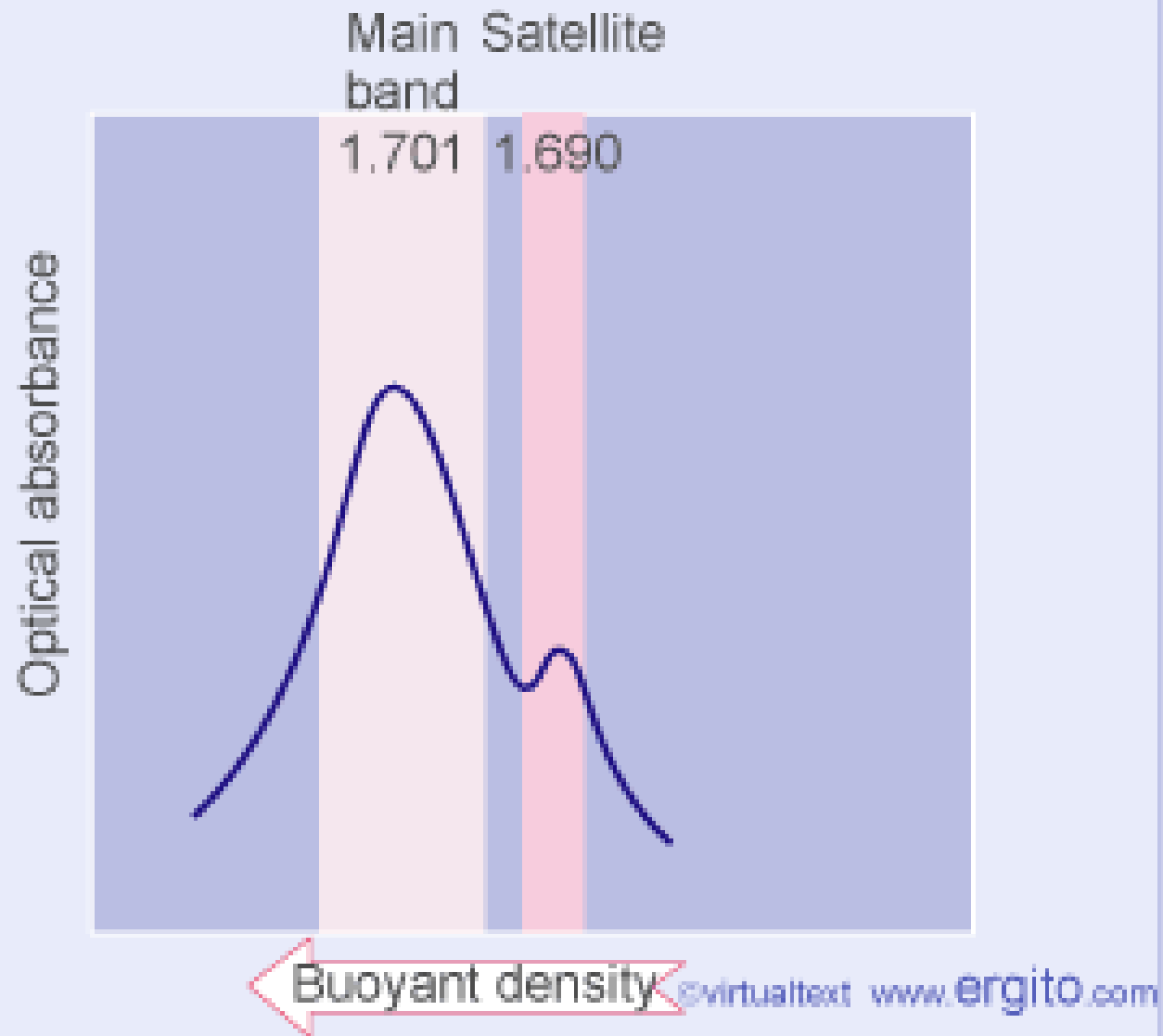
## Sequenze altamente ripetute

Sono presenti in almeno  $10^5$  copie per genoma (1-10% del genoma), e sono disposte a tandem.

Includono:

- DNA satellite
- DNA minisatellite
- DNA microsatellite

## Mouse satellite DNA forms a distinct band

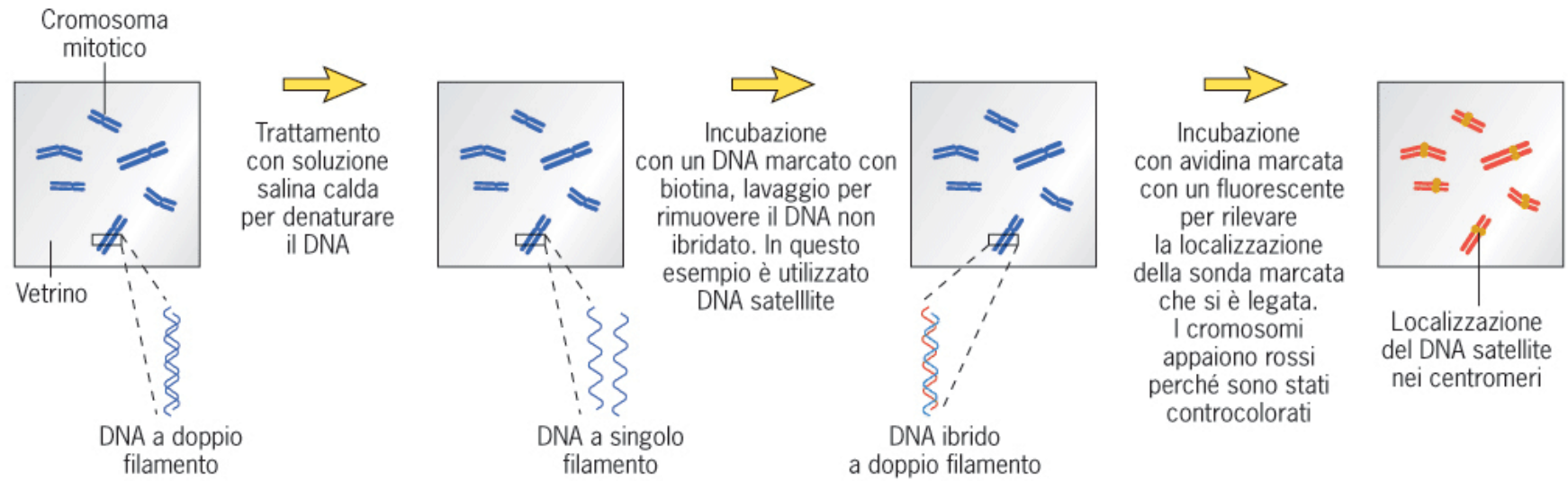


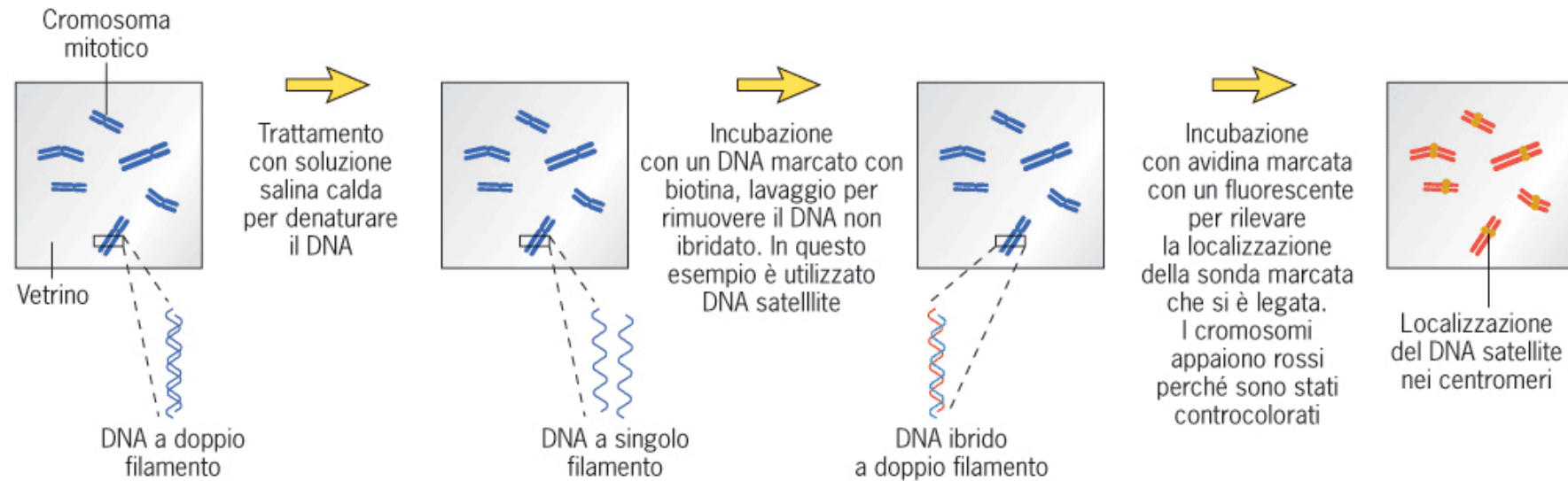
## Sequenze altamente ripetute

DNA satellite: composto da sequenze (da 5 a qualche centinaio di coppie di basi) ripetute un gran numero di volte. Possono essere lunghe diverse megabasi.

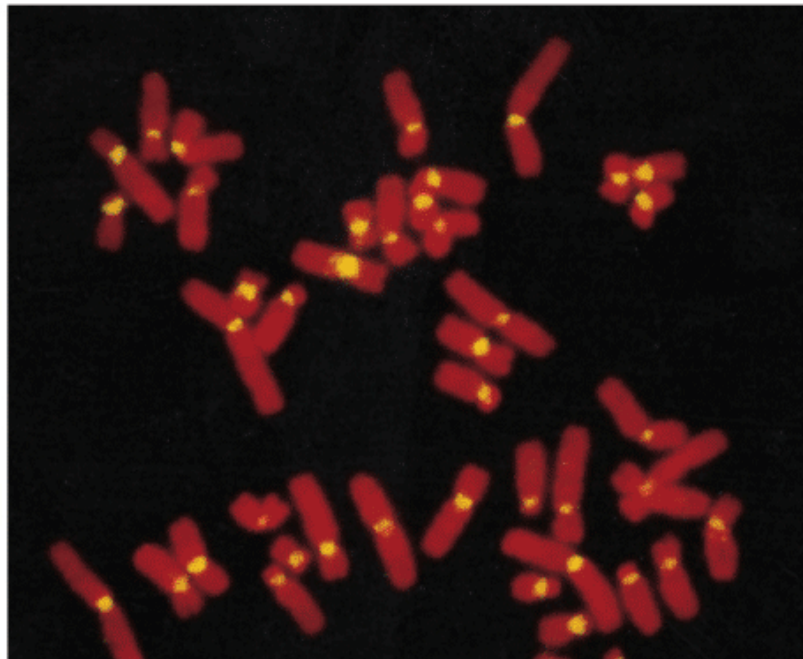
Es: centromeri. Sequenze di 171 bp (DNA  $\alpha$ -satellite), ripetute in tandem, lunghe oltre 500 chilobasi.

Evolvono rapidamente.





(a)



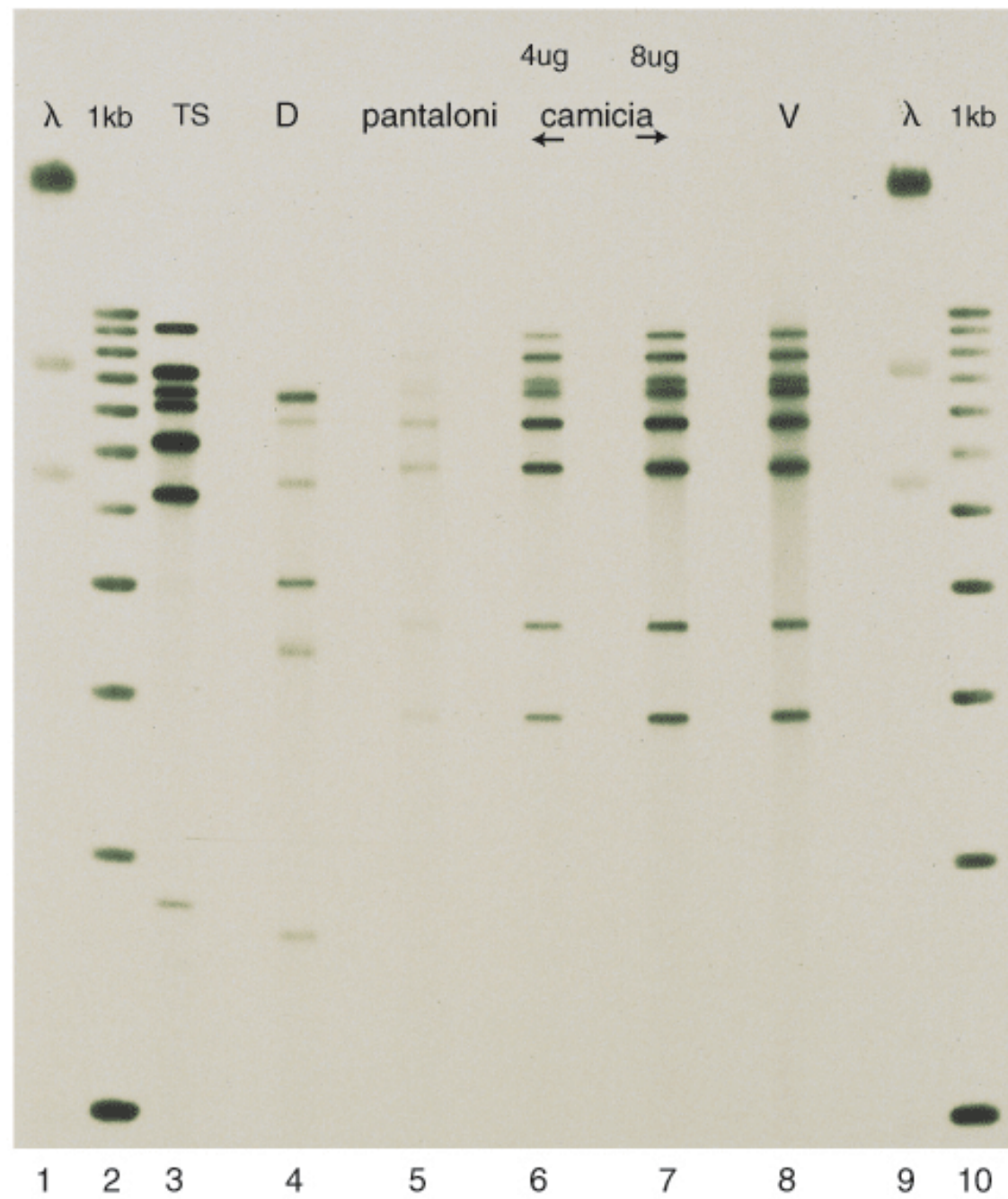
**FIGURA 10.19** Ibridazione *in situ* fluorescente e localizzazione del DNA satellite. (a) Le tappe del metodo dell'ibridazione *in situ* fluorescente. In questa tecnica, la sonda di DNA è marcata senza utilizzare isotopi radioattivi, bensì alcuni nucleotidi del DNA sono legati covalentemente a piccole molecole organiche, solitamente biotina. Dopo l'ibridazione, la localizzazione del DNA marcato con biotina può essere visualizzata trattando la preparazione con avidina, una proteina che mostra alta affinità per la biotina marcata con un fluorescente. I cromosomi in queste preparazioni solitamente appaiono in rosso perché sono stati controcolorati con ioduro di propidio. (b) Localizzazione del DNA  $\alpha$ -satellite a livello del centromero dei cromosomi umani. La fluorescenza gialla indica la presenza del DNA satellite ibridato marcato con biotina, che è evidente sul fondo rosso dovuto alla controcolorazione dei cromosomi. La marcatura fluorescente appare solo nei siti in cui vi è la costrizione del cromosoma, che indica la localizzazione del centromero. (B: DA HUNTINGTON F. WILLARD, TRENDS GENET. 6:414, 1990).

## **Sequenze altamente ripetute**

DNA minisatellite: composto da sequenze da 10 a 100 coppie di basi, ripetute in tandem fino a 3000 volte.

Sono sequenze instabili: il crossing over ineguale causa un aumento o una diminuzione del numero di copie di tali sequenze. La loro grande variabilità viene sfruttata in medicina forense.





## **Sequenze altamente ripetute**

DNA microsatellite: composto da sequenze molto corte (fino a 5 coppie di basi), ripetute in tandem, che formano sequenze lunghe 10 – 40 coppie di basi.

Altamente variabili, per errori durante la replicazione, tali sequenze trovano diverse applicazioni.

## **Sequenze moderatamente ripetute**

Sequenze ripetute da alcune a fino a decine di migliaia di volte (20-80% del genoma).

Alcune di tali sequenze hanno funzioni codificanti: es: i geni che codificano per gli RNA ribosomali e quelli che codificano per gli istoni.

## Sequenze moderatamente ripetute

La maggior parte di tali sequenze sono sparse nel genoma (intersperse) e non sono codificanti. Sono derivati da elementi trasponibili.

Es: SINE (short interspersed elements), lunghe circa 300 bp, e LINE (long interspersed elements), lunghe circa 6000 bp.

## Sequenze uniche

Sono sequenze presenti in singola copia ed occupano sempre la stessa posizione (locus) su uno specifico cromosoma.

Comprendono le sequenze che codificano per le proteine, e rappresenta meno dell'1.5% del genoma umano.

