

Evoluzione dei cromosomi sessuali

Introduzione generale

Lavori specifici:

- **1** - The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene
- **2** - Comparative mapping of Xp22 genes in hominoids - evolutionary linear instability of their Y homologues
- **3** - Evolution of Chromosome Y in primates
- **4** - Transposition of SRY into the ancestral pseudoautosomal region creates a new pseudoautosomal boundary in a progenitor of simian primates
- **5** - The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes
- **6** - The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned
- **7** - Functional Coherence of the Human Y Chromosome
- **8** - Simian Y chromosome: species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY
- **9** - The IL-9 receptor gene, located in the Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y
- **10** - Differential expression pattern of XqPAR-linked genes SYBL1 and IL9R correlates with the structure and evolution of the region
- **11** - Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region

Evoluzione dei cromosomi sessuali

(Tesi di laurea della Dr.ssa Clelia Tiziana Storlazzi)

Sebbene fisicamente e geneticamente molto distinti, i cromosomi X ed Y dei mammiferi (euteri, metateri e prototeri) si ritiene siano derivati da una coppia cromosomica omeomorfa presente in un antenato comune a mammiferi e rettili, la cui divergenza è datata a 200 milioni di anni fa.

Nonostante la formulazione di questa ipotesi, risulta abbastanza complesso determinare come l'X e l'Y si siano differenziati da tale coppia omeomorfa dal momento che i cromosomi sessuali degli euteri (placentati) si presentano privi di notevoli variazioni.

Il cromosoma X, che rappresenta il 5% del genoma aploide, è molto conservato e tale conservazione sembra sia dovuta ad un meccanismo intrinseco di protezione dai riarrangiamenti che potrebbero alterare la determinazione del sesso e la compensazione del dosaggio di geni X-linked. Il cromosoma Y degli euteri, generalmente molto più piccolo della X, è ampiamente eterocromatico e pochi geni sono stati mappati su di esso. Tra questi geni, degno di nota è SRY, gene che ha la proprietà di determinare il sesso maschile (TDF) nei mammiferi euteri.

Una possibile sorgente di informazione sulla variabilità nell'evoluzione dei cromosomi sessuali è fornita dai marsupiali (metateri) e dai monotremi (prototeri), che hanno subito evoluzione indipendente dagli euteri. I loro cromosomi sessuali, anche se meno noti rispetto a quelli dei placentati, presentano variazioni informative di forma e funzione che mancano invece tra gli euteri.

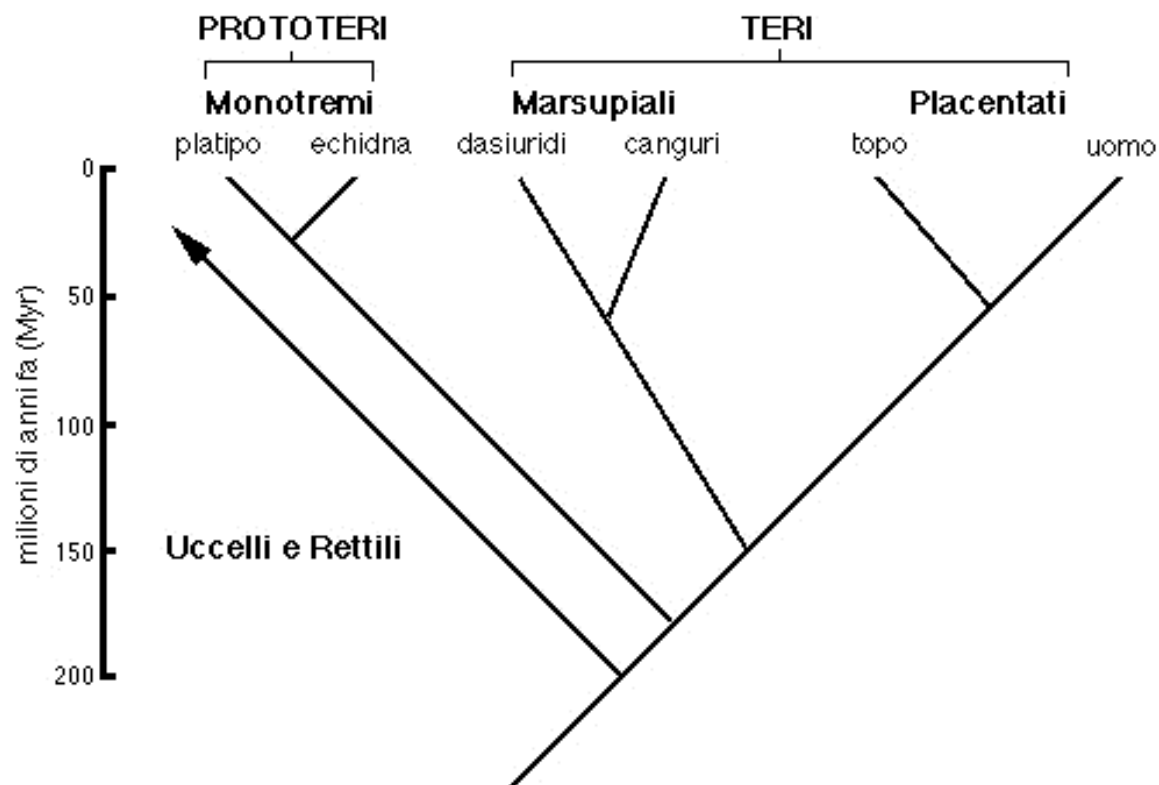
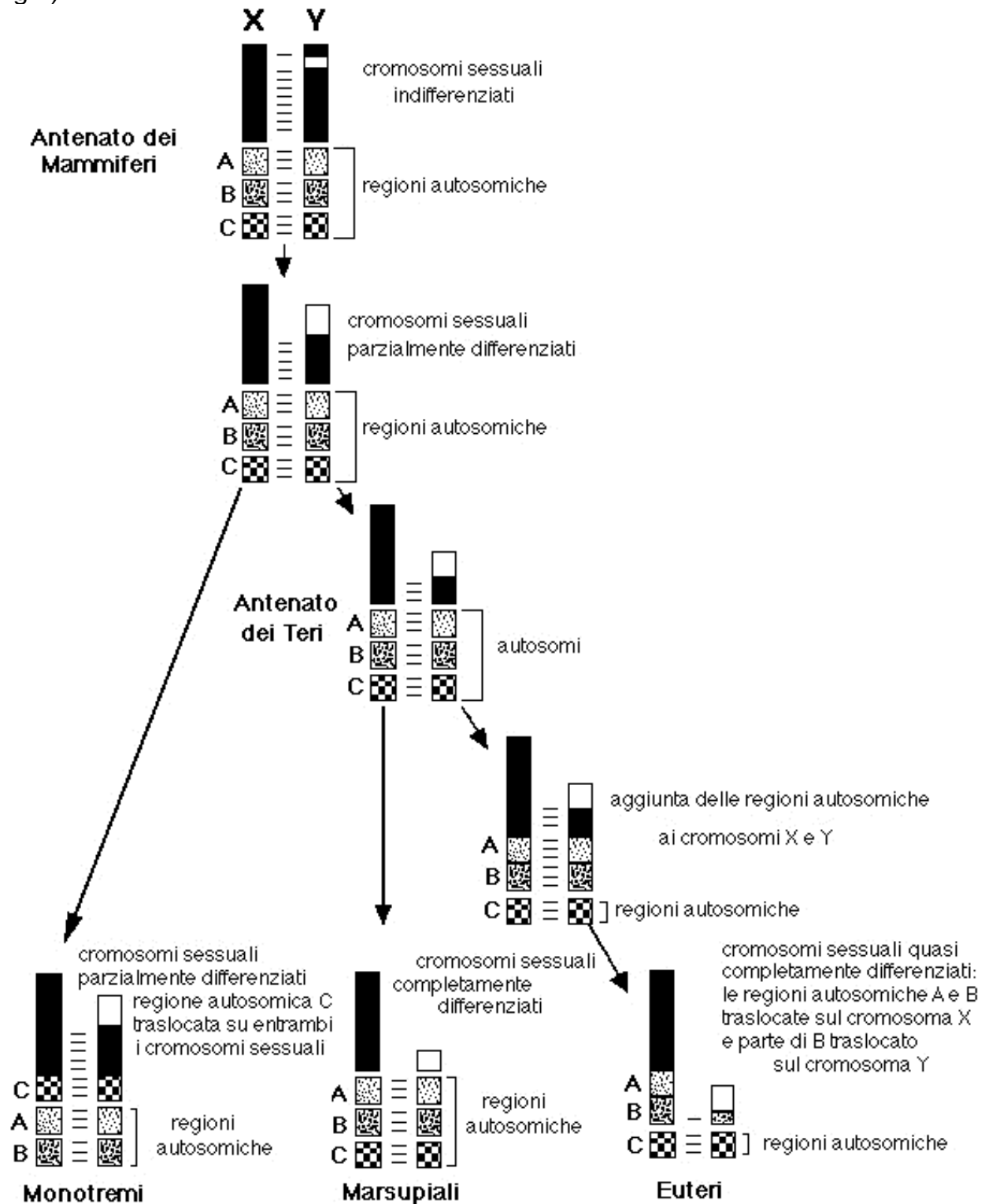


Fig. 1 - Albero evolutivo dei mammiferi

La divergenza tra marsupiali e placentati risale a 150 milioni di anni fa (Hope et al., 1990), mentre i monotremi si sarebbero staccati dal ramo dei teri (metateri e placentati) circa 170 milioni di anni fa (Hope et al., 1990) (vedi fig.1). I marsupiali presentano un cariotipo molto conservato con $2n=14$ cromosomi. La X di base differisce da quella degli euteri per la dimensione (3% del genoma aploide anziché il 5% degli euteri) e non ha regioni di omologia con Y. Nei

monotremi, invece, l'X e l'Y sono rispettivamente il 6% e il 4% del genoma aploide e presentano alto grado di omologia tra loro

Esperimenti di mappatura di geni dell'X, hanno dimostrato che tutti i geni del braccio lungo dell'X umano sono localizzati sull'X anche nei marsupiali e monotremi, mentre quelli del braccio corto dell'X umano, sono assenti dall'X degli aplacentati e questi ultimi marcatori sono clusterizzati su due autosomi in entrambi i gruppi, suggerendo che tale arrangiamento sia condiviso da un antenato comune. Sulla base di questo e' stata fatta un'ipotesi di evoluzione dei cromosomi sessuali di mammifero dalla coppia omeomorfica: i cromosomi X e Y erano geneticamente identici fatta eccezione per il locus maschio-determinante sull'Y e sono appaiati in tutta la loro lunghezza (vedi fig.2).



2 Fig. 2 - Teoria evolutiva dei cromosomi sessuali

Gia' prima che si verificasse la divergenza dei monotremi dal ramo dei teri, si ipotizza che la Y si differenzio' parzialmente per delezione ed eterocromatinizzazione. Alla X e all' Y dell'antenato dei teri vennero aggiunte le regioni autosomiche A e B; esse vennero mantenute nella X degli euteri, mentre nella Y venne mantenuta solo parte di B (che costituisce cosi' la zona di omologia con la X). Tali regioni A e B rimasero autosomiche invece nei marsupiali, cosi' come la regione C (autosomica nei teri, ma aggiunta ad X e Y nei monotremi al momento della divergenza dal ramo dei teri). A conferma di tale ipotesi vi e' la scoperta, fatta da Watson et al. nel 1992, che il gene per l'amilogenina, una proteina dello smalto dei denti, ha una localizzazione autosomica sia nei marsupiali (5q e 1q in Tammar Wallaby) sia nei monotremi (1 e 2 nel platipo), mentre nell'uomo vi sono due sequenze corrispondenti ad esso: una sequenza risulta X-linked e mappa in posizione Xp22.2 mentre l'altra mappa in posizione Yp11. Cio' da' un'ulteriore conferma all'ipotesi che una regione autosomica equivalente all'Xp umano (dove mappa AMELX) sia stata traslocata sul cromosoma X degli euteri dopo la divergenza dei marsupiali 150 milioni di anni fa. La regione contenente il gene per l'amilogenina e' probabile che sia stata aggiunta 80-150 milioni di anni fa all' X ed Y degli euteri; gli alleli dell'X ed Y avrebbero cominciato a divergere dopo questa data. Un altro lavoro sempre del 1992 ha dimostrato inoltre che sia AMELX che AMELY (gli omologhi dell'X e Y di AMEL) sono altamente conservati nei primati e mappano sempre rispettivamente sulle braccia corte di X ed Y. Il cromosoma X sarebbe dunque piu' conservato nell'evoluzione dei mammiferi placentati rispetto all'Y, in accordo con l'ipotesi di Ohno, che sostiene la conservazione del cromosoma X nei mammiferi placentati. Una recente scoperta, pero', sembra andare contro tale legge: un gruppo di ricercatori ha infatti dimostrato che un gene codificante per una proteina carrier di membrana per il cloro (Clcn 4) mappa sul braccio lungo distale della X nella specie di topo selvatico *Mus spretus* e sul cromosoma 7 nel topo di laboratorio *Mus musculus*. Questi dati indicano che si e' verificato un recente riarrangiamento nell'evoluzione dei cromosomi sessuali di topo, in prossimita' della regione pseudoautosomica (regione di appaiamento e scambio tra X ed Y alla meiosi maschile), localizzata, nel topo, all'estremita' dei cromosomi X ed Y (che risultano acrocentrici). Cio' trova ulteriore conferma nel fatto che in incroci tra le due diverse specie di topo, il sesso eterogametico della progenie F1 e' sterile: i loro testicoli sono piccoli probabilmente a causa di un'alterazione nella spermatogenesi dopo la prima divisione meiotica, la cui caratteristica principale sarebbe la dissociazione di quasi tutti i bivalenti X/Y alla diacinesi. Tale dissociazione potrebbe essere dovuta alla perdita di omologia tra le regioni adiacenti alle PARs (regioni pseudoautosomiche) di *Mus musculus* e *Mus spretus*, a causa di un riarrangiamento che ha coinvolto tale regione nel corso dell'evoluzione e che ha determinato l'evento di speciazione. In conclusione si puo' dire che negli euteri esista una regione di omologia tra Xp ed Yp che si ritiene possa avere un'origine autosomica. I geni compresi in questa regione sembrano sfuggire all'inattivazione della X.

Inattivazione della X

L'inattivazione del cromosoma X e' una particolare forma di regolazione genica per cui un intero cromosoma e' "spento" durante l'embriogenesi precoce della femmina di mammifero. Per un meccanismo di compensazione del dosaggio rispetto ai maschi, nei quali esiste una sola X, nelle femmine uno di questi cromosomi e' trascrizionalmente silente. Tale inattivazione avverrebbe allo stadio di 16 blastomeri ed ogni singola cellula inattiverrebbe una delle X in maniera casuale. Il cromosoma X inattivo, poi, sarebbe mantenuto inalterato attraverso le successive generazioni cellulari, originando cosi' cloni con la stessa X inattiva che rendono la femmina di mammifero un mosaico di cellule in cui e' inattiva o la X materna o la X paterna. Questo meccanismo assicura una opportuna compensazione di dosaggio per geni X-linked, dal momento che nei maschi c'e' una sola copia di tali geni e nelle femmine, invece, due copie. A causa della inattivazione della X, maschi emizigoti per mutazioni X-linked recessive risultano affetti, mentre le femmine eterozigoti sono portatrici non affette. Grazie a questo pattern di ereditarieta', facilmente riconoscibile, di sindromi X-linked, e' possibile identificare facilmente i geni legati alla X.

Il processo di inattivazione inizia dal centro di inattivazione e si diffonde lungo il cromosoma.

Sebbene il fenomeno sia noto già da tempo, il suo meccanismo rimane per lo più sconosciuto. Una importante svolta nella comprensione di esso è stata la scoperta recente del gene XIST (X inactive specific transcript). XIST è localizzato in un locus che mappa dove si suppone sia localizzato il centro di inattivazione dell'X ed è espresso solo dalla X inattiva. Esso potrebbe dunque svolgere un ruolo per l'inizio dell'inattivazione della X durante l'embriogenesi. Tale processo può coinvolgere anche geni autosomici traslocati sull'X, indicando così che sia geni X-linked che autosomici sono suscettibili di questa forma di regolazione genica.

È stato sorprendente inoltre scoprire che i geni che vengono inattivati non sono clusterizzati e che alcuni geni X-linked, in regioni diverse dell'X, sfuggono all'inattivazione, per cui nelle femmine sono espresse entrambe le copie del gene: tra questi, XIST rappresenta una eccezione in quanto è il solo gene ad essere espresso dal cromosoma X inattivo e non espresso da quello attivo. L'esistenza di geni che sfuggono all'inattivazione è stata suggerita come causa del fenotipo anormale di individui affetti da sindrome di Turner che mancano di un cromosoma X.

Geni che sfuggono all'inattivazione

I primi geni che sfuggono all'inattivazione sono stati mappati in corrispondenza della regione pseudoautosomica.

La PAR, come già accennato, rappresenta la regione di appaiamento e di ricombinazione alla meiosi tra i cromosomi sessuali. La sua funzione è molto importante in quanto, in seguito alla formazione dei chiasmi all'interno di essa, consente all'X e all'Y di assumere l'orientamento giusto in metafase I al fine di assicurare una corretta segregazione degli omologhi. La PAR umana, di 2.6 Mb, è localizzata all'estremità distale del braccio corto del cromosoma X, banda Xp22.3, e all'estremità del braccio corto del cromosoma Y, banda Yp11.32. La PAR è limitata in corrispondenza della sua estremità prossimale (centromerica) da un locus definito come boundary pseudoautosomico (PAB1). PAB1 rappresenta l'interfaccia tra le sequenze sesso-specifiche e le sequenze pseudoautosomiche.

È stato isolato il boundary dal cromosoma X (PABX) e dal cromosoma Y (PABY) umano. Nell'uomo, il boundary pseudoautosomico su Xp/Yp è marcato da un repeat Alu inserito solo nel cromosoma Y. Distalmente al repeat Alu, le sequenze sono altamente omologhe (99%), mentre prossimalmente al repeat c'è una stretch di 220 bp di ridotta omologia (78%). Le sequenze prossimali alla regione di ridotta omologia sono non omologhe. Studi sulle scimmie del Vecchio Mondo e grandi scimmie hanno indicato che il repeat Alu non ha creato il boundary. Infatti l'elemento Alu è stato trovato sul boundary dell'Y nelle grandi scimmie, ma non in due scimmie del Vecchio Mondo. Durante l'evoluzione delle grandi scimmie e delle scimmie del Vecchio Mondo, l'omologia tra i cromosomi sessuali è stata mantenuta per ricombinazione nelle sequenze telomeriche al sito d'inserzione Alu. Tale elemento si sarebbe pertanto inserito nel boundary preesistente dopo la divergenza tra questi gruppi di scimmie tra loro, indicando che probabilmente il differente grado di omologia tra le sequenze a monte e a valle della sequenza Alu sull'Y fosse già presente.

All'interno della PAR sono stati mappati alcuni geni e, come ci si aspettava, essi sfuggono all'inattivazione. Il locus che determina il gruppo sanguigno XG è stato il primo gene ad essere studiato sulla base dell'espressione del polimorfismo XG. Il gene che controlla questo gruppo sanguigno presentava un comportamento ambiguo, con un pattern di eredità diverso. Tale polimorfismo consiste nel fatto che, dal punto di vista sierologico, la condizione XG^{a+} è ereditata autosomicamente, mentre l'espressione del gene, vista per Northern Blotting, sarebbe X-linked. Il gene per il gruppo sanguigno XG corrisponde al gene PBDX, isolato recentemente dalla regione del boundary pseudoautosomico di Xp. PBDX è ereditato in due modi: la sua estremità al 5' è ereditata pseudoautosomicamente mentre quella al 3' è X-linked. Inoltre il prodotto amminoacidico di tale gene risulta essere omologo al 48% del prodotto di un altro gene pseudoautosomico (MIC 2) che codifica per l'antigene cellulare di superficie CD99 e che sicuramente sfugge all'inattivazione (Goodfellow et al., 1984).

Tra gli altri geni pseudoautosomici che sfuggono all'inattivazione c'è XE7, un gene di funzione sconosciuta, isolato screenando per geni che sfuggono all'inattivazione della X (Ellison et al., 1992), e il gene codificante per la traslocasi ATP/ADP e cioè ANT3 (Slim et al., 1993; Shiebel et al., 1993).

Una seconda regione pseudoautosomica e' stata recentemente scoperta alle estremita' telomeriche delle braccia lunghe dei cromosomi sessuali umani (Freije et al., 1992). L'esistenza di tale regione e' stata documentata non solo dall'osservazione di appaiamenti tra X ed Y durante la meiosi, ma anche dalla scoperta di eventi ricombinativi grazie all'individuazione di microsatelliti usati come marcatori informativi. Questa PAR potrebbe anche contenere geni che sfuggono all'inattivazione.

Altri geni che sfuggono parzialmente all'inattivazione sono stati mappati vicino alla regione pseudoautosomica. Essi sono: STS (gene per la steroido sulfatasi umana) (Shapiro et al., 1979), KAL1, il gene della sindrome di Kallmann (Franco et al., 1991) e GS1X, un gene di funzione sconosciuta (Yen et al., 1992). Tutti e tre i geni mappano nella banda Xp22.3 ed hanno sequenze omologhe sull'Y ma, almeno nel caso di STS e KAL1, questi analoghi della Y (STSP e KALP) sarebbero pseudogeni non completamente funzionali. Le sequenze della X di questi geni sono state studiate ampiamente da Ballabio e Andria (1992) in quanto individui maschi portatori di delezioni o traslocazioni X;Y o X;autosoma coinvolgenti tali geni mostrano fenotipi aberranti che comprendono: bassa statura, CDPX (condrodiplosia punctata, alterazione del processo di formazione dei tessuti osseo e cartilagineo), ritardo mentale, ittiosi X-linked (ipercheratosi dermica) e sindrome di Kallmann. La presenza di individui con delezioni o traslocazioni di tali geni che sfuggono all'inattivazione ha permesso di mapparli sul braccio corto distale del cromosoma X ed ha consentito di formulare un'ipotesi sulla causa di tali riarrangiamenti: e' possibile che, dal momento che KAL1, STS e GS1X mappano vicino alla PAR dove normalmente avviene l'appaiamento e la ricombinazione dei cromosomi sessuali, si verifichi un crossing over aberrante che porti via segmenti di cromosoma X sull'Y generando individui maschi affetti (Ballabio e Andria, 1992). Altri geni umani che sfuggono all'inattivazione sono localizzati a distanza considerevole della PAR. Un esempio e' ZFX (che codifica per una proteina zinc finger legata all'X) presente nella banda Xp22.1 (Schneider-Gadicke et al., 1989). Un secondo esempio e' Rps4x (proteina ribosomale S4, X-linked) (Fischer et al., 1990) nella banda Xq13. Come i geni pseudoautosomici, sia ZFX che RPS4X hanno omologhi funzionali sull'Y (ZFY e RPS4Y rispettivamente).

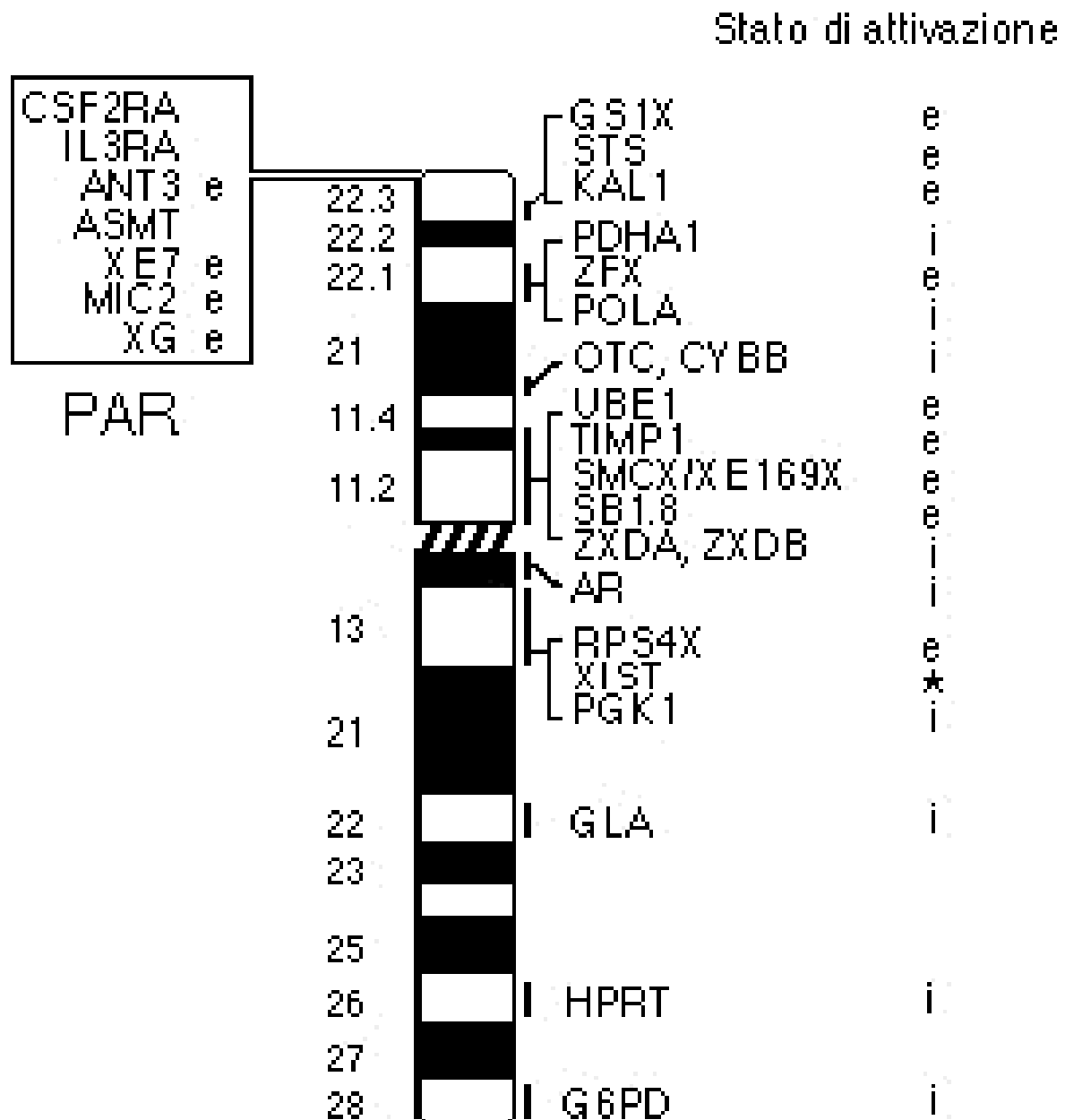
Sebbene gli omologhi dell'Y non siano identici ai geni X-linked per quanto riguarda le sequenze di DNA, la loro presenza suggerisce che un uguale dosaggio del gene tra maschi e femmine possa essere raggiunto esprimendo nelle femmine entrambe le copie della X in seguito a mancata inattivazione. In modo simile, un gene recentemente scoperto sul braccio corto prossimale del cromosoma X, di funzione sconosciuta, indicata come SMCX o XE169X, avrebbe un omologo sull'Y, espresso in tutti i tessuti, che potrebbe esprimersi nei maschi insieme alla copia dell'X, compensando il dosaggio delle femmine in cui c'e' mancata inattivazione (Wu et al., 1994; Aguinik et al., 1994).

Per quanto concerne gli omologhi del gene AMEL (per una proteina specifica dello smalto dei denti) (AMELX e AMELY), si e' visto che entrambe le copie sono espresse nelle gemme dentarie nei maschi ed il gene Y-linked determina il 10% dell'ammontare totale della trascrizione (Salido et al., 1992). Non e' pero' attualmente noto se AMELX sfugga all'inattivazione perche' il gene ha una tessuto- specificita' molto ristretta. Infatti, sulla base del pattern di espansione a mosaico in femmine con amelogenesi, e' stato suggerito che AMELX potrebbe essere soggetto a completa o parziale inattivazione. Infine, alcuni geni che sfuggono all'inattivazione potrebbero essere espressi ad un livello maggiore nelle femmine piu' che nei maschi, suggerendo che il dosaggio genico non sia un fattore critico per tutti i geni X-linked. Per esempio, il gene UBE1 (codificante per ubiquitin-activating enzyme E1), sul braccio corto prossimale della X umana, sfugge all'inattivazione, sebbene non vi sia presenza di un gene suo omologo sull'Y (Brown e Willard, 1989).

Lo stato di inattivazione dei geni della X differisce tra uomo e topo

Una scoperta importante scaturita dal confronto dei cromosomi X umano e murino riguarda le differenze nello stato di inattivazione della X di parecchi geni tra le due specie. Questo lavoro e' stato compiuto grazie a studi in vivo sul topo che hanno utilizzato traslocazioni X;autosoma per determinare lo stato di inattivazione dei geni nei diversi tessuti (Adler et al., 1991; Ashworth et al., 1991). Tali studi vengono effettuati su cellule di femmina di topo portatrici di una traslocazione X;autosoma, in cui si osserva che la X normale viene sempre inattivata, mentre quella traslocata rimane attiva.

Una probabile spiegazione e' che in tal modo si evita l'inattivazione dei geni autosomici traslocati sulla X. In questo modo e' possibile seguire l'espressione allele-specifica di geni X-linked su entrambi i cromosomi.



e = sfugge alla inattivazione
i = soggetto ad inattivazione
* = attivo solo sulla X inattiva

Fig. 3 - Schema dello stato di inattivazione della X umana

Usando questo sistema, e' stato determinato che Zfx, Rps4 e Ube1 sono soggetti ad inattivazione, in contrasto con lo stato dei loro omologhi umani (Adler et al., 1991; Zinn et al., 1991). Cio' indicherebbe, a prima vista, che il cromosoma X di topo potrebbe subire una inattivazione piu' completa rispetto al cromosoma X umano. Tuttavia, geni che sfuggono all'inattivazione sono anche presenti nel topo: per esempio, il gene Smcx (o Xe169x) sfugge all'inattivazione come il corrispondente gene umano ed ha un omologo sull'Y, Smcy, ampiamente espresso (Wu et al., 1994; Aguinik et al., 1994).

Differenze negli omologhi Y-linked tra uomo e topo possono in parte spiegare le differenze specie-specifiche nell'inattivazione dell'X. Il gene Zfx del topo ha due omologhi sull'Y: Zfy1 e Zfy2. Il gene Ube1x ha anche un omologo sull'Y, Ube1y, localizzato tra Zfy1 e Zfy2. Tuttavia, in entrambi i casi, i geni Y-linked sono espressi solo nel testicolo (Koopman et al., 1991; Kay et al., 1991; Wu et al., 1994). Quindi, nel topo, gli omologhi dell'Y non hanno la stessa funzione degli omologhi sull'X espressi ubiquitariamente. Nel caso di Rps4, l'omologo dell'Y e' perso nel topo, e quindi l'uguale dosaggio tra maschi e femmine e' raggiunto tramite inattivazione di Rps4. In modo simile, nel caso di Amel, sebbene il suo stato di inattivazione non sia stato determinato, l'omologo dell'Y e' perso nel topo (Lau et al., 1989), cosa che potrebbe spiegare perche' ci sono differenze sesso-specifiche nella dimensione dei denti nell'uomo ma non nel topo.

Differenze nello stato di inattivazione dei geni umani e murini potrebbero spiegare le differenze fenotipiche tra uomo e topo mancanti di un cromosoma X (Ashworth et al., 1991; Zinn et al., 1989). Topi 39, XO di sesso femminile hanno un fenotipo quasi normale: possono riprodursi e i loro unici disturbi riguardano un lieve ritardo nella crescita, la riduzione dell'eta' feconda ed un leggero incremento della morte in fase intrauterina. Invece, donne 45, XO hanno un fenotipo abnorme che include bassa statura, linfoedema, mancato sviluppo delle ovaie e alta mortalita' in fase fetale. Aploinsufficienza di geni che sfuggono all'inattivazione dell'X nell'uomo potrebbe spiegare il fenotipo abnorme di individui con sindrome di Turner (Zinn et al., 1993). Nei maschi, il cromosoma Y proteggerebbe dalla sindrome di Turner e molti dei geni coinvolti sarebbero proprio quelli con omologhi funzionali sull'Y. Geni che sfuggono all'inattivazione nell'uomo, ma che non hanno omologhi sull'Y, potrebbero essere importanti in una ancora non identificata funzione femmina-specifica e sensibile al dosaggio, coinvolta in processi come lo sviluppo ovarico che e' compromesso nella sindrome di Turner. E' probabile che geni critici per il fenotipo Turner siano tra quelli che mostrano una differenza sostanziale tra stato di inattivazione nell'uomo e nel topo. Altra possibilita' e' che tali geni possano essere legati all'X nell'uomo, ma autosomici nel topo, contravvenendo alla legge di Ohno.

Evoluzione della PAR

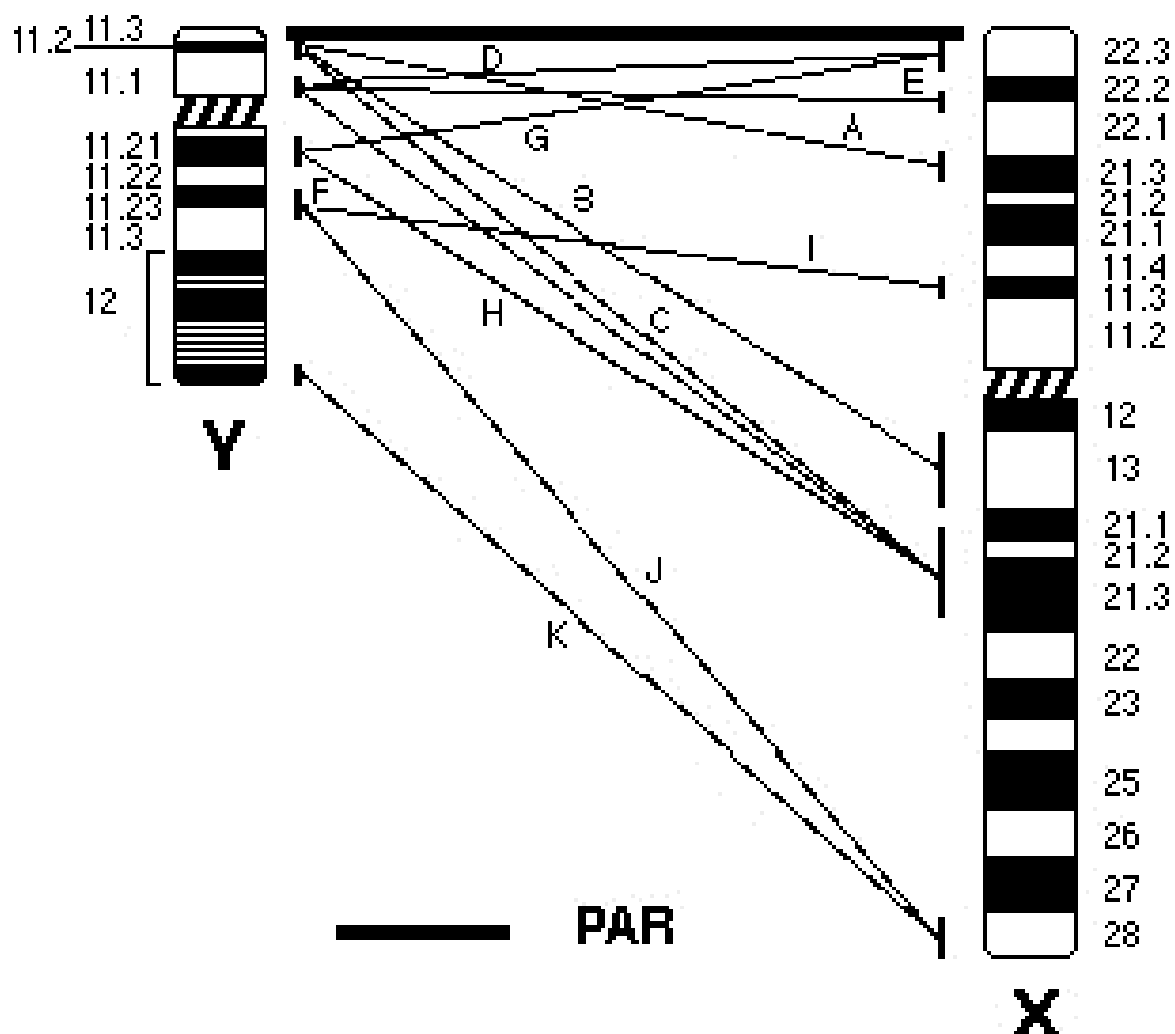
Le sequenze nella regione pseudoautosomica (porzione terminale delle braccia corte dei cromosomi sessuali) sono dunque identiche e, durante le meiosi maschile, c'e' un singolo e obbligatorio crossover X-Y all'interno di questa regione. Occasionalmente l'interscambio X-Y, per un crossing over ineguale, avviene fuori dalla PAR. In alcuni di questi casi il gene per il fattore determinante del testicolo (TDF) viene trasferito sul cromosoma X risultando in un fenotipo maschile XX. Fuori dalla PAR sono state trovate molte sequenze omologhe (vedi fig.3).

A = Yp11.2/Xp 21.2-p22.1 (ZFX/ZFY)
 B = Yp11.2/Xq13 (RPS4X/RPS4Y)
 C = Yp11.1 distale/Xq21.1-q21.3
 D = Yp11.1 prossimale/Xp22.3-pter
 E = Yp11.1 prossimale/Xp22.2 (Amelogenina)
 F = Yp11.1 prossimale/Xq21.1-q21.3
 G = Ycen-q11.21/X p22.3-pter (XGpY, STS, KAL)
 H = Ycen-q11.21/Xq21.1-q21.3 (TT221)
 I = Yq11.23/Xp11.3 (SMCY-HYA)
 J = Yq11.23/Xq28
 K = Yqter/Xq28 (PAR Yq/Xq)

Fig. 4 - Relazioni di omologia tra i cromosomi X ed Y

Le sequenze omologhe su X e Y in generale sono state divise in tre categorie da Bickmore e Cooke (1987).

La categoria I comprende quelle sequenze che mappano sul braccio lungo del cromosoma X (Xq12-28) e sul braccio corto o il braccio lungo prossimale del cromosoma Y (Yp o Ycen-q11.1) (Page et al., 1984; Weissenback et al., 1989; Bickmore e Cooke, 1987; Arveiler et al., 1989). Queste sequenze mostrano alti livelli di omologia tra X e Y. L'omologia di queste sequenze tra i cromosomi sessuali e' piu' alta del 99% e comprende almeno 36 Kb. Poiche' queste sequenze sono state trovate nelle scimmie antropomorfe (gorilla, scimpanze' e orango) solo sul cromosoma X, mentre nell'uomo si localizzano su X ed Y, si pensa che esse si siano trasposte e duplicate dal cromosoma X al cromosoma Y dopo la divergenza dell'uomo e le linee dello scimpanze' (Page et al., 1984). Appartengono alla categoria II parecchie geni che mappano sul braccio corto distale della X e sulla parte euromatica del braccio lungo dell'Y, e sempre fuori dalla zona pseudoautosomica. L'omologia tra X e Y evidenziata da tali regioni e' minore di quella evidenziata da sonde della categoria I: in un



caso studiato (DXS31) (Koenig et al., 1985), l'omologia tra X e Y e' stata stimata intorno all'80%. Sembra che tali sonde della categoria II generalmente evidenzino frammenti di dimensione diversa tra X e Y. Non molto si conosce circa queste sequenze.

La categoria III include infine le sequenze pseudoautosomiche (Cooke et al., 1985; Simmler et al., 1985; Darling et al., 1986; Page et al., 1987).

Soprattutto le sequenze della II categoria sono oggetto di studio a tema evolucionistico perche' la loro origine potrebbe in un certo qual modo spiegare l'origine della PAR [infatti per l'omologia di sequenza STS-X e STS-Y appartengono alla II categoria (Yen et al., 1988)]. Lavori su marcatori all'interno della regione Xp22.3, in particolare su STS, che appartiene alla II categoria, hanno fatto formulare l'ipotesi di una inversione pericentrica sul cromosoma Y durante l'evoluzione dei primati; in particolare tale inversione sarebbe avvenuta 40 milioni di anni fa in corrispondenza della divergenza tra primati superiori e proscimmie (Yen et al., 1988). Infatti, studi su STS indicano che questo gene insieme ad altri due marcatori pseudoautosomici murini (Mov 15 e Sxr), e tre nuovi marcatori relativi al telomero dell'Yp del topo si comportano pseudoautosomicamente nelle proscimmie e nel topo (Keitges et al., 1985; Harbers et al., 1986; Yen et al., 1988; Eicher et al., 1982).

Nell'uomo, invece, STS e' fuori dalla regione pseudoautosomica sia sulla X che sulla Y. Addirittura lo pseudogene di STS Y-linked mappa su Yq, cosi' come anche l'omologo di KAL1; entrambi gli pseudogeni sono orientati in maniera opposta sull' Yq rispetto alla situazione su Xp (Yen et al., ; Bardoni et al., 1991), come per altri loci da questo gruppo di linkage.

L'omologia di Xp22.3 e Yq11.2 e' tale che l'appaiamento e il crossing over puo' occasionalmente verificarsi, manifestandosi come rare traslocazioni X;Y (Ballabio et al., 1989; Yen et al., 1991). In seguito a tali traslocazioni, si ottengono delezioni nei geni compresi, come in STS, generando fenotipi aberranti come ittiosi, CDP, ecc..

In particolare e' stata costruita una mappa di delezione della banda Yq11 analizzando 23 individui portatori di aberrazioni strutturali (isocromosomi, delezioni terminali e traslocazioni X;Y, Y;X o A;Y) sul braccio lungo del cromosoma Y (Bardoni et al., 1991). Sono stati cosi' mappati 22 loci Yq-specifici usando 14 sonde a DNA ordinate in 11 intervalli di delezione e correlati con la mappa fisica del cromosoma (tra questi fattori controllanti la spermatogenesi come AZF o fattore di azoospermia) (Koenig et al., 1985; Vergnaud et al., 1986; Affara et al., 1989). Sono stati mappati i punti di rottura di 7 traslocazioni coinvolgenti Yq11 e Xp22. I risultati ottenuti da almeno cinque traslocazioni hanno suggerito che questi cromosomi abnormi potessero derivare da scambi aberranti tra regioni di omologia tra X e Y.

L'uso di sonde che evidenziano sequenze omologhe di Yq11 e Xp22.3 hanno permesso di comparare l'ordine dei loci all'interno di queste due regioni cromosomiche. I dati ottenuti hanno percio' permesso di suggerire almeno tre tipi di riarrangiamenti fisicamente e temporalmente distinti (inversione pericentrica di sequenze pseudoautosomiche e/o trasposizioni X-Y e duplicazioni) avvenuti durante l'evoluzione per spiegare l'attuale organizzazione di questa regione sul cromosoma Y (Bardoni et al., 1991). Questo studio e' stato approfondito in seguito al clonaggio di altri geni dal gruppo di linkage della Xp22.3 e sull'analisi comparativa di queste sequenze.

Gene della sindrome di Kallmann: implicazioni per la divergenza evolutiva dei cromosomi sessuali.

Il gene X-linked della sindrome di Kallman, una malattia dello sviluppo caratterizzata da ipogonadismo ipogonadotropico e anosmia (incapacita' olfattiva) (Kallmann et al., 1994; De Morsier et al., 1954), e' stato recentemente identificato, mappato nella banda Xp22.3 (Ballabio et al., 1987) e clonato (Franco et al., 1991; Bick et al., 1992). La proteina prodotta da questo gene ha omologia con le molecole di adesione alle cellule neurali, cosa che suggerisce un suo ruolo come fattore di migrazione neurale (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991).

L'ibridazione del cDNA di KALX con il DNA umano maschile e femminile ha rivelato la presenza di un omologo del gene sul cromosoma Y (KAL-Y) che e' stato mappato nella Yq11.2 (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991). Sebbene il pattern d'ibridazione di KAL-X e KAL-Y sia simile, l'ereditarieta' recessiva X-linked della sindrome di Kallman suggerisce che KAL-Y non puo' complementare mutazioni in KAL-X; inoltre dati sperimentali hanno mostrato che KAL-Y non sia

espresso almeno in ibridi somatici (Guisli et al., 1992). Si tratterebbe dunque di uno pseudogene (KAL-P). KAL-X e KAL-P hanno una organizzazione in esoni ed introni, ma mentre KAL-X possiede 12 esoni, 3 di essi (3, 8, 9) sono deleti in KAL-P e in altri sono state evidenziate piccole inserzioni, delezioni e sostituzioni di base. (del Castillo et al., 1992). La delezione di 3 esoni e la presenza di mutazioni frameshift che creano codoni di terminazione prematura indicano che KAL-Y non sia funzionale (del Castillo et al., 1992). Il gene della sindrome di Kallmann e' localizzato in una grande regione di omologia tra il braccio corto distale del cromosoma X (Xp22.3) e il braccio lungo prossimale del cromosoma Yq11.2. E' stato proposto che questa regione di omologia fosse originariamente parte di una regione pseudoautosomica ancestrale che e' stata interrotta da un'inversione pericentrica che sarebbe avvenuta sul cromosoma Y recentemente nell'evoluzione (Yen et al., 1988; Fraser et al., 1987).

Questa ipotesi e' stata basata su quattro linee di evidenza:

1) questa regione e' localizzata in prossimita' della PAR (Ballabio et al., 1990; Petit et al., 1990) su Xp distale; 2) i due geni che sono stati isolati da questa regione (STS e KAL) hanno entrambi un omologo su Yq11.2 e sfuggono all'inattivazione (Franco et al., 1991; Shapiro et al., 1979); cio' suggerisce che fossero originariamente pseudoautosomici e che quindi non avessero bisogno di essere compensate nel dosaggio nelle femmine; 3) l'ordine e l'orientamento di parecchi loci su Xp22.3 e Yq11.2, includendo STS e KAL e' lo stesso rispetto ai telomeri (Bardoni et al., 1991) su Xp e Yq; 4) c'e' evidenza che il gene sts murino sia pseudoautosomico.

Recentemente, un altro gene (GS1), che sfugge all'inattivazione della X e che ha omologia con il cromosoma Y, e' stato isolato dalla regione Xp22.3 (Yen et al., 1992). Tuttavia nessuna informazione e' disponibile sulla posizione di mappa o sulla sequenza dell'omologo di GS1 sulla Y. L'analisi di divergenza di sequenza in regioni di omologia nell'uomo e nelle altre specie di primati potrebbe aiutare a testare questa ipotesi e a determinare la cronologia dagli eventi che portano alla organizzazione degli attuali cromosomi sessuali umani.

P.P.R. = Regione Prossimale alla PAR

P.A.B. = Boundary Pseudo Autosomico

Fig. 5A - Omologie tra Xp21-pter e Y

Fig. 5B - Teoria evolutiva del boundary pseudoautosomico

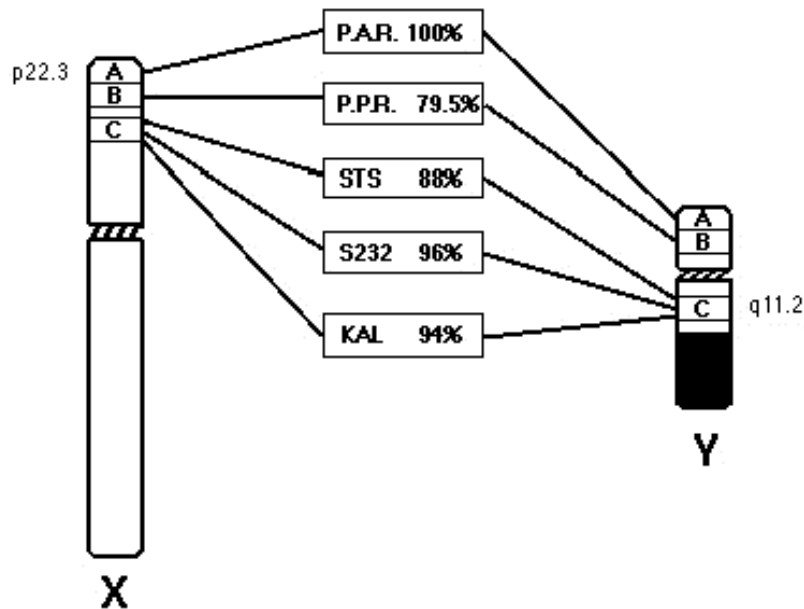


fig. 5A

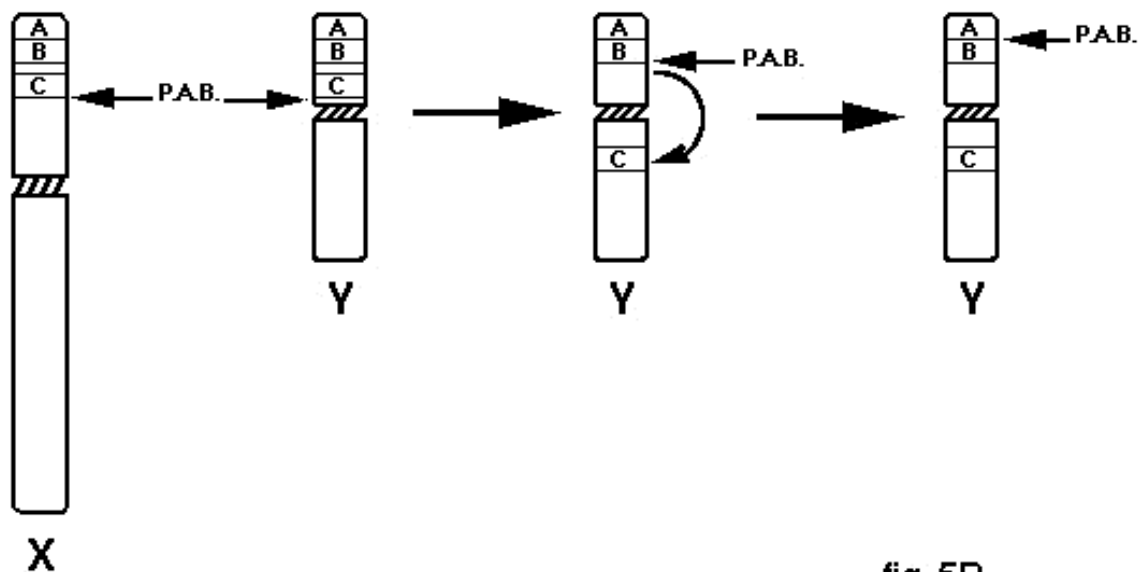


fig. 5B

Nella figura 4A la regione distale Xp umana e' stata divisa in tre regioni principali di omologia X/Y. Nella PAR (regione A) l'identita' X/Y del 100% e' mantenuta per ricombinazione (Rouyer et al., 1986; Cooke, Brown, Rappold, 1985). Immediatamente prossimale alla PAR e' una piccola regione di 225 bp (regione B) che non e' piu' soggetta a ricombinazione e dove l'identita' tra X e Y e' all'incirca del 79.5% (Ellis et al., 1989 e 1990). Prossimale alla regione B ci sono parecchi loci (regione C) che comprendono STS e KAL, che mostrano l'identita' Xp/Yq che va dall'88 al 96%. In accordo col modello della inversione pericentrica, un primo evento che muoverebbe la regione C

dal corto al braccio lungo del cromosoma Y, sarebbe seguito da un altro evento che muoverebbe la localizzazione del boundary pseudoautosomico (Yen et al., 1988; Fraser et al., 1987) (vedi fig.4B). Quindi, sequenze coinvolte nell'inversione pericentrica sul cromosoma Y (regione C) avrebbero cominciato a divergere dai loro omologhi sulla X prima delle sequenze localizzate nella regione B. Assumendo un uguale tasso di mutazione per loci differenti, i dati ottenuti non confermerebbero questa ipotesi dal momento che l'omologia per la regione C è significativamente più alta che quella nella regione B.

Una ipotesi alternativa sarebbe che l'omologia Xp22.3/Yq11.2 (regione C) sia il risultato di una o più recenti trasposizioni di sequenze dalla X al cromosoma Y (Koenig et al., 1984; Bickmore et al., 1987). Questa ipotesi implicherebbe che gli omologhi dell'Y di STS e KAL non siano mai andati incontro a pressione selettiva e pertanto abbiano rapidamente perso la loro funzione. In accordo con tale ipotesi, non si riscontrano significative differenze di identità di sequenze X/Y tra gli esoni ed introni mantenuti in KAL-Y. Tuttavia è difficile conciliare queste ipotesi con l'evidenza che entrambi STS e KAL umani sfuggano all'inattivazione. Inoltre, la cronologia di questo putativo evento di trasposizione, basato su studi evolutivi in differenti primati (Franco et al., 1991; Yen et al., 1988) è in contrasto con la percentuale di identità X/Y trovata nei loci STS e KAL.

In conclusione, questi dati suggeriscono che la situazione attuale di regioni omologhe tra X e Y sia il risultato di una complessa serie di eventi e non possa essere spiegata da un modello semplice (Incerti et al., 1992). A tale scopo sono necessari ulteriori studi, resi possibili dal clonaggio di geni molto prossimi alla PAR.

Geni per sulfatasi su Xp22.3

Gli enzimi appartenenti al gruppo delle sulfatasi catalizzano le reazioni di idrolisi di legami esterei solforici in una grande varietà di composti che vanno dai GAGs ai sulfolipidi e agli ormoni steroidei (Bergner e Shapiro 1988).

Nove diverse sulfatasi umane sono state descritte e caratterizzate (Hopwood e Morris, 1990; Ballabio e Shapiro, 1995; Kolodny e Fluharty, 1995; Neufeld e Muenzer, 1995). L'importanza di queste proteine nel metabolismo umano è enfatizzata dalla presenza di sette malattie ereditarie che risultano dalla deficienza di sulfatasi specifiche (Kolodny e Fluharty, 1995; Neufeld e Muenzer, 1995). Tutte le sulfatasi sarebbero funzionalmente correlate e questo scaturisce dalla scoperta di una malattia genetica (MSD o multiple sulfatase deficiency) in cui tutte le sulfatasi sono alterate (Kolodny e Fluharty, 1995), forse a causa di un evento post-traduzionale comune a tutte le sulfatasi (Rommerskirch e von Figura, 1992). Tre delle sulfatasi precedentemente descritte, note come arilsulfatasi A, B e C (ARSA, ARSB e ARSC) sono in grado di idrolizzare substrati artificiali contenenti un anello fenolico (Kolodny e Fluharty, 1995). ARSC è meglio conosciuta come steroide-sulfatasi (STS) a causa della sua abilità nell'idrolizzare steroide-solfati. ARSA e ARSB sono lisosomiali e hanno pH acido come optimum, mentre ARSC è microsomale ed ha pH ottimale che oscilla tra il neutro e l'alcalino (Ballabio e Shapiro, 1995).

Tre nuovi geni sono stati identificati sul cromosoma X (ARSD, ARSE e ARSF): essi presentano omologia con tutti gli altri membri della famiglia della sulfatasi. Sono posizionati in tandem in una piccola regione su Xp22.3. Similarità di sequenza e strutturali tra questi geni suggeriscono che essi siano stati generati da un'antica duplicazione. Un evento obbligatorio di crossing over in questa regione dei cromosomi X e Y ad ogni meiosi maschile può renderla più soggetta a scambio ineguale che porterebbe a delezioni e duplicazioni. I loci ARSD, ARSE e ARSF sono localizzati a sole 150 Kb dal boundary pseudoautosomico (Franco, Ballabio et al., 1995). È stato proposto che questo cluster di tre geni sia stato generato per eventi di crossing over ineguale che sono avvenuti in una PAR ancestrale. Il retroposizionamento del boundary pseudoautosomico più telomerico su Xp avrebbe permesso alle copie della X e dell'Y di questi geni di divergere, con perdita successiva di funzione delle copie della Y (un meccanismo simile è già stato proposto per STS e KAL) (Yen et al., 1988; del Castillo et al., 1992; Incerti et al., 1992). La scoperta che almeno due di questi geni (ARSD e ARSE) sfuggano all'inattivazione della X, così come la scoperta di loci omologhi sulla Y confermerebbe questa ipotesi. L'identificazione di tre geni codificanti per sulfatasi nella regione critica CDPX (chondrodysplasia punctata) ha suggerito che tale malattia possa essere dovuta ad una deficienza di sulfatasi (Franco, Ballabio et al., 1995).

Il termine "chondrodysplasia punctata" si riferisce ad un gruppo di displasie scheletriche caratterizzate da un'abnorme deposizione di calcio in regioni di formazione encondrale delle ossa. La CDP e' eterogenea sia a livello genetico che clinico (Spranger et al., 1970): uno specifico tipo di CDP e' associato alla nullisomia del braccio corto distale del cromosoma X umano (Xp22.3) in maschi con delezioni e traslocazioni coinvolgenti questa regione (Curry et al., 1984). Questi pazienti hanno sindromi di geni contigui dovuti al coinvolgimento di geni adiacenti su Xp22.3 (Ballabio e Andria, 1992; Ledbetter e Ballabio, 1995).

Per identificare la regione critica CDPX si sono studiati piu' di 50 pazienti portatori di delezioni e traslocazioni coinvolgenti la regione Xp22.3 e aventi il fenotipo della CDPX (Ballabio e Andria, 1992). L'analisi genetico-molecolare di alcuni di essi ha definito la regione genomica critica che avrebbe dovuto contenere il gene per la CDPX (Wang et al., 1995). Da questa regione sono stati isolati tre geni per arilsulfatasi (ARSD, ARSE e ARSF, di cui si e' detto prima) organizzati in cluster e si e' dimostrato, in particolare, che mutazioni puntiformi in uno di questi tre geni (ARSE) sono state osservate in 5 pazienti con CDPX, cosa che indica che questa malattia sia causata da una deficienza per una sulfatasi (Franco, Ballabio et al., 1988).

Il gene ARSD e' composto da 10 esoni, mentre ARSE da 11. Il gene ARSD codificherebbe per una proteina di 594 amminoacidi, mentre il prodotto di ARSE sarebbe un ipotetico polipeptide di 590 amminoacidi. Analisi comparativa delle sequenze amminoacidiche delle proteine ARSD, ARSE e ARSF con altre sulfatasi ha mostrato che l'omologia si osserva soprattutto vicino all'N-terminale dove presumibilmente si trova il sito attivo di alcuni di questi enzimi.

L'omologia piu' alta comunque si osserva confrontando fra loro ARSD ad ARSE e confrontando queste due ad ARSC/STS, indicando che questi tre geni sono molto piu' vicini evolutivamente tra loro che ad altri membri della famiglia (Franco, Ballabio et al., 1995).

Pattern di espressione di ARSD e ARSE

Analisi di Northern Blot di mRNA di ARSD e ARSE ha rivelato un diverso pattern di espressione per questi due geni. Sonde di cDNA per ARSD hanno evidenziato un trascritto di 5 Kb ed un altro meno abbondante di 3.5 Kb nel pancreas, rene, fegato, polmone, placenta, cervello e cuore. Pancreas e rene mostrano i piu' alti livelli di espressione. Sotto le stesse condizioni, sonde del gene ARSE hanno evidenziato un trascritto abbondante di 2.2 Kb e uno meno abbondante di 4 Kb. L'mRNA di ARSE e' molto piu' abbondante rispetto a quello di ARSD e sembra avere una distribuzione tissutale piu' discreta, essendo espresso esclusivamente da pancreas, fegato e rene. I diversi trascritti per ogni gene sarebbero ottenuti dall'uso di diversi siti di poliadenilazione, risultando in una diversa lunghezza della regione non tradotta al 3'. ARSD e ARSE inoltre sfuggono all'inattivazione dell'X.

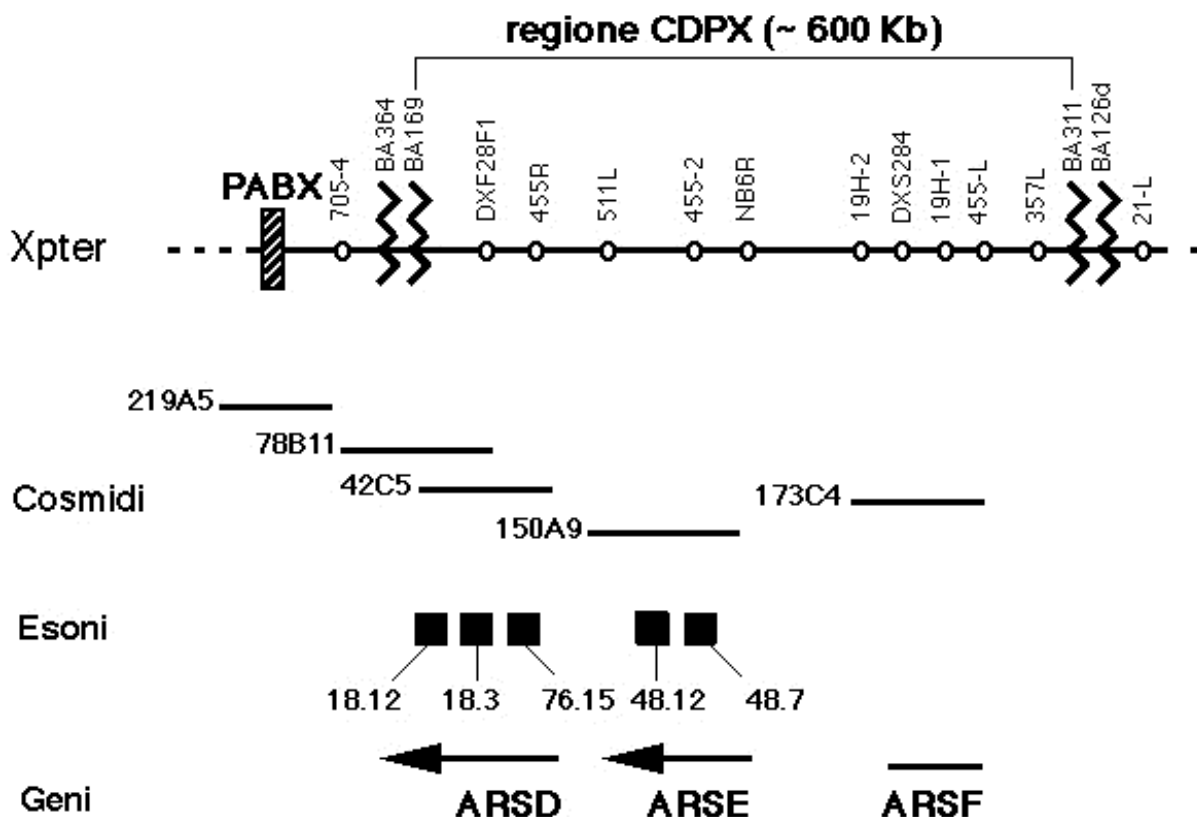
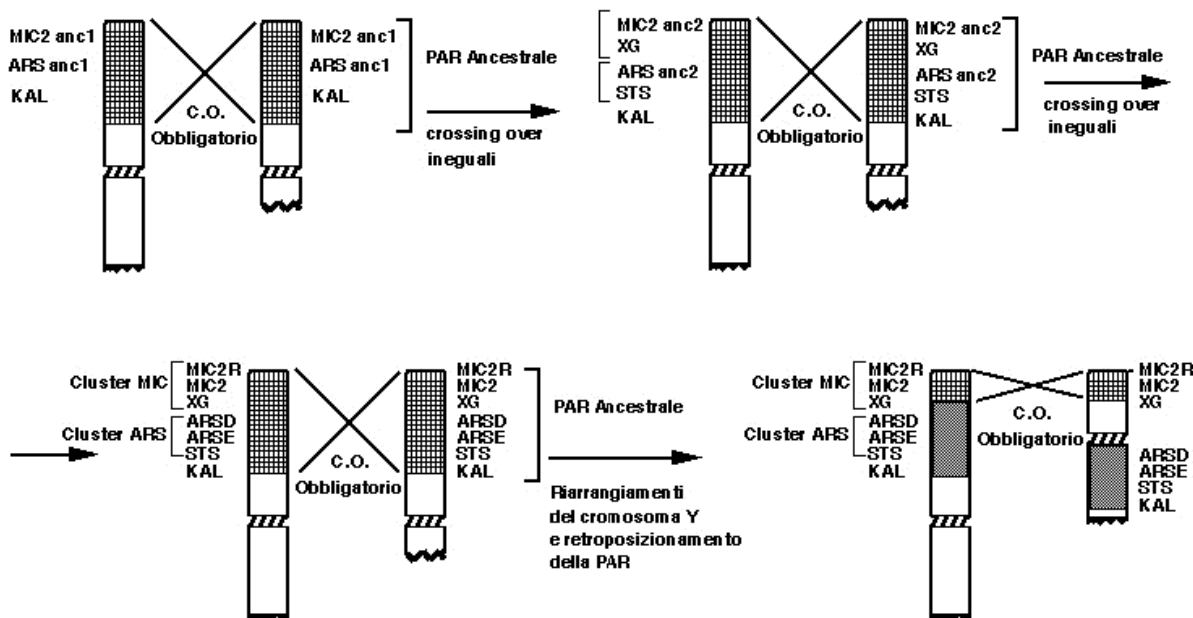


Fig. 6 - Organizzazione genomica di ARSD, ARSE e ARSF

E' indubbio, quindi, che nel corso dell'evoluzione si siano verificati degli eventi particolari che, ad esempio, hanno portato al cambiamento della posizione della PAR e, dunque, del boundary pseudoautosomico. In questo senso, si e' ipotizzato un insieme di meccanismi sequenziali al fine di spiegare la localizzazione attuale dei geni STS, KAL, ARSD ed ARSE sul cromosoma Y umano. Tale ipotetico schema (vedi figura 8) servirebbe anche per spiegare l'esistenza di clusters di geni omologhi come appunto quello di ARSD, ARSE e STS o come quello di MIC2, XG e MIC2R (pseudogene correlato a MIC2).



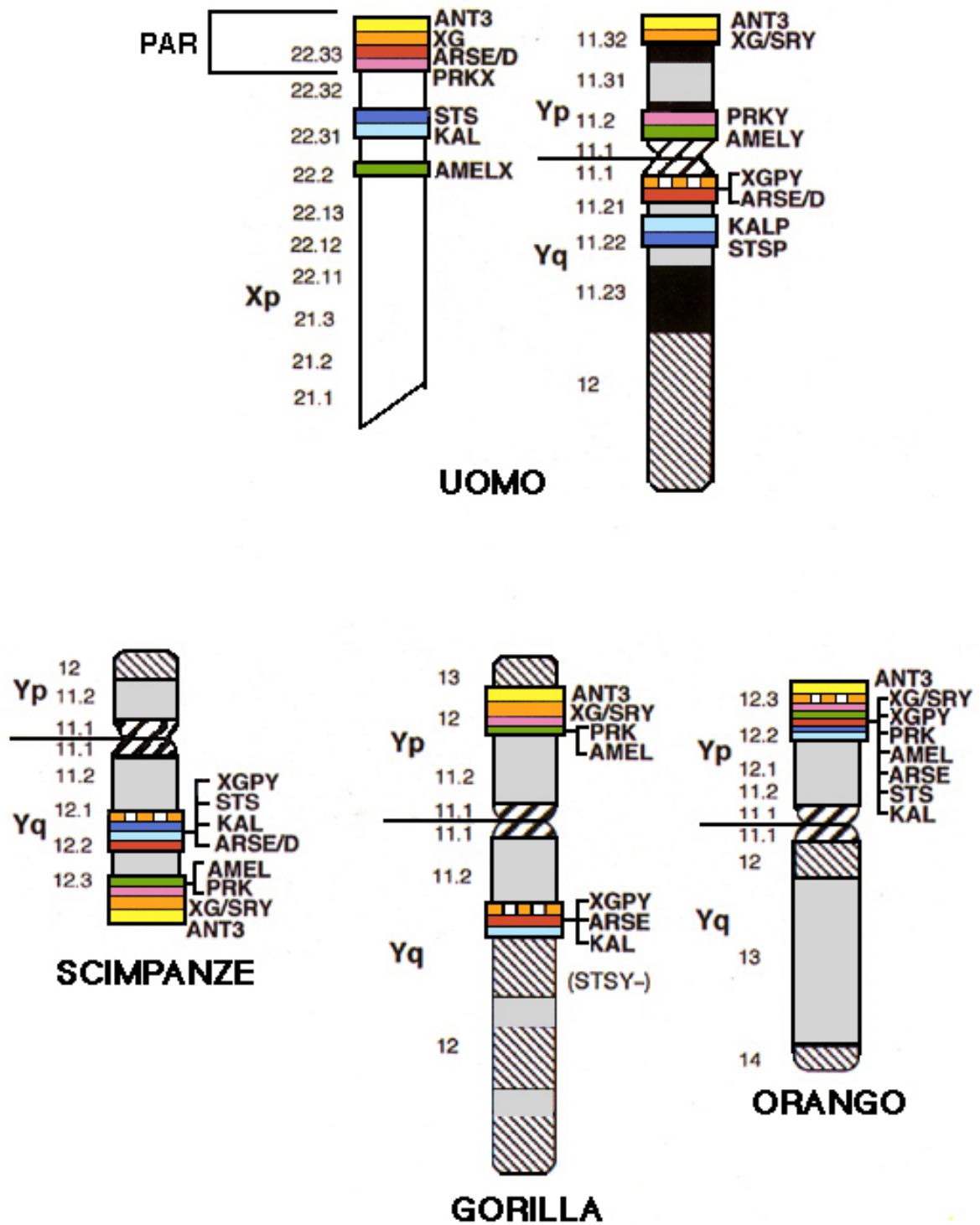
Si postula la presenza di una PAR ancestrale, contenente due geni ancestrali, MICanc1 e ARSanc1, ed il gene KAL: tale ipotesi si basa sul fatto che ARSD e ARSE, come KAL e STS, sfuggono all'inattivazione, hanno un omologo sull'Y e non sono conservati nel topo (tutte caratteristiche peculiari dei geni pseudoautosomici). Un primo evento di crossing-over ineguale all'interno di questa regione genererebbe STS e ARSanc2 (per la famiglia delle sulfatasi) e XG e MICanc2 (per la famiglia MIC). Cio' e' supportato dai valori di identita' di sequenza tra i membri di ciascuna famiglia: infatti, ARSD e ARSE sono piu' omologhi tra loro che rispetto a STS (Ballabio e al, 1994), mentre MIC2 e XG sono meno simili rispetto a MIC2 e MIC2R tra loro (Ellis, 1994). Successivamente, un secondo evento di crossing-over ineguale (sempre nella PAR ancestrale) creerebbe un'ulteriore duplicazione, generando il terzo membro di ognuna delle due famiglie geniche. Infine, il retroposizionamento del PAB a livello di XG come conseguenza dell'inserzione di SRY porterebbe ARSD, ARSE, STS e KAL fuori dalla PAR. Mentre sull'X questi geni continuano a mappare sull'Xp, sull'Y, a causa di riarrangiamenti cromosomici successivi, si posizionerebbero su Yq nel seguente ordine: CEN-(XGPY, ARSD-Y, ARSE-Y)-KALY-STSY, quale e' l'organizzazione attuale.

Sintesi di

Comparative mapping of Xp22 genes in hominoids - evolutionary linear instability of their Y homologues.

Glaser, B. et al. *Chrom.Res.* 1997; 5: 167-176.

SEQUENZE Y SPECIFICHE
ETEROCROMATINA



I dati ottenuti con la FISH comparativa (FIG), dimostrano che in contrasto con l'estrema conservazione dell'ordine di questi marcatori su Xp22 dei primati superiori, la mappatura sul cromosoma Y mette in evidenza riarrangiamenti multipli su questo cromosoma. Questo potrebbe riflettere l'evoluzione isolata di queste specie nel corso di milioni di anni, durante i quali riarrangiamenti hanno portato alla morfologia dei cromosomi Y che oggi si ritrovano in ogni specie. Tutti i riarrangiamenti riguardano però le regioni al di fuori della PAR. Dati di FISH comparativa riguardanti ANT3, SRY e ZFY mostrano in tutte le grandi scimmie la vicinanza di SRY e ZFY alla PAR, . SRY risulta adiacente alla PAR anche nelle scimmie del vecchio e nuovo mondo.

E' interessante notare che solo i loci dell'-Y di uomo e di gorilla omologhi a quelli prossimali ad XG (ARSD-ARSE-PRKX- STS-KAL- AMELX) sembrano coinvolti in inversioni peri e paracentriche. Nell'uomo PRKY e AMELY mappano molto vicini in Yp11.2 molto lontani dalla PAR, inseriti fra i due cluster di TSPY (geni per la maturazione del testicolo vedi oltre), localizzazione che si riscontra solo nell'uomo (vedi oltre). Inoltre XGPY e gli omologhi di ARSE, ARSD, KAL, e STS mappano nell'uomo in Yq e gli stessi locus con l'eccezione di STS che e' deletato, mappano sul braccio lungo di gorilla. A prima vista questi dati sembrerebbero sostenere l'ipotesi della singola inversione pericentrica ipotizzata inizialmente come causa della riduzione della PAR circa 40 milioni di anni fa dopo la radiazione dalle proscimmie. In realtà la mappatura comparativa dei geni ARS, di STS e KAL ha evidenziato che questa ipotesi e' troppo semplicistica (vedi prima). Inoltre non e' necessario ipotizzare come evento chiave nell'evoluzione della PAR l'inversione pericentrica se si osservano i dati ottenuti su scimpanze ed oranghi (Fig.) con la FISH comparativa. Infatti gli omologhi della regione Xp22 prossimale si trovano adiacenti alla PAR, ma separati da questa dalla presenza di SRY. [\[Situazione riscontrabile anche nelle scimmie del vecchio mondo; vedi oltre\].](#)

Se si parte dalla teoria che una trasposizione di un autosoma sui cromosomi sessuali ancestrali nella linea dei primitivi euteri abbia creato un'ampia PAR ancestrale su i proto cromosomi sessuali dei mammiferi, questi dati di FISH e la vicinanza di SRY alla PAR in tutti i primati superiori danno sostegno all'idea che una trasposizione di SRY all'interno della PAR ancestrale abbia creato un nuovo PABDY e ridotto perciò le dimensioni della PAR. Non e' stato ancora determinato quando questo evento ha avuto luogo nel corso dell'evoluzione dei mammiferi. Una serie di eventi complessi comprendente inversioni, trasposizioni, delezioni, amplificazione di geni (vedi oltre) ha dato origine ai cromosomi Y come oggi li vediamo. Per quello che riguarda le regioni di omologia X-Y sono presenti numerosi dati di confronto di sequenza che potrebbero fornire indicazioni in merito ai tempi in cui la divergenza fra X e Y ha avuto inizio, in realtà la grande differenza di variazione fra sequenze introniche ed esoniche trovata non permette di tracciare un quadro evoluzionistico chiaro. (Molto probabilmente non e' possibile applicare al cromosoma Y i parametri utilizzati per altre regioni del genoma, a causa della particolarità di questo cromosoma: il cromosoma Y dei mammiferi e' l'unico che non ha omologo, che perciò e' libero di mutare sia in termini di sequenza che di morfologia. Gli studi sui geni della fertilità maschile confermano l'estrema variabilità in termini di numero di copie e di mappatura di questi locus nella scala evolutiva in cui l'unico limite alla variazione e' imposto dal mantenimento della loro funzionalità, vedi oltre).

I dati di Weller et. su XGPY (vedi sopra) danno indicazione della varietà di eventi che hanno contribuito all'evoluzione di questo cromosoma: i loro dati suggeriscono che un evento precoce ha creato il nuovo confine della PAR interrompendo il gene XG [\[molto probabilmente dopo la radiazione delle scimmie dalle proscimmie, ma prima della separazione delle scimmie del nuovo e vecchio mondo\].](#) Solo successivamente, dopo la separazione delle grandi scimmie, un evento di duplicazione e trasposizione ha creato il gene XGPY. I dati di FISH comparativa riportati in questo lavoro confermano questo dato, evidenziando la presenza di un doppio segnale nelle grandi scimmie. [\[FISH comparativa su scimmie del vecchio mondo conferma che la duplicazione e' avvenuta dopo la separazione dalle grandi scimmie africane vedi oltre\]](#)

Nicoletta Archidiacono, Clelia T. Storlazzi, Cosma Spalluto, Angela S. Ricco, Rosalia Marzella and Mariano Rocchi

Chromosomal rearrangements that differentiated the karyotype of primates were initially investigated using conventional cytogenetic techniques and comparative gene mapping (Yunis, Prakash, 1982; Dutrillaux, 1979; O'Brien, Graves, 1990). The advent of molecular cytogenetic tools, painting libraries in particular, have allowed a much more efficient approach to this topic (Wienberg and Stanyon, 1995). The study of the cytogenetic evolution of the Y chromosome, however, faces two problems: the small size of its euchromatic region, and the peculiar cytogenetic evolution of this chromosome, which has not been constrained by meiotic pairing which strongly acts against cytogenetic rearrangements. Available cytogenetic data on the evolution of chromosome Y in primates concern SRY (Toder et al. 1993), YRRM and TSY (Guttenbach et al. 1992; Schempp et al. 1995; Conrad et al. 1996), Xp22 genes (Meroni et al. 1996; Glaser et al. 1997a), and Y-linked genes (Glaser et al. 1997b). Most of the probes used in these studies contain expressed sequences which can be assumed to be under stringent selective pressure. To gain a more comprehensive picture of the recent cytogenetic evolution of the Y chromosome in primates the authors undertook a systematic fluorescence in situ hybridization (FISH) study using 17 Y-specific YAC clones covering a large portion of the euchromatic region of the human chromosome Y. Probes specific for the PAB, TSPY gene family, and for the SRY gene were also used. The study was conducted on males of humans (*Homo sapiens*, HSA), common chimpanzee (*Pan troglodytes*, PTR), gorilla (*Gorilla gorilla*, GGO), and Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*, PPY). The long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*, MFA) and olive baboon (*Papio anubis*, PAN) were chosen as an outgroup. The results suggest a very rapid evolution of the Y chromosome body, contributing to a comprehensive understanding of the evolution of chromosome Y in primates.

Most FISH comparative studies in great apes have made use of expressed sequences, which can be assumed to be under selective pressure (see Introduction). In this respect, the use of YAC probes have the advantage of disclosing a more comprehensive cytogenetic picture of the evolution of the Y chromosome body, even though lower level variation (small sequence variation, microdeletions, etc.) can escape detection.

FIG

The most interesting observation of the present paper concerns the discrepancies between A-DNA and T-DNA of the YACs #3, #4, #5, #6, #12, #13, #15, and #17. As an example, A-DNA from YACs #3 and #5 (Fig. 3d and 3e, upper rows), both containing TSPY sequences, did not detect the multiple signals specifically revealed by TSPY sequences, as did cY91 (data not shown). These inconsistencies disappeared when T-DNA was used (Fig. 3d and 3e, lower rows). It is important to note that these kinds of inconsistencies were never observed for the autosomal component of chimeric YACs. Furthermore, they never observed such inconsistencies in extensive comparative mapping studies the authors performed using A-DNA from YACs (personal observation). These inconsistencies can be explained assuming (i) that expressed sequences are devoid of Alu sequences, (ii) that signals detected by T-DNA are mainly due to the highly conserved (frequently repeated) expressed sequences they contain, and (iii) that the background DNA sequences of these regions have substantially diverged or been lost in the examined species. Data reported by Saxena et al. (1996) show that a large portion of the DAZ repeat lies in a large (37 kb) inter-Alu segment not represented, therefore, in the Alu-PCR products. Results obtained in this study and those available in the literature on the evolution of Y-linked expressed sequences suggest that sequences with relevant function, such as TSPY, RBM, DAZ, AZF sequences, and SMCY, moved and magnified independently from the surrounding DNA. On the whole, the Y chromosome seems to evolve at a speed that far exceeds that of autosomes.

In Bornean orangutan the RBM sequences have been mapped by Schempp et al. (1995) on Yp. Our results, using the YAC #17 which contains the RBM sequences, generated a signal on Yq (Fig. 3g, 3h). The discrepancy prompted us to use a second unrelated Bornean orangutan individual (PPY2),

who was found to bear a Y chromosome with a larger heterochromatic block on Yq, thus allowing an easier identification of the p and q arms. The results clearly showed that the signal was localized on the Yq arm, close to the centromere (Yq11.2). Schempp et al. (1993) have reported the existence of two variant Y chromosomes in the Sumatran orangutan. Although no similar variants have been reported in the Bornean orangutan, this possibility can not be excluded.

Results on PAB and SRY are in agreement with the data reported by Toder et al. (1993) and Glaser et al. (1997), who showed that PAR and SRY co-localize in HSA, PTR, GGO, and PPY. They have extended this observation to MFA and PAN (Fig. 3a, 3b and 3c), thus further supporting the hypothesis that SRY repositioning occurred before the divergence of Anthroidea (Weller et al. 1995; Toder et al. 1993). In addition to the signal at the PAB, the c219a5 cosmid detects, in all the great apes, a second signal that always colocalizes with YACs of the A-PAR (Fig. 3a), in agreement with the fact that the XG gene underwent a transpositional event from the X to the Y chromosome before great ape speciation (Weller et al. 1995). Toder et al. (1993) did not detect the second signal in PPY. This discrepancy can be due to differences in stringency conditions and/or to the nature of the probes.

YACs containing the Xq21-HR. The Y-specific region in humans has been interrupted by a transposition of a region from Xq21-HR after HSA divergence from great apes (Lambson et al. 1992). This duplicative transposition probably interrupted a region containing repeated TSPY elements, which now flank the transposed Xq21 region. Sargent et al. (1996) and Lambson et al. (1992) have also suggested that this transposed region was originally a single continuous fragment, which subsequently split into one large (approximately 3Mb) and one small (0.3Mb) region as a consequence of a paracentric inversion. The YAC #2, which contains exclusively the Xq21-HR, did not detect any signal on the Y chromosome of non-human primates, in agreement with the view that the Xq21-HR is restricted to humans (Lambson et al. 1992). YAC #1 gave unexpected signals at the tip of Xp and close to the PABY of all the examined species. The CEPH databank, however, reports two different forms of this YAC (see Table 1); an explanation for these data could be attributed to the second form including a portion of the PAR or, at least, the ZFY region. The YACs #3, #4 and #5 extend on the centromeric side of the Xq21-HR and contain the Y-specific segment nested in the Xq21-HR (see above). The signals they yielded on the Y chromosomes of non-human primates are therefore not unexpected.

Ancestral PAR. The present results obtained using YACs #7, #8, #9, #10, #11 and plasmid c219a5 (PAB) confirmed the well known previous data that the centromere lies between PAR and A-PAR in HSA and GGO. Unlike the situation in HSA and GGO, however, the A-PAR was found near the PAB in PTR and PPY, in agreement with the recently reported data by Glaser et al (1997a). Our study extends these observation to MFA, and PAN. The hypothesis that the same pericentric inversion brought the SRY adjacent to the present-day PAR and the A-PAR to Yq is based essentially on the data from HSA (Ellis et al. 1990). Our FISH results using YAC #6 is relevant in this respect. The hybridization signal, in fact, is localized on Yq in HSA, but on Yp in GGO (Fig. 3f), thus strongly supporting the view (Glaser et al. 1997a) that the two inversions are different and have occurred independently in the HSA and GGO specific-lineage.

A high sequence homology (85-96%) between Xp22 genes (ASRD, ARSE, KAL, STS, XG) and the corresponding pseudogenes in the A-PAR has been reported in HSA (Weller et al. 1995; Meroni et al. 1996; Incerti et al. 1992). These data seem to conflict with the fact that the three YACs covering the A-PAR do not show any cross-hybridization signals on the X chromosome. This striking difference suggests that the genes of the A-PAR remained active long after the SRY repositioning under a relatively efficient selective pressure which, on the contrary, did not affect the rapid evolution of the neighbouring regions. These data raise the interesting question of the evolution of the dosage compensation of these genes, which, on the X chromosome, escape X-inactivation

References

Affara N A, Bishop C, Brown W, Cooke H, Davey P, Ellis N, Graves J M, Jones M, Mitchel M, Rappold G, Tyler-Smith C, Yen P, Lau J F C (1996) Report of the second international workshop on human chromosome Y mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* 73: 33-76

Arnemann J, Jakubiczka S, Thuring S, Schmidtke J (1991) Cloning and sequence analysis of human Y-chromosome-derived, testicular cDNA, TSPY. *Genomics* 11: 108-114

Baldini A, Ross M, Nizetic D, Vatcheva R, Lindsay E A, Lehrach H, Siniscalco M (1992) Chromosomal assignment of human YAC clones by fluorescence in situ hybridization - Use of single-yeast-colony PCR and multiple labeling. *Genomics* 14: 181-184

Conrad C, Hierl T, Glaser B, Taylor K, Zeitler S, Chandley A C, Schempp W (1996) High-resolution fluorescence in situ hybridization of RBM- and TSPY-related cosmids on released Y chromatin in humans and pygmy chimpanzees. *Chrom Res* 4: 201-206

Dutrillaux B (1979) Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum Genet* 10: 251-314

Ellis N, Yen P, Neiswanger K, Shapiro L J, Goodfellow P N (1990) Evolution of the pseudoautosomal boundary in Old World monkeys and great apes. *Cell* 63: 977-986

Glaser B, Grutzner F, Taylor K, Schiebel K, Meroni G, Tsiopura K, Pasantes J, Rietschel W, Toder R, Willmann U, Zeitler S, Yen P, Ballabio A, Rappold G, Schempp W (1997a) Comparative mapping of Xp22 genes in hominoids - evolutionary linear instability of their Y homologues. *Chrom Res* 5: 167-176

Glaser B, Hierl T, Taylor K, Schiebel K, Zeitler S, Papadopoulos K, Rappold G, Schempp W (1997b) High-resolution fluorescence in situ hybridization of human Y-linked genes on released chromatin. *Chrom Res* 5: 23-30

Guttenbach M, Muller U, Schmid M (1992) A human moderately repeated Y-specific DNA sequence is evolutionarily conserved in the Y-chromosome of the great apes. *Genomics* 13: 363-367

Incerti B, Guioli S, Pragliola A, Zanaria E, Borsani G, Tonlorenzi R, Bardoni B, Franco B, Wheeler D, Ballabio A, Camerino G (1992) Kallmann syndrome gene on the X and Y chromosomes: implications for evolutionary divergence of human sex chromosomes. *Nature Genet* 2: 311-314

Jones M H, Khwaja O S A, Briggs H, Lambson B, Davey P M, Chalmers J, Zhou C -Y, Walker E M, Zhang Y, Todd C, Ferguson-Smith M A, Affara N A (1994) A set of ninety-seven overlapping yeast artificial chromosome clones spanning the human Y chromosome euchromatin. *Genomics* 24: 266-275

Kirsch S, Edelmann A, Henegariu O, Hirschmann P, Lepaslier D, Vogt P H (1996) Molecular analysis of the genomic structure of the human Y chromosome in the euchromatic part of its long arm (Yq11). *Cytogenet Cell Genet* 75: 197-206

Lambson B, Affara N A, Mitchell M, Ferguson-Smith M A (1992) Evolution of DNA sequence homologies between the sex chromosomes in primate species. *Genomics* 14: 1032-1040

Lichter P, Tang Chang C -J, Call K, Hermanson G, Evans G A, Housman D, Ward D C (1990) High resolution mapping of human chromosomes 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247: 64-69

Liu P, Siciliano J, Seong D, Craig J, Zhao Y, de Jong P J, Siciliano M J (1993) Dual Alu PCR primers and conditions for isolation of human chromosome painting probes from hybrid cell. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 93-99

Manz E, Schnieders F, Muller Brechlin A, Schmidtke J (1993) TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics* 17: 726-731

Meroni G, Franco B, Archidiacono N, Messali S, Andolfi G, Rocchi M, Ballabio A (1996) Characterization of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggest gene duplications in an ancestral pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 5: 423-431

O'Brien S J, Graves J A (1990) Report of the committee on comparative gene mapping. *Cytogenet Cell Genet* 55: 406-433

Sargent A C, Briggs H, Chalmers J I, Lambson B, Walker E, Affara A N (1996) The sequence organization of Yp-proximal Xq homologous regions of human sex chromosomes is highly conserved. *Genomics* 32: 200-209

Saxena R, Brown L G, Hawkins T, Alagappan R K, Skaletsky H, Reeve M P, Reijo R, Rozen S, Dinulos M B, Disteche C M, Page D C (1996) The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genet*

14: 292-299

Schempp W, Toder R, Rietschel W, Grutzner F, Mayerova A, Gaukler A (1993) Inverted and satellited Y chromosome in the orangutan (*Pongo pygmaeus*). *Chrom Res* 1: 69-75

Schempp W, Binkele A, Arnemann J, Glaser B, Ma K, Taylor K, Toder R, Wolfe J, Zeitler S, Chandley A C (1995) Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes. *Chrom Res* 3: 227-234

Seuanez H N, Evans H J, Martin D E, Fletcher J (1979) An inversion of chromosome 2 that distinguishes between Bornean and Sumatran orangutans. *Cytogenet Cell Genet* 23: 137-140

Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, Hawkins J R, Griffiths B L, Smith M J, Foster J W, Frischauf A -M, Lowell-Badge R, Goodfellow P N (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244

Toder R, Zeitler S, Goodfellow P N, Schempp W (1993) Comparative mapping of SRY in the great apes. *Chrom Res* 1: 117-120

Tyler-Smith C, Taylor L, Muller U (1988) Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J Mol Biol* 203: 837-848

Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown L G, Beer-Romero P, Bogan J S, Page D (1992) The human Y chromosome: a 43 interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258: 52-59

Weller A P, Critcher R, Goodfellow N P, German J, Ellis A N (1995) The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene. *Hum Mol Genet* 4: 859-868

Wienberg J, Stanyon R (1995) Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev* 5: 792-797

Yunis J J, Prakash O (1982) The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 215: 1525-1530

Legend to Table and Figures

Table 1

| A | YAC | Loci | Y interval | Size (Kb) | Additional signal(s) |
|----|--------|-------------------------|------------|-----------|-------------------------|
| 1 | 804g10 | | 1D->2A | 890, 1630 | Xp22; Xq21; 1p21; 12q21 |
| 2 | 881G1 | | 2A->3B | 1200 | Xq21 |
| 3 | 757H5 | TSPY; AMELY; prky | 2B->4A | >2500 | Xq21 |
| 4 | 758G1 | TSPY; AMELY; prky | 3C->3G | 2600 | 5q35 |
| 5 | 821g7 | TSPY minor; AMELY; prky | 3G->4A | 1690 | Xq21 |
| 6 | 713E1 | | 5A->5B | 400 | 1q44; 11p13 |
| 7 | 900E7 | XGPY; AZFa | 5B-5D | 1025 | 10q22; Xp22.1 |
| 8 | 787g2 | XGPY; AZFa | 5C->5D | 1040 | 3q24 |
| 9 | 708F5 | KALP | 5D->5G | 460 | 5q21; 16p13.3 |
| 10 | 946H3 | KALP | 5D->5G | 1240 | 2p16; 4q13 |
| 11 | 734h2 | STSP | 5I | 610 | 15q24 |
| 12 | 802d9 | | 5I->5J | >1500 | 7q32 |
| 13 | 955a4 | | 5I->5K | 1520 | 10q23 |
| 14 | 884A7 | | 5J->5L | 1450 | |
| 15 | 908e8 | SMCY (H-Y); AZFb | 5L->5P | 1380 | |
| 16 | 753d4 | AZFb | 5Q->6A | 650 | |
| 17 | 913b1 | AZFb, c; DAZ; SPGY; RBM | 6D->6F | 1600 | 1q44; 1q42; 1q32; 15q25 |
| | | | | | |
| B | Others | Locus | Y interval | Size (Kb) | |
| | | | | | |

| | | | | | |
|---|--------|------|----|----|------|
| a | c2195A | PABX | | 40 | Xp22 |
| b | pHu14 | SRY | 1A | 13 | |
| c | cY91 | TSPY | 3 | 40 | |

Probes used in the study.

Most of the data on these probes have been derived from the "Report of the Second International Workshop on Human Y Chromosome Mapping 1995" (Affara et al. 1996). The deletion intervals reported by Vollrath et al. (1992) have been included in the Table. Data on YAC size are from CEPH data-bank.

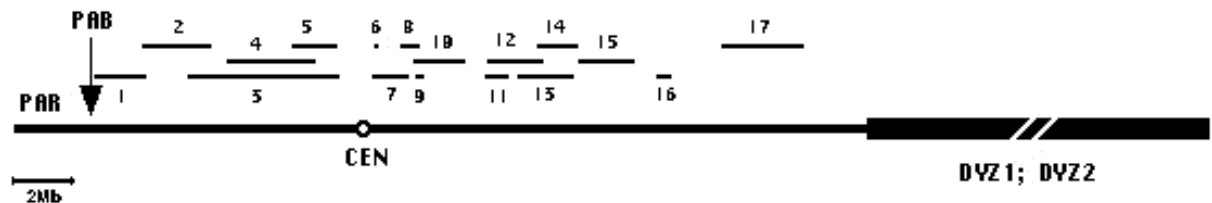


Figure 1

The diagram reports the size and relative position of the 17 YACs used in the study, drawn according to the contig map reported by Affara et al. (1996) and Sargent et al. (1996). Most of the YACs are chimeric, so the size of the YAC, as reported in the Figure, do not match the size reported in Table 1. PAR = pseudoautosomal region; PAB = PARY boundary; CEN = centromere.

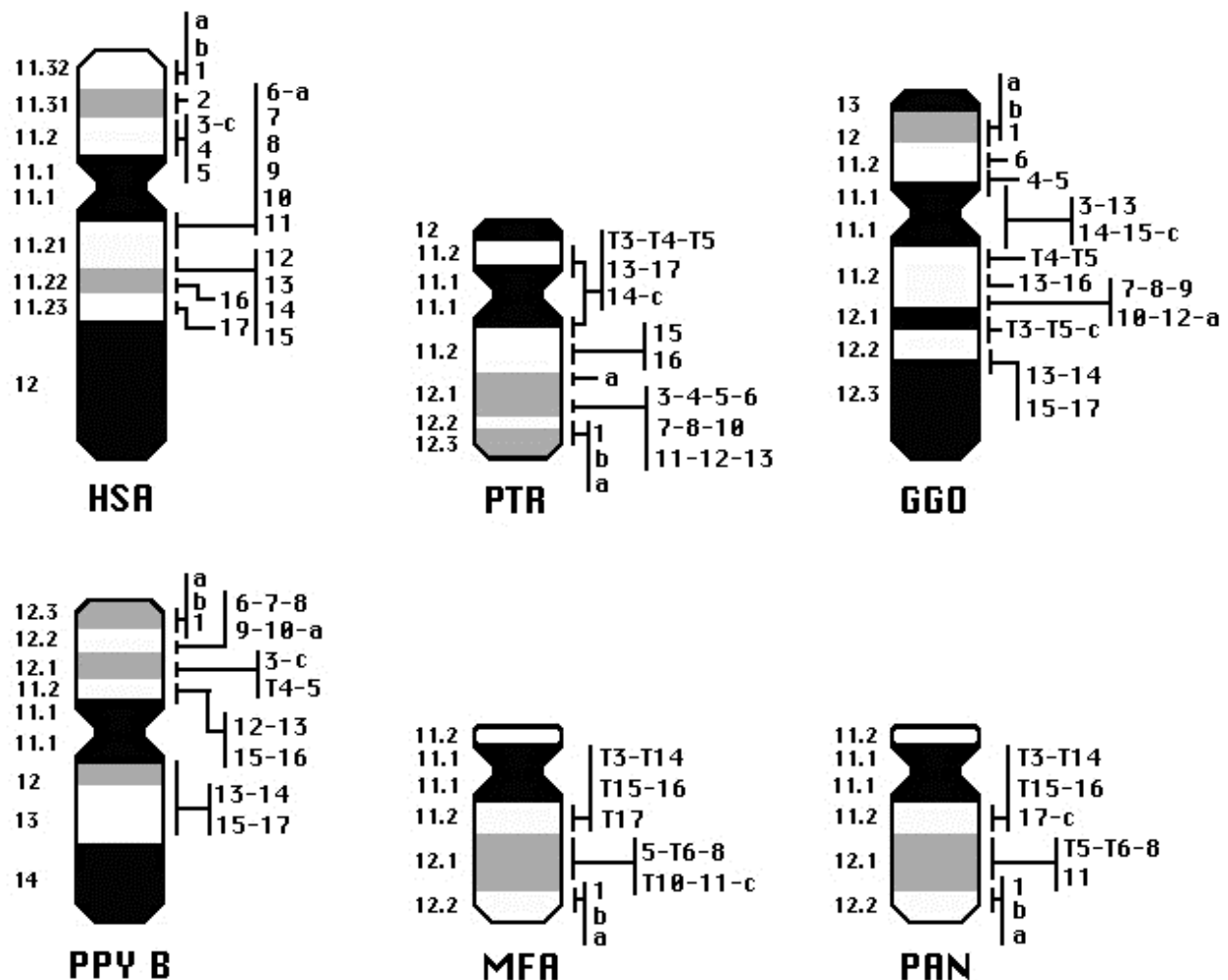


Figure 2

The Figure schematically summarizes the FISH results: figures and letters on the right of each Y chromosome refer to the probes listed in Table 1. A figure alone indicates that the signal has been detected by both T-DNA and A-DNA. "T" preceding the figure indicates that the signal has been detected only by T-DNA of that YAC. In non-human primates the relative order among probes grouped by a segment is unknown. Some YACs failed to hybridize to a specific species. YAC #9 in MFA and PAN, and YAC #7 in PAN: not done.

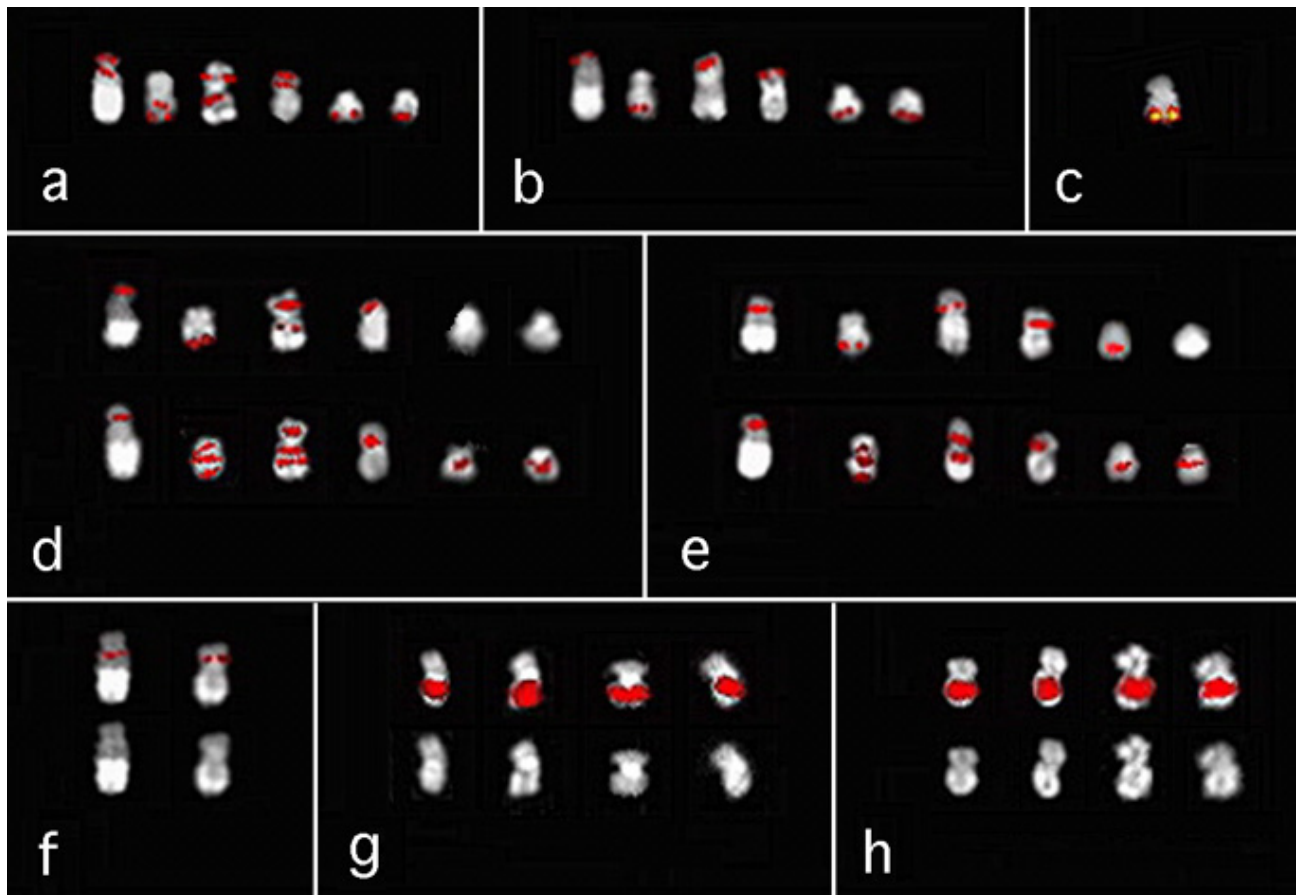


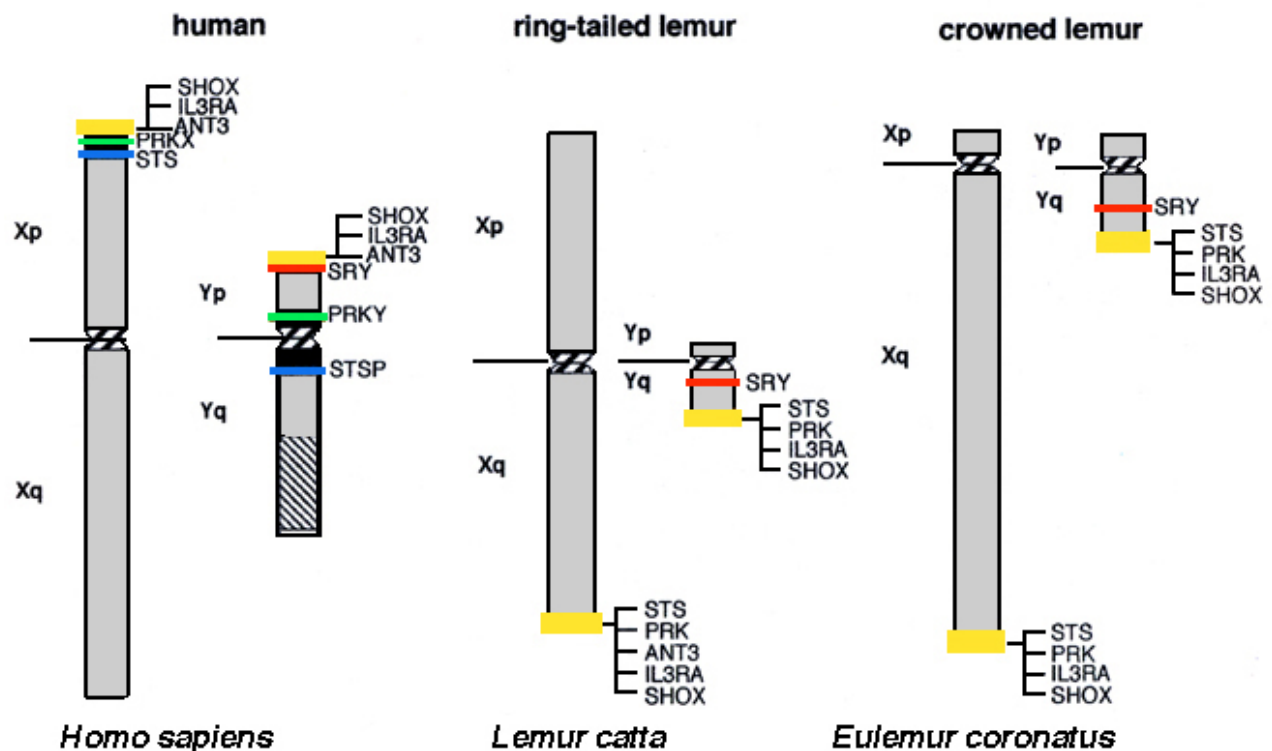
Figure 3

Figures 3a and 3b show DAPI banded Y chromosomes after FISH experiments using probes c219a5 (PAB, 3a) and pHu14 (SRY, 3b). From the left: HSA, PTR, GGO, PPY, MFA, and PAN. A large heterochromatic block is present on the Ypter of GGO chromosome Y. Figure 3c shows co-hybridization examples of probes c219a5 (red signals) and pHu14 (green signals) on PTR. Note that in PTR the c219a5 detects, in elongated chromosomes, two distinct signals (see Fig. 3a). Figures 3d and 3e show examples of discrepancies between the signals revealed by T-DNA (lower row) and A-DNA (upper row), after hybridization with YACs #3 and #5 respectively. In both Figures the order, from left, is the following: HSA, PTR, GGO, PPY, MFA, PAN. Fig. 3f shows HSA and GGO Y chromosomes hybridized with YAC #6, which is located on Yq in HSA and on Yp in GGO. Chromosomes are reported with and without signals for more efficient identification of the centromere. In Fig. 3g and 3h are reported four examples of Y chromosomes of two distinct PPY individuals (PPY1 and PPY2). PPY2 shows an increased heterochromatic region, which allows a better identification of p and q arms. Each chromosome Y is reported twice: with (above), and without the signal (below), for better identification of the centromere.

Sintesi di

Transposition of SRY into the ancestral pseudoautosomal region creates a new pseudoautosomal boundary in a progenitor of simian primates.

Birgitta Gläser, Daniel Myrtek, Yves Rumpler, Katrin Schiebel, Marcel Hauwy, Gudrun A. Rappold, Werner Schempp *Human Molecular Genetics* 1999 Vol.8 n.11



genes map close to the PAR, although separated from the pseudoautosomal genes at least by the SRY and ZFY genes (14). It can furthermore be shown that homologues of the human pseudoautosomal genes ANT3 and CSF2RA, as well as homologues of the proximal Xp22 genes PRK and STS, map to the meiotic pairing regions of dog and sheep (17). Indeed, this indicates that ANT3, CSF2RA, PRK and STS could well be part of an extended ancestral PAR in non-primate eutherian mammals. Moreover, the close proximity of SRY to the PABY in all simians investigated (15, 16), and the clearly visible chromosomal distance between SRY and the PABY in dog (18) and sheep (19), lends support to the view that, in an ancestral primate PAR, it was the transposition of SRY distal to STS and PRK that excluded these loci from the region of X-Y crossing-over and gave rise to the human PABY. The timing of this SRY transposition event during early primate lineage remains to be determined.

So far only in one study have human Xp22 genes been comparatively mapped on chromosomes of prosimian lemurs suggesting an autosomal location of STS and ANT3 homologues in two prosimian lemurs (20). In analogy to the translocations to autosomes of the mouse Csf2ra and Il3ra genes (21, 22), these autosomal locations of STS and ANT3 were then interpreted as partial loss of the PAR in prosimians (23). However, these autosomal hybridizations of STS and ANT3 have to be interpreted with caution, as only human-derived gene sequences have been hybridized to chromosomes of such distantly related lemur species. Moreover, and most importantly, there were no data for the location of the SRY gene on prosimian Y chromosomes.

Figure 1. Schematic comparison of the FISH mapping data of genes on X and Y chromosomes of human, ring-tailed lemur and crowned lemur. Brackets that connect the genes within the yellow coloured meiotic X-Y pairing segment (PAR) indicate that a discrimination of these loci was not possible by FISH, thus the relative order is unknown in lemurs. Note that PRK and STS are X- and Y- specific in the human, but map within the PAR in lemurs, and that SRY maps close to the PAR in human but distant from the PAR in lemurs.

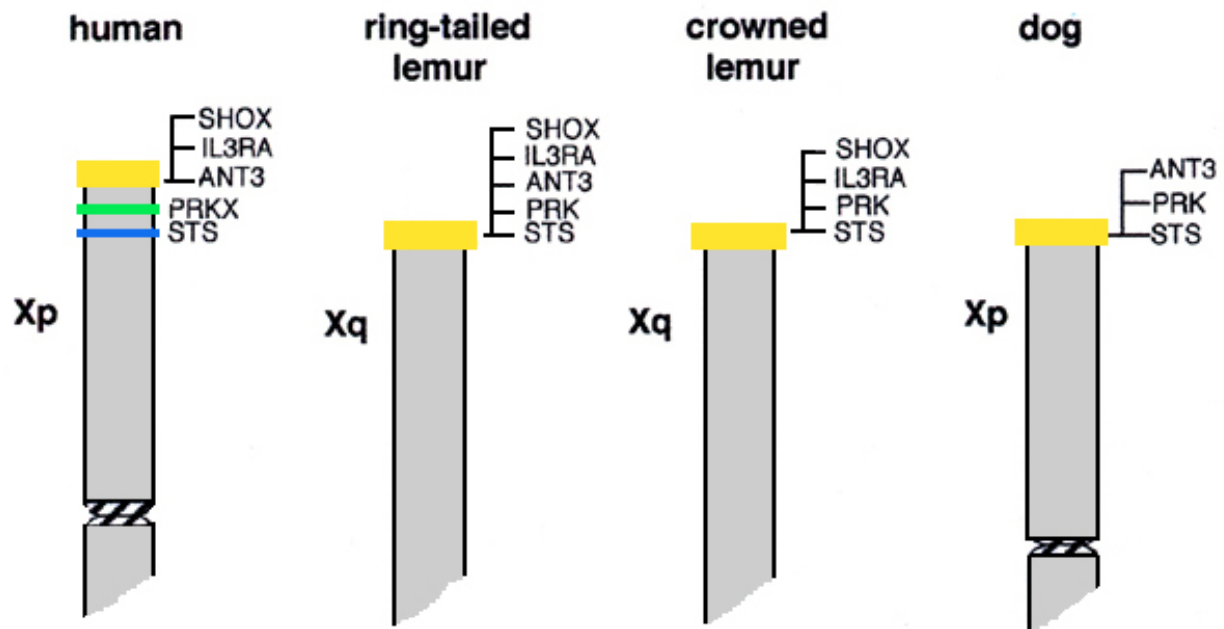


Figure 2. Schematic comparison of FISH mapping data of genes within the human Xp22 segment with those of corresponding X-chromosomal segments in lemurs and dog. Brackets that connect the genes within the yellow coloured meiotic X-Y pairing segment (PAR) indicate that a discrimination of these loci was not possible by FISH, thus the relative order is unknown in lemurs and dog. Note that pseudoautosomal genes including STS and PRK in lemurs and dog show co-localization within a rather small telomeric R-band on the X chromosomes in the two lemur species and the dog.

Chromosomal mapping of the lemur-specific STS probe by FISH unequivocally located STS into the early replicating telomeric long arm segments of the X and Y chromosomes in the crowned lemur (*E. coronatus*) and the ring-tailed lemur (*Lemur catta*). Moreover, co-localization of the human pseudoautosomal genes SHOX, IL3RA and ANT3 as well as of the proximal Xp22-linked gene PRK, was demonstrated within these distal Xq and Yq regions of both lemur species. Altogether, these locations fall within the meiotic X-Y pairing region where a synaptonemal complex forms and crossing-over occurs during the pachytene stage of spermatogenesis in the ring-tailed lemur (25). Likewise, these locations are in accordance with former mapping data for the human-derived pseudoautosomal STIR sequences on the telomeric long arm segments of lemur X and Y chromosomes (27). Thus, the authors conclude that STS and PRK, together with SHOX, IL3RA and ANT3, are still pseudoautosomal in both lemur species, and therefore are part of the ancestral PAR of eutherian mammals.

Lemur-specific SRY maps at a distinct and clearly visible distance from the PAR on Y chromosomes of the crowned lemur and the ring-tailed lemur. From two-colour FISH experiments the physical distance between the SRY and the PAR can roughly be estimated to be at least 5 Mb on the Y chromosomes. As summarized in Table 1, in dog (18) and sheep (19) SRY also maps distant from the PABY. Furthermore, as in lemurs, homologues of STS, PRK and ANT3 map to the PAR of the dog, and homologues of STS and CSF2RA to the PAR of the sheep (17). In contrast to dog, sheep and

prosimian lemurs, for the human and all other simian primates investigated, a close proximity of the SRY gene to the PABY can be demonstrated. Moreover, neither STS nor PRK homologues are pseudoautosomal but, rather, map within X- and Y-specific regions of these simian primates (15, 16).

Table 1. Comparative mapping position of human X/Y homologous loci and SRY in a variety of eutherian mammalian species

| Gene locus | Humana | Lemur | Dog | Sheep |
|------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------|
| SHOX | PAR | PAR | | |
| CSF2RA | PAR | | | PAR |
| IL3RA | PAR | PAR | | |
| ANT3 | PAR | PAR | PAR | |
| XG. | Spans PABX Deleted in PABY | | | |
| ARSE | Xp22.33 (Yq11.21) | | | |
| PRK | Xp22.33 (Yp11.2) | PAR | PAR | |
| STS | Xp22.31 (Yq11.21) | PAR | PAR | PAR |
| KAL | Xp22.31 (Yq11.21) | | | |
| FXI | X-specific Xp22.31 | | | |
| AMEL | Xp22.2 Yp11. 2 | | | |
| SRY | Yp11.32 Close PAB | Yq proximal Distant PABY | Ycentrom Distant PABY | Yq PAB |

Pseudogenes are shown in parentheses

Interestingly, sequence divergence of the HMG box of the SRY gene between the crowned lemur and the human can be estimated to be 12.5%. Taking into account a rate of sequence divergence of 0.24% per million years for two genetically isolated loci (29), DNA sequence divergence of the HMG box of the SRY genes of the human and the prosimian lemur goes back ~52 million years.

Phylogenetically, this time period falls between the presumed branching of the prosimian lineages and the New World monkey lineage from the human lineage (30).

Therefore, they conclude that a Y chromosomal transposition of SRY into the ancestral eutherian PAR in a simian progenitor some 52 million years ago has defined a new PABY. By this transposition, STS and PRK, amongst other genes, were moved out of the PAR making them Y-specific and thus susceptible to rearrangements or deterioration on the Y chromosomes in simian primates including the human.

Phylogenetic timing of major events leading to the present-day human PAR

In a broader evolutionary context it is believed that the mammalian X and Y chromosomes have evolved from an autosomal pair (31). The proto X retained and the proto Y chromosome gradually lost most ancestral genes only after the proto Y chromosome acquired a strict sex-determining function in the form of the SRY gene. Moreover, substantial experimental data suggest that the ancestral sex chromosomes of eutherian (placental) mammals resulted only after fusion with other autosomal segments comprising the ancestral eutherian PAR (32).

The experimental findings that all human pseudoautosomal genes known at present are either located autosomally or cannot be detected in the mouse genome (33, 34) makes it very unlikely that the mouse PAR reflects this ancestral eutherian situation (Table 1).

As outlined in a phylogenetic tree in Figure 3, the authors suggest that the ancestral eutherian PAR is represented by the dog (carnivores) and the sheep (artiodactyls), and the gene content of this

ancestral eutherian PAR is still conserved in the prosimian lemur and loris lineage. Although not yet proven, Southern blot data make it very likely, too, that STS is still pseudoautosomal in prosimian tarsiers (7). Molecular and FISH mapping data strongly indicate that only after the branching of the prosimian lineages did the Y-chromosomal transposition of SRY into this ancestral eutherian PAR occur in a common ancestor of simian primates creating a new PABY just within the XG gene (38). By means of that transposition event the close proximity of SRY to the PABY in simian resulted. At the same time, several formerly pseudoautosomal genes including STS and PRK as well as KAL and ARSE were excluded from recombination and therefore became X and Y specific. On the Y chromosome these genes are now subject to further species-specific rearrangements, and/or to mutational degeneration in simian primates including the human (14). In all species of New World monkeys investigated so far, STS and KAL genes are not detectable on their Y while retained on their X chromosomes (7, 10, 11), leading to the assumption that this deletion must have occurred shortly after the branching of the NewWorld monkey lineage.

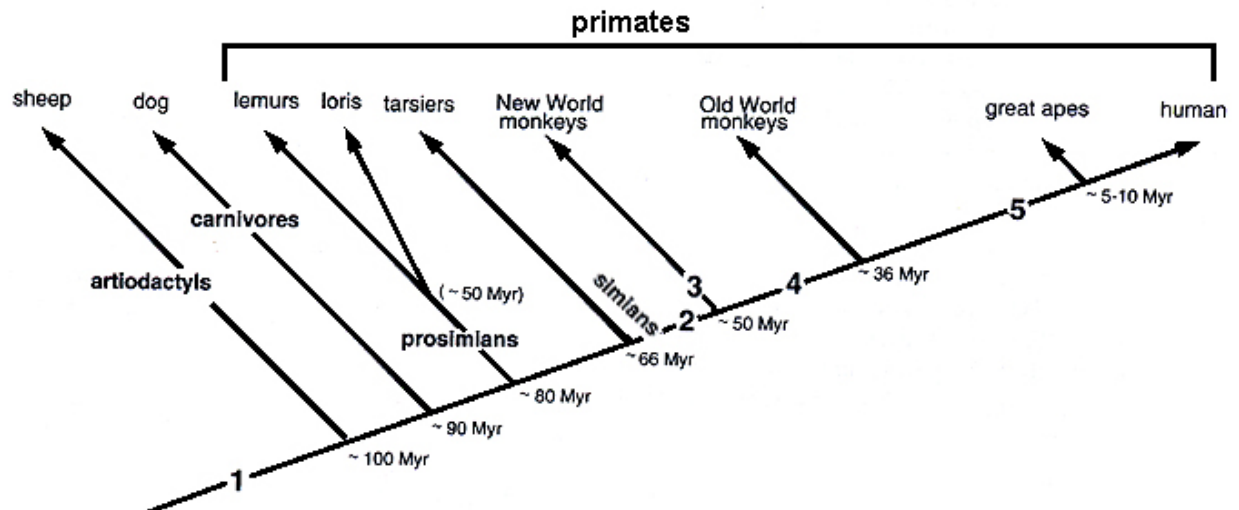


Figure 3. Phylogenetic tree of the order primates modified after Martin (30); phylogenetic branching times of sheep (order artiodactyls) and dog (order carnivores), that were chosen as an outgroup, are according to Novacek (36). Major events of evolutionary modelling of the present-day human PAB are numbered. 1, ancestral eutherian PAR including STS and PRK in addition to human pseudoautosomal genes; SRY maps distant from PABY; 2, transposition of SRY into the ancestral PAR distal to STS and PRK has defined a new PAB in a simian progenitor; by this transposition STS and PRK, amongst other genes, were excluded from the X-Y crossing-over process, and SRY got in close proximity to PABY; 3, deletion of STS and KAL from the Y chromosome in New World monkeys (7, 10); 4, degeneration of STS, KAL and ARSE to pseudogenes on the Y chromosomes; 5, insertion of an Alu repeat element into the proximal PAR on the Y chromosome, redefining the PAB at a position 220 bp more distal (38); Myr, million years before present.

An average sequence divergence of 12% with no significant differences between intronic and exonic regions of STS and its Y-linked pseudogene homologue STSP has been reported (7). These data strongly suggest that the Y-linked homologue lost its function soon after it started to diverge from the STS gene some 50 million years ago in a common ancestor of Old World monkeys, great apes and the human. In fact, the rates of the average sequence divergence between X and Y copies reported for the human KAL (10, 11) and ARSE (13) genes differ from the STS rate and point to independent mutational events leading to deterioration and pseudogene formation of these genes on the Y chromosomes, respectively.

The present-day PABY in human is defined by an Alu repeat element that is inserted, on the Y chromosome only, in a common ancestor of great apes and human (36-38).

The SRY transposition into the ancestral eutherian PAR moves several formerly pseudoautosomal genes out of the ancestral PAR making them Y-specific and subject to rearrangements and deterioration on the Y chromosomes in simian primates including the human. Likewise, on the X-chromosome these formerly pseudoautosomal genes like STS, KAL, ARSE and PRK were shuffled into the X-specific part of the Xp22-segment in simian primates. As shown by comparative FISH mapping data, the physical distances and arrangements of these Xp22 genes on the X chromosomes of extant simian primates do by no means mirror their physical distances and arrangements within the PAR in prosimian lemurs, and non-primate eutherians like dog and sheep. Rather, only after the SRY transposition event did these formerly pseudoautosomal Xp22-genes become physically rearranged on a progenitor X chromosome of the simian lineage. By recombination in female meiosis this X-chromosomal arrangement of Xp22 genes proximal to the PAR remained highly conserved in all extant simian primates including the human.

References

1. Burgoyne, P.S. (1982) Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum. Genet.*, 61, 85-90.
2. Gabriel-Robez, O., Ratomponirina, C., Dutrillaux, B., Carré-Pigeon, F. and Rumpler, Y. (1990) Deletion of the pseudoautosomal region and lack of sex chromosome pairing at pachytene in two infertile men carrying an X;Y translocation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 54, 39-42.
3. Mohandas, T.K., Speed, R.M., Passage, M.B., Yen, P.H., Chandley, A.C. and Shapiro, L.J. (1992) Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with deletion of distal Xp. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 526-533.
4. Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K., Sutcliffe, M.J. and Palmer, S.J. (1992) Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal 'spermiogenesis' gene mapping to the long arm. *Cell*, 71, 391-398.
5. Rappold, G.A. (1993) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.*, 92, 315-324.
6. Fraser, N., Ballabio, A., Zollo, M., Persico, G. and Craig, I.W. (1987) Identification of incomplete coding sequences for steroid sulphatase on the human Y chromosome: evidence for an ancestral pseudoautosomal gene? *Development*, 101 (suppl.), 127-132.
7. Yen, P.H., Marsh, B., Allen, E., Tsai, S.P., Ellison, J., Connolly, L., Neiswanger, K. and Shapiro, L.J. (1988) The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y-encoded pseudogene: evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. *Cell*, 55, 1123-1135.
8. Ellis, N.A. and Goodfellow, P.N. (1989) The mammalian pseudo- autosomal region. *Trends Genet.*, 5, 406-410.
9. Franco, B., Guioli, S., Pragliola, A., Incerti, B., Bardoni, B., Tonlorenzi, R., Carrozzo, R., Maestrini, E., Pieretti, M., Taillon-Miller, P., Brown, C.J., Willard, H.F., Lawrence, C., Persico, M.G., Camerino, G. and Ballabio, A. (1991) A gene deleted in Kallman's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal pathfinding molecules. *Nature*, 353, 529-536.
10. del Castillo, J., Cohen-Salmon, M., Blanchard, S., Lutfalla, G. and Petit, C. (1992) Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nature Genet.*, 2, 305-310.
11. Incerti, B., Guioli, S., Pragliola, A., Zanaria, E., Borsani, G., Tonlorenzi, R., Bardoni, B., Franco, B., Wheeler, D., Ballabio, A. and Camerino, G. (1992) Kallmann syndrome gene on the X and Y chromosomes: implications for evolutionary divergence of human sex chromosomes. *Nature Genet.*, 2, 311-314.
12. Klink, A., Schiebel, K., Winkelmann, M., Rao, E., Horthemke, B., Lüdecke, H.J., Claussen, U., Scherer, G. and Rappold, G.A. (1995) The human protein kinase gene PKX1 on Xp22.3 displays Xp/Yp homology and is a site of chromosomal instability. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 869-878.
13. Meroni, G., Franco, B., Archidiacono, N., Messali, S., Andolfi, G., Rocchi, M. and Ballabio, A. (1996) Characterization of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggests gene duplications in an ancestral pseudoautosomal region. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 423-431.
14. Gläser, B., Grützner, F., Taylor, K., Schiebel, K., Meroni, G., Tsioupra, K., Pasantes, J., Rietschel, W., Toder, R., Willmann, U., Zeitler, S., Yen, P., Ballabio, A., Rappold, G. and Schempp,

- W. (1997) Comparative mapping of Xp22 genes in hominoids-evolutionary linear instability of their Yhomologues. *Chromosome Res.*, 5, 167-176
15. Gläser, B., Grützner, F., Willmann, U., Stanyon, R., Arnold, N., Taylor, K., Rietschel, W., Zeitler, S., Toder, R. and Schempp, W. (1998) Simian Y chromosomes: species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY. *Mamm. Genome*, 9, 226-231.
 16. Archidiacono, N., Storlazzi, C.T., Spalluto, C., Ricco, A.S., Marzella, R. and Rocchi, M. (1998) Evolution of chromosome Y in primates. *Chromosoma*, 107, 241-246.
 17. Toder, R., Gläser, B., Schiebel, K., Wilcox, S.A., Rappold, G., Graves, J.A.M. and Schempp, W. (1997) Genes located in and near the human pseudoautosomal region are located in the X-Y pairing region in dog and sheep. *Chromosome Res.*, 5, 301-306.
 18. Olivier, M., Breen, M., Binns, M.M. and Lust, G. (1999) Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosome Res.*, 7, 223-233.
 19. Cui, X., Kato, Y., Sato, S. and Sutou, S. (1996) Mapping of the sheep and goat Sry genes to the long arms of the Y chromosomes by the FISH method. *Anim. Sci. Technol. (Jpn)*, 67, 333-337.
 20. Toder, R., Rappold, G.A., Schiebel, K. and Schempp, W. (1995) ANT3 and STS are autosomal in prosimian lemurs: implications for the evolution of the pseudoautosomal region. *Hum. Genet.*, 95, 22-28.
 21. Distèche, M.C., Brannan, C.J., Larsen, A., Adler, A., Schorderet, D.F., Gearing, D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Park, L.S. (1992) The human GM-CSF receptor subunit gene is autosomal in mouse. *Nature Genet.*, 1, 333-336.
 22. Milatovich, A., Kitamura, T., Miyajima, A. and Francke, U. (1993) Gene for the alpha-subunit of the human interleukin-3 receptor (IL3RA) localized to the X-Y pseudoautosomal region. *Am. J. Hum. Genet.*, 53, 1146-1153.
 23. Graves, J.A.M., Wakefield, M.J. and Toder, R. (1998) The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1991-1996.
 24. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhan, Z., Miller, W. and Lipman, D.F. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
 25. Moses, M.J., Karatsis, P.A. and Hamilton, A.E. (1979) Synaptonemal complex analysis of heteromorphic bivalents in Lemur hybrids. *Chromosoma*, 70, 141-160.
 26. Dutrillaux, B. (1979) Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum. Genet.*, 48, 251-314.
 27. Schempp, W., Weber, B. and Müller, G. (1989) Mammalian sex-chromosome evolution: a conserved homologous segment on X and Y chromosomes in primates. *Cytogenet. Cell Genet.*, 50, 201-205.
 28. Whitfield, L.S., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N. (1993) Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature*, 364, 713-715.
 29. Sibley, C.G. and Ahlquist, J.E. (1987) DNA hybridization evidence of hominoid phylogeny: results from an expanded data set. *J. Mol. Evol.*, 26, 99-121.
 30. Martin, R.D. (1993) Primate origins: plugging the gaps. *Nature*, 363, 223-234.
 31. Ohno, S. (1967) Sex Chromosomes and Sex-linked Genes. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 32. Graves, J.A.M. (1995) The origin and function of the mammalian Y chromosomes and Y-borne genes-an evolving understanding. *Bioessays*, 17, 311-321.
 33. Ellison, J.W., Li, X., Francke, U. and Shapiro, L.J. (1996) Rapid evolution of human pseudoautosomal genes and their mouse homologs. *Mamm. Genome*, 7, 25-30.
 34. Blaschke, R.J. and Rappold, G.A. (1997) Man to mouse-lessons learned from the distal end of the human X chromosome. *Genome Res.*, 7, 1114-1117.
 35. Novacek, M.J. (1992) Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*, 356, 121-125.
 36. Ellis, N., Yen, P., Neiswanger, K., Shapiro, L.J. and Goodfellow, P.N. (1990) Evolution of the pseudoautosomal boundary in old world monkeys and great apes. *Cell*, 63, 977-986.

37. Ellis, N.A., Ye, T.Z., German, J., Goodfellow, P.N. and Weller, P. (1994) Cloning of PBDX, a MIC2-related gene that spans the pseudoautosomal boundary on chromosome Xp. *Nature Genet.*, 6, 394-400.
38. Weller, P.A., Critcher, R., Goodfellow, P.N., German, J. and Ellis, N.A. (1995) The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene. *Hum. Mol. Genet.*, 1, 587-591.
39. Conary, J.T., Lorkowski, G., Schmidt, B., Pohlmann, R., Nagel, G., Meyer, H.E., Krentler, C., Cully, J., Hasilik, A. and von Figura, K. (1987) Genetic heterogeneity of steroid sulfatase deficiency revealed with cDNA for human steroid sulfatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144, 1010-1017.
40. Ried, T., Lengauer, C., Cremer, T., Wiegant, J., Raap, A., van der Ploeg, M., Groitl, P. and Lipp, M. (1992) Specific metaphase and interphase detection of the breakpoint region in 8q24 of Burkitt lymphoma cells by triple-color fluorescent in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 4, 69-74.
41. Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., Rump, A., Niesler, B., Mertz, A., Muroya, K., Binder, G., Kirsch, S., Winkelmann, M., Nordsiek, G., Heinrich, U., Breuning, M.H., Ranke, M.B., Rosenthal, A., Ogata, T. and Rappold, G.A. (1997) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genet.*, 16, 54-63.
42. Schiebel, K., Weiss, B., Wöhrle, D. and Rappold, G.A. (1993) A human pseudoautosomal gene, ADP/ATP translocase, escapes X-inactivation whereas a homologue on Xq is subject to X-inactivation. *Nature Genet.*, 3, 82-87.
43. Schempp, W., Binkele, A., Arnemann, J., Gläser, B., Ma, K., Taylor, K., Toder, R., Wolfe, J., Zeitler, S. and Chandley, A.C. (1995) Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmid in man and hominoid apes. *Chromosome Res.*, 3, 227-234.

Sintesi di

The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes.

Jennifer A. M. Graves, Matthew J. Wakefield and Roland Toder. Human Molecular Genetics 1998 Vol7 N13

The human pseudoautosomal regions

The human X and Y chromosomes are morphologically and genetically distinct. The X is large and euchromatic, and on the basis of its size would be expected to contain 3000-4000 genes, whereas the Y is small and heterochromatic, and contains, at last count, ~30 (1, 2). However, at either end of the sex chromosomes are X-Y homologous regions. These pseudoautosomal regions (PARs) pair regularly at male meiosis and undergo recombination. PAR1 at the tips of the short arms, is 2.6 Mb long and contains eight genes (PGPL, SHOX, CSF2RA, IL3RA, ANT3, ASMT, XE7 and MIC2) and the 5' region of a ninth (XGA) (3, others reviewed in ref. 4). Only two known genes, SYBL1 and IL9R, have so far been discovered on the shorter (320 kb) PAR2 at the tips of the long arms (5-7).

The part of the differential region in Xp22.3 just proximal to PAR1 also contains numerous genes with active or inactive homologues on the Y (X-Y shared genes). STS, ARSD and ARSE, PRKX, GS1, KAL and GS2 all detect closely related pseudogenes on the Y whereas AMELX, and the more proximal ZFX, have active homologues (8). Not surprisingly, since their dosage is equal in males and females, PAR and active X-Y shared genes are not subject to X chromosome inactivation in females. Even X-linked genes, like STS, which recognize only pseudogenes on the Y, are exempt from X inactivation. The PAR2 gene IL9R, which is expressed from the Y copy, also escapes inactivation on the X (9). However, the Y copy of SYBL1 is not expressed, and the X copy is subject to inactivation (10).

Because deletion of PAR1 results in failure of pairing and male sterility (11), PAR1 has been thought to be essential for meiotic pairing and male fertility. To discover whether this requirement is universal, and to what extent the gene content of the PAR is relevant to its function, it has been instructive to compare the PARs of different mammal species.

Gene content of the par in other eutherian mammals

The PAR of eutherian ('placental') mammals has a surprisingly variable gene content for a region credited with such a critical function (Fig. 1). There is variation even within primates, and the mouse and human PARs are completely non-homologous.

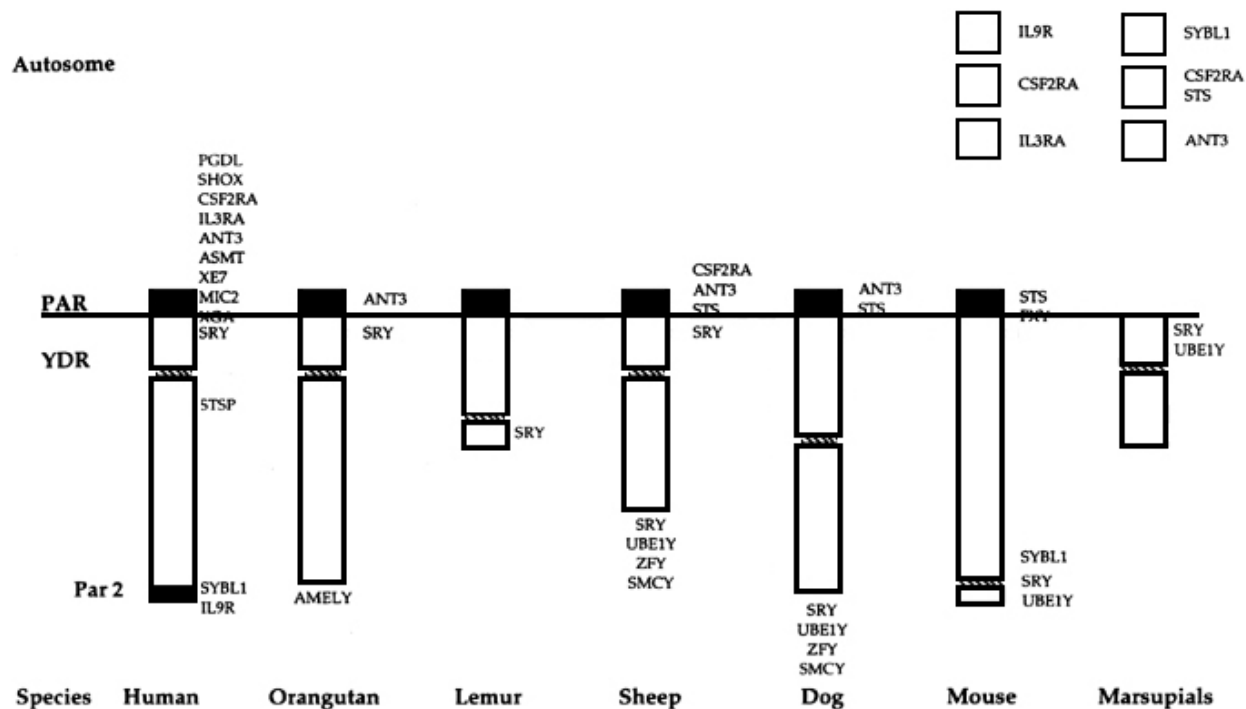


Figure 1. Representation of the gene content of the pseudoautosomal regions (PARs) of the Y chromosomes of different therian mammals: eutherians (human, orang-utan, lemur, sheep, dog, mouse) and marsupial (tammar wallaby). With the exception of the SRY gene which determines male sex, only genes which are present in the PAR of at least one therian species are shown.

However, the overlapping sets of genes within and near the PARs in different eutherian species suggest that they all represent relics of a larger ancestral PAR which once extended from Xp22 to Xpter. It included human X-Y shared genes such as ZFX/Y, AMELX/Y, PRKX/Y and STS/STSP, as well as the present human PAR genes. This explains why the pairing segments of carnivore and artiodactyl sex chromosomes are larger than the human PAR and apparently include STS and PRKX as well as ANT3 and CSF2RA (12).

The ~2.0 Mb PAR at the ends of the mouse Xq and Yq contains none of the human PAR genes. Only one active gene, Sts, has been detected in the PAR (13, 14). The newly recognized Mid1(Fxy) gene (whose human homologue lies near the PAR on the X and has no Y partner) spans the pseudoautosomal boundary on the mouse X and detects a truncated partner at the boundary of the PAR on the Y (15-18). In mouse, as in human, Zfx has homologues on the Y. All these genes, as well as other human Xp genes such as AMELX and CLC4, lie in the same order on the human and mouse X. These observations can also be explained by the hypothesis that the whole human Xp22-Xpter region was once part of an ancient PAR, whose boundary has moved to different extents in different species.

However, other observations require gain or loss of regions from the PAR to autosomes. The autosomal location of IL3RA and CSF2RA in mouse (20, 21), could be explained either by differential addition or loss from this ancestral PAR. The absence of these genes from the X and Y in mice, and doubts about the homology of human and mouse Sts, initially suggested that the whole CSF2RA-STS region might have been added only recently to the primate sex chromosomes. However, the recent finding of human PAR and Xp22.3 genes within the pairing segment on the tips of the X and Y in carnivores and ungulates, and the demonstration that the cloned mouse Sts is, after all, homologous to human STS, means that this region must have been a part of the sex chromosomes for at least 80 million years (12, 14). Parts of the PAR have therefore been lost independently in rodents.

The question of the origin of the human PAR2 has been addressed recently by comparative mapping of PAR2 sequences and genes in other mammals. A sequence now known to lie within human PAR2 was shown by Southern analysis to be X-specific in great apes (22), and the sequence at the PAR2 boundary on the X and Y suggests that illegitimate recombination between LINEs resulted in a transposition from the X to the Y (23).

A mouse homologue of SYBL1 maps close to the centromere of the mouse X (10). These data imply that PAR2 was part of the original eutherian X, but recently was transposed to the Y in the primate lineage. However, the more distal IL9R is autosomal in mouse (9), so it may also have been part of an ancient X chromosome and subsequently been lost in mouse, or may be part of a very recent addition to both sex chromosomes in the primate lineage. Thus the variation in PAR gene content reflects the stochastic processes of differential addition, rearrangement and Y degradation. The inconsistent gene contents of the PAR in different eutherian species argues that the PAR plays no sequence-dependent role in fertility.

Since the suggestion of Koller and Darlington (24) that the mammalian X and Y chromosomes share a pairing region and the demonstration of pairing between the human X and Y (25), it has been expected that the PAR serves a critical function in mammalian spermatogenesis. Indeed, there is much evidence that XY pairing is essential for spermatogenesis in mice and humans (11, 26), and non-homology of this region may contribute to male infertility in species hybrids which obey Haldane's rule (27). However, there are some rodent species which apparently accomplish meiosis without the benefit of homologous pairing (e.g. ref. 28), and the necessity for homologous pairing has been challenged even for mouse and man (29).

The absence of a PAR is most striking in marsupials. Cytological work first led to the conclusion that the small X and Y of Australian and American marsupials failed to undergo homologous pairing at male meiosis. The condensed X and Y remained separate until mid-pachytene, when they formed end-to-end attachments but never underwent synapsis or crossing over (30, 31). Since it remained possible that chiasmata in the condensed sex chromosomes evaded detection, X-Y homology in marsupials recently was re-investigated using chromosome painting in a dasyurid species which has a minimal X and a tiny Y. When DNA from a female *Sminthopsis macroura* was painted onto a male chromosome spread, the X chromosome and autosomes labelled strongly, but the Y remained completely unlabelled. Conversely, painting with the microdissected Y produced no signal over the X or autosomes. Thus there is no molecular evidence for a PAR in this species. Even in kangaroo species whose X and Y share recently added heterochromatic regions (32), these do not pair.

The absence of a PAR and of homologous pairing between the marsupial X and Y apparently causes no disruption to regular segregation at meiosis, implying that a PAR is not a universal necessity for mammalian sex chromosome pairing and male fertility.

Pursuing the origin of the human PAR into even earlier mammalian ancestors requires comparative mapping between more distantly related mammal groups. Marsupials and monotremes diverged independently from eutherian mammals ~130 and 170 MYrBP respectively.

Comparisons have already provided valuable insights into the origins of regions of the human sex chromosomes. Marsupials have a small basic X and a tiny Y, which, do not undergo homologous pairing. Monotremes are just the opposite, having large sex chromosomes which pair over the entire short arm of the X and long arm of the Y (33). Genes on the long arm and pericentric region of the human X lie on the X in all three mammal groups (8). This X conserved region (XCR) therefore represents an ancient X in a common ancestor at least 170 million years ago. The presence of three human and/or mouse X-Y shared genes (RPS4X/Y, SMCX/Y and Ube1x/y) on the X and Y in marsupials implies that at least part of this ancient X was also shared with the ancient Y. The large pairing region of the monotreme X and Y chromosomes contains several classic human X-linked genes with no Y homologues in any eutherian species (34), as well as the UBE1Y gene (35) which is present on the differentiated regions of the X and Y in all therian mammals except primates. This implies that at least some of the conserved region of the X was originally pseudoautosomal in an ancestral mammal.

In contrast, genes on the differential region of Xp distal to the fusion point at Xp11.23 (36) are autosomal in marsupials and monotremes, lying in at least two conserved clusters. Since marsupials and monotremes diverged independently from eutherians, this implies that most of the human Xp was added to the eutherian X after the divergence of eutherians and marsupials 130 MYrBP, but before the eutherian radiation 80 MYrBP. This X added region (XAR) harbours most of the X-Y shared genes, implying that addition must have been made to both the X and Y. The human X and Y is proposed to have evolved by cyclical additions to the PAR, offset by progressive degradation of the Y chromosome (8).

The demonstration that the eutherian X is composed of ancient and recently added regions raises questions concerning the origin and the function of the human PARs. Are the PARs merely parts of the XAR which, for reasons of their recent addition, have not yet been degraded on the Y?

Alternatively, are the PARs ancient features of the mammalian X and Y chromosomes, conserved through evolution because they maintain equal dosage of some critical PAR gene(s) between males and females, or sequences which perform a function in meiotic pairing and male fertility?

The recent finding that cloned marsupial homologues of human and mouse pseudoautosomal genes CSF2RA, ANT3 and STS are autosomal in the tammar wallaby (37) implies that the eutherian PAR is a recent addition. Marsupial CSF2RA and STS co-localized with seven other human Xp genes within a single autosomal cluster in marsupials, implying that the human PAR was part of the larger autosomal addition to the X and Y 130-80 MYrBP. Marsupial ANT3 maps separately, so it may represent a region independently added to the eutherian PAR, or rearranged in marsupials. The authors conclude, therefore, that the human PAR1 was part of the autosomal region(s) transferred relatively recently to the eutherian X and Y chromosomes.

The origin of PAR2 is more ambiguous. [\[Vedo oltre gli ultimi tre articoli per i dettagli su PAR2\]](#) SYBL1 recently was mapped to the distal region of Xq in the marsupial *Potorous tridactylis* (10), and it was concluded that the PAR2 was part of the XCR that represents the original mammalian sex chromosomes. However, the long (satellited) arm of the potoroo X is actually an autosome in disguise. The potoroo is one of several marsupials in which a recent X-autosome fusion has produced a classic XY1Y2 sex chromosome system (38). Xq pairs with Y2, which represents the original autosome (Fig. 2). [\[N.B. questa traslocazione fra un autosoma e uno dei cromosomi sessuali e' presente anche in una scimmia del vecchio mondo :*Presbytis cristata* e nel genere *Alouatta*, scimmia del nuovo mondo. In queste scimmie si parla di X1X2Y1Y2. In questi organismi il numero cromosomico non varia fra maschi e femmine, ma i maschi hanno l' autosoma 1 di origine materna che prende il nome di X2 senza l'omologo paterno in quanto questo e' diviso in due parti per formare Y1 e Y2. I maschi ricevono dal padre Y1 e Y2 e in questo modo hanno sia la componente autosomica che le sequenze Y specifiche. Le femmine ricevono dal padre la X1, che e' la vera X e il cromosoma 1 \(X2\)\]](#)

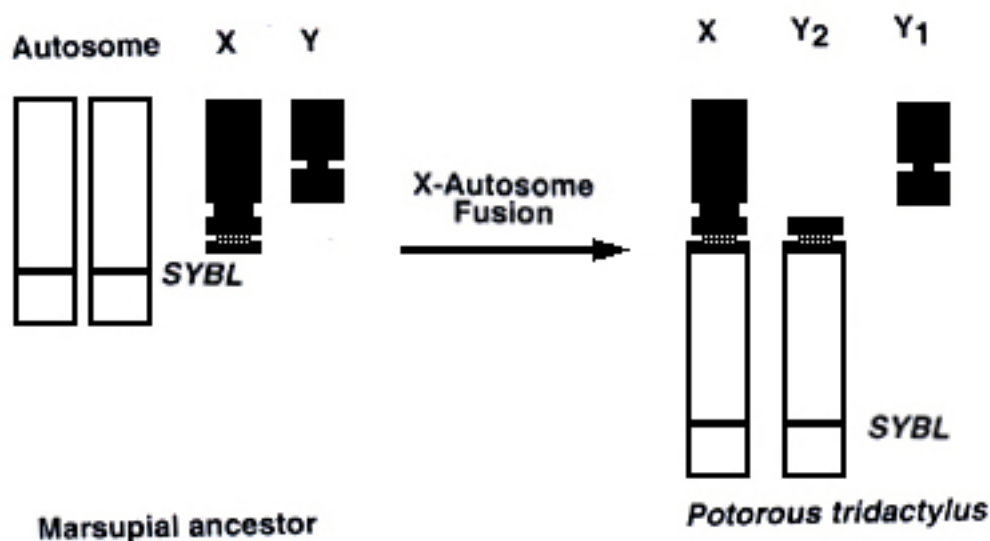


Figure 2. Autosomal location of the human PAR2 gene SYBL1 in marsupials. The potoroo has an XY1Y2 sex chromosome system. The short arm and proximal part of the long arm (carrying the NOR) are derived from the original X, and the remainder of the long arm, bearing SYBL1, was originally autosomal. [Nelle femmine si hanno 2 X composte dalla X ancestrale piu' l'autosoma, i maschi hanno ovviamente un cromosoma in piu': Y1. Essi ricevono dal padre Y2 che si chiama cosi perche' e' specifico del maschio, ma in realta' e' praticamente un autosoma e Y1, dalla madre ricevono la X.]

An autosomal location of SYBL1 in marsupials could mean that PAR2, like PAR1, was not a part of the original mammalian X, but was added to the X and Y 130-80 MYrBP. Alternatively, the region could have been part of the original X, which subsequently was lost in the marsupial lineage. Its presence on the human Y may derive from an ancient paired X and Y, or may be the result of more recent illegitimate recombination between the primate X and Y (23).

Comparisons between the most distantly related mammals also provide evidence that different additions to sex chromosomes have occurred independently in different lineages.

The PAR of platypus and echidna sex chromosomes contains, as well as genes which are on the conserved XCR, a large euchromatic region to which no genes have yet been mapped. This presumably contains genes that are autosomal in eutherians, and represents an independent addition to both sex chromosomes in an ancestral monotreme.

Another independent addition is represented by relics of a nucleolus organizer region (NOR)-bearing segment on the sex chromosomes in kangaroo species. Macropodid X chromosomes all contain ribosomal DNA on a heterochromatic short arm. The Y chromosome in at least one kangaroo species (*Macropus parryi*) retains an active NOR (39), and chromosome painting reveals sequences shared between the heterochromatic tammar wallaby Xp and the Yq (32). This suggests that the NOR-bearing region was added to the X and Y in an ancestral macropodid, and was originally pseudoautosomal, but that the rRNA genes have degraded in most species and the heterochromatin on the X and Y has lost homology.

The process of sequential addition was taken to extremes by another kangaroo species, in which an autosomal region representing ~20% of the genome was added to both the X and Y chromosomes atop the NOR addition. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*, has what looks like a classic XY1Y2 system in which a large autosome was added to the NOR-containing arm of the original X. The Y2 represents the second copy of this autosome (itself a fusion of chromosomes 2 and 7 in other kangaroo species). However, chromosome painting reveals that the Y2 also contains sequences from the shared region of the X and Y, implying that originally the autosome was added to both sex chromosomes (within the PAR provided by the NOR addition), then subsequently lost from the Y1 (40).

The inconsistent gene contents of the PAR in different mammal groups therefore reflect differential addition, as well as differential loss, rearrangement and degradation of the Y chromosome.

Model for the evolution of the eutherian pars

The presence or absence of a PAR, its gene content and its function, can be easily understood in terms of the evolutionary forces that have shaped the mammalian sex chromosomes: addition of autosomal segments to the shared region of proto-X and -Y chromosomes, and progressive degradation of the Y chromosome (8). This addition-attrition hypothesis predicts three sources of variation of the PAR between species (Fig. 3).

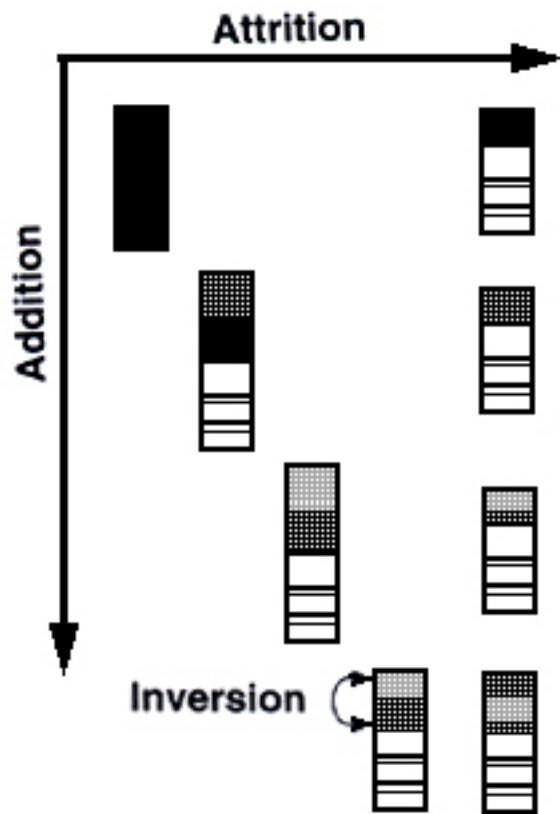


Figure 3. Variation of the gene content of the PAR predicted by the addition-attribution hypothesis for the evolution of mammalian sex chromosomes. (i) Attrition. The original Y (black) was homologous to the X except at a male sex-determining locus, around which recombination was suppressed. Deletion and mutation within this genetically isolated region progressively reduced the coding region of the Y, leaving a few functional male-specific genes (black stripes on a background of white non-coding DNA) and a terminal PAR (black) still homologous and recombining with the X. (ii) Addition of an autosomal segment (dark grey) to the PAR of one of the sex chromosomes, followed by recombination onto the other, results in different terminal sequences. Attrition of both the original and the added region leaves a few active genes (black and grey stripes) and a different PAR (dark grey terminal region). This process can be repeated, adding another (light grey) terminal region which ultimately becomes the new PAR. By the same mechanism, genes may be lost from the PAR to an autosome. Different autosomal segments could be added to the PAR independently in different lineages, and attrition would lead to PARs with different gene contents in different lineages. (iii) Rearrangement (in this case inversion) within the paired region of the partially differentiated Y may change the gene order (dark and light grey regions) in some lineages. Progressive attrition leaves a PAR with the gene content of the inverted region. Lineage-specific addition or loss of PAR genes may occur by translocations between the PAR and an autosome. Such exchanges would cause minimal disruption to fertility, and do not really constitute transgressions of Ohno's law that the X chromosome is conserved (41, 42). Independent additions to the PAR evidently have occurred in eutherians, macropodid marsupials and monotremes. Lineage-specific loss of PAR genes is evident in mouse. In addition, the recent finding that *Clcn4*, lying in the differential region of the X distal to *ZFX* and *AMELX* in human and *Mus spretus*, is autosomal in *M. musculus* (43, 44) is understandable if this gene were part of an ancestral PAR

which could be exchanged with autosomes without causing sterility (45).

Another source of PAR variation is the different extent of degradation of the Y in different lineages, either by accumulation of small changes at the boundary or by major rearrangement. Gradual loss of homology with the X has been demonstrated by sequence comparisons of the pseudoautosomal boundary in human and great apes (46). Cataclysmic loss of homology between human Xp22.3 and its Y homologue is ascribed to one or probably more inversions in the primate Y chromosome (47, 48). This removed part of the original PAR to Yq11.2, including half of the unfortunate XGA gene (49). In their new site, genes such as STS degraded rapidly because they were now isolated from recombination.

A third potential source of variation would be an inversion contained within the PAR. This would not, of itself, disrupt homology, but would change gene order so that after degradation, different terminal sequences would remain pseudoautosomal in different lineages.

The future of the par

The end-point in Y attrition would be expected to be the complete differentiation of the X and Y, and the disappearance of the PAR. This point evidently has been reached by marsupial X and Y chromosomes. The tiny dasyurid X and Y lack any homology (Toder et al., in preparation). Even the larger macropodid X and Y, with their recent addition of the NOR region (32), show no homologous pairing (31). In most species, there is no active NOR on the Y (39), suggesting that the sequences on the Y have been inactivated and degraded. A new mechanism for X-Y recognition, association and segregation, perhaps involving telomere sequences, must have replaced homologous pairing and recombination in marsupials.

The mouse PAR also seems to be in the last throes of degradation. Although it still contains an active Sts gene, the atypical GC-rich base composition of the distal 250 kb of the PAR, Sts included (14), suggests that it is now being selected for another role (pairing?) at the expense of activity of the genes it bears. The loss of a degraded PAR in the Akodont rodents, and the evolution of other mechanisms to ensure meiotic segregation, may provide a vision of what is in store for the sex chromosomes of other rodents-and maybe primates-in the 100 million years to come.

The only salvation for the PAR will be a further addition to both X and Y, as evidently has occurred in some rodent lineages [e.g. lemmings (50)]. Continued addition to the X and degradation of the Y would produce species in which males are haploid and females diploid for a large fraction of the genome. Taken to extremes, this could eventually lead to a haplodiploid mode of sex determination such as that in some insects.

References

1. Vogt, P.H., Affara, N., Davey, P., Hammer, M., Jobling, M.A., Lau, Y.-F.C., Mitchell, M., Schempp, W., Tyler-Smith, C., Williams, G., Yen, P. and Rappold, G.A. (1997) Report of the third international workshop on Y chromosome mapping 1997. *Cytogenet. Cell Genet.*, 79, 1-20.
2. Lahn, B.T. and Page, D.C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*, 278, 675-680.
3. Gianfrancesco, F., Esposito, T., Montanini, L., Ciccodicola, A., Mumm, S., Mazzarella, R., Rao, E., Giglio, S., Rappold, G. and Forabosco, A. (1998) A novel pseudoautosomal gene encoding a putative GTP-binding protein resides in the vicinity of the Xp-Yp telomere. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 407-414.
4. Blaschke, R.J. and Rappold, G.A. (1997) Man and mouse-lessons learned from the distal end of the X chromosome. *Genome Res.*, 7, 1114-1117.
5. Freije, D., Helms, C., Watson, M.S. and Donis-Keller, H. (1992) Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*, 258, 1784-1787.
6. D'Esposito, M., Ciccodicola, A., Gianfrancesco, F., Esposito, T., Flagiello, L., Mazzarella, R., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1995) A synaptobrevin like gene in Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nature Genet.*, 13, 227-229.
7. Kermouni, A., Van Roost, E., Arden, K.C., Vermeesch, J.R., Weiss, S., Godelaine, D., Flint, J., Lurquin C., Szikora, J.P., Higgs, D.R., Marynen, P. and Renauld, J.C. (1995) The IL9 receptor gene IL9R: genomic structure and chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the

- longarm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter and 18pter. *Genomics*, 29, 371-382.
8. Graves, J.A.M. (1995) The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes-an evolving understanding. *BioEssays*, 17, 311-320.
 9. Veermeesch, J.R., Petit, P., Kermouni, J.-C., Van Den Berghe, H. and Marynen, P. (1997) The IL9R receptor gene, located in Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1-8.
 10. D'Esposito, M., Matarazzo, M.R., Ciccodicola, A., Strazzullo, M., Mazzarella, R., Quaderi, N.A., Fujiwara, H., Ko, M.S.H., Rowe, L.B., Ricco, A., Archidiacono, N., Rocchi, M., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1997) Differential expression pattern of XqPAR-linked genes SYBL1 and IL9R correlates with the structure and evolution of the region. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1917-1923.
 11. Mohandas, T.K., Speed, R.M., Passage, M.B., Yen, P.H., Chandley, A.C. and Shapiro, L.J. (1992) Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 526-533.
 12. Toder, R., Gläser, B., Schiebel, K., Wilcox, S.A., Rappold, G., Graves, J.A.M. and Schempp, W. (1997) Genes located in and near the human pseudoautosomal region are located in the X-Y pairing region in dog and sheep. *Chromosome Res.*, 5, 1-4.
 13. Keitges, E., Rivest, M., Siniscalco, M. and Gartler, S.M. (1985) X-linkage of steroid sulphatase in the mouse is evidence for a functional Y-linked allele. *Nature*, 315, 226-227.
 14. Salido, E.C., Li, X.M., Yen, P.H., Martin, N., Mohandas, T.K. and Shapiro, L.J. (1996) Cloning and expression of the mouse pseudoautosomal steroid sulphatase gene (Sts). *Nature Genet.*, 13, 83-86.
 15. Palmer, S., Perry, J., Kipling, D. and Ashworth, A. (1997) A gene spans the pseudoautosomal boundary in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 12030-12035.
 16. Quaderi, N.A., Schweiger, S., Gaudenz, K., Franco, B., Rugarli, E., Berger, W., Feldman, G.J., Volta, M., Andolfi, G., Gilgenkrantz, S., Marion, R.W., Hennekam, R.C.M., Opitz, J.M., Muenke, M., Ropers, H.H. and Ballabio, A. (1997) Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nature Genet.*, 17, 285-291.
 17. Dal Zotta, L., Quaderi, N.A., Elliott, R., Lingerfelter, P.A., Carrel, L., Valsecchi, V., Montini, E., Yen, C.-H., Chapman, V., Kalcheva, I., Arrigo, G., Zuffardi, O., Thomas, S., Willard, H., Ballabio, A., Disteche, C.M. and Rugarli, E.I. (1998) The mouse Mid1 gene: implications for the pathogenesis of Opitz syndrome and the evolution of the mammalian pseudoautosomal region. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 489-499.
 18. Perry, J., Feather, S., Smith, A., Palmer, S. and Ashworth, A. (1998) The human FXY gene is located within Xp22.3: implications for evolution of the mammalian X chromosome. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 299-305.
 20. Disteche, C.M., Brannan, C.I., Larsen, A., Adler, D.A., Schorderet, D.F., Gearing, D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Park, L.S. (1992) Evolution of the pseudoautosomal region: the GM-CSF receptor a subunit gene is autosomal in mouse. *Nature Genet.*, 1, 333-336.
 21. Milatovich, A., Kitamura, T., Miyaiima, A. and Francke, U. (1993) Gene for the alpha subunit of the human interleukin-3 receptor (IL3RA) localized to the X-Y pseudoautosomal region. *Am. J. Hum. Genet.*, 53, 1146-1153.
 22. Bickmore, W.A. and Cooke, H.J. (1987) Evolution of homologous sequences on the human X and Y chromosomes, outside of the meiotic pairing segment. *Nucleic Acids Res.*, 15, 6261-6271.
 23. Kvaloy, K., Galvagni, F. and Brown, W.R.A. (1994) The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 771-778.
 24. Koller, P.C. and Darlington, C.D. (1934) The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes 1. *Rattus norvegicus*. *J. Genet.*, 29, 159-173.
 25. Chandley, A.C., Goetz, P., Hargreave, J.B., Joseph, A.M. and Speed, R.M. (1984) On the nature and extent of the XY pairing at meiotic prophase in man. *Cytogenet. Cell Genet.*, 38, 241-247.
 26. Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K., Sutcliffe, M.J. and Palmer, S.J. (1992) Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal 'spermiogenesis' gene mapping to the long arm. *Cell*,

71, 391-398.

27. Hale, D.W., Washburn, L.L. and Eicher, E.M. (1993) Meiotic abnormalities in hybrid mice of the C57BL/6J \times Mus spretus cross suggest a cytogenetic basis for Haldane's rule of hybrid sterility. *Cytogenet. Cell Genet.*, 63, 221-234.
28. Carnero, A., Jimenez, R., Burgos, M., Sanchez, A. and Diaz de la Guardia, R. (1991) Achiasmatic sex chromosomes in Pitimys duodecimcostatus: mechanisms of association and segregation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 56, 78-81.
29. Ashley, T. (1985) Is crossover between the X and Y a regular feature of meiosis in mouse and man? *Genetica*, 66, 161-167.
30. Solari, A.J. and Bianchi, N.O. (1975) The synaptic behaviour of the X and Y chromosomes in the marsupial Monodelphis dimidiata. *Chromosoma*, 52, 11-25.
31. Sharp, P. (1982) Sex chromosome pairing during male meiosis in marsupials. *Chromosoma*, 86, 27-47.
32. Toder, R., Wienberg, J., Voullaire, L., Maccarone, P. and Graves, J.A.M. (1997) Shared DNA sequences between the X and Y chromosomes in the tammar wallaby-evidence for independent additions to eutherian and marsupial sex chromosomes. *Chromosoma*, 106, 94-98.
33. Murtagh, C.E. (1977) Unique cytogenetic system in monotremes. *Chromosoma*, 65, 37-57.
34. Watson, J.M., Spencer, J.A., Riggs, A.D. and Graves, J.A.M. (1995) The X chromosome of monotremes shares a highly conserved region with the eutherian and marsupial X chromosomes despite the absence of X chromosome inactivation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 87, 7125-7129.
35. Mitchell, M.J., Wilcox, S.A., Lerner, J., Woods, D., Scheffler, J., Hearn, J., Bishop, C. and Graves J.A.M. (1998) The origin and loss of the ubiquitin activating enzyme (UBE1) genes on the mammalian Y chromosome. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 429-434.
36. Wilcox, S.A., Watson, J.M., Spencer, J.A. and Graves, J.A.M. (1996) Comparative mapping identifies the fusion point of an ancient mammalian X-autosomal rearrangement. *Genomics*, 35, 66-70.
37. Toder, R. and Graves, J.A.M. (1998) CSF2RA, ANT3 and STS are autosomal in marsupials: implications for the origin of the pseudoautosomal region of mammalian sex chromosomes. *Mamm. Genome*, 9, 373-376.
38. Hayman, D.L. and Martin, P.G. (1965) An autoradiographic study of DNA synthesis in the sex chromosomes of two marsupials with an XX/XY1Y2 sex chromosome mechanism. *Cytogenetics*, 4, 209-218.
39. Hayman, D.L. and Rofe, R. (1977) Marsupial sex chromosomes. In Calaby, J.H. and Tyndale-Biscoe, C.H. (eds), *Reproduction and Evolution*. Australian Academy of Science, pp. 69-79.
40. Toder, R., O'Neill, R.W., Wienberg, J., Voullaire, L. and Graves, J.A.M. (1997) Comparative chromosome painting between two marsupials: origins of an XX/XY1Y2 sex chromosome system. *Mamm. Genome*, 8, 418-422.
41. Ohno, S. (1967) *Sex Chromosomes and Sex Linked Genes*. Springer Verlag, Berlin.
42. Graves, J.A.M., Disteche, C.M. and Toder, R. (1998) Gene dosage in the evolution and function of mammalian sex chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 80, 94-103.
43. Rugarli, E.I., Adler, D.A., Borsani, G., Tsuchiya, K., Franco, B., Hauge, X., Disteche, C., Chapman, V. and Ballabio, A. (1995) Different chromosomal localization of the CLC4 gene in Mus spretus and C57BL/6J mice. *Nature Genet.*, 10, 466-471.
44. Palmer, S., Perry, J. and Ashworth, A. (1995) A contravention of Ohno's law in mice. *Nature Genet.*, 10, 472-476.
45. Graves, J.A.M. (1996) Breaking laws and obeying rules. *Nature Genet.*, 12, 121.
46. Ellis, N., Yen, P., Neiswanger, K., Shapiro, L.J. and Goodfellow, P.N. (1990) Evolution of the pseudoautosomal boundary in Old World monkeys and great apes. *Cell*, 63, 977-986.
47. Yen, P.H., Marsh, B., Allen, E., Tsai, S.P., Ellison, J., Connolly, L., Neiswanger, K. and Shapiro, L.J. (1988) The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y-encoded pseudogene: evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. *Cell*, 55, 1123-1135.
48. Gläser, B., Grützner, F., Taylor, K., Schiebel, K., Meroni, G., Tsioupra, K., Pasantes, J., Rietschel, W., Toder, R., Willmann, U., Zeitler, S., Yen, P., Ballabio, A., Rappold, G. and Schempp,

- W. (1997) Comparative mapping of Xp22 genes in hominoids-evolutionary linear instability of their Y homologues. *Chromosome Res.*, 5, 167-176.
49. Weller, A.P., Critcher, R., Goodfellow, P.N., German, J. and Ellis, N. (1995) The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 859-868.
50. Berend, S.A., Hale, D.W., Engstrom, M.D. and Greenbaum, I.F. (1997) Cytogenetics of collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Cytogenet. Cell Genet.*, 79, 288-292.

Sintesi di

The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned.

Saxena R. et al. Nature Genetics vol.14 292-299 1996

Si ritiene che i cromosomi X e Y si siano originati a partire da una coppia di autosomi in modo autonomo nelle diverse linee evolutive. Secondo le teorie attualmente accettate, una volta che fra i nascenti cromosomi sessuali la ricombinazione ha cominciato a ridursi, il contenuto genico del cromosoma Y ha iniziato a declinare sistematicamente ed inesorabilmente. Eventi di traslocazione possono aggiungere nuovo contenuto genico autosomico ai cromosomi X ed Y, nel qual caso il processo di degenerazione ricomincia. I pochi geni che rimangono sull'altamente differenziato cromosoma Y sono ritenuti residui del contenuto ancestrale condiviso con il cromosoma X. Secondo questa teoria tutti i geni del cromosoma Y erano o sono tuttora condivisi dal cromosoma X. Come conseguenza se il cromosoma Y accumulasse sequenze indipendentemente dal cromosoma X, queste vengono ritenute essere elementi trasponibili la cui principale conseguenza è di accelerare la degenerazione dei geni del cromosoma Y.

Teorie riconducibili a Fisher forniscono un'alternativa a questa teoria dell'evoluzione puramente degenerativa del cromosoma Y. Nel 1931 Fisher ipotizzò che nei primi stadi della differenziazione dal cromosoma X, il futuro cromosoma Y avrebbe accumulato alleli (di quei geni affini ma distinti dai geni determinanti del sesso) che aumenterebbero la fitness maschile diminuendo quella femminile. Tali alleli "sessualmente antagonisti" o "benefici per i maschi" sono comparsi su un cromosoma Y *Drosophila* simile. Potrebbe capitare che il cromosoma Y, anche se estremamente differenziato dal cromosoma X, acquisisca geni che aumentano la capacità riproduttiva (fitness) nel maschio? Questa ipotesi è in accordo con la teoria di Burgyne, che ha ipotizzato che il cromosoma Y potrebbe accumulare geni che aumentano la spermatogenesi. Ma in nessun caso finora era stato dimostrato in nessun animale l'acquisizione di tali fattori della fertilità da un'autosoma. Questa opportunità è stata offerta dalla possibilità di ricostruire la storia evolutiva del 'Fattore dell'azospermia' (AZF) umano.

Nel 1976 Tiepolo e Zuffardi hanno riportato la delezione *de novo* della meta' distale del braccio lungo (Yq) del cromosoma Y in quattro uomini azospermici e su questa base hanno formulato l'ipotesi dell'esistenza di uno più geni essenziali per la spermatogenesi. Grazie alla disponibilità di una mappa ottenuta con sonde di DNA di Yq, è stato possibile dimostrare la presenza di delezioni interstiziali in uomini sterili. In particolare si è dimostrato che delezioni *de novo* dell'intervallo 6D-6E causano il 13% dei casi di azospermia ed alcuni casi di oligospermia. Uomini con delezioni di questa regione sono sterili, ma con nessuna conseguenza sulla salute complessiva, indicando che AZF sia un locus "di pura sterilità maschile", con nessuna funzione somatica.

L'unica unità di trascrizione identificata in questa regione solitamente deleta è DAZ (Deleted in Azoospermia), un candidato forte per AZF che codifica una proteina di legame del RNA. L'espressione di DAZ è limitata ai testicoli, dove il gene è trascritto nelle cellule premeiotiche, essenzialmente negli spermatogoni. Perciò DAZ potrebbe avere una funzione nella spermatogenesi precoce, o anche prima, nel mantenere la popolazione di cellule staminali, e questo giustificerebbe il difetto della spermatogenesi riscontrato per effetto della delezione di AZF. Non sono state riportate mutazioni puntiformi di DAZ in uomini infertili, tuttavia un omologo di DAZ è stato identificato in *Drosophila* e le mutazioni con perdita di funzione di questo omologo, denominato *boule*, provocano azospermia senza coinvolgimenti nel soma, esattamente come AZF. Questi studi in *Drosophila* forniscono una forte sia pure indiretta prova che DAZ sia AZF. In *Drosophila* il gene *boule* è autosomico, come l'omologo murino DAZhomologue Dazh (chiamato anche Dazla). Se omologhi autosomici di DAZ sono stati ritrovati in altri animali, potrebbe esserci una copia autosomica anche nell'uomo? In realtà quando si ibrida su Southern blot di genómico umano il cDNA di DAZ non riconosce solo il frammento Y-specifico, ma anche una banda comune ai maschi e alle femmine che potrebbe rappresentare la copia autosomica DAZH. Questo ipotetico omologo autosomico è un gene funzionale o uno pseudogene? In che relazione si trova con il DAZ Y-specifico?

L'esame di tutte le sequenze disponibili di DAZ e DAZH, dei cDNA e delle proteine da loro codificate suggerisce i seguenti eventi evolutivi:

1) Trasposizione. Durante l'evoluzione dei primati una copia completa dell'unità di trascrizione di DAZH si è trasposta da un autosoma ancestrale (che oggi viene identificato nel cromosoma 3 umano) al cromosoma Y. Questa trasposizione si è verificata prima della separazione della linea evolutiva dell'orango da quella dell'uomo, come dimostrato dalla presenza di una banda Y-specifica in entrambe le specie.

2) Amplificazione e 'sfrondatura'. All'interno del nuovo gene trasposto, un frammento genomico di circa 2.4kb comprendente gli esoni 7 e 8 è stato amplificato in tandem generando un lungo schieramento. Ma nella maggior parte delle unità amplificate uno o entrambi gli esoni sono degenerati o si sono deleti. Per esempio all'inizio del processo di amplificazione si è generata un'unità di ripetizione in cui l'esone 8 a causa di una mutazione di splicing o altre mutazioni degenerative non viene utilizzato, la successiva amplificazione di questa unità da' origine alla sequenza di 2.4kb ritrovata oggi che porta un derivativo funzionale dell'esone 7 di DAZ e una traccia dell'esone 8. Solo nel penultimo repeat entrambi gli esoni 7 e 8 sono conservati. Il "discendente" dell'esone 9 del DAZH trasposto è degenerato senza amplificazione. Con questa unica eccezione la sfrondata unità di trascrizione di DAZ ha conservato uno o più discendenti di ciascun esone.

3) Amplificazione genica. L'emergente unità di trascrizione DAZ, mentre andava incontro a duplicazioni interne e a sostanziale sfrondatura, è stata amplificata cosicché esiste un certo numero di unità in una regione adiacente a AZF. Vi sono dati che mettono in evidenza l'esistenza di almeno tre copie di DAZ che mostrano il 99.9% di identità. Probabilmente è una sottostima del numero di copie di DAZ, dal momento che il segnale di DAZ su Southern blot dovuto alla banda Y-specifica è molto più forte della banda di DAZH comune al X e al Y, soprattutto considerando che il locus autosomico è presente in due copie per cellula a differenza del cromosoma Y.

Dal momento che è stato dimostrato che DYS1 [\[locus polimorfico mappato su Yq nel 1984 che presentava anche una banda comune ai maschi e alle femmine\]](#) è DAZ e che DYS1 è altamente polimorfico ci si può aspettare che alcune copie del gene DAZ possono essere diverse fra individui. Infatti sono state trovate 11 differenze a livello nucleotidico fra i cDNA di DAZ e a livello genomico 8 di queste si ritrovano negli esoni 7d e 7c. Queste differenze potrebbero riflettere differenze fra le copie del gene DAZ di un singolo cromosoma Y, o un vero polimorfismo che distingue il DNA degli individui con i quali i cDNA e le library sono stati creati.

Il cluster del gene DAZ sul cromosoma Y si è originato da un ancestrale autosomico DAZH, attraverso una serie di trasformazioni strutturali. È tuttavia evidente che il nascente cluster Y-specifico ha mantenuto le caratteristiche funzionali chiave del suo antenore autosomico. Primo, la sequenza della proteina codificata è ampiamente conservata. Il prodotto di DAZ e DAZH è una proteina RNA-binding le cui sequenze, a parte i repeat di 24 residui in DAZ, sono abbastanza simili per quasi tutta la loro lunghezza. Questa conservazione della maggior parte della reading frame dei trascritti maturi è un dato notevole dal momento che l'unità di trascrizione di DAZ comprende 26 fra esoni e pseudoesoni, in confronto agli 11 esoni di DAZH.

Secondo, è evidente che sia l'ancestrale che i nuovi membri della famiglia DAZ sono espressi esclusivamente nelle cellule germinali. Come il suo omologo murino (Dazh/Dazla) il DAZH umano è abbondantemente trascritto nei testicoli dell'adulto e ad un livello più basso nell'ovaio adulto, mentre il DAZ, assente nelle femmine, è espresso esclusivamente dai testicoli. L'espressione di Dazh è assente nei topi privi di cellule germinali (mutanti White-spotted e Steel), a dimostrazione della sua tessuto-specificità. In questi stessi mutanti l'espressione è assente nell'ovaio. Nel testicolo dell'adulto DAZ è espresso dagli spermatogoni e forse dagli spermatociti precoci, perciò sia nell'uomo che nel topo le cellule germinali sono il solo sito di espressione della famiglia DAZ.

Sembra probabile che il prodotto del gene ancestrale, DAZH autosomico e del suo derivativo (DAZ Y-linked), interagiscono con lo stesso target di RNA nello stesso tipo cellulare. La similarità del fenotipico azospermico associato con la delezione di DAZ nell'uomo e con le mutazioni nell'omologo di *Drosophila*, suggerisce la funzione della proteina della famiglia DAZ nelle cellule germinali si sia

conservata attraverso l'evoluzione dei metazoi. Nell'uomo, la parziale ridondanza di DAZ e la funzione dell'autosomico DAZH potrebbero contribuire alla variabilit  dei difetti originati dalla delezione di AZF. Alternativamente, le mutazioni di DAZH potrebbero contribuire ai difetti nella spermatogenesi in individui con cromosoma Y intatto [N.B.: in realt  lo studio delle delezioni negli individui azospermici ha indicato che la delezione DAZ   coinvolta solo nel 5% dei casi. Grazie al clonaggio dell'intera regione AZF oggi   possibile individuare tramite PCR le delezioni anche al di fuori della famiglia DAZ].

Il caso di DAZ sfida il punto di vista prevalente che la maggior parte se non tutti i geni del cromosoma Y siano condivisi dal cromosoma X. Si pu  affermare che la maggior parte dei geni del cromosoma Y riflettono il contenuto genico dell'antecore di questo cromosoma e mantengono relazioni meiotiche e funzionali con il cromosoma X. Un'importante frazione dei geni e delle sequenze dell'Y hanno una controparte sull'X, tuttavia DAZ suggerisce che l'evoluzione del cromosoma Y e del suo contenuto genico possa avere avuto un'evoluzione indipendente dal cromosoma X. Si pu  ritenere che l'acquisizione diretta di geni autosomici che aumentino la fertilit  maschile sia una componente importante dell'evoluzione del cromosoma Y. La pressione selettiva favorirebbe questo processo, soprattutto se i geni trasposti sull'Y avessero fornito un vantaggio nullo o minimo alle femmine o se addirittura avessero diminuito la fertilit  femminile. DAZ rappresenta il primo esempio certo di trasposizione autosoma-Y di un fattore delle cellule germinali, ma vi sono alcune osservazioni che sembrano indicare che ve ne siano degli altri. Parecchi altri geni nell'uomo, nel topo, e in *Drosophila* localizzati sull'Y ed espressi specificatamente nei testicoli con una probabile funzione nella spermatogenesi, non hanno omologo sull'X. Pur non essendo dati definitivi, questi sembrano indicare che la trasposizione autosoma - Y di geni della fertilit  sia un evento ricorrente nell'evoluzione dell'Y.

I geni trasposti nella regione dell'Y che non ricombina, indipendentemente dalla loro origine autosomica, si troverebbero ad affrontare le spinte degenerative ed inevitabilmente soccomberebbero ad esse. Forse il livello di acquisizione dei geni della fertilit  maschile potrebbe essere pari al livello di degenerazione, portando ad un livello costante di evoluzione. In contrasto con l'estrema stabilit  del cromosoma X, almeno nei mammiferi, singoli geni della fertilit  maschile potrebbero non avere vita lunga, almeno in senso evolutivo, sul cromosoma Y.

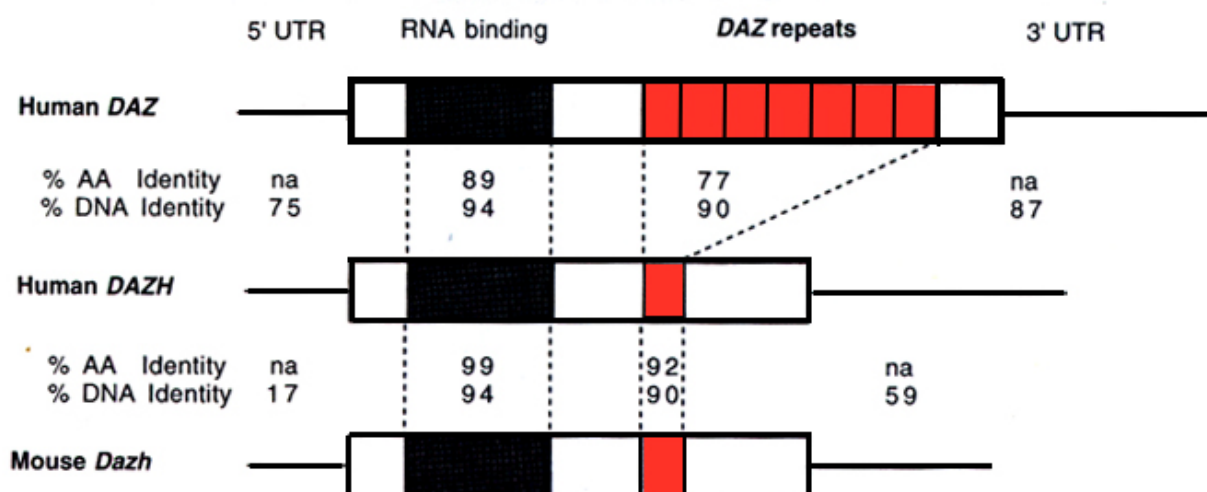


Fig. 1. Confronto tra DAZ e DAZH umano e *Dazh* di topo.

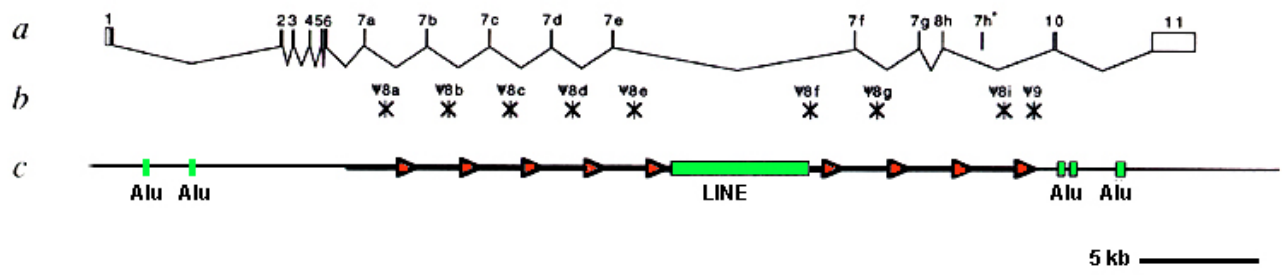


Fig. 2. Cluster del gene DAZ umano.

Sintesi di:

Functional Coherence of the Human Y Chromosome

Bruce T. Lahn, David C. Page Science vol 278 24 oct 1997 675-680

Functional or developmental themes have rarely been ascribed to whole chromosomes in eukaryotes. Instead, individual chromosomes appear to contain motley assortments of genes with extremely heterogeneous patterns of developmentally regulated expression. The authors speculated that the human Y chromosome might be a functionally coherent exception, at least in its nonrecombining portion (the NRY), which makes up 95% of its length. It is known to differ from all other nuclear human chromosomes by the absence of recombination, its presence in males only, its common ancestry and persistent meiotic relationship with the X chromosome, and the tendency of its genes to degenerate during evolution.

From the 1950s to the present day, many biologists have assumed that the Y chromosome is a functional wasteland, despite the discovery of several NRY genes during this period. Studies of human pedigrees had identified many traits exhibiting autosomal or X-linked inheritance but no convincing cases of Y-linked inheritance. In 1959, reports of XO females and XXY males established the existence of a sex-determining gene on the human Y chromosome, but this was perceived as a special case on a generally desolate chromosome. The wasteland model has been revised only during the past decade, when eight NRY transcription units (or families of closely related transcription units) were identified, mostly during regionally focused, positional cloning experiments. Even in recent years, it has been argued that the NRY's gene content is essentially limited to random disintegrating vestiges of its common ancestry with the X. The Y-specific repetitive sequences that are so plentiful in the euchromatic regions have often been assumed to be functionally inert. Realizing that these wasteland theories were based on limited anecdotal data about the NRY's gene content, the authors decided to embark on a broad, systematic gene hunt that could uncover previously unrecognized.

A complete description of the NRY's gene content cannot be obtained with current research methods, short of sequencing the entire NRY. However, it should be possible to obtain a broad representative sampling of NRY genes that could enable them to make comprehensive generalizations. They searched for this sampling in sequences transcribed in a single complex organ, the testis. To assess the suitability of the testis and of a "cDNA selection" protocol for this project, the authors first sought to crudely measure what fraction of human genes, regardless of developmental regulation, are detectably transcribed there. They did this by testing whether previously identified pseudoautosomal genes, whose diversity in developmentally regulated expression is like that of autosomal genes, could be found among testis transcripts. The nine known pseudoautosomal genes were previously identified using mRNA sources as specialized as liver, pineal gland, and skeletal muscle. The extent to which the authors recovered the nine known pseudoautosomal genes from sampling of testis cDNA would provide a measure of this tissue's adequacy in representing a broad array of genes. In fact, they recovered testis cDNAs for all nine known pseudoautosomal genes, which suggested that the testis as a single source would be sufficient to provide nearly comprehensive access to NRY genes. From primary, uncloned testis cDNA, the authors selected and determined the nucleotide sequence of 2539 fragments that hybridized to Y-chromosomal DNA. They anticipated that these sequence fragments would represent a redundant sampling of a much smaller set of genes. Nucleotide sequence analysis revealed that 579 fragments corresponded to known Y genes, including all nine pseudoautosomal genes previously reported and seven of eight known NRY genes. (The one previously reported NRY gene failed to recover was AMELY, which is expressed only in developing tooth buds.) After further analysis, both to eliminate human repetitive sequences and to assemble overlapping fragments into contigs, novel sequences were hybridized to Southern (DNA) blots of human genomic DNAs. Sequences that detected at least one prominent male-specific fragment were judged likely to derive from the NRY, and for each the authors attempted to isolate cDNA clones from a human testis library. Nucleotide sequencing of cDNA clones and rescreening of libraries as necessary yielded full-length cDNA sequences for 10 novel NRY genes or families and partial cDNA sequences for two additional ones (Table 1).

Table 1 Twelve novel genes and gene families in the NRY.

NRY genes and gene families Functional X homologs

| Gene symbol | Gene name | Tissue expression | Multicopy on Y | Gene symbol | X-Y a.a seq.ident | Escape X inactivation |
|-------------|--|-------------------|----------------|-------------|-------------------|-----------------------|
| DBY | Dead Box Y | Ubiquitous | No | DBX | 91% | Yes |
| TB4Y | Thymosin beta4 Y isoform | Ubiquitous | No | TB4X | 93% | Yes |
| EIF1AY | Translation Initiation Factor 1A,Y isoform | Ubiquitous | No | EIF1AX | 97% | Yes |
| UTY | Ubiquitous TPR motif Y | Ubiquitous | No | UTX | 85% | Yes |
| DFFRY | Drosophila Fat Facets Related Y | Ubiquitous | No | DFFRX | 91% | Yes |
| CDY | Chromodomain Y | Testis | Yes | | | |
| BPY1 | Basic Protein Y 1 | Testis | Yes | | | |
| BPY2 | Basic Protein Y 2 | Testis | Yes | | | |
| XKRY | XK Related Y | Testis | Yes | | | |
| PRY | PTP-BL Related Y | Testis | Yes | | | |
| TTY1 | Testis Transcript Y1 | Testis | Yes | | | |
| TTY2 | Testis Transcript Y2 | Testis | Yes | | | |

The authors localized all 12 novel genes on the Y chromosome (Fig. 1) and assessed their expression in diverse human tissues by Northern (RNA) blotting. The novel genes encode an assortment of proteins (Table 1) and are dispersed throughout the euchromatic portions of the NRY (Fig. 1).

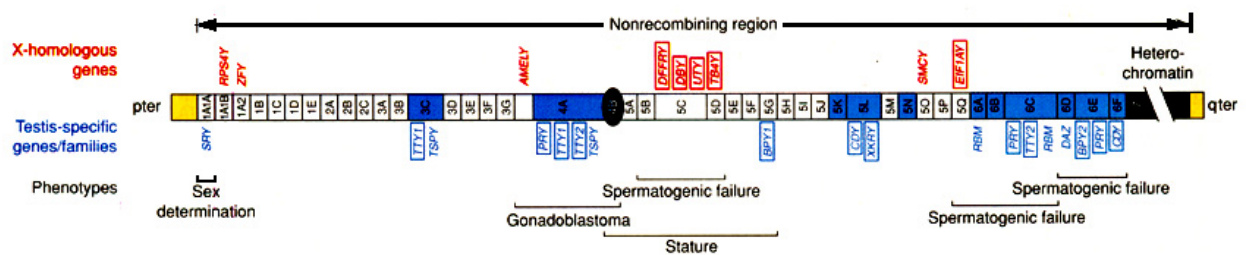


Fig. 1. Gene map of NRY. The Y chromosome consists of a large nonrecombining region (NRY; euchromatin plus heterochromatin) flanked by pseudoautosomal regions (yellow). Pter, short-arm telomere; qter, long-arm telomere. The NRY is shown divided into 43 ordered intervals (1A1A through 7) defined by naturally occurring deletions; deletion intervals previously shown to contain Y-specific repeats are shaded blue. Listed immediately above the chromosome are nine NRY genes with functional X homologs (red); novel genes are boxed. Immediately below the chromosome are 11 testis-specific genes or families (blue), some with multiple locations. Within deletion intervals, genes have not been ordered. Some testis-specific families probably have members in

additional deletion intervals; indicated locations are representative but not necessarily exhaustive. At bottom are shown NRY regions implicated, by deletion mapping, in sex determination, germ cell tumorigenesis (gonadoblastoma), determination of stature, and spermatogenic failure. For DFFRY, previously thought to be a pseudogene, these mapping studies confirm published findings. Although the gene hunt was systematic, it is likely that some NRY genes in addition to AMELY escaped detection; this could have resulted from failure to select corresponding cDNAs or from discarding them during subsequent screening steps. Like AMELY, other NRY genes may not have been recovered because they are not transcribed in sufficient amounts in the testis. The screening criteria may have discriminated against NRY genes located in regions of exceptionally high sequence similarity to the X chromosome. In particular, the authors may have overlooked genes located in a 4-Mb region of the NRY characterized by 99% sequence identity to the X. Nonetheless, they suspect that the gene hunt was sufficiently comprehensive for us to form meaningful generalizations about the NRY's gene content.

The 12 novel genes readily sort into two discrete classes (Table 1). The first group, of five novel NRY genes, has several shared features. Each gene has a homolog on the X chromosome encoding a very similar but nonidentical protein isoform; every gene is expressed in a wide range of human tissues; and each gene appears to exist in a single copy on the NRY. The other seven novel NRY genes constitute the second group and share quite different traits. They appear to be expressed specifically in testes. They also seem to exist in multiple copies on the NRY, as judged by (1) the number and intensity of hybridizing fragments on genomic Southern blots or (2) multiple map locations on the Y. The two classes of genes suggested by the NRY-wide search also accommodate six of eight NRY genes previously identified by less systematic means, confirming the validity of this bipartite classification.

Many of the X-homologous genes appear to be involved in cellular housekeeping, as suggested by their ubiquitous expression and by the functions of their encoded proteins, which are well established in three cases. TB4Y encodes a Y isoform of thymosin 4, which functions in actin sequestration and which it is found to be encoded by the X chromosome. EIF1AY encodes a Y isoform of eIF-1A, an essential translation initiation factor. RPS4Y encodes a Y isoform of an essential ribosomal protein.

In contrast with these single-copy, X-homologous housekeeping genes, the multicopy NRY gene families appear to encode proteins with more specialized functions. All appear to be expressed specifically in the testis. This study identified full-length cDNA clones for five of these gene families, which were all found to encode proteins not previously characterized (Table 1). Several of the testis-specific gene families may encode DNA- or RNA-binding proteins, including two small, unrelated basic proteins, BPY1 and BPY2 (Table 1); two putative RNA-binding proteins, RBM and DAZ; and CDY, which contains a "chromodomain" [a chromatin-binding motif (Table 1)]. The authors postulate that the NRY's evolution was dominated by two strategies. The first strategy favored conservation of particular X-Y gene pairs to maintain comparable expression of certain housekeeping functions in males and females. This strategy is at odds with the general behavior of X-Y gene pairs during mammalian evolution. The mammalian X and Y chromosomes evolved from autosomes; most ancestral gene functions were retained on the nascent X chromosome but deteriorated on the nonrecombining portion of the emerging Y chromosome. This resulted in females having two copies but males having only one copy of many genes, an inequality predominantly addressed in mammals by transcriptional silencing, or inactivation, of one X chromosome in females. The findings on X-homologous NRY genes, together with previous studies, suggest the importance in human evolution of an additional solution: preservation of homologous genes on both NRY and X, with male and female cells expressing two copies of such genes. A critical prediction of this model is that the X homologs should escape X inactivation. This is the case for all widely expressed X-linked genes with known NRY homologs, including the X homologs of the five novel NRY genes reported here. A second prediction is that the X- and Y-encoded proteins should be functionally interchangeable despite considerable divergence of their genes' nucleotide sequences. Indeed, each of the eight known X-NRY gene pairs encodes closely related isoforms, with 85 to 97% amino acid identity throughout their lengths; functional interchangeability has been demonstrated

in the one case tested to date .

These dosage compensation strategies may be relevant to Turner syndrome, which is classically associated with an XO sex chromosome constitution. The Turner phenotype may be due to inadequate expression of certain X-Y common genes that escape X inactivation . Given that several X-NRY genes appear to be involved in cellular housekeeping, the authors speculate that some features of the XO phenotype (such as poor fetal viability) reflect inadequate expression of particular housekeeping functions. The X-homologous NRY genes (Fig. 1) should be investigated as Turner candidates .

In addition to the strategy for conserving certain X-Y gene pairs, a second strategy probably shaped the NRY's evolution. This strategy favored the acquisition of testis-specific families, perhaps through selectively retaining and amplifying genes that enhance male reproductive fitness. Animal genomes may contain genes or alleles that enhance male reproductive fitness but are inconsequential or even detrimental to females, as first appreciated by Fisher . Fisher recognized that selective pressures would favor the accumulation of such genes in male-specific regions of genomes. Of course, male reproductive fitness depends critically on sperm production, the task of the adult testis. As the only male-specific portion of the mammalian genome, the NRY should have a unique tendency to accumulate male-benefit genes during evolution.

Consider the human NRY's DAZ gene cluster, de novo deletions of which are associated with severe spermatogenic defects . The DAZ cluster on the human Y chromosome arose during primate evolution by transposition and amplification of an autosomal gene. Similarly, two other testis-specific NRY gene families--RBM and TSPY--may also be the result of the Y chromosome having acquired and amplified autosomal genes . The selective advantage conferred by the NRY's retention and amplification of male fertility factors (from throughout the genome) could account for the multitude of testis-specific gene families there. These activities may have been preeminent in shaping the NRY's gene repertoire, because it appears that most NRY transcription units are members of testis-specific families . The authors suspect that most of the NRY's transcription units do not date from the Y chromosome's common ancestry with the X chromosome but instead are more recent acquisitions.

The importance of the human Y chromosome in fertility has been underscored by recent genetic studies. Many men with spermatogenic failure, although otherwise healthy, lack portions of the NRY . These findings have suggested the existence of NRY genes that play critical roles in male germ cell development but are not required elsewhere in the body. Previous deletion-mapping studies have implicated four regions of the NRY in either spermatogenic failure or germ cell tumorigenesis, and in each of the four regions novel candidate genes expressed specifically, or most abundantly , in testes (Fig. 1).

Although X-homologous and testis-specific genes are somewhat intermingled within the NRY, clustering is evident (Fig. 1). The geographic distribution of the two classes correlates well with previously identified sequence domains within the euchromatic NRY . Ten of the 11 known testis-specific families map to previously identified regions of Y-specific repetitive sequences . Indeed, one or more testis-specific gene families are found in nearly all known regions of euchromatic Y repeats (Fig. 1). Ironically, it had been widely assumed, partly on theoretical grounds, that these domains consisted of "junk" DNA . To the contrary, the results argue that these Y-specific repetitive regions are gene-rich, containing most of the NRY's transcription units . We speculate that these were regions of rampant gene amplification during mammalian evolution. By contrast, none of the eight X-homologous genes map to the Y-repeat domains; they all map to regions previously identified as consisting largely of single-copy (or in some cases X-homologous) sequences. Earlier in mammalian evolution, these regions of the NRY could share extensive nucleotide sequence identity with the X chromosome.

Although more genes probably remain to be discovered, the 20 genes and families shown in Fig. 1 may constitute the majority of NRY genes, and full-length cDNA sequences are available for 18 of them. The stage is now set for systematic evolutionary, biochemical, and cell-biological studies of this distinctive segment of the human genome.

Sintesi di

Simian Y chromosome: species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY.

Glaser B. et al. Mammalian Genome 9 226-231 1998

La mappatura comparativa dei geni della regione Xp22 umana (cioè ANT3, XG, ARSEE (CPDX), ARSD, PRK, STS, KAL, AMEL) e dei loro omologhi Y-linked negli ominoidi ha messo in evidenza che i geni localizzati prossimalmente alla PAR hanno conservato il loro ordine sul cromosoma X delle scimmie, ma hanno subito riarrangiamenti sul cromosoma Y. Questi dati tuttavia modificano l'ipotesi di un'inversione pericentrica che avrebbe distrutto una più estesa PAR ancestrale, trasferendo su Yq la parte prossimale della regione in un momento precoce dell'evoluzione dei primati. In contrasto con la mappatura in una regione pericentromerica del cromosoma Y nell'uomo e nel gorilla, gli omologhi Y-linked dei geni di Xp22 mappano in prossimità del PAR negli altre grandi scimmie africane e nei gibboni. Ancora più interessante è l'osservazione che gli omologhi dei geni pseudoautosomici ANT3 e CSFR2A e dei geni omologhi a PRK e STS (prossimali in Xp22), mappano nella regione pseudoautosomica della pecora e del cane. Questo dimostra che ANT3, CSFR2A, PRK e STS avrebbero potuto fare parte di una PAR ancestrale più ampia nei mammiferi non primati.

La vicinanza di SRY alla PAR in tutte le scimmie studiate porta a supporre che sia stata la trasposizione di questo gene in una regione distale a AMEL, KAL, STS, PRK e ARSE ad escludere da una PAR ancestrale dei primati questi geni e ad originare il confine PAR su quello che sarebbe divenuto il cromosoma Y umano. Si può inoltre concludere che la serie di eventi che ha portato all'attuale situazione delle regioni di omologia X-Y nelle scimmie attuali sia piuttosto complessa e non può essere ricondotta ad un modello semplice.

Nella regione del cromosoma Y che non ricombina (NrY) ci sono, oltre ai geni X-Y, tre cluster di famiglie geniche: DAZ (Deleted in AZoospermia), RBM (RNA-Binding Motif) e TSPY (Testis-Specific Protein Y encoded) che sul cromosoma Y umano mappano in Yp11.2 e/o Yq11.23. Questi sono geni candidati per essere coinvolti nella spermatogenesi. L'espressione di DAZ e di TSPY nell'uomo è limitata al testicolo dell'adulto, dove vengono trascritti nelle cellule germinali, in particolare negli spermatogoni e/o nei spermatociti primari. L'espressione di RBM è stata dimostrata oltre che nelle cellule germinali nelle cellule fetali e nelle cellule germinali nel periodo prepuberale, suggerendo un ulteriore ruolo nello sviluppo delle cellule germinali [\[N.d.T.: in un lavoro successivo a quello di Page riportato sopra: Elliott et al. PNAS 94 3848-3853 1997\]](#).

La localizzazione di DAZ, RBM, a TSPY nella NrY, la loro funzione maschi-specifica e il loro presunto ruolo nella spermatogenesi li rende estremamente interessanti per una mappatura comparativa. Inoltre questo approccio potrebbe rivelarsi utile per testare e chiarire l'ipotesi che una serie complessa di eventi ha portato in ogni specie e in modo indipendente alla attuale morfologia del cromosoma Y nell'uomo e nelle scimmie.

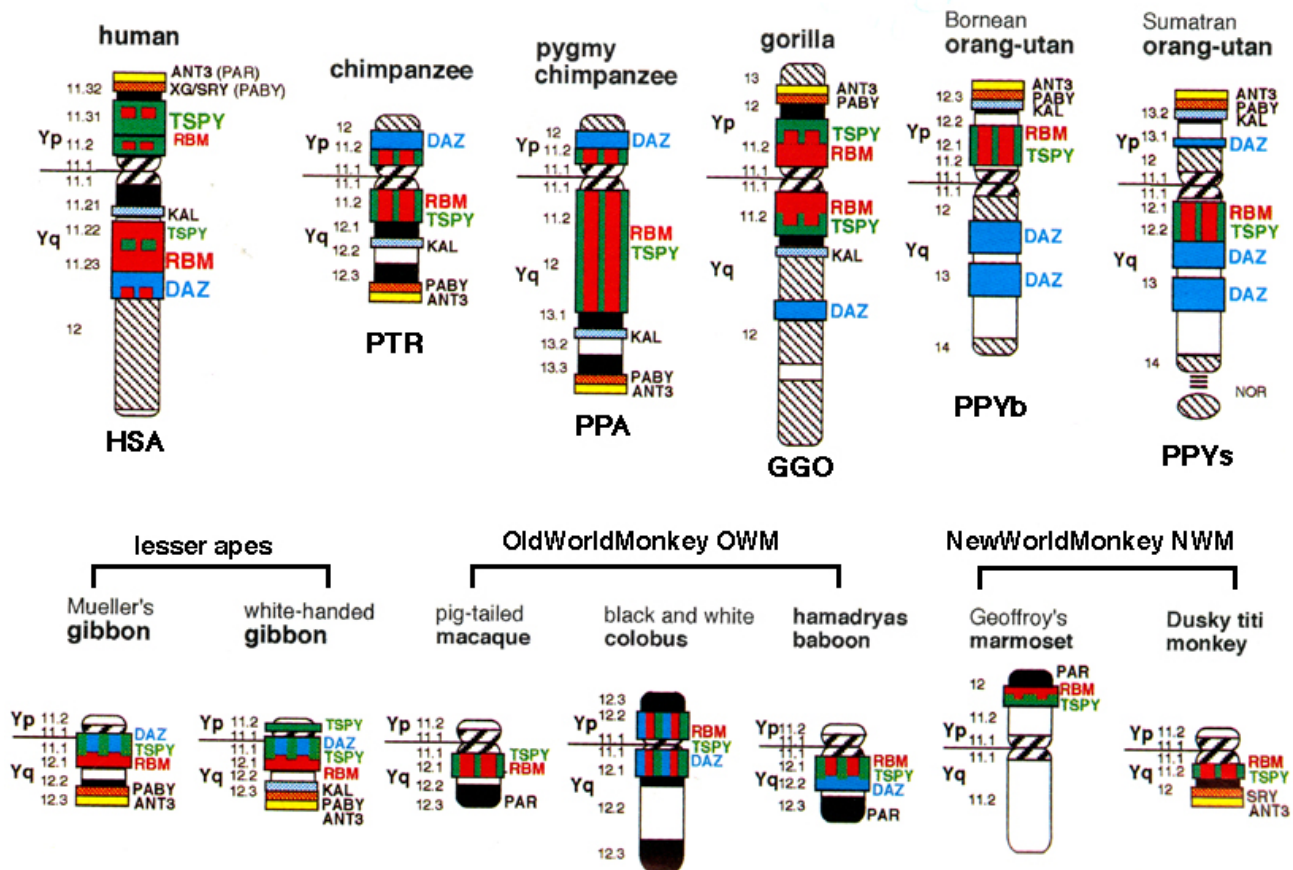


Fig.1 Schema dei dati di mappatura comparativa dei geni (colorati) su un diagramma del cromosoma Y delle scimmie. I siti di coibridazione [N.d.T. quando non è possibile discriminare la posizione relativa dei segnali delle due sonde] di TSPY(verde), RBM(rosso) e DAZ (blu scuro) sono indicati dalle barre verticali che si alternano. Come marker del PABY sono state usate una sonda contenente sia XG che SRY e/o la sonda contenente solo SRY

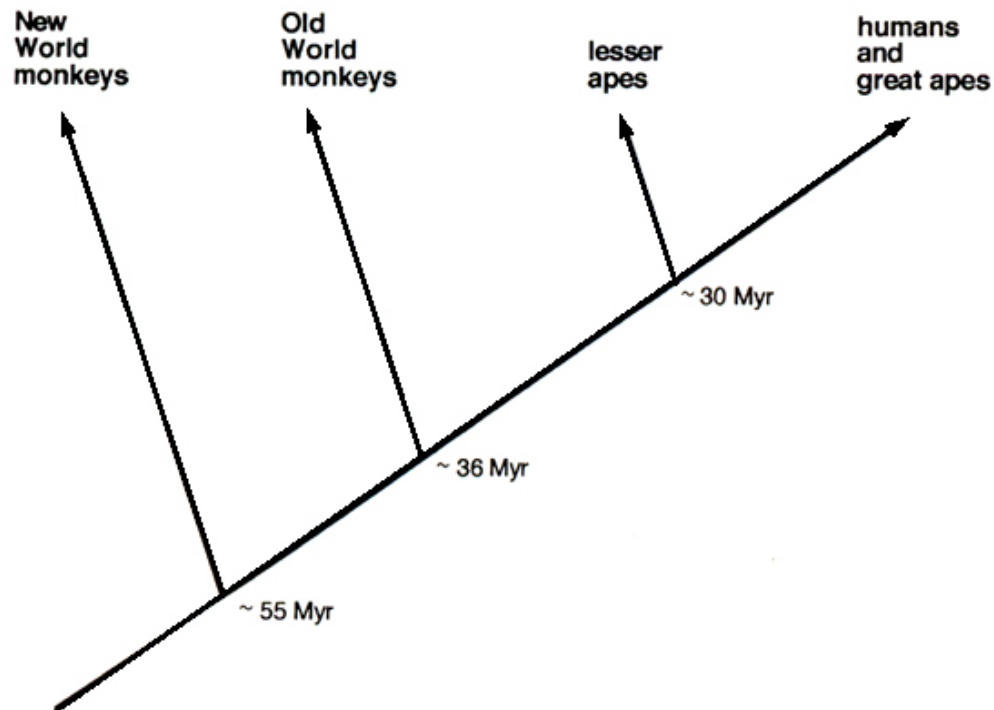


Fig.2 Albero filogenetico delle scimmie, Le specie indicate in parentesi sino quelle riportate nella figura1. Myr= milioni di anni.

Un'enorme variabilit  morfologica   evidente quando si esaminano i diversi cromosomi Y delle scimmie. Il cromosoma Y di gorilla (GGO) e di uomo (HSA) sono i pi  grandi, contengono circa il 2-3% dell'intero genoma aploide, presentano ampie zone di eterocromatina sul braccio lungo. Il pi  piccolo   quello della scimmia del nuovo mondo Dusky titi (*Callicebus molloch*, CMO), che contiene solo lo 0.4% del genoma aploide e non presenta una colorazione particolare dell'eterocromatina costitutiva. Tuttavia tutti i cromosomi Y condividono la posizione di SRY immediatamente adiacente a PABY. Quindi   evidente un'alta conservazione dell'ordine lineare dei geni della PAR e di SRY in tutte le scimmie. In evidente contrasto la NrY eccetto SRY [N.d.T. SRY per ovvie ragioni pur non essendo strettamente nella regione che non ricombina: non pu  ricombinare perche' non ha l'omologo. Quando per effetto di una ricombinazione illegittima si trova a far parte di un segmento ricombinato, la sterilit  dovuta al sex reverse che ne consegue impedisce la diffusione e la fissazione dei crossover nella popolazione], sembra essere caratterizzato, soprattutto nell'uomo e nelle grandi scimmie africane, da amplificazione e riarrangiamenti specie specifici delle sequenze Y-specifiche inclusi DAZ, RBM e TSPY.

Esaminando la localizzazione e l'intensit  del segnale dopo FISH eseguita con sonde umane,   evidente che DAZ, RBM e TSPY sono presenti in copie multiple e sempre Y specifici nelle scimmie. L'unica eccezione   rappresentata da DAZ che non   stata messa in evidenza nelle scimmie del nuovo mondo (NWM).

Un'elevata amplificazione delle sequenze RBM e TSPY   riscontrabile nello scimpanz  nano (PPA). Quando si confronta la mappatura di RPM e TSPY di PPA con quella dello scimpanz  comune (PTR) questa giustifica la differenza di dimensione del segmento euromatico riscontrabile citogeneticamente sul braccio lungo del cromosoma Y di queste due specie.

Pi  sorprendente   il raffronto fra sottospecie: confrontando i risultati ottenuti nell'orango di

Sumatra (PPYs) e in quello del Borneo (PPYb) si evidenzia che si sono verificati riarrangiamenti specifici a carico delle sequenze Y-specifiche comprese DAZ, RBM e TSPY. L'amplificazione delle sequenze DAZ era già stata messa in evidenza tramite Southern blot e i dati di FISH confermano l'elevata amplificazione delle sequenze sul braccio lungo dell'Y di PPYb, inoltre evidenziano che l'inversione pericentrica che caratterizza il cromosoma Y di PPYs ha trasferito parte del cluster di DAZ sul braccio corto del cromosoma Y di questa sottospecie. Insieme alla già nota inversione del cromosoma 2 di PPYs questa inversione del cromosoma Y è costitutiva nella popolazione degli oranghi di Sumatra. Perciò la presenza del riarrangiamento di DAZ, RBM e TSPY non sembra avere alcun effetto negativo sulla normale fertilità dell'orango di Sumatra. Anche gli individui ibridi fra le due sottospecie di orango che si sono originati negli zoo non presentano alcun problema di fertilità.

Un'altro aspetto interessante nell'evoluzione del cromosoma Y riguarda la mancanza di segnale delle sequenze DAZ nelle NWM. Questo dato è in contrasto con la conservazione in queste specie di RBM, TSPY e SRY. Dati molecolari hanno messo in evidenza che le sequenze DAZ sono presenti sul cromosoma Y di alcuni primati, ma non di tutti i mammiferi. D'altra parte il topo ha un unico locus autosomico di DAZ e nell'uomo è presente un locus autosomico sul cromosoma 3, che costituirebbe il gene di partenza di eventi di trasposizione, amplificazione e sfronatura che hanno originato il cluster Y-specifico di DAZ (N.d.T.: cfr. articolo precedente). I risultati della FISH su NWM sono in accordo con i dati di Southern blot che indicherebbero la data dell'evento di trasposizione del gene DAZH in un periodo successivo alla separazione delle NWM e OWM (circa 30-50 Myr).

In sintesi i dati della mappatura comparativa indicano che la vicinanza di SRY alla PAR è conservata in tutte le scimmie. Perciò SRY, in quanto induttore della differenziazione del sesso, è un limite invalicabile fra la PAR e la NrY. La NrY, comprendente fra gli altri i cluster delle famiglie DAZ, RBM, e TSPY potrebbero essere soggetti ad amplificazioni, diversificazioni e riarrangiamenti specie-specifici che non interferiscano con la fertilità maschile. I diffusi polimorfismi del cromosoma Y, come inversioni e/o presenza di regioni organizzatrici del nucleolo sono l'espressione morfologica di quella variabilità a livello genomico. Inoltre la trasposizione autosoma-Y come esemplificata da DAZ, costituisce un rischio di malsegregazione o ricombinazione illegittima eccetto quando si verifichi una rapida diversificazione delle sequenze del cromosoma Y. Infatti una rapida diversificazione evolutiva e la fissazione di tali geni della fertilità sarebbe possibile solo all'interno della NrY. Questo potrebbe spiegare come mai la sequenza di DAZ e quella di DAZH (fra loro paraloghe) sono più divergenti di quella di DAZH e Dazh (fra loro ortologhe) [N.d.T: la definizione di ortologhe e' paraloghi si può trovare sullo Strachan]]. Inoltre le diversificazioni specie-specifiche e l'amplificazione delle sequenze geniche per la fertilità nella NrY potrebbero costituire una barriera alla formazione di ibridi fertili costituendo una spinta all'evoluzione della specie.

The IL-9 receptor gene, located in the Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y.

Joris Robert Vermeesch, Paul Petit, Abdenaïm Kermouni, Jean-Christophe Renauld, Herman Van Den Berghe and Peter Marynen *Human Molecular Genetics*, 1997, Vol. 6, No. 1

The human sex chromosomes are structurally and genetically different from one another, except for two regions of 2.5 Mbp and 320 kbp located respectively near the short and long arm telomeres. These regions can pair and recombine during meiosis and are thus termed pseudoautosomal regions (PAR) (1). Linkage analysis indicates that a single obligatory cross-over occurs within the short arm PAR which is probably involved in proper sex chromosome segregation (2, 3). The crossing-over frequency of the long arm PAR is much lower (4, 5). Two genes located in the short arm PAR in man, CSF2RA and IL3RA, are autosomal in mice, suggesting that this region is of autosomal origin (6, 7). The origin of the long arm PAR is unknown. Bickmore et al. (8) demonstrated by Southern analysis that a sequence, which was later shown to originate from the long arm PAR (4, 9, 10), is present on the X but absent from the Y chromosome of great apes. Sequence analysis of the Xq/Yq pseudoautosomal boundary further supported the notion that the formation of this region occurred recently during human evolution (10). Genes present on the mammalian X chromosome are generally subject to X inactivation, which results in an equal dosage of expressed sequences in males and females. A small minority of genes, most of which have copies on the X and the Y chromosome, escape X inactivation (reviewed by Disteche, 11). Surprisingly, SYBL1, a gene located within Xq PAR does not escape X inactivation and, in addition, is also inactive on the Y chromosome, thereby maintaining dosage compensation in an unprecedented way (12). The interleukin-9 (IL-9) receptor gene (IL9R) is also located within Xq PAR at 10­25 kbp from the telomere. IL9R pseudogenes, lacking at least the promoter and exon 1a, are present at 9qter, 10pter, 16pter and 18pter (13).

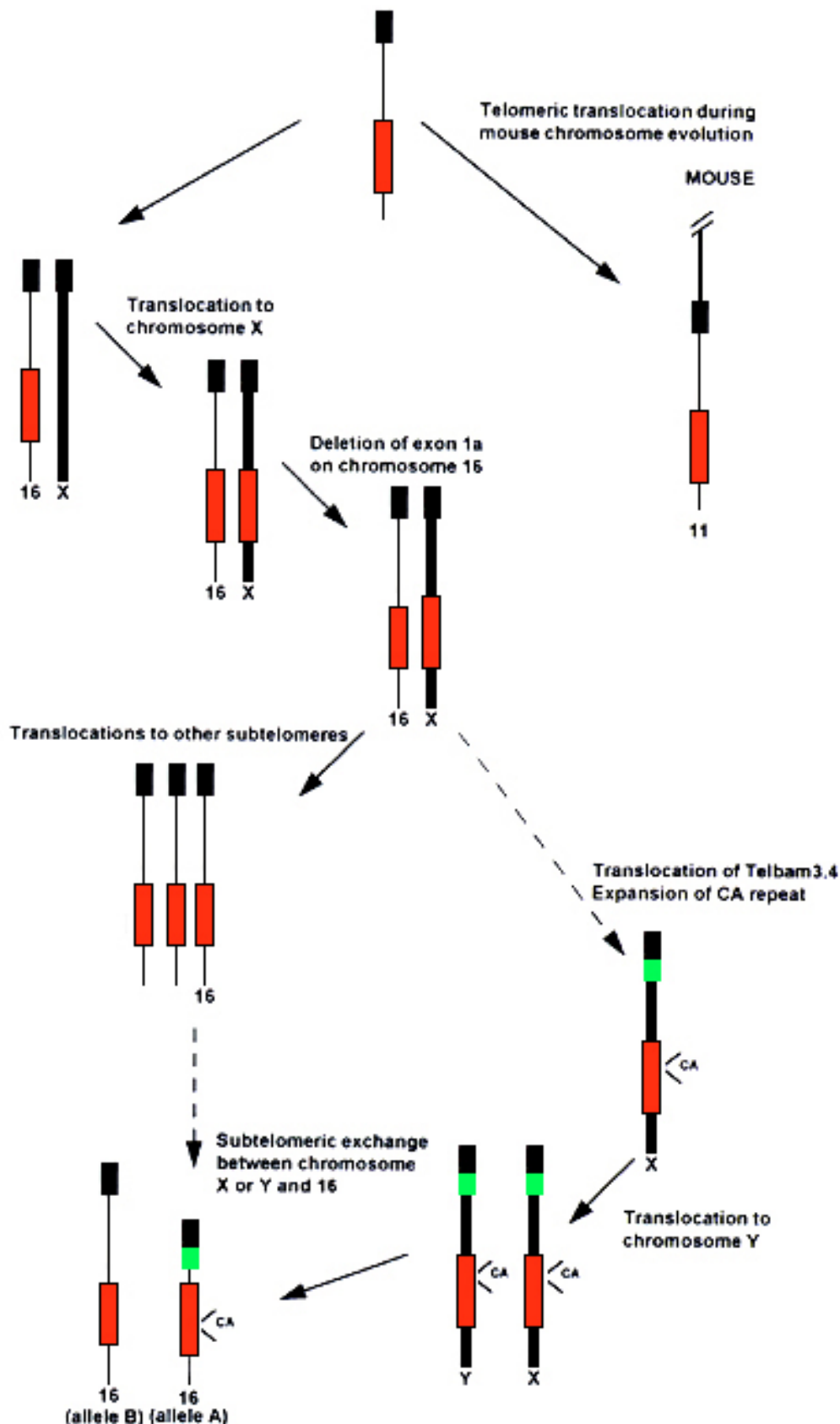
Chromosomal evolution of the IL9R locus

The genes present on the mammalian X chromosome have been strongly conserved as a single linkage group in all eutherian mammals. It was postulated by Ohno that this strong linkage is due to the constraints imposed by X chromosome inactivation (16). A translocation of an X-linked gene subject to X inactivation to an autosome or an autosome to X translocation would alter the gene dosage and such a change would be selected against. So far, only three genes are known that defy X linkage in all eutherian mammals. CLCN4 was shown recently to be present on the X chromosome of *Mus spretus* but on autosome 7 in C57BL/6 mice (17, 18). In human, two genes present within the short arm PAR, CSF2RA and IL3RA, map autosomal in mice (6, 7). The results demonstrate that the IL-9 receptor is located on mouse chromosome 11. Thus, the IL9R locus represents a second region of the human X chromosome, besides the short arm PAR, which is autosomal in mice and contains a fourth gene eluding X-linkage in eutherian mammals. Comparison of the human and mouse gene maps sheds further light on the evolution of the IL9R locus. In mouse, the Hba gene cluster as well as Il9r are located on chromosome 11A, while in human the HBA gene cluster is located near the chromosome 16 telomere, ~10 kb centromeric from the chromosome 16 IL9R pseudogene (19). The authors postulate that Il9r is physically linked with the Hba locus and that the human 16p IL9R pseudogene is a remnant of the original ancestral IL-9 receptor.

The human IL9R probe detects homologous sites on the gorilla 9, 12, 16 and X and on the chimpanzee 12, 16 and X homologous chromosomes but not on their Y chromosome. The absence of an IL9R homologous site on the great apes Y indicates that the IL-9 receptor gene was duplicated recently onto the human Y chromosome, a finding in agreement with previous observations suggesting the duplication of Xq PAR following the human­ chimpanzee divergence (8, 10). As all human IL9R pseudogenes branched before the great apes divergence (13) and as a recent translocation created the Xq/Yq pseudoautosomal region, IL9R exists most likely as an X linked gene in the great apes. The finding that the strongest cross- hybridizing locus is located on the great

apes X chromosome further validates this hypothesis. IL9R is thus exceptional among X/Y genes in that it is X linked in some mammals (great apes), but autosomal or pseudoautosomal in others (mice and human).

Xp PAR genes are thought to have evolved by succeeding additions onto one sex chromosomal PAR



mitosome to the
preserves the
re-existing
the X
g the X to X/Y
o silenced on Y
I have
enes. However,

to the fact
which is located
. As IL9R is
r not this gene
n the great
ion escape
istory for the

Fig. 1. Proposed chromosomal evolution of the human IL9R locus. The black boxes indicate the telomeres, the red boxes indicate the IL9R gene and the green boxes indicate the Telbam 3.4 sequence. Thin lines indicate random sequence on the autosomes, while the thick line indicates random sequence on the sex chromosomes. The interrupted arrows separate the events occurring before the great ape divergence and the events occurring after human­chimpanzee divergence.

An IL9R ancestral gene resided near the telomere on what became the present-day human chromosome 16. During the mouse chromosomal evolution, a telomeric translocation, inversion or fusion internalized IL9R (24). The chromosome 16 telomere-associated region translocated from chromosome 16 onto a region that is now defined as the long arm PAR. A deletion caused the loss of exon 1a on the chromosome 16 IL9R. Shortly after and well before the divergence of the great apes, other terminal translocations created the pseudogenes on chromosomes 9 and 10. Since no hybridization signals were detected on the chromosome 10 homologs of gorilla and chimpanzee nor on the chromosome 9 homolog of chimpanzee, the chromosome 10 and 9 pseudogenes have probably been lost during gorilla and chimpanzee chromosome evolution. Later, during human evolution, a second translocation may have added Telbam3.4 (25) near the IL9R gene and shortened the original subtelomeric region (16pter allele B-like) on chromosome X. After the human­ chimpanzee divergence, the CA repeat present within intron 8 of the IL9R expanded on the X chromosome followed by a translocation of the Xq terminal region to the Yq chromosome, which created the present day long arm PAR (10, this paper). Finally, ectopic gene conversion or recombination between the IL-9 receptor gene present on chromosome X and chromosome 16 (allele B) generated allele A on chromosome 16 and is responsible for part of the allelic variation described at chromosome 16p13.3 (13, 14, 26).

References

1. Rappold, G.A. (1993) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.*, 92, 315­324.
2. Rouyer, F., Simmler, M.-C., Johnsson, C., Vergnaud, G., Cooke, H.J. and Weissenbach, J. (1986) A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Nature*, 319, 291­295.
3. Page, D.C., Bieker, K., Brown, L.G., Hinton, S., Leppert, M., Lalouel, J.-M., Lathrop, M., Nystrom-Lahti, M., De La Chapelle, A. and White, R. (1987) Linkage, physical mapping, and DNA sequence analysis of pseudoautosomal loci on the human X and Y chromosomes. *Genomics*, 1, 243­256.
4. Freije, D., Helms, C., Watson, M.S. and Donis-Keller, H. (1992) Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*, 258, 1784­1786.
5. Lin, L. and Hamer, D.H. (1995) Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2013­2016.
6. Disteche, C.M., Brannan, C.I., Larsen, A., Adler, D.A., Schorderet, D.F., Gearing, D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Park, L.S. (1992) The human pseudoautosomal GM-CSF receptor a subunit gene is autosomal in mouse. *Nature Genet.*, 1, 333­336.
7. Miyajima, I., Levitt, L., Hara, T., Bedell, M.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Miyajima, A. (1995) The murine interleukin-3 receptor a subunit gene: chromosomal localization, genomic structure, and promoter function. *Blood*, 85, 1246­1253.
8. Bickmore, W.A. and Cooke, H.J. (1987) Evolution of homologous sequences on the human X and Y chromosomes, outside of the meiotic pairing segment. *Nucleic Acids Res.*, 15, 6261­6271.
9. Arveiler, B., Vincent, A. and Mandel, J.-L. (1989) Toward a physical map of the Xq28 region in man: linking color vision, G6PD, and coagulation factor VIII genes to an X-Y homology region. *Genomics*, 4, 460­471.
10. Kvaløy, K., Galvagni, F. and Brown, W.R.A. (1994) The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 771­778.
11. Disteche, C.M. (1995) Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.*, 11, 17­22.

12. D'Esposito, M., Ciccodicola, A., Gianfrancesco, F., Esposito, T., Flagiello, L., Mazzearella, R., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1996) A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nature Genet.*, 13, 227­229
13. Kermouni, A., Van Roost, E., Arden, K.C., Vermeesch, J.R., Weiss, S., Godelaine, D., Flint, J., Lurquin, C., Szikora, J.-P., Higgs, D.R., Marynen, P. and Renauld, J.-C. (1995) The IL-9 receptor gene (IL9R): genomic structure and chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter, and 18 pter. *Genomics*, 29, 371­382.
14. Wilkie, A.O.M. and Higgs, D.R. (1992) An unusually large (CA)_n repeat in the region of divergence between subtelomeric alleles of human chromosome 16p. *Genomics*, 13, 81­82.
15. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, R., Preisinger, A.C., Willard, H.F., Michelson, A.M., Riggs, A.D. and Orkin, S.H. (1987) Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res.*, 47, 4806­4813.
16. Ohno, S. (1967) *Sex Chromosomes and Sex Linked Genes*. Springer Verlag, Berlin.
17. Palmer, S., Perry, J. and Ashworth, A. (1995) A contravention of Ohno's law in mice. *Nature Genet.*, 10, 472­476.
18. Rugarli, E.I., Adler, D.A., Borsani, G., Tsuchiya, K., Franco, B., Hauge, X., Disteche, C., Chapman, V. and Ballabio, A. (1995) Different chromosomal localization of the *Clcn4* gene in *Mus spretus* and C57BL/6J mice. *Nature Genet.*, 10, 466­471.
19. Kielman, M.F., Smits, R., Devi, T.S., Fodde, R. and Bernini, L.F. (1993) Homology of a 130-kb region enclosing the α -globin gene cluster, the α -locus controlling region, and two non-globin genes in human and mouse. *Mammalian Genome*, 4, 314­323.
20. Graves, J.A. (1995) The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes-an evolving understanding. *BioEssays*, 17, 311­320.
21. Shore, D. (1995) Telomere position effects and transcriptional silencing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Blackburn, E.H. and Greider, C.W. (eds), *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139­191
22. Zuckerland, E. and Henning, W. (1995) Tracking heterochromatin. *Chromosoma*, 104, 75­83.
23. Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P., Mamalami, C., Parrington, J., Fox, M., Miliou, A., Jones, M. and Kioussis, D. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science*, 271, 1123­1125.
24. Elliott, R.W. and Pazik, J. (1995) An interstitial telomere array near Hba on mouse chr 11 is a candidate for the homolog of the telomere at human 16p. *Genomics*, 27, 217­218.
25. Brown, W.R.A., MacKinnon, P.J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V.J. and Dobson, M.J. (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell*, 63, 119­132.
26. Wilkie, A.O.M., Higgs, D.R., Rack, K.A., Buckle, V.J., Spurr, N.K., Fischel-Ghodsian, N., Ceccherini, I., Brown, W.R.A. and Harris, P. (1991) Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell*, 64, 595­606.
27. Avanzi, G.C., Lista, P., Giovinazzo, B., Miniero, R., Saglio, G., Benetton, G., Coda, R., Cattoretti, G. and Pegoraro, L. (1988) Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br. J. Haematol.*, 69, 359­366.
28. Jauch, A., Wienberg, J., Stanyon, R., Arnold, N., Tofanelli, S., Ishida, T. and Cremer, T. (1992) Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 8611­8615

Differential expression pattern of XqPAR-linked genes SYBL1 and IL9R correlates with the structure and evolution of the region.

Maurizio D'Esposito, Maria Rosaria Matarazzo, Alfredo Ciccodicola, Maria Strazzullo, Richard Mazzarella, Nandita A. Quaderi, Hiroyuki Fujiwara, Minoru S.H.Ko, Lucy B. Rowe, Angela Ricco, Nicoletta Archidiacono, Mariano Rocchi, David Schlessinger and Michele D'Urso - Human Molecular Genetics, 1997, Vol. 6, No. 11

The recently discovered second pseudoautosomal region (XqPAR) contains at least two genes, IL9R and SYBL1. Recent findings show that, like XpPAR genes, IL9R escapes X inactivation and its Y allele is also expressed, but SYBL1 seems to act like an X-linked gene, expressed from the active X chromosome but not from the inactive X or Y. Here the authors show that differences are also seen in the evolution of the sex chromosome locations of IL9R and SYBL1. IL9R is known to be autosomal in mice, and is X-linked only in primates. SYBL1, however, has been found to be on the X chromosome in all mammals tested, from marsupials to humans. Both genes were duplicated on the Y homo-logue of the terminal portion of the X chromosome during the evolution of Homo sapiens from other higher primates. The inactivation pattern of SYBL1 may be correlated with its longer history of X linkage, and at a more centromeric chromosomal position during evolution; the more recent X linkage and more telomeric position of the IL9R gene may explain its autosomal, 'uninactivated' transcriptional status.

Sex chromosomes are thought to derive from a homomorphic pair of sex chromosomes, with gradual reduction of the Y chromosome in a complex multistep process recently called the 'addition-attrition hypothesis' (1). Homologous regions on both the long and short arms of the X and Y chromosomes attest to their common origin (2, 3). Various lines of evidence (4, 5) reveal that a special class of homology occurs in a region, the XpPAR, 2.6 Mb in length, that recombines between X and Y, ensuring correct segregation at male meiosis (6).

In the pseudoautosomal region (PAR), the requirement for dosage compensation, which underlies Ohno's law (7) of the conservation of genes on the X chromosome, is relaxed. As a result, addition-attrition could lead to variation in PARs among different species; in fact, the mouse homologues of two genes in the human XpPAR, CSFR2A and IL3RA (8, 9) have been mapped to autosomes. A second, 320 kb PAR at the Xq end of the chromosome recently has been characterized (10­12). Its evolutionary history is only partially known. Anonymous probes like DXYS61 (3) showed X linkage in higher primates and presence on both human X and Y; but the inclusion of those probes in a PAR was only clear when DNA from the whole region was cloned (13). The sequence at the PAR boundary on the X and Y chromosomes indicates that the XqPAR may have arisen by transposition via illegitimate recombination between LINE sequences (12).

A more detailed analysis of the molecular history of the XqPAR has become possible with the isolation of two genes encoded in the region (14, 15). In spite of their close linkage in the XqPAR, their transcriptional status is quite different: like XpPAR genes, IL9R escapes X inactivation and its Y allele is also expressed. In contrast, SYBL1 seems to act like an X-linked gene; it is expressed on the active X chromosome but not from the inactive X or the Y. IL9R was shown recently (16) to be autosomal in the mouse while it is X-linked in apes and X/Y-linked only in the human lineage. It thus represents a fourth case of a gene eluding conservation of X linkage in eutherian mammals. In contrast, the authors show that, using the XqPAR synaptobrevin-like gene SYBL1 (15) as an evolutionary marker, at least one XqPAR-linked gene shows conservation of X linkage among eutherian species. This coincides with previous observations in marsupials and monotremes for other Xq genes (17). In order to explore the evolutionary history of the locus, they identified SYBL1 homologues in marsupials, mice and higher primates, and they show that this gene is X-linked in each species studied. A further step in Homo sapiens progenitors added the corresponding segment to the Y to create the modern human XqPAR. A bipartite structure and evolution of this region can thus be suggested that correlates with the striking differences in transcriptional behaviour of the two genes so far studied.

Recent studies on monotreme and marsupial chromosomes reveal that genes mapped on the long arm

of the human X chromosome retain this linkage in these distantly related genomes (17). Those studies postulated the presence of an XCR (X conserved region) including all of Xq, beginning before or at the time of divergence between Prototheria, Methateria and Eutheria, or ~170 million years ago (17). This can be taken as a confirmation and refinement of Ohno's law, though exceptions have also been noted (8, 9).

Previous calculations (3, 12), based on sequence divergence of the LINE element at the human XqPAR boundary compared with homologues, indicate that the chromosome translocation and subsequent X/Y inheritance for sequence elements in this region occurred 15±20 million years ago. On the other hand, divergences between human, chimpanzee and gorilla lineages seem to have occurred more recently in evolution. The details are uncertain because expert opinion varies on the 'star-like' branching and timing of the process, but one estimate suggests a critical period 6±8 million years ago (21).

Earlier evidence for X­Y homologous DNA near the Xq/Yq termini in humans was found by Bickmore and Cooke (3), who showed that an anonymous probe DXYS61 (formerly called 2: 13) in the region was X-linked in great apes but was found on both X and Y in humans. Because the DXYS61 sequence is limited to higher primates and is not expressed, this analysis was necessarily limited, and only hinted at the possibility of more extensive homologies.

The use of the human SYBL1 gene as a probe has permitted us to detect the mouse and marsupial homologues and determine some features of the molecular and functional evolution of the XqPAR. Apparently the conservation of syntenic equivalence in Xq extends to the human SYBL1 gene, but not to the somewhat more telomeric gene, IL9R [16; the genes are ~ 40 kb apart (A.Ciccodicola et al., in preparation)]. The simplest evolutionary pathway for the human XqPAR would start from a time at which the SYBL1 gene was already at a subtelomeric position on the X. An IL9R gene copy would then have been interpolated from its earlier autosomal location (mouse chromosome 11 or its evolutionary equivalent) between the SYBL1 locus and the telomere, before the divergence of human from the great apes (16). Then the region was duplicated on a Y chromosome homologue as well, possibly involving an illegitimate LINE-mediated recombination between X and Y chromosomes (12). Other additions in the XqPAR included the introduction of the proterminal repeat TelBam3.4 (16).

A PAR is defined by two criteria: a copy of the sequences is found on both the X and the Y chromosomes, and the region shows meiotic pairing and recombination between the X and the Y. Genetic exchange between the X and Y homologues of the XqPAR has been demonstrated by the use of polymorphic markers in the region (11, 22). Ongoing sequencing efforts have revealed that three markers (see Fig. 1) that have been used to detect polymorphism and recombination are respectively within the SYBL1 gene (LH1, GDB name: DXYS225, between exons 5 and 6), closely linked to SYBL1 (sDF1, GDB name: DXYS154), and very near to IL9R (LH2, GDB name: DXYS227). In addition, sequencing results show that the X and Y copies of the coding sequences of SYBL1 are identical at the nucleotide level, consistent with the active homogenization of the content of this part of the X and Y via recombination (A.Ciccodicola et al., in preparation). In their currently extant forms, the XpPAR and XqPAR both show relatively high recombination rates though, unlike the XpPAR (5), the XqPAR does not show an obligate cross-over in every meiosis.

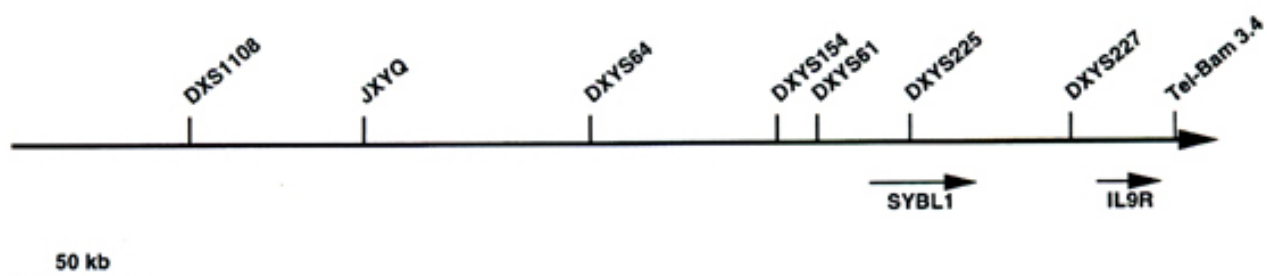


Figure (A) Schematic representation of the human XqPAR region. From left to right: DXS1108 (11), JXYQ [XqPAR boundary marker (12)], DXYS64 (30), DXYS154(11), DXYS61 (3), DXYS225 (22), DXYS227 (22) and TelBam3.4 (31).

The more detailed understanding from the mapping data of the physical evolution of the XqPAR can be used to address questions about the function of genes in this region. The most striking difference between the two genes so far studied in the XqPAR remains their modes of regulation of expression, that are reported elsewhere (15, 16). IL9R expression seems to be typically pseudoautosomal, occurring from both X and Y copies; this may reflect its more recent introduction from an autosome to the X chromosome at this distal position. A sequence barrier may protect some X-linked genes, including genes in the XpPAR (23), from the passage of a wave of inactivation. If so, such a barrier could exist between the SYBL1 and IL9R loci, since the X-linked copy of SYBL1 is subject to X-inactivation and IL9R is not. The exact nature of such barriers is not yet known, but might include epigenetic changes, such as methylation of CpG islands, replication timing or absence of acetylated histone H4 (24­26), or other structural changes in chromatin.

In addition to the X inactivation, the unusual inactivation of the SYBL1 copy on the Y chromosome suggests the presence of other mechanisms, that differ from those that inactivate X chromosome genes, since there is no known inactivation centre on the Y. The effect is to render the function of the SYBL1 gene typical of normal X linkage, and to make the Y homologue a reservoir of alleles that can be recruited back to active form by recombinational exchange.

In conclusion, the analysis suggests that the XqPAR includes a highly conserved, older, more centromeric part of the X which has been extended by punctate evolution in the more distal portion. The authors have demonstrated that the XqPAR is a region newly added to the human Y and not a remnant of an ancient X­Y homology region, and they postulate that differences in expression of SYBL1 and IL9R can be explained by differences in the time of transfer of these segments to the X and Y chromosomes, and the proximity of each to the telomere.

References

1. Graves, J.A.M. (1995) The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes-an evolving understanding. *BioEssays*, 17, 311­321.
2. Affara, N.A. and Ferguson-Smith, M.A. (1994) In *Molecular Genetics of Sex Determination*. Academic Press, pp. 225­265
3. Bickmore, W.A. and Cooke, H.J. (1987) Evolution of homologous sequences on the human X and Y chromosomes, outside the meiotic pairing segment. *Nucleic Acids Res.*, 15, 6261­6271
4. Chandley, A.C., Goetz, P., Hargreave, J.B., Joseph, A.M. and Speed, R.M. (1984) On the nature and extent of the XY pairing at meiotic prophase in man. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 38, 241.
5. Burgoyne, P.S. (1982) Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of the mammals. *Hum. Genet.*, 61, 85­90.
6. Rouyer, F., Simmler, M.C., Johnsson, C., Vergnaud, G., Cooke, H.J. and Weissenbach, J. (1987) A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Nature*, 319, 291­295.
7. Ohno, S. (1967) *Sex Chromosome and Sex Linked Genes*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
8. Disteche, C., Brannan, D.I., Larsen, A., Adler, D.A., Schorderet, D.F., Gearing, D., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Park, L. S. (1992) The human pseudoautosomal GM-CSF receptor a subunit is autosomal in mouse. *Nature Genet.*, 1, 333­336.
9. Miyajima, I., Levitt, L., Hara, T., Bedell, M.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Miyajima, A. (1995) The murine interleukin-3 receptor a subunit gene: chromosomal localization, genomic structure and promoter function. *Blood*, 85, 1246­1253.
10. Rappold, G.A. (1993) The pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.*, 92, 315­324.
11. Freije, D., Helms, C., Watson, M.S. and Donis-Keller, H. (1992)

- Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*, 258, 1784­1787.
12. Kvaloy, K., Galvagni, F. and Brown, W.R.A. (1994) The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 771­778.
 13. Freije, D. and Schlessinger, D. (1992) A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 66­80.
 14. Kermouni, A., Van Roost E., Arden, K.C., Vermeesch, J.R., Weiss, S., Godelaine, D., Flint, J., Lurquin, C., Szikora, J.P., Higgs, D.R., Marynen, P. and Renaud, J.C. (1995) The IL9R receptor gene (IL9R): genomic structure and chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter and 18pter. *Genomics*, 29, 371­382.
 15. D'Esposito, M., Ciccociola, A., Gianfrancesco, F., Esposito, T., Flagiello, L., Mazzarella, R., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1995) A synaptobrevin like gene in Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nature Genet.*, 13, 227­229
 16. Vermeesch, J.R., Petit, P., Kermouni, A., Renaud, J.-C., Van Den Berghe, H. and Marynen, P. (1997) The IL9R receptor gene, located in Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1­8.
 17. Graves, J.A.M. and Watson, J.M. (1991) Mammalian sex chromosomes: evolution of organization and function. *Chromosoma*, 101, 63­68.
 18. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403­410.
 19. Shaw, M.W. and Krooth, R.S. (1964) The chromosomes of tasmanian rat-kangaroo (*Potorous tridactylis apicalis*). *Cytogenetics*, 3, 19­33.
 20. Lichter, P., Tang, C. J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. A., Housman, D. and Ward, D. C. (1990) High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*, 247, 64­69
 21. Koop, B.F., Goodman, M., Xu, P., Chan, K. and Slightom, J.L. (1986) Primate h-globin DNA sequences and man's place among the great apes. *Nature*, 319, 234­238.
 22. Lin, L. and Hamer, D.H. (1995) Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2013­2016.
 23. Disteche, C.M. (1995) Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.*, 11, 17­22.
 24. Riggs, A.D. and Pfeifer, G.D. (1992) X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet.*, 8, 169­174.
 25. Scott Hansen, R., Canfield, T.C., Fjeld, A.D. and Gartler, S.M. (1996) Role of late replication in the silencing of X-linked genes. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1345­1353.
 26. Jeppesen, P. and Turner, B.M. (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74, 281­289.
 27. Rowe, L.B., Nadeau, J.H., Turner, R., Frankel, W.N., Letts, V.A., Eppig, J.T., Ko, M.S.H., Thurston, S.J. and Birkenmeier, E.H. (1994) Maps from two interspecific backcross DNA panels available as a community genetic mapping resource. *Mamm. Genome*, 5, 253­274.
 28. Yotsumoto, S., Fujiwara, H., Horton, J.H., Mosby, T.A., Wang, X., Cui, Y. and Ko, M.S.H. (1996) Cloning and expression analysis of mouse dystroglycan gene: specific expression in maternal decidua at the peri-implantation stage. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1259­1267.
 29. Zornig, M., Klett, C., Lovec, H., Hameister, H., Winking, H., Adolph, S. and Moroy, T. (1995) Establishment of permanent wild-mouse cell lines with readily identifiable marker chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 71, 37­40.
 30. Arveiler B., Vincent A. and Mandel J.L. (1989) Toward a physical map of a Xq28 region in

man: linking color vision, G6PD, and coagulation factor an X­Y homology region. *Genomics*, 4, 460­471.

31. Brown, W.R.A., McKinnon, P.J., Villasanta, A., Spurr, N., Buckle, V.J. and Dobson, M.J. (1990) Structure and polymorphisms of human telomere-associated DNA. *Cell*, 63, 119­132.

Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yqpseudoautosomal region.

Alfredo Ciccodicola, Maurizio D'Esposito, Teresa Esposito, Fernando Gianfrancesco, Carmela Migliaccio, Maria Giuseppina Miano, Maria Rosaria Matarazzo, Marcella Vacca, Annamaria Franzè, Monica Cuccurese, Massimo Cocchia, Anna Curci, Antonio Terracciano, Anna Torino, Silvia Cocchia, Grazia Mercadante, Emilio Pannone, Nicoletta Archidiacono, Mariano Rocchi, David Schlessinger, Michele D'Urso. Human Molecular Genetics 2000 vol.9 n.3

During the progressive attrition of genes from the Y chromosome during evolution, the requisite pairing of Y and X at meiosis is maintained by the retention of some DNA that is the same on both chromosomes. Recombination between this 'pseudoautosomal' DNA at the end of the short arm of the chromosomes (Xp and Yp) assures the homogenization of sequence in the region (1, 2). Like most autosomal genes, those in the 2.6 Mb Xp/YpPAR are expressed from both X and Y alleles (3).

A formally comparable second pseudoautosomal region, Xq/YqPAR, was discovered during the mapping of the X chromosome (4). It contains sequences that had been earlier recovered from both X and Y, and shows recombination over its entire extent (5). However, it also shows properties distinct from those of the Xp/YpPAR. The level of recombination is 6-fold higher than in the bulk of the X chromosome, though much less than the requisite recombination at every meiosis in the Xp/YpPAR (5, 6). Perhaps more striking, when two genes were mapped to the Xq/YqPAR and studied further, IL9R showed the biallelic expression characteristic of Xp/YpPAR genes (7), but SYBL1 was found to be inactivated on both the inactive X and Y chromosomes, achieving dosage compensation in a unique manner (8).

To analyze the nature and regulation of Xq/YqPAR genes, the 330 270 bp region has been sequenced. Analysis shows that the two genes found earlier are characteristic of two distinct subregions. The two segments differ sharply in GC and repetitive sequence content and show different modes of gene expression. The proximal portion contains a second gene, HSPRY3, with the same unusual inactivation pattern reported for SYBL1: the distal portion contains not only IL9R but also a gene that is embedded in the GC-rich region adjoining the telomeric TTAGGG repeats. Consistent with recommendations of the HUGO nomenclature committee, named it CXYorf1. Like IL9R, it can be expressed even from inactive X chromosome.

Using probes for these genes, analyses of evolutionary dynamics reveal a quite complex stepwise addition of autosomal portions to the ancestral region, which subsequently translocated to the Y chromosome, thus forming the modern Xq/YqPAR. The analysis of allele-specific expression reveals a uniquely human situation for the Xq/YqPAR, in which, for two of the four constituent genes (SYBL1 and HSPRY3), the Y chromosome provides a reserve of inactive alleles that can be activated by recombination. A possible relation of these inactivation properties to potential sex-limitation of some conditions mapped to distal Xq could be supposed.

Definition of the PAR

A number of regions on the X and Y chromosomes share sequence content. In general, X-Y homologous sequences in the body of the chromosome are relics remaining on the Y after the evolutionary attrition of its gene content. Because these regions do not recombine at any detectable level between X and Y, they are gradually diverging by mutation, so that sequences clearly differ [e.g. in direct sequencing of probes from the 4 Mb Xq21.3-Yq11 homologous region (20)]. In contrast, the Xp/YpPAR and Xq/YqPAR sequences recombine, and therefore remain homogenized; but they differ in idiosyncratic secondary features, including recombination rates and region-specific gene regulation.

The difference in recombination is quantitative. Xp/YpPAR recombines at least once at every male meiosis; the Xq/YqPAR recombines at a rate of 2% (though this is still 6-fold greater than the average for X-specific DNA). In contrast, the difference in regulation of the two PAR regions is qualitative, and readily apparent at the gene level. Like the Xp/YpPAR, where all genes escape inactivation, biallelic expression is seen for the distal portion of the Xq/YqPAR for IL9R and very likely for CXYorf1 genes [expression from one of three inactive X chromosomes in hybrid cells was not concordant, but this is similar to findings with other genes (as in ref. 21)]. In contrast, the

genes in the proximal portion of the Xq/YqPAR (SYBL1 and HSPRY3) show a distinctive pattern, with inactivation on both X and Y chromosomes.

Zones of the Xq/YqPAR: structure and evolution

Differences in regulation are correlated with evolution and structure of zones 1 and 2 of the Xq/YqPAR. Zone 1 was first translocated onto the X chromosome at a time after the development of marsupials but before the development of mice (22). Zone 2, with its different content of GC and repetitive elements, was probably added later, in a multistep process that first created the IL9R subregion. The presence of a third, separate region, which includes CXYorf1 and the telomeric repeat, is clearly demonstrated using CXYorf1 as an evolutionary marker. In fact, the anonymous marker TelBam3.4 has already showed that telomere-associated DNA is common to Xq/Yq and other chromosomes (11). It is interesting to note that the mobilization of these sequences may have started from chromosome 12 and later spread on a number of autosomes, thus forming neo-telomeres. This notion is further supported by the finding of a degenerate TTAGGG repeat between transition zones (see below). Thus, the Xq/YqPAR has two transcriptionally distinct subregions, zones 1 and 2, but in terms of evolutionary origin, zone 2 shows a further division into at least two distinct subregions.

The figure shows putative steps in evolution from the simpler X structure in mouse to the more complex structure in primates. Presumably all of the steps shown are subsequent to the stages of Y attrition defined for the non-recombining portion of the sex chromosomes by Lahn and Page (23). The oldest segment of the PAR, zone 1, is characteristically GC poor and richer in LINEs compared with Alu sequences and, in fact, the centromeric border of zone 1 is defined by a crossover in a LINE element that created the region. The addition of zone 1 to X-specific sequences may have been correlated with the local concentration of LINE elements to the exclusion of genes [the first gene centromeric of the Xq/YqPAR border is BBOX2, transcribed starting 116 kb centromeric and in the centromeric direction (Ciccociola et al., manuscript in preparation); HSPRY3, the first gene in the PAR, is 67 kb distal].

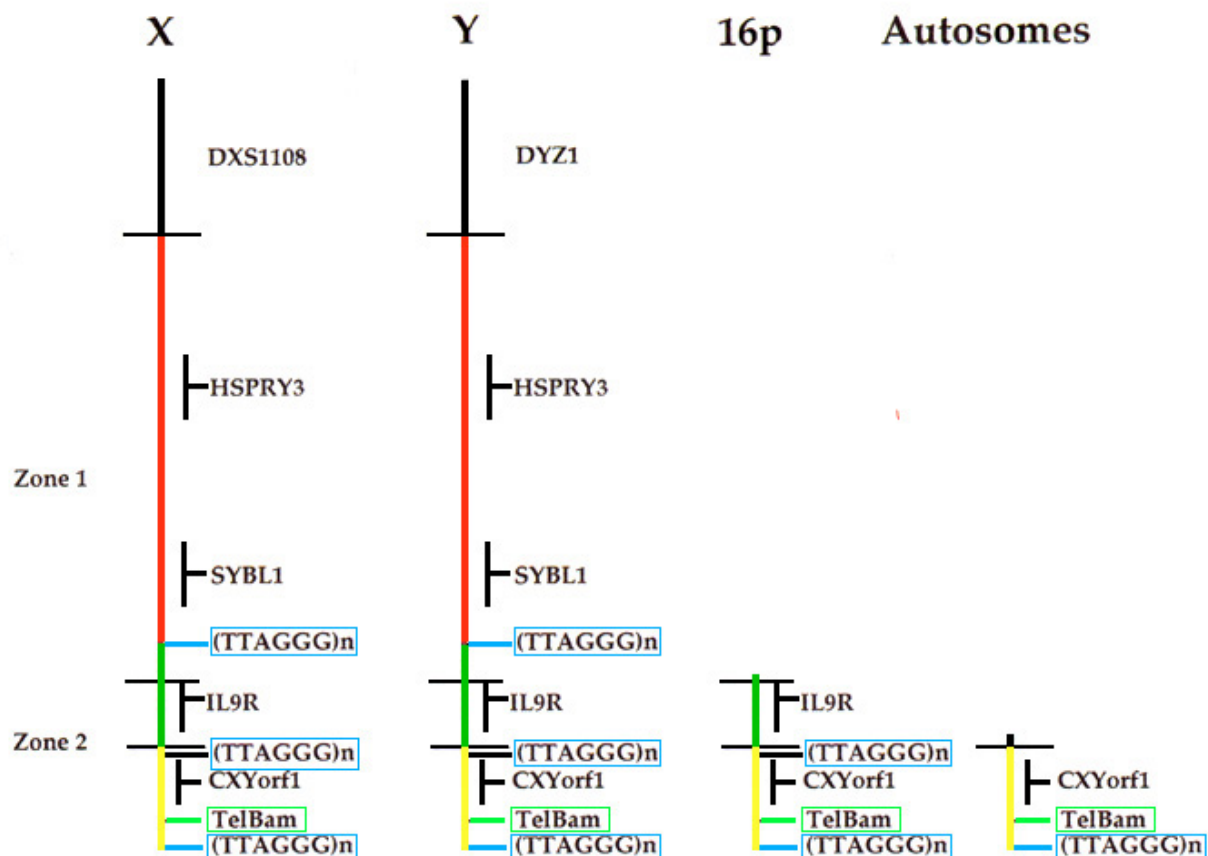


Figure 1. Schematic representation of the Xq/Yq PAR, subdivision into zones 1 and 2 and segments homologous to autosomes. Evolutionary steps are indicated by colour code: red, region conserved in the mouse X chromosome; green, region conserved only in primates. The late addition of CXYorf1 is highlighted in yellow. Degenerate tandem repeats of TTAGGG roughly demarcate boundaries between these segments (see text).

The sites of translocation/recombination events that added parts of zone 2 to the end of the X chromosome may be marked by some degenerate sequence remnants of telomere (TTAGGG) repeats between the SYBL1 and IL9R genes (at positions 250 446-254 511 and 279 809-280 386) and between the IL9R and CXYorf1 genes (at position 318 737-319 056) (Fig. 1). This may be a general feature of transitions between proximal and distal portions of subtelomeric regions (cf. ref. 24). CXYorf1 might then have been added in another step(s), a possibility strengthened by the finding that, in all mammalian species analyzed but human, IL9R and CXYorf1 are physically separated.

The final step in the actual creation of the Xq/YqPAR occurred when, late in primate evolution, all of zones 1 and 2 were duplicated as a unit at the end of the Y chromosome. Presumably this event involved another, L1-mediated translocation (9).

X- and X/Y-inactivated genes: regionalization and possible mechanism

It may not be surprising that zone 1 genes show 'normal' X inactivation, as they were in residence on the X chromosome for a long evolutionary period, and could well have been co-opted into a standard X inactivation module. The general notion is that action from the XIST locus spreads in cis across the entire chromosome, and it has been suggested that there are 'boosters' (25) that act as relay stations to reinforce the process. But in addition to a current lack of molecular detail about what is moving along the chromosome and what a booster might be, models have also found it awkward to accommodate the existence of some genes that escape inactivation. Some of these genes are embedded among others that are fully inactivated. An attractive model has been that local

decisions for inactivation are made on a regional basis (rather than gene by gene). This would be consistent with the fact that genes that escape inactivation seem to cluster, for example, in Xp/YpPAR and in Xp11.3 (26). Also consistent with a regionalization model is the differential inactivation of genes in the zones of Xq/YqPAR. White et al. (27) have proposed that sequence differences are paramount, and Lyon (28) has suggested that LINE sequences may somehow promote inactivation, acting as a point in which XIST makes contact with the inactive chromosome. It is certainly striking that zone 1 contains a relative concentration of LINE sequences.

What remains unanticipated and unaccounted for, however, is the phenomenon of Y inactivation. Y inactivation has already been reported for SYBL1, but could have required a specialized, gene-specific mechanism. Instead, it is now clear that Y inactivation occurs across a region, including both SYBL1 and HSPRY3, extending >100 kb. HSPRY3 thus represents a second exception, in addition to SYBL1, to a recently proposed model for the evolution of mammalian X inactivation (29). In the absence of an inactivation center on Y, no simple sequence (like LINEs, for example) can determine inactivation, because the same genes function fully on the active X. But as suggested earlier (8), neighbouring heterochromatin might block the access of transcription machinery to zone 1, or might otherwise promote inactivation by mechanisms including methylation of the promoter regions of SYBL1 (30).

Its proximity to the telomere of many chromosomes (Fig. 3b, and the subgroups of CXYorf1-like ESTs) suggests that CXYorf1 might act, for example, in modulating the local action of telomerase. But the genes in the rest of Xq/YqPAR are apparently a mixed bag, with SYBL1 involved in transport activities in the brain, HSPRY3 in growth factor signaling and IL9R in cytokine action. It seems likely that they were randomly selected for transfer to X and then to Y (Fig. 5). The unique mode of dosage compensation for zone 1 might then have occurred fortuitously, as a consequence of Y sequence in the vicinity of the translocation breakpoint, or might have somehow been subsequently selected.

However, once Y inactivation of these genes is in place, they represent a curious and unprecedented instance in which zone 1 on the Y is a reserve of silent alleles that are nevertheless potentially transcribed and translated. They would be mobilized for expression each time that recombination in the Xq/YqPAR exchanged Y alleles onto the X chromosome.

Because recombination occurs in only 2% of cases, this could have several effects: (i) a null allele usually on the Y could be exchanged onto the X, leading to inactivation of the only gene on the single X in males, which could be disease producing and even lethal, and could have detrimental action in females as well; (ii) an active Y allele might be transferred to an X that has a mutated gene, increasing the activity from that X chromosome; and (iii) a polymorphic variant of a gene on Y might be transferred to X and become functional, possibly changing the probability of certain gene-dependent effects.

References

1. Cooke, H.J., Brown, W.R.A. and Rappold, G.A. (1985) Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature*, 317, 687.
2. Rappold, G.A. (1993) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.*, 92, 315-324.
3. Disteche, C.M. (1995) Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.*, 11, 17-22.
4. Freije, D. and Schlessinger, D. (1992) A 1.6 Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 66-80.
5. Freije, D., Helms, C., Watson, M.S. and Donis-Keller, H. (1992) Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*, 258, 1784-1787.
6. Li, L. and Hamer, D.H. (1995) Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2013-2016.
7. Veermeesch, J.R., Petit, P., Kermouni, J.-C., Van Den Berghe, H. and Marynen, P. (1997) The IL9R receptor gene, located in Xq/Yq

pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1-8.

8. D'Esposito, M., Ciccodicola, A., Gianfrancesco, F., Esposito, T., Flagiello, L., Mazzarella, R., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1996) A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nature Genet.*, 12, 227-229.
9. Kvaloy, K., Galvagni, F. and Brown, W.R.A. (1994) The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 771-778.
10. Bernardi, G. (1989) The isochore organization of the human genome. *Annu. Rev. Genet.*, 23, 637-661.
11. Brown, W.R.A., McKinnon, P.J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V.J. and Dobson, M.J. (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell*, 63, 119-132.
12. D'Esposito, M., Matarazzo, M.R., Ciccodicola, A., Strazzullo, M., Mazzarella, R., Quaderi, N.A., Fujiwara, H., Ko, M.S., Rowe, L.B., Ricco, A. et al. (1997) Differential expression pattern of XqPAR-linked genes SYBL1 and IL9R correlates with the structure and evolution of the region. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1917-1923.
13. Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. and Krasnow, M.A. (1998) sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell*, 92, 253-263.
14. Casci, T., Vinos, J. and Freeman, M. (1998) Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell*, 96, 655-665.
15. de Maximy, A.A., Nakatake, Y., Moncada, S., Itoh, N., Thiery, J.P. and Bellusci, S. (1999) Cloning and expression pattern of a mouse homologue of *Drosophila* sprouty in the mouse embryo. *Mech. Dev.*, 81, 213-216.
16. Kermouni, A., Van Roost, E., Arden, K.C., Vermeesch, J.R., Weiss, S., Godelaine, D., Flint, J., Lurquin, C., Szikora, J.P., Higgs, D.R. et al. (1995) The IL-9 receptor gene (IL9R): genomic structure, chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter, and 18pter. *Genomics*, 29, 371-382.
17. Flint, J., Thomas, K., Micklem, G., Raynham, H., Clark, K., Doggett, N.A., King, A. and Higgs, D.R. (1997) The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nature Genet.*, 15, 252-257.
18. Maric, S.C., Crozat, A., Louhimo, J., Knuutila, S. and Janne, O.A. (1995) The human S-adenosylmethionine decarboxylase gene: nucleotide sequence of a pseudogene and chromosomal localization of the active gene (AMD1) and the pseudogene (AMD2). *Cytogenet. Cell Genet.*, 70, 195-199.
19. Frank, S. and Werner, S. (1996) The human homologue of the yeast CHL1 is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 24337-24340.
20. Mumm, S., Molini, B., Terrell, J., Srivastava, A. and Schlessinger, D. (1997) Evolutionary features of the 4-Mb Xq21.3 XY homology region revealed by a map at 60-kb resolution. *Genome Res.*, 7, 307-314.
21. Brown, C.J., Carrel, L. and Willard, H.F. (1997) Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 1333-1343.
22. Graves, J.A.M., Wakefield, M.J. and Toder, R. (1998) The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1991-1996.
23. Lahn, B.T. and Page, D.C. (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science*, 286, 964-967.
24. Coleman, J., Baird, D.M. and Royle, N.J. (1999) The plasticity of human telomeres demonstrated by a hypervariable telomere repeat array that is located on some copies of 16p and 16q. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1637-1646.
25. Gartler, S.M. and Riggs, A.D. (1983) Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.*, 17, 155-190.
26. Miller, A.P. and Willard, H.F. (1998) Chromosomal basis of X chromosome inactivation: identification of a multigene domain in

- Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 8709-8714.
27. White, W.M., Willard, H.F., Van Dyke, D.L. and Wolff, D.J. (1998) The spreading of X inactivation into autosomal material of an X/autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 209-228.
 28. Lyon, M.F. (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet. Cell Genet.*, 80, 133-137.
 29. Jegalian, K. and Page, D.C. (1998) A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes become X inactivated. *Nature*, 394, 776-780.
 30. Huber, R., Hansen, R.S., Strazzullo, M., Pengue, G., Mazzarella, R., D'Urso, M., Schlessinger, D., Pilia, G., Gartler, S.M. and D'Esposito, M. (1999) DNA methylation in transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, GPC3 and SYBL1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 616-621.
 31. Chen, E.Y., Zollo, M., Mazzarella, R., Ciccodicola, A., Chen, C.N., Zuo, L., Heiner, C., Burrough, F., Repetto, M., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1996) Long-range sequence analysis in Xq28: thirteen known and six candidate genes in 219.4 kb of high GC DNA between the human RCP/GCP and G6PD loci. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 659-668.
 32. Genetics Computer Group (1991) Program Manual for the GCG package, Version 7. GCG, Madison, WI.
 33. Jurka, J., Klonowski, P., Dagman, V. and Pelton, P. (1996) CENSOR-a program for identification and elimination of repetitive elements from DNA sequences. *Computers Chem.*, 20, 119-122.
 34. Solovyev, V.V., Salamov, A.A. and Lawrence, C.B. (1995) Identification of human gene structure using linear discriminant functions and dynamic programming. *Ismb*, 3, 367-375.
 35. Solovyev, V. and Salamov, A. (1997) The Gene-Finder computer tools for analysis of human and model organisms genome sequences. *Ismb*, 5, 294-302.
 36. Tiwari, S., Ramachandran, S., Bhattacharya, A., Bhattacharya, S. and Ramaswamy, R. (1997) Prediction of probable genes by Fourier analysis of genomic sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, 13, 263-270.
 37. Murakami, K. and Takagi, T. (1998) Gene recognition by combination of several gene-finding programs. *Bioinformatics*, 14, 665-675.
 38. Prestridge, D.S. (1995) Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J. Mol. Biol.*, 249, 923-932.
 39. Reese, M.G., Harris, N.L. and Eeckman, F.H. (1996) Large scale sequencing specific neural networks for promoter and splice site recognition. In Hunter, L. and Klein, T.E. (eds), *Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium*. World Scientific Publishing, Singapore, Singapore.
 40. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
 41. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
 42. Archidiacono, N., Storlazzi, C.T., Spalluto, C., Ricco, A.S., Marzella, R. and Rocchi, M. (1998) Evolution of chromosome Y in primates. *Chromosoma*, 107, 241-246.
 43. Lichter, P., Tang, C.J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G.A., Housman, D. and Ward D.C. (1990) High resolution mapping of human chromosomes 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*, 247, 64-69.