

**DIPARTIMENTO DI GENETICA E ANATOMIA
PATOLOGICA
SEZIONE DI GENETICA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI**

**DOTTORATO DI RICERCA
IN GENETICA ED EVOLUZIONE MOLECOLARE**

**CARATTERIZZAZIONE
DI SEQUENZE ALFOIDI CENTROMERICHE IN
PTR *Pan troglodytes* E GGO *Gorilla gorilla***

COORDINATORE:

Prof. MARIANO ROCCHI

DOTTORANDA:

Dott.ssa COSMA SPALLUTO

XII CICLO

1996-2000

”Un essere umano e’ parte di un tutto che noi chiamiamo Universo, una parte limitata nel tempo e nello spazio. Sente se’ stesso, i suoi pensieri, le sue sensazioni come qualcosa di separato dal resto: una specie di illusione ottica della sua coscienza. Questa illusione e’ per noi una sorta di prigione che fa si’ che noi ci limitiamo ai nostri desideri personali e all’affetto per alcune persone che sono le piu’ vicine a noi. E’ nostro compito liberare noi stessi da questa prigione ampliando il campo della nostra compassione affinche’ questo abbracci tutte le creature viventi e l’intera natura nella sua bellezza. Nessuno e’ in grado di realizzarlo interamente, ma il grande sforzo che esso richiede fa di per se’ parte della liberazione ed e’ un presupposto per la sicurezza interiore.”

Albert Einstein

...Mamma, Babbo e Donatello...

...Nicoletta, Mariano, Gigi, Lia e Mike...

...Tom...

...GRAZIE A TUTTI...

Mirella

INDICE

FRONTESPIZIO E RINGRAZIAMENTI	1
ABBREVIAZIONI.....	5
1 INTRODUZIONE	6
1.1 ETEROCROMATINA.....	6
1.2 DNA RIPETUTO.....	8
1.2.1 SEQUENZE RIPETUTE IN TANDEM.....	9
1.2.2 SEQUENZE RIPETUTE INTERSPERSE.....	13
1.3 IL DNA ALFOIDE.....	14
1.4 IL CENTROMERO.....	19
1.4.1 CENTROMERO DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	22
1.4.2 CENTROMERO DI SACCAROMYCES POMBE.....	23
1.4.3 CENTROMERO DI DROSOPHILA MELANOGASTER.....	24
1.4.4 CENTROMERO DI CAENORHABDITIS ELEGANS.....	26
1.4.5 CENTROMERO DI ARABIDOPSIS THALIANA.....	27
1.4.6 CENTROMERO DI MUS MUSCULUS.....	28
1.5 IL CINETOCORE DEGLI EUKARIOTI SUPERIORI.....	28
1.6 IL DNA CENTROMERICO DEGLI EUKARIOTI SUPERIORI.....	33
1.7 MECCANISMI EPIGENETICI.....	34
1.8 I NEOCENTROMERI.....	36
1.9 REGIONI PERICENTROMERICHE.....	42
1.10 STUDI EVOLUTIVI E CLASSIFICAZIONE DEI PRIMATI.....	46
2 SCOPO DELLA RICERCA.....	49
3 STRATEGIE	55
3.1 STRATEGIE PER IL PTR.....	56
3.1.1 STRATEGIA 1.....	56
3.1.2 STRATEGIA 2.....	57
3.1.3 STRATEGIA 3.....	57
3.1.4 STRATEGIA 4.....	58
3.2 STRATEGIE PER IL GGO.....	60
4 RISULTATI	62
4.1 GORILLA.....	62
4.1.1 FISH.....	62
4.1.1.1 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI GGO SU METAFASI DI GGO.....	62
4.1.1.2 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI GGO SU METAFASI DI PTR.....	63
4.1.1.3 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI GGO SU METAFASI DI HSA.....	63
4.1.2 SOUTHERN.....	63
4.1.3 SEQUENZE.....	64
4.2 SCIMPANZE'.....	64
4.2.1 FISH.....	64
4.2.1.1 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI PTR SU METAFASI DI PTR.....	64
4.2.1.2 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI PTR SU METAFASI DI GGO.....	65
4.2.1.3 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI PTR SU METAFASI DI HSA.....	65
4.2.2 SOUTHERN.....	66
4.2.3 SEQUENZE.....	66
5 DISCUSSIONE.....	67
5.1 ORGANIZZAZIONE DELLE SEQUENZE ALFOIDI.....	67
5.2 EVOLUZIONE INTERSPECIFICA.....	70
5.3 REGIONI PERICENTROMERICHE E ALFOIDI.....	71
6 METODICHE SPERIMENTALI.....	72
6.1 FISH.....	72
6.2 SOUTHERN.....	72
6.3 SEQUENZE.....	72

6.4	GEL ELETTROFORESI.....	73
6.4.1	GEL DI AGAROSIO.....	73
6.4.2	MARKERS DI PESI MOLECOLARI.....	73
6.5.1	ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO.....	74
6.5.2	ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO.....	74
6.6	PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) CON LA COPPIA DI PRIMERS $\alpha 27/ \alpha 30$ E CON LA PWO DNA POLIMERASI (Boehringer).....	75
6.7	ELUIZIONE DI DNA DA GEL LMP (Gene clean II).....	77
6.8	CLONAGGIO.....	77
6.8.1	VETTORE DI CLONAGGIO.....	77
6.8.2	PREPARAZIONE DELLE PIASTRE LB ⁺	78
6.8.3	DIGESTIONE DEL VETTORE.....	78
6.8.4	REAZIONE DI LIGAZIONE.....	78
6.8.5	TRASFORMAZIONE CHIMICA.....	79
6.8.6	TRASFORMAZIONE CON L'ELETTROPORATORE.....	79
6.8.7	SCREENING DELLE COLONIE RICOMBINANTI:.....	79
6.8.7.1	ESTRAZIONE RAPIDA DI DNA PLASMIDICO CON FENOLO-CLOROFORMIO.....	79
6.8.7.2	METODO DELLO STUZZICADENTI (TOOTHPICK PLASMID ASSAY).....	80
6.8.7.3	PCR CON LA COPPIA DI PRIMERS SP6 E T7.....	80
6.9	SOUTHERN BLOT.....	81
6.9.1	MARCATURA RADIOATTIVA (Random priming).....	81
6.9.2	IBRIDAZIONE RADIOATTIVA CON α^{32} P-dATP.....	82
6.10	IBRIDI SOMATICI.....	82
6.10.1	COLTURA DI LINFOCITI ED ALLESTIMENTO DI PREPARATI CROMOSOMICI.....	83
6.10.2	COLTURA DI FIBROBLASTI E LINFOBLASTI.....	84
6.11	IBRIDAZIONE <i>IN SITU</i> NON RADIOATTIVA (FISH).....	84
6.11.1	MARCATURA PER NICK-TRANSLATION (con BIOTINA).....	84
6.11.1.1	Precipitazione della sonda.....	85
6.11.1.2	Pretrattamento del vetrino.....	85
6.11.1.3	Denaturazione dei vetrini.....	85
6.11.1.4	Ibridazione.....	85
6.11.1.5	Risciacqui.....	85
6.11.1.6	Bloccaggio.....	86
6.11.1.7	Detection.....	86
6.11.1.8	Risciacqui.....	86
6.11.1.9	Colorazione con DAPI.....	86
6.11.2	OSSERVAZIONE DEI VETRINI.....	86
6.12	PRINS (Primed <i>In situ</i>).....	87
6.13.1	MICRODISSEZIONE.....	88
6.13.1.1	Preparazione dei microaghi.....	88
6.13.1.2	Dissezione del DNA cromosomico.....	88
6.13.2	AMPLIFICAZIONE ENZIMATICA CATALIZZATA DA SEQUENASE E TAQ POLIMERASE.....	89
	BIBLIOGRAFIA.....	90
	LISTA DELLE PUBBLICAZIONI.....	99

ABBREVIAZIONI

AS	Alta stringenza
BS	Bassa stringenza
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> ibridation
GGO	Gorilla gorilla (gorilla)
HOR	High order repeat
HOS	High order structure
LINE	Long interspersed repetitive elements
mya	million years ago
PEV	variegazione per effetto di posizione
PPA	Pan paniscus (bonobo)
PPY	Pongo pygmaeus (orango)
PTR	Pan troglodytes (scimpanze')
SINE	Short interspersed repetitive elements

1 INTRODUZIONE

1.1 ETEROCROMATINA

Il termine eterocromatina fu coniato da Heitz nel 1928 per indicare il materiale cromosomico densamente impacchettato e piu' scuro all'interno del nucleo eucariotico che rimane condensato durante l'intero ciclo cellulare, a differenza dell'eucromatina, piu' lucente che invece appare diffusa in interfase (Holmquist et al., '98). L'eterocromatina è stata distinta da Brown in due tipi: facoltativa e costitutiva (Brown, '66).

L'eterocromatina facoltativa corrisponde a specifiche regioni o anche ad interi cromosomi che restano condensati solo in determinati tessuti o stadi di sviluppo. Questo tipo d'inattivazione è stabilito precocemente durante lo sviluppo embrionale ed è poi mantenuto nelle generazioni successive in cellule somatiche. L'esempio del cromosoma X inattivo nelle femmine di mammifero e' il piu' conosciuto. (Hennig, '99)

L'eterocromatina costitutiva, invece, rappresenta un tipo strutturale di cromatina il cui significato biologico non è ancora chiaro. Essa è presente in tutti gli eucarioti superiori, dagli animali alle piante, in percentuale variabile dal 20% al 80%. L'eterocromatina costitutiva è presente in tutte le fasi del ciclo cellulare e in tutti gli stadi dello sviluppo, sulle regioni corrispondenti di entrambi i cromosomi omologhi; si replica tardivamente durante la fase S, presenta una ridotta ricombinazione meiotica (Hennig, '99, Dernburg et al., '96, Karpen e Allshire, '97). Inoltre l'eterocromatina ha un livello relativamente basso di trascrizione e contiene pochi geni per unità di lunghezza rispetto all'eucromatina; dal punto di vista molecolare, infatti, l'eterocromatina costitutiva è formata principalmente da DNA mediamente e altamente ripetuto. È generalmente localizzata a livello dei centromeri, dei telomeri e in vicinanza delle regioni organizzatrici del nucleolo. Costituisce, inoltre, una cospicua parte dei cromosomi sessuali; può trovarsi interspersa nell'eucromatina e assume per questo il nome di eterocromatina intercalare.

Un'organizzazione simile e' presente in *Arabidopsis thaliana*, dove l'eterocromatina centromerica consiste principalmente di sequenze satelliti con ripetizioni di 180bp e di retrotrasposoni, la maggior parte dei quali fanno parte della famiglia Athilia (Fransz et al., '00). In questa specie e' stato inoltre sequenziato un knob eterocromatico sul braccio corto del cromosoma 4, rivelando 22.5 copie organizzate in tandem di una ripetizione di 1950bp circondato da DNA ricco in retrotrasposoni (CSHL/WUGSC/PEB arabidopsis seq. cons., 00). Un simile knob eterocromatico e' stato parzialmente caratterizzato anche in *Zea Mays* e presenta un'organizzazione analoga (Ananiev et al., '98). Si presume le sequenze ripetute siano le responsabili del conferimento di proprieta' eterocromatiche, un'ipotesi convalidata dal fatto che, in mammiferi transgenici, le sequenze ripetute sono capaci di indurre il silenziamento dei geni (Garrick et al., '98).

Nei cromosomi umani le regioni eterocromatiche sono presenti essenzialmente a livello dei centromeri: le larghe bande C presenti ai cromosomi 1, 2, 9 e 16 e sul braccio lungo

del cromosoma Y. Come già visto per altri eucarioti, tutte queste regioni del genoma sono ricche di sequenze ripetute in tandem (Lee et al., '97).

In *Drosophila*, l'eterocromatina codifica per un certo numero di geni e ha un'importante ruolo nei meccanismi cromosomici. Senza sufficiente eterocromatina, i cromosomi segregano inappropriatamente nelle cellule figlie (Wallrath, '98). In *Drosophila*, l'eterocromatina può essere di tipo α o β (Holmquist et al., '98). La α -eterocromatina, citologicamente individuabile con il bandeggio C, costituita da eterocromatina costitutiva, può sia contenere sia mancare di elementi mobili e consiste di ripetizioni in tandem di una sequenza semplice che subisce evoluzione concertata (cfr alfoidi). I blocchi di α -eterocromatina sono polimorfici, possono variare da un individuo all'altro e non presentano i chiasmi associati alla ricombinazione.

La β eterocromatina è stata individuata nel braccio corto dei cromosomi di hamster siriano (Popescu e DiPaolo, '79), ed è stata originariamente individuata in *Drosophila melanogaster* dove è presente nei cromosomi politenici sotto forma di fibre relativamente disorganizzate e tardive nella replicazione e costituisce il limite tra α -eterocromatina centromerica non politenizzata e l'eucromatina bandeggiata e politenizzata. La β -eterocromatina è costitutiva, presenta poche sequenze uniche, ed è ricca di elementi ripetuti mobili non in tandem. Ambedue i tipi di eterocromatina, tardivi nella replicazione, possono incorporare retrotrasposoni mobili, ma la differenza che giustifica la distinzione in eterocromatina α e β deriva dalla proprietà, da parte della β -eterocromatina, oltre alla presenza di geni unici, di formare chiasmi nei processi di ricombinazione omologa; i chiasmi, sopprimendo la formazione delle ripetizioni in tandem, sono all'origine della tipica struttura della β -eterocromatina.

Una proprietà molto studiata dell'eterocromatina è la sua capacità di reprimere la trascrizione quando riarrangiamenti cromosomici o meccanismi di trasposizione portano delle regioni eucromatiche vicine all'eterocromatina. Questo fenomeno denominato variegazione per effetto di posizione (PEV) è stato descritto per la prima volta in *Drosophila* dove il gene *white+* per il colore rosso dell'occhio, a causa di un'inversione cromosomica, veniva a trovarsi vicino all'eterocromatina centromerica; questo provocava un mosaicismo bianco e rosso dell'occhio per effetto di variegazione nell'espressione di questi geni. Il silenziamento PEV-tipo è anche osservato per i geni eucromatici localizzati vicino ai telomeri in *Saccharomyces cerevisiae*, in prossimità dei centromeri di *Saccharomyces pombe* e nel topo (Wallrath, '98). Queste osservazioni portano alla conclusione che le proprietà strutturali dell'eterocromatina possono essere propagate ad altre regioni cromosomiche che vengono in contatto con domini cromatinici inattivati. Il silenziamento telomerico e il PEV prevedono l'associazione del DNA con complessi proteici multimerici: questi complessi interagendo con istoni modificati si propagherebbero includendo diverse e nuove regioni di DNA reprimendo la trascrizione dei geni in quelle regioni. (Hennig, '99).

Un'altra proteina conosciuta, associata con l'eterocromatina, è HP1. L'HP1 è una proteina cromosomica non istonica di *Drosophila* codificata dal gene *Su(var)205*

(Henikoff e Matzke, '97). Poiche' mutazioni di questo gene sopprimono PEV e la sua overespressione amplificano PEV, HP1 potrebbe essere coinvolta nella determinazione della struttura della cromatina richiesta nell'attivazione dei geni, tuttavia la presenza della proteina HP1 da sola non e' sufficiente a garantire la repressione dei geni, ma sono richiesti componenti addizionali. L'affinita' di HP-1 per i trasposoni artificiali suggerisce un altro ruolo funzionale per l'eterocromatina. Gli elementi parassiti del DNA, come ad esempio i retrotrasposoni L1, rappresentano fino al 16% del genoma umano. Per limitare i danni da parte di questi genomi parassiti, gli organismi sembrano abbiano evoluto meccanismi di difesa: la condensazione dell'eterocromatina, per esempio, potrebbe funzionare in parte anche per prevenire le interazioni di questi parassiti con fattori transagenti e per limitarne la velocita' di diffusione.

La natura interspersa degli elementi parassiti e dei loro discendenti permette loro di colonizzare sia regioni introniche che regioni intergeniche, mentre altre frazioni sono evidenziabili come blocchi di ripetizioni privi di geni nelle vicinanze. Queste frazioni, individuabili intorno al centromero, consistono di sequenze satellite ripetute in tandem e cluster di ripetizioni derivate da trasposoni. Tali regioni sono cosi' grandi che costituiscono grossi blocchi condensati visibili attraverso tutto il ciclo cellulare. Queste formazioni eterocromatiche sono molto importanti per due motivi: in interfase, l'eterocromatina potrebbe essere a difesa del genoma e regolare i geni, e durante la mitosi potrebbe essere importante per la funzionalita' centromerica; inoltre faciliterebbe la localizzazione e l'assemblaggio delle componenti centromeriche come speciali nucleosomi centromerici che contengono proteine istoniche H3-like (Henikoff, '00a, Henikoff et al., '00b).

1.2 DNA RIPETUTO

I singoli filamenti di DNA, se denaturati, (ad esempio dal calore) tendono, una volta riportati in condizioni permissive, a riassociarsi con il filamento di DNA complementare a una velocita' che dipendera' dalla concentrazione del DNA stesso. La cinetica di riassociazione misura la velocita' con la quale un filamento di DNA trova il suo complementare e forma un duplex e dipende principalmente da due parametri: la concentrazione di partenza del DNA (C_0) e il tempo di reazione (t); il grado di riassociazione e' proporzionale a C_0t . La cinetica di riassociazione suggerisce che i genomi complessi, come quelli umani, comprendano diverse classi di sequenze sulla base del numero di copie: nella componente a singola copia, circa il 60%, ogni filamento richiede un tempo considerevole ad appaiarsi con la copia complementare poiche' la maggioranza dei frammenti di DNA con cui viene in contatto nella riassociazione non sono correlati con esso; questo gruppo e' costituito da geni e sequenze correlate a basso numero di copie.

La componente moderatamente ripetuta, il 30%, ha una velocita' di riassociazione intermedia, costituito da geni presenti in numerose copie famiglie multigeniche.

La componente altamente ripetuta, il 10%, si riassocia molto rapidamente, costituito in genere da sequenze non codificanti, trascrizionalmente inattive, ripetute in tandem o intersperse.

1.2.1 SEQUENZE RIPETUTE IN TANDEM

Le famiglie costituite da sequenze ripetute in tandem formano dei blocchi su alcuni o molti cromosomi e in base alle dimensioni del blocco si suddividono in subclassi di DNA: macro o mega satellite, satellite, minisatellite e microsatellite.

A dispetto del nome, il DNA megasatellite non è un blocco enorme, ma è il monomero della ripetizione ad essere di grosse dimensioni, un esempio per questa classe è il RS447, un monomero di 4.7kb ripetuto in tandem solo 60 volte sul cromosoma 4p15 e individuato anche sul cromosoma 8p (Gondo et al., '98).

Il DNA minisatellite comprende due tipi di sequenze di DNA ripetuto in tandem, non trascritto, di modeste dimensioni e disperso nel genoma nucleare: i minisatelliti ipervariabili e i minisatelliti ai telomeri.

Il DNA ipervariabile è altamente polimorfico ed è organizzato in oltre 1000 gruppi (0.1-20kb) di corte ripetizioni in tandem localizzato anche ai telomeri e in altre localizzazioni cromosomiche. La sequenza della singola ripetizione varia considerevolmente nelle dimensioni ma conserva un core simile a un segnale di ricombinazione in *E. Coli*. La maggior parte delle sequenze ipervariabili non sono trascritte, eccetto alcuni elementi all'interno di sequenze intrageniche non codificanti. Il significato dei minisatelliti non è ancora chiaro, sebbene si ritenga che siano dei punti caldi nella ricombinazione omologa nelle cellule umane (Wahls et al., '90). Indipendentemente dalla reale funzione di queste sequenze nel genoma umano, esiste un utilizzo pratico dei minisatelliti ipervariabili nel DNA fingerprinting, in cui una singola sonda di DNA contenente una sequenza comune può ibridare simultaneamente con i loci dei minisatelliti su tutti i cromosomi, avendo così un complesso pattern di ibridazione individuo-specifico utile in molte applicazioni.

I minisatelliti ai telomeri, sono responsabili della funzione dei telomeri stessi: 10-15kb di un esanucleotide TTAGGG, sono aggiunti di volta in volta dalla telomerase replicando le estremità lineari della molecola di DNA e proteggendo così il cromosoma dalla degradazione.

Le famiglie di DNA microsatellite includono piccoli blocchi di ripetizioni in tandem semplici nella sequenza (da 1 a 4 basi) e dispersi nel genoma. Sono abbastanza comuni le ripetizioni mononucleotidiche $(A)_n$ o $(T)_n$, in tutto circa 10Mb e raggiungono lo 0.3% del genoma, più rare le ripetizioni $(G)_n$ e $(C)_n$. Le ripetizioni dinucleotidiche CA/TG, (TG sul filamento complementare), sono molto comuni, circa lo 0.5% del genoma, e sono altamente polimorfiche. Le ripetizioni CT/AG, in media un microsatellite di questo tipo ogni 50kb, circa lo 0.2% del genoma, sono anch'esse molto comuni mentre le ripetizioni CG/GC risultano molto rare. Questo perché i residui C fiancheggiati al 3' da una G (CpG) sono soggetti alla metilazione, i successivi fenomeni di deaminazione convertono la citosina in timina, e gradualmente le CpG mutano in TpG (CpA sull'altro filamento). I trinucleotidi e tetranucleotidi ripetuti in tandem sono rari, ma sono spesso polimorfici e potenzialmente utili per l'identificazione di marker polimorfici. Il significato dei microsatelliti è sconosciuto, ma l'alternanza di purine e pirimidine, come CA o TG in alcuni blocchi di ripetizione, possono alterare la

conformazione del DNA *in vitro* in Z-DNA, ma non si sa se e' possibile *in vivo*. I microsatelliti sono evidenziabili nel DNA intergenico, negli introni e nelle regioni codificanti dei geni; le ripetizioni in tandem di tre nucleotidi sono dei siti soggetti a espansione patologica come nel caso del sito fragile dell'X (in Xq27.3 e Xq28 con amplificazione delle triplette (CGG)_n e (CCG)_n rispettivamente); in questo caso l'amplificazione e' fuori della regione codificante, ma e' proprio l'amplificazione a provocare il silenziamento del gene molto distante dal sito variabile, probabilmente bloccando la RNA polimerasi o altri fattori di trascrizione. Questa categoria di ripetizioni e' stata individuata essere fonte di fenotipi patologici quando la ripetizione supera una certa soglia.

Il DNA satellite umano comprende un grande gruppo di blocchi di DNA ripetuto in tandem con singole unita' ripetute piu' o meno complesse. Il DNA di questo tipo non e' trascritto e praticamente costituisce il grosso dell'eterocromatina del genoma localizzata al centromero (eterocromatina pericentromerica) (Strachan e Ried, 99 e ref all'interno). Il primo DNA centromerico umano a essere identificato e' stato isolato da tre frazioni genomiche di DNA aventi diversa densita' di galleggiamento in un gradiente di cloruro di cesio, da cui il nome di DNA satellite. Queste frazioni di DNA vengono indicate come i classici satelliti I, II e III. Ciascuna frazione di DNA consiste di una popolazione eterogenea di sequenze di DNA ripetuto, in gran parte identificate (Lee et al., '97). Le tre famiglie satelliti 1, 2 e 3 non sono altro che le sequenze di DNA ripetuto predominanti nei satelliti I, II e III, rispettivamente. Studi di ibridazione *in situ* nell'uomo, hanno dimostrato che il DNA satellite I, II e III contiene sequenze con localizzazione pericentromerica in tutti i cromosomi e localizzazione sul terzo distale del braccio lungo del cromosoma Y. I satelliti II e III sono strettamente correlati presentando una estesa crossibridazione e un simile pattern di restrizione; analizzando le sequenze di questi due satelliti, approssimativamente il 40% delle molecole presenti nel satellite III, crossreagiscono con il 20% delle molecole del satellite II (Lee et al., '97). Studi biochimici hanno rivelato due distinte frazioni del satellite I: il satellite 1 e la famiglia DYZ2.

DYZ2 e' un gruppo complesso di ripetizioni di 2.47kb localizzato nella regione eterocromatica Yq12 che definisce la frazione del satellite I maschio-specifico, anche se crossibrida con sequenze del cromosoma 14 (Tagarro et al., '94a). Il satellite 1 e' una famiglia di DNA che comprende ripetizioni di 42bp, organizzate in un'alternanza di unita' di ripetizioni di 17bp e di 25bp; e' la componente piu' ricca in A e T del genoma umano (72%) ed e' anche il piu' abbondante tra i satelliti classici. Analisi di FISH su cromosomi in metafase localizzano il satellite 1 nelle regioni pericentromeriche del cromosoma 3 e 4 e nelle regioni pericentromeriche sul braccio corto dei cromosomi acrocentrici (13, 14, 15, 21 e 22) (Tagarro et al., '94a).

La famiglia del satellite 2 identifica un gruppo di ripetizioni poco conservate di 5bp ATTCC, che si ripetono con alcune varianti e precedute da una o piu' ATG. Il satellite 2 e' localizzato nelle regioni eterocromatiche del cromosoma 1 e 16, e con altri domini meno pronunciati sui cromosomi 2 e 10 (Lee et al., '97).

Il satellite 3 e' una ripetizione di pentameri ben conservati ATTCC interspersi occasionalmente con una sequenza specifica di 10 bp con localizzazione sui cromosomi 1 e 9, sul braccio lungo del cromosoma Y e sul braccio corto di tutti i cromosomi acrocentrici prossimale alle regioni dell'rDNA. Tagarro et al. (1994b), sostengono l'individuazione del satellite 3 sui cromosomi 5, 10, 17 e 20, e altri ricercatori suggeriscono che ripetizioni pentameriche simili al satellite 3 siano presenti nelle regioni centromeriche di tutti i cromosomi umani, infatti, diversi approcci molecolari confermano la posizione del satellite 3 su vari cromosomi in prossimita' delle sequenze alfoidi, come sul cromosoma 10 (Jackson et al., '93), 13,14,15,21 e Y (Grady et al., '92). Altre sequenze centromeriche di DNA ripetuto sono state individuate da altre frazioni di DNA satellite; la frazione IV dei satelliti classici potrebbe essere identica alla frazione 3, basandosi su simili mappe di restrizione, densita' di galleggiamento e cinetica di riassociazione.

La frazione C, individuata tra le sequenze di DNA ripetuto, ibrida con le regioni centromeriche eterocromatiche dei cromosomi acrocentrici e sul cromosoma 9 (Lee et al., '97).

Il satellite alfa, (cfr alfoidi), circa il 3-5% del DNA di ciascun cromosoma, non e' risolvibile con centrifugazione in gradiente di concentrazione, e fu individuato con digestioni del DNA genomico con enzimi di restrizione che hanno un sito di riconoscimento in ogni monomero; la perdita di alcuni di questi siti produce un tipico pattern di multimeri. Il monomero alfoide, 171bp, e' presente su tutti i cromosomi a formare blocchi che vanno da 250 kb nel cromosoma Y a 5000kb sul cromosoma 11. Le variazioni polimorfiche tra blocchi alfoidi su cromosomi omologhi rispecchiano un'eredita' di tipo mendeliano e permette l'utilizzo di alcuni satelliti alfoidi come marker genetici (Lee et al., '97).

La famiglia del DNA satellite beta, chiamata inizialmente famiglia Sau3A, e' organizzata in tandem, ricca in G e C, e costituita da monomeri di 68bp. Esperimenti di ibridazione *in situ* localizzano il satellite beta sulle regioni pericentromeriche del braccio corto dei cromosomi acrocentrici in posizione prossimale e distale ai cluster dei geni per gli rRNA e sulla costrizione secondaria del cromosoma 1. Questa famiglia di DNA e' stata localizzata anche nelle regioni pericentromeriche del cromosoma 3, 9 e Y.

Il DNA satellite gamma, fu isolato inizialmente come ripetizioni di 220 bp in tandem, derivanti dal cromosoma 8, e poi identificato sul cromosoma X. Ambedue le subfamiglie del satellite gamma possiedono un'affinita' per il proprio centromero, perfino a bassa stringenza dove in FISH e' possibile anche vedere due segnali fluorescenti ai lati della costrizione primaria, richiamando una situazione simile con il satellite minore di topo. Studi di RFLP rivelano una mancanza di polimorfismi dei siti HpaI e SstI, diversamente da quello visto di solito per la maggior parte del DNA centromerico, e cio' puo' essere dovuto a qualche pressione funzionale sulla sequenza o alle ridotte dimensioni del blocco di sequenze gamma che potrebbero limitare la formazione di RFLP e gli eteromorfismi di grandezza del blocco.

Il satellite gamma per il cromosoma X umano utilizzato in analisi evolutive in esperimenti di FISH crossibrida in tutte le sei specie di primati in localizzazioni centromeriche. Nelle grandi scimmie, il gamma-X e' localizzato esclusivamente al centromero del cromosoma X; tra le scimmie del vecchio mondo, solo nella *Rhinopithecus roxellanae*, (golden monkey) questa sintenia e' conservata, mentre nella *Colobus angolensis* (black-and-white colobus) e nella *Macaca nemestrina* (pig-tailed macaque), le sequenze umane gamma-X risiedono nelle regioni pericentromeriche degli autosomi 1 e 4 rispettivamente (Lee et al., '99).

La famiglia di DNA satellite 48bp, con ripetizioni in tandem di 48bp, e' stata individuata per la prima volta sul cromosoma 22, con due diversi cluster, in 22pter-q11 e in 22cen-q11 e successivamente sul cromosoma 21. Le consensus che derivano dai blocchi presenti sui due cromosomi presentano una divergenza del 4-30%, mentre ibridazioni *in situ* a bassa stringenza rivelano segnali sulle regioni pericentromeriche dei cromosomi 13, 14, 15 e 21. Recentemente sono stati scoperti due blocchi di ripetizioni di 48bp anche al centromero del cromosoma Y. Questa famiglia di DNA nei cromosomi 21, 22 e Y mappa vicino alle sequenze alfoidi e varia nelle dimensioni del blocco: 200-1100kb al centromero del cromosoma 21 e 40kb al centromero dell'Y. Queste sequenze di DNA di 48bp legano dei complessi proteici, non ancora individuati (Lee et al., '97).

La famiglia di DNA satellite Sn5, e' stato isolato come un clone di 465bp, ottenuto da una libreria di DNA derivante da microdissezione da metafase di sangue periferico di un marker cromosomico di un individuo neonato con cariotipo 94, XXXX, +2 mar. Il clone amplificato per PCR (pcrsn5), ibrida in FISH i cromosomi 2 e 20 e i cromosomi acrocentrici. Una sequenza omologa a pcrsn5 e' stata inoltre individuata nel genoma di *Cercopithecus aethiops* (african green monkey, AGM) con il 69% di omologia; e analisi di sequenze hanno dimostrato, sia nell'uomo sia in AGM, che i due cloni fanno parte di una famiglia di unita' di ripetizioni organizzate in tandem, ma non e' ancora stato determinato il singolo monomero. Johnson et al. (1992), hanno ipotizzato che il satellite Sn5 evolve parallelamente alle sequenze alfoidi della soprafamiglia 2 a causa del pattern simile.

1.2.2 SEQUENZE RIPETUTE INTERSPERSE

Una frazione abbastanza consistente del genoma umano e' costituito da sequenze ripetute intersperse che rappresentano i "fossili" delle copie inattivate di elementi trasponibili. Il nostro genoma aploide contiene piu' di un milione di corti elementi ripetuti interspersi (SINE) derivanti da pseudogeni di RNA strutturali, centinaia di migliaia di lunghe ripetizioni intersperse: le LINE che non possiedono alle estremita' le ripetizioni lunghe (LTR), e migliaia di sequenze endogene retrovirali. Solo i retrovirus e le LINE possiedono la trascrittase inversa, ma tutti questi elementi si diffondono per retroposizione, un meccanismo che richiede un intermedio a RNA (Smit e Riggs, '96).

Inoltre esistono altri gruppi di ripetizioni intersperse non completamente caratterizzati come la famiglia long Sau, il gruppo AT rich, gli elementi ripetuti sul cromosoma Y e la famiglia multisequenza chB4.

Il gruppo piu' interessante sembra essere ATRS, (AT rich sequence), per quanto non si riesca a individuare nessun motivo interno nella sequenza che aiuterebbe a dimostrare una sua eventuale ripetizione in tandem; individuato sul cromosoma 7, adiacente alle sequenze alfoidi, ibrida in FISH inoltre vicino ai centromeri dei cromosomi 1, 2, 7, 9, 16, 17 e sugli acrocentrici(Lee et al., '97).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
Sat. 1																									
Sat. 2																									
Sat. 3																									
Sat. Alfa SF1																									
Sat. Alfa SF2																									
Sat. Alfa SF3																									
Sat Alfa SF4																									
Sat Alfa SF5																									
Sat. Beta																									
Sat. Gamma																									
Sat.48bp																									
Sat. Sn5																									
ATRS																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	

TAB.1.1 LOCALIZZAZIONI CENTROMERICHE DEI SATELLITI UMANI

1.3 IL DNA ALFOIDE

Il satellite alfa e' stato da sempre il piu' studiato tra le famiglie di DNA ripetuto in tandem poiche' si riteneva, fino a pochissimi anni fa, che il DNA alfoide fosse una condizione necessaria e forse sufficiente per la formazione del centromero nei primati. Gli entusiasmi sono stati raffreddati dall'analisi dei neocentromeri che, per quanto centromeri a tutti gli effetti, non contengono sequenze alfoidi; l'interrogativo adesso e': se il DNA alfoide non e' la sequenza "magica" che da' origine ad un centromero, qual e' la sua funzione? Se non e' la causa, e' la conseguenza della funzionalita' centromerica? Come risposta a questi interrogativi ci sono solo delle ipotesi, e probabilmente in un prossimo futuro sara' piu' facile dare una risposta piu' concreta a questi interrogativi.

Maio nel '71 e' stato il primo studioso che ha descritto il DNA alfoide come una frazione di DNA altamente ripetuto nel genoma della scimmia verde africana AGM e piu' tardi, Gruss e Sauer (1975) dimostrarono che la unita' fondamentale di ripetizione e' una sequenza di 169-171bp. Rosenberg et al. nel 1977 sequenziarono un membro di questa famiglia di DNA alfoide. Sequenze omologhe vennero in seguito identificate in un frammento Eco RI umano non clonato (Manuelidis e Wu, '78) e fu evidenziata un'omologia con la consensus alfoide di AGM del 70-80% (Rosenberg et al., '78; Musich et al., '80).

Il DNA alfoide, considerando i dati a disposizione, e' per il momento l'unica famiglia di DNA satellite presente nelle regioni centromeriche di tutti i cromosomi di primati incluse le scimmie del vecchio e del nuovo mondo, le proscimmie e uomo (Manuelidis, '78, Willard e Waye, '87b). Il DNA alfoide e' una sequenza monomerica, con una tipica composizione di basi A + T, ripetuta in tandem pressoché senza interruzioni a formare dei blocchi che rappresentano fino a 3-5% del DNA totale di ciascun cromosoma e 10% del DNA genomico totale; la successione ininterrotta dei monomeri definisce un primo ordine di ripetizione (Wu e Manuelidis, '80).

Come per altri tipi di satelliti presenti nel genoma di vertebrati ed invertebrati, quando il DNA di ibridi somatici monocromosomici digerito con diversi enzimi di ripetizione e' esaminato in esperimenti di ibridazione su filtro usando DNA alfoide come sonda, i monomeri alfoidi presenti in ciascun cromosoma umano danno origine a bande multiple di 171, mostrando una periodicitá nei siti di restrizione presenti all'interno di questi domini: cio' permette di organizzare i monomeri alfoidi in una struttura di ordine superiore (HOR: high order repeat) (Jorgensen et al., '92). Ogni HOR e' delimitata da due siti successivi di riconoscimento di un enzima di restrizione ed e' caratterizzata da un unico set di tipi monomerici che si alternano piu' o meno regolarmente (Romanova et al., '96). All'interno di ogni HOR, l'omologia tra i diversi monomeri e' del 60-70%, l'omologia invece tra i monomeri corrispondenti di due HOR successive raggiunge il 99% (Willard e Waye, '87a).

Ciascun cromosoma umano possiede almeno una famiglia alfoide cromosoma specifica caratterizzata da un tipo di unita' HOR derivante, durante l'evoluzione, dall'introduzione di mutazioni casuali nei monomeri in successione, avvenuta abbastanza lontano nel passato da aver avuto il tempo di diffondersi su tutto il satellite nei cromosomi omologhi sia nell'individuo sia nella popolazione. La diffusione e' causata da inefficienti scambi meiotici tra i multimeri alfoidi di cromosomi omologhi, i quali, non appaiandosi perfettamente in registro di una o poche unita', subiscono una delezione o una duplicazione. La variante monomerica puo' essere persa nel cromatide con la delezione e conservata sul cromatide con la duplicazione; all'interno del cromatide con la duplicazione si diffonde in seguito a successivi eventi di amplificazione con la generazione di un gran numero di copie identiche disposte in tandem (fissazione del crossing-over). Se vengono amplificate copie di sequenze non mutate, identiche a quella originale, si verifica un processo di omogeneizzazione; se, invece, vengono amplificate copie mutate, si ha la diffusione di varianti polimorfiche.

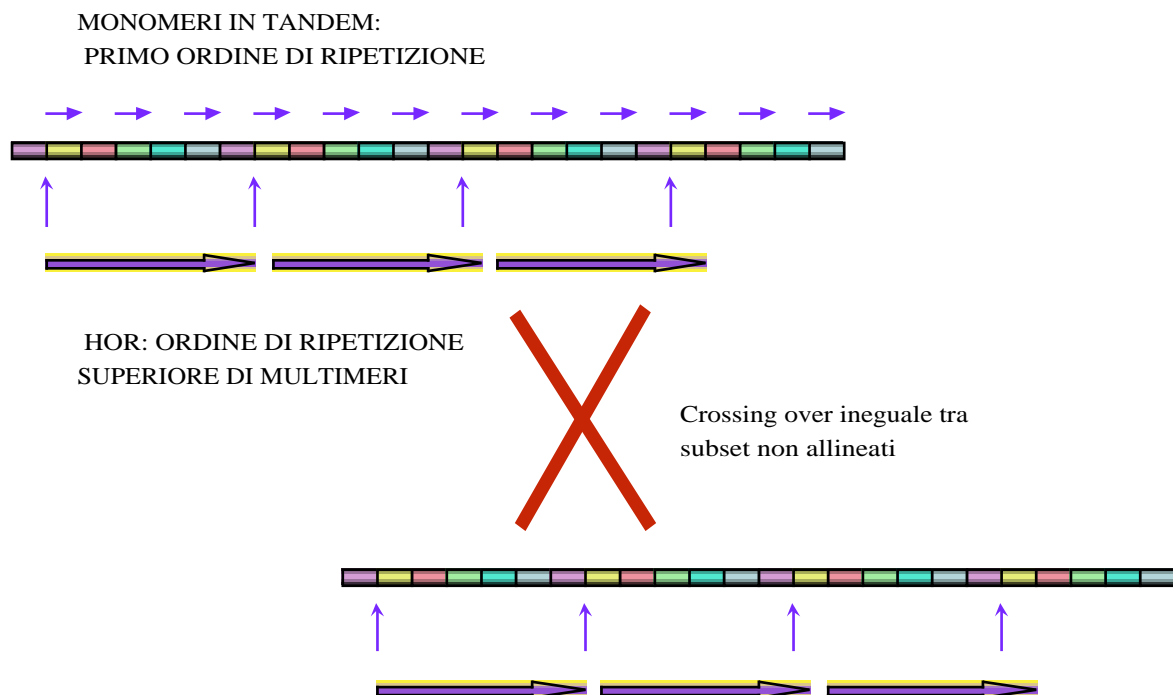


FIG.1.1 HOR E CROSSING OVER

Il DNA satellite, quindi, potrebbe evolversi attraverso una combinazione tra processi di amplificazione e l'accumulo di mutazioni e deve la sua stabilita' alla omogeneizzazione risultante da crossing over ineguale e da conversione genica (Willard e Wayne, '87b; Warburton e Willard, '96).

L'omogeneizzazione a cui sono sottoposte le sequenze alfoidi procede localmente tra sequenze di 10-40kb gia' omologhe tra loro, determinando la formazione di domini con identita' di sequenza del 99%. L'omogeneizzazione tende a mantenere l'identita' di sequenza tra ripetizioni alfoidi o a fissare nuove mutazioni, e inoltre periodici crossing over ineguali tra cromosomi non omologhi fissano casualmente una sequenza, che puo'

essere o meno quella mutata; e in seguito piu' cromosomi condivideranno quel particolare monomero favorito durante i crossing over (Alexandrov et al., '91, Haaf e Willard, '97).

La conversione genica procede per un meccanismo simile nel quale la sequenza del donatore rimane immutata, mentre la sequenza del ricevente viene sostituita dalla sequenza donatrice, anche in questo caso una nuova mutazione viene eliminata o amplificata a seconda che sia contenuta nella sequenza ricevente o donatrice.

Qualunque sia il contributo dei vari meccanismi di omogenizzazione all'evoluzione di queste ripetizioni, la generazione di subset cromosoma-specifici, puo' essere ipotizzata se si considera che i meccanismi di omogenizzazione intracromosomica, come conseguenza di scambi tra cromosomi omologhi, siano piu' massivi o avvengano piu' frequentemente di quelli intercromosomici (Willard e Waye, '87a).

A loro volta i meccanismi di omogenizzazione intercromosomica potrebbero spiegare la presenza di subset alfoidi condivisi da piu' cromosomi in seguito a scambi relativamente recenti tra i centromeri di cromosomi non omologhi e di conseguenza la mancanza, per alcuni cromosomi, di distinti subset cromosoma specifici (Warburton e Willard, '96).

Come strumento per lo studio della sequenza dei monomeri alfoidi (confronto all'interno della specie e tra specie, individuazione delle regioni conservate, esame delle variazioni delle sequenze all'interno e tra subset cromosomici), si e' proceduto all'individuazione delle sequenze consensus dei diversi monomeri alfoidi: in ciascuna posizione della sequenza consensus, e' riportato il nucleotide presente nella posizione corrispondente dei monomeri presi in esame in piu' del 50% dei casi (Willard e Waye, '87b).

Il fatto che ci siano una serie di mutazioni in posizioni condivise da piu' monomeri su diversi cromosomi perfino in specie diverse, puo' dipendere dalla fissazione delle mutazioni avvenute inizialmente sui monomeri primordiali, per cui un'origine comune piuttosto che costrizione indotta dalla selezione naturale potrebbe essere alla base di questo pattern di mutazione molto simile presente sui diversi monomeri. Altre mutazioni accumulate nel tempo si sarebbero fissate dopo la propagazione del monomero ancestrale sui diversi cromosomi prima o durante la formazione delle HOR sui rispettivi cromosomi determinando i diversi tipi monomerici (Willard e Waye, '87a).

Studi basati sull'analisi del DNA alfoide hanno in parte svelato la genesi e l'evoluzione di questa famiglia di DNA satellite. La similarita' delle sequenze dei monomeri suggerisce che tutto il DNA alfoide umano deriva fundamentalmente da due o tre monomeri alfoidi ancestrali che hanno subito fenomeni di divergenza e amplificazione dando origine a dodici distinti tipi di monomeri. La combinazione di questi dodici monomeri attraverso cicli di trasferimento intercromosomici e di amplificazione avrebbe portato alla formazione di cinque distinte famiglie alfoidi sopracromosomiche individuate sia con esperimenti di FISH, sia analizzando e confrontando le sequenze dei singoli monomeri e raggruppando insieme i monomeri con meno del 20% di divergenza (Alexandrov et al., 1989, 1991, 1993; Romanova et al., 1996). Subsets

alfoidi usati come sonde in esperimenti di FISH su cromosomi in metafase ad alta stringenza ibridano con una coppia di cromosomi omologhi, mentre a bassa stringenza producono un segnale piu' o meno intenso anche su altre coppie di cromosomi, definendo cosi' i membri di ogni soprafamiglia (Warburton e Willard, '96):

SF	CROMOSOMI	MONOMERO	ORGANIZZAZIONE
1	1,3,5,6,7,10,12,16,19	J	J1-J2 (dimero)
2	2,4,8,9,13,14,15,18,20,21,22	D	D1-D2 (dimero)
3	1,11,17,X	W	W1÷W5 (pentamero)
4	13,14,15,21,22,Y	M	M1 (monomero)
5	5,7,13,14,19,21	R	R1-R2 (dimero)

TAB.1.2 SOPRAFAMIGLIE ALFOIDI NELL'UOMO

La famiglia sopracromosomica 1 è caratterizzata da un'unità dimerica EcoRI: J1-J2 ed e' composta dai cromosomi 1, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 16 e 19. Anche la famiglia 2 è costituita da dimeri: D1-D2, ma di tipo diverso rispetto a quelli che definiscono la famiglia 1, individuata sui cromosomi 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 18, 20, 21 e 22. La famiglia 3, con arrangiamento pentamerico W1-W2-W3-W4-W5, e' specifica per i cromosomi 1, 11, 17 e X. La famiglia 4, sui cromosomi 13, 14, 15, 21, 22 e Y comprende blocchi alfoidi aventi un'organizzazione monomerica M1 simile a quella ritrovata originariamente nel DNA alfoide di AGM. In questo caso, quindi, non è riscontrabile un HOR e si ha maggiore similarità di sequenza tra monomeri successivi. La famiglia 5 è definita da un'irregolare alternanza dei monomeri di tipo R1 e R2 sui cromosomi 5, 7, 13, 14, 19 e 21.

Sui subsets cromosomici, non solo i monomeri ma anche l'ordine stesso e' conservato, per cui ciascun subset potrebbe derivare da un multimerico comune (Willard e Ward, '87a). Tre sono probabilmente i multimeri alfoidi ancestrali da cui sono derivati i diversi tipi monomerici: J1-D2-W4-W5-M1-R2, J2-D1-W1-W3-R1 e W2. (Alexandrov, '93), ma tutti discendono da due prototipi A e B. I due tipi di monomeri consensus differiscono tra loro nella zona delimitata dalle posizioni 35÷51 presente in due forme alternative: A e B, il monomero di tipo A contiene il sito di legame per la proteina pJ α , mentre nel tipo B, la zona corrispondente, indicata come CENP-B box, lega la CENP-B, partecipante alla formazione del centromero funzionale di mammifero. I satelliti B sono sempre presenti nell'uomo e nelle scimmie antropomorfe, ma mai nei primati inferiori. La sequenza di legame per la proteina pJ α del tipo A è stata trovata negli α -satelliti di tutti i primati inferiori e nella maggioranza delle scimmie antropomorfe, inoltre i monomeri di tipo A sono più strettamente correlati al monomero alfoide identificato nell'AGM (Alexandrov et al., 1993; Romanova et al., '96; Gaff et al., '94). Legano la proteina pJ α i monomeri J1,D2,W4,W5,M1 e R2, (monomeri di tipo A), legano la proteina CENP-B i monomeri J2,D1,W1,W2,W3 e R1, (monomeri di tipo B). Le consensus R1 e R2 della SF5, sono molto simili alle consensus di A e B, indicando un'origine molto antica per questa SF, come se R1 e R2 fossero molto simili ai monomeri ancestrali.

Confrontando le consensus del gruppo A e B, Romanova et al. (1996), hanno ipotizzato che il tipo B si sarebbe originato dal tipo A e non da un intermedio comune. Il tipo B si è formato al momento della divergenza delle grandi scimmie quando il tipo A già esisteva; il tipo B quindi è una variante divergente di A che è stato mantenuto dalla selezione naturale per la sua specificità con una proteina come la CENP-B, traendone vantaggio al momento della speciazione. La selezione naturale, al fine di conservare le funzioni di queste proteine, ha influito sulla distribuzione delle mutazioni in queste regioni e ha conservato la specificità di A e di B nel sito di legame alle rispettive proteine impedendo fenomeni di omogenizzazione. Esistono infatti un certo numero di proteine che nei mammiferi potrebbero assolvere alla funzione di appaiamento nella meiosi, e specie diverse attribuiscono questa funzione a proteine differenti a creare alternativi domini di legame DNA-proteina.

Il satellite alfa che lega la CENP-B si è diffuso in tutti i cromosomi umani, eccetto che nell'Y, questo cromosoma non contiene la regione di riconoscimento per la CENP-B, ma contiene la sequenza che lega la pJ α proteina probabilmente richiesta per la funzionalità centromerica. Poiché il cromosoma Y ha soltanto appaiamento e ricombinazione con il cromosoma X nella regione pseudoautosomale, ma non intorno al centromero, la mancanza di CENP-B nel centromero del cromosoma Y potrebbe essere dovuta alla mancanza di appropriati meccanismi di diffusione, come la ricombinazione meiotica, cruciali per la rapida espansione di sequenze mutate nella popolazione cromosomica; inoltre, se l'appaiamento è la funzione primaria della CENP-B, la sua presenza nel cromosoma Y (che non appaia) non riceverebbe nessuna spinta selettiva positiva.

Alcuni cromosomi sono compresi contemporaneamente in famiglie sopracromosomiche diverse e ciò sarebbe dovuto alla presenza di domini alfoidi multipli su uno stesso centromero (Warburton e Willard, '96). Questi blocchi alfoidi multipli sullo stesso cromosoma indicano appaiamenti meiotici e scambi ristretti a subsets altamente omologhi, requisiti per l'omogenizzazione intracromosomica (Finelli et al., '96). Questi domini alfoidi multipli non sono correlati tra loro e non presentano un'evoluzione comune, sono separati da DNA non alfoide, non presentano fenomeni di omogenizzazione e spesso sono appartenenti a soprafamiglie diverse (il cromosoma 1 presenta due distinti subset appartenenti alla soprafamiglia 1 e 3, mentre i cromosomi 18 e 15 contengono due diversi subset della soprafamiglia 2). I subsets alfoidi multipli per esempio quelli condivisi dai cromosomi acrocentrici oltre ad essere fisicamente separati avrebbero un certo grado di divergenza che impedirebbe l'omogenizzazione tra loro all'interno dello stesso cromosoma. Nonostante si pensi che gli scambi tra DNA di cromosomi non omologhi non siano comuni, le 5 coppie di cromosomi acrocentrici nell'uomo, cromosomi 13, 14, 15, 21 e 22, contengono subsets alfoidi multipli, mancanti però di cromosoma-specificità probabilmente a causa dei frequenti scambi intercromosomici che avvengono tra questi cromosomi; ciò può essere attribuito alla forte associazione tra gli acrocentrici nel nucleolo durante la divisione cellulare che favorirebbe la ricombinazione intercromosomica tra i geni per il

DNA ribosomale sul braccio corto di questi cromosomi e tra i domini alfoidi (Vissel e Choo, '91; Alexandrov et al., '91).

Sono stati osservati diversi pattern di polimorfismi nei blocchi di sequenze alfoidi, le cui dimensioni possono variare da un individuo ad un altro di un fattore da 4 a 6 volte; questa variabilita' tra individui e' stabilmente trasmissibile nelle generazioni. Blocchi alfoidi con varianti si presume derivino da mutazioni puntiformi (cromosoma X con variabilita' nel sito XbaI o HindIII) o da errato allineamento durante il crossing over che determina variazioni nel numero dei monomeri nell'ambito di una HOR. Il cromosoma 17, con HOR variabili di 11 o 16 monomeri, e' un esempio di questa variabilita', utile quest'ultima per la costruzione di mappe genetiche di linkage o di marker genetici (Warburton e Willard, '95).

1.4 IL CENTROMERO

I cromosomi contengono molti siti di replicazione e di coesione che assicurano l'efficienza dei meccanismi di duplicazione della molecola di DNA persino quando uno di questi siti fallisce la sua funzione, ma in quasi tutti gli organismi, il sito di attacco al fuso e' invece un'unica regione definita: il centromero, che non ha "sostituti" nello svolgimento della sua funzione (Murphy e Karpen, '98).

I centromeri di *Drosophila* consistono di blocchi di DNA satellite nell'ordine di una megabase separati da cluster di diversi trasposoni; una simile organizzazione e' visibile nelle regioni pericentromeriche umane. Inserzioni multiple di trasposoni nei blocchi di DNA satellite potrebbero disgregare un centromero poiche' introdurrebbero nuove origini di replicazione, con il rischio di perdere il cromosoma corrispondente a causa delle premature repliche, a meno che regioni vicine non assumono funzioni centromeriche con replicazione tardiva. Nel tempo, questo processo porta all'accumulo di blocchi di satelliti separati da cluster di trasposoni. (Henikoff, '00a).

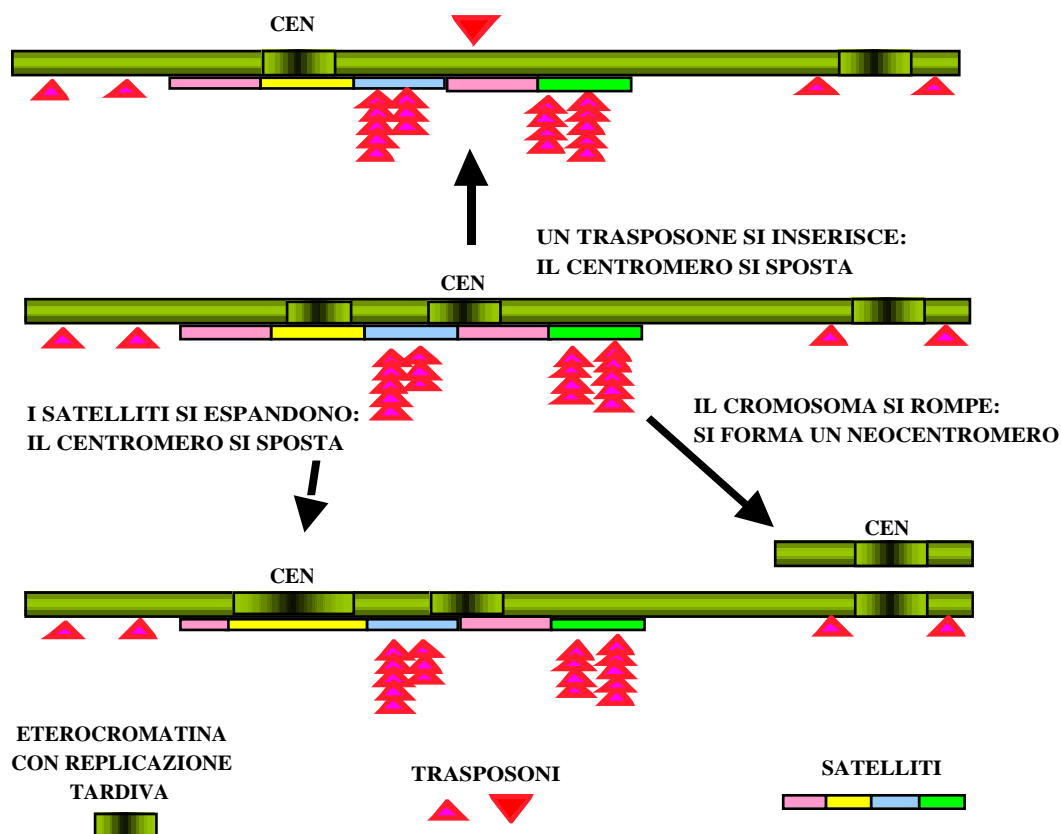


FIG.1.2 MODELLO PER L'EVOLUZIONE DELL'ETEROCROMATINA CENTROMERICA

Le inserzioni di trasposoni in blocchi di satelliti introduce origini di replicazione che potrebbero interferire con la funzionalità centromerica. Tuttavia l'espansione dei satelliti con replicazione tardiva potrebbe diventare il sito per un nuovo centromero.

Chiave del ruolo dell'eterocromatina nel centromero è la PEV e l'inibizione della ricombinazione. Se l'eterocromatina generalmente inibisce i processi enzimatici durante l'interfase, allora anche l'origine di replicazione verrà inibita; come conseguenza, le forche di replicazione che attraversano i blocchi eterocromatici inizieranno nelle regioni fiancheggianti e attraverseranno i grossi blocchi di eterocromatina terminando in tarda fase S. Questa terminazione tardiva è cruciale per la funzione centromerica poiché secondo DuPraw i centromeri sono gli ultimi a replicare (DuPraw, '68). È presente pertanto una forte spinta selettiva a mantenere la replicazione tardiva a livello dei centromeri che permette il legame con i nucleosomi contenenti Cenp-A. Unica eccezione alla tardiva replicazione è costituita dal centromero di lievito.

Il centromero è riconoscibile come una costrizione primaria sui cromosomi condensati in metafase. La costrizione cromosomica comprende una struttura cromatidica differenziata costituita da DNA e complessi proteici, il cinetocore, (cfr. cinetocore) su cui i microtubuli si legano per un corretto movimento dei cromosomi. Eccetto che per un piccolo numero di casi come il centromero puntiforme di lievito di 125 bp e il centromero regionale del minicromosoma di *Drosophila* di 420 kb, la precisa localizzazione funzionale del centromero non è spesso ben definita, nonostante a

livello citologico il centromero sia individuabile come costrizione primaria; questo a causa delle difficoltà tecniche nel delimitare i limiti funzionali delle sequenze di DNA cis-agente in un centromero. Spesso viene usato il termine "pericentromerico", per indicare sia il centromero che le regioni cromosomiche fiancheggianti, che contengono sequenze non ben definite a livello funzionale, ma coinvolte nella stabilità centromerica (Choo, '00).

Varie indicazioni suggeriscono che per la formazione del centromero non sono richieste specifiche sequenze di DNA, ma piuttosto sono invocati meccanismi epigenetici (Choo '00): infatti il centromero degli eucarioti superiori contiene centinaia o migliaia di kb di sequenze di DNA ripetute in tandem, ma non è conservata nessuna sequenza nucleotidica, per cui non si può identificare nessuna sequenza centromerica universale negli insetti, piante, funghi, mammiferi o altri vertebrati. Inoltre i cromosomi umani isodicentrici, stabili in mitosi, con due identiche e separate regioni di DNA alfoide centromerico, contengono solo un centromero attivo, suggerendo che il DNA alfoide da solo non è sufficiente per la formazione del centromero e che un centromero funzionale può essere disattivato. Su tali cromosomi isodicentrici, se si riduce la distanza che separa i due centromeri (per esempio a <10Mb), ambedue i centromeri risultano attivi, e questo sarebbe un'ulteriore indicazione che la loro attività è controllata epigeneticamente e non da meccanismi che indurrebbero mutazioni. Neocentromeri (cfr. neocentromeri) funzionali sono stati descritti sia nell'uomo che in *Drosophila* in regioni di DNA che non presentano le caratteristiche usuali di DNA centromerico e ciò indica che un cinetocore può assemblarsi indipendentemente dalla presenza di DNA satellite.

I meccanismi che portano alla formazione del centromero, sono perciò sequenza-indipendenti, e' possibile che solo le sequenze in grado di assumere delle strutture secondarie o terziarie riescano a dare origine a un centromero.

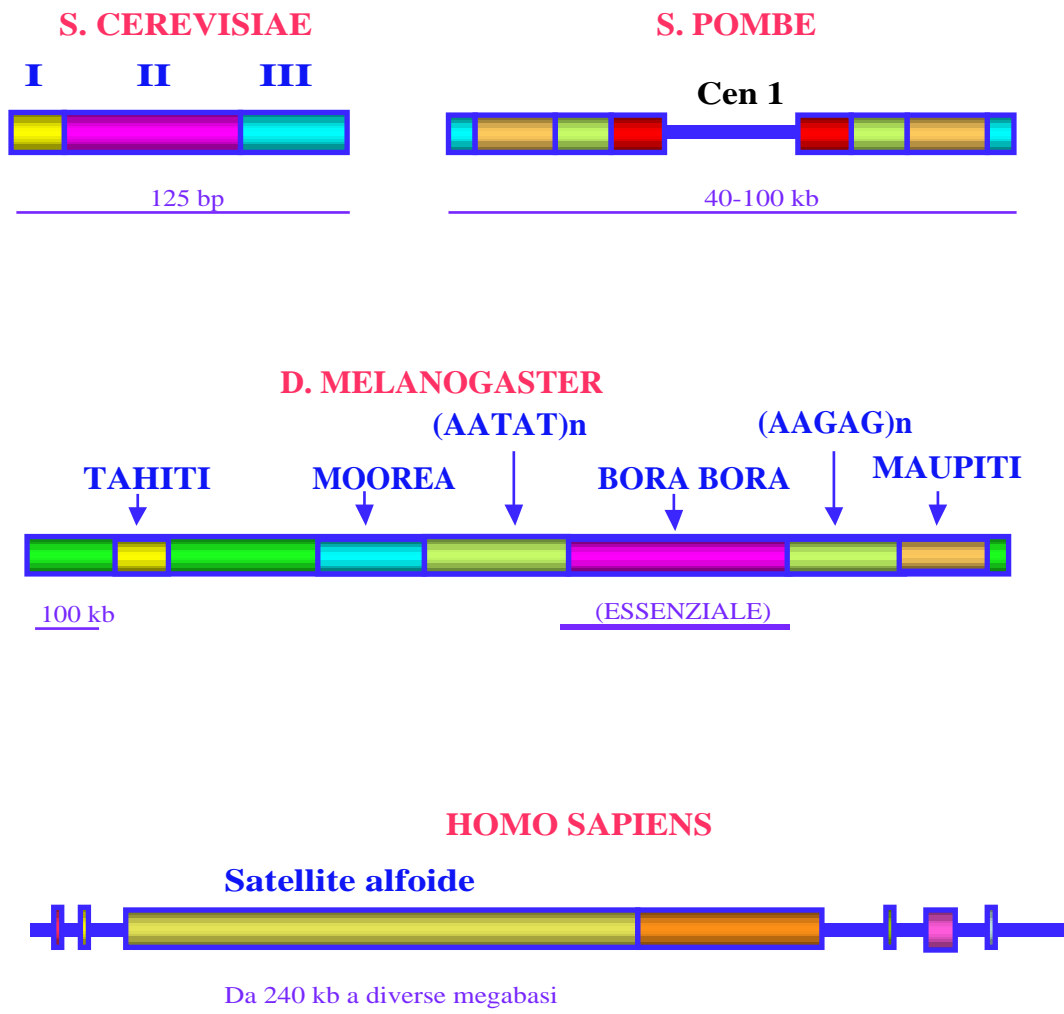


FIG.1.3 CENTROMERI

1.4.1 CENTROMERO DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Nel centromero di *S. cerevisiae*, l'informazione minima genetica necessaria e sufficiente per l'attività di un centromero funzionale nella segregazione dei cromosomi in mitosi e meiosi e' contenuta interamente in un segmento di DNA di circa 125 bp conosciuto come CEN (Choo '97a). Il CEN DNA e' contenuto in un frammento di 220-225 bp protetto al taglio delle nucleasi e fiancheggiato da entrambi i lati da siti ipersensibili organizzati in nucleosomi altamente ordinati (Clarke, '98). Sono state descritte tutte le sequenze CEN nei 16 cromosomi di lievito e la sequenza consensus derivante e' organizzata in 3 domini o Centromere DNA Elements (CDEI, II, III). Le sequenze CEN sono funzionali in ambedue gli orientamenti e non sono cromosoma specifiche; tuttavia e' importante l'orientamento di CDEIII rispetto a CDEI e CDEII, poiche' l'inversione di CDEIII abolisce la funzione delle sequenze CEN nella

meiosi e nella mitosi. Alterando l'orientamento di CDEI invece, gli effetti sono poco rilevanti sulla funzionalità centromerica. Mutazioni delle sequenze che circondano le sequenze CEN, non alterano la funzionalità in meiosi e mitosi di quest'ultime.

Il dominio CDEI è un frammento di 8 bp con palindromo interna: (A/G)TCAC(A/G)TG, il cui terminale sinistro sembra essere più importante del terminale destro durante la mitosi. CDEI è richiesto per una completa funzionalità centromerica, ma una delezione completa di questo segmento diminuisce la stabilità di 10 volte; CDEI potrebbe agire come un'enhancer di CDEII e CDEIII. La proteina CBF1, Centromere Binding Factor 1, lega specificatamente la regione CDEI, e alterazioni nel segmento o nella proteina risultano in una diminuzione della funzione centromerica in mitosi e causa una prematura separazione dei cromatidi fratelli in meiosi I (Clarke, '98; Choo, '97a).

Il dominio CDEII è un segmento di 78-87 bp, ricco in A e T, che separa CDEI e CDEIII; è richiesto per la normale stabilità e per il mantenimento della coesione dei cromatidi fratelli. I mutanti per delezione di CDEII possono recuperare la funzionalità completa del centromero tramite l'inserzione di un segmento A-T casuale della stessa lunghezza di CDEII. Probabilmente l'alto contenuto di A e T influenza la conformazione del DNA che, nell'attività centromerica, è più critica della stessa sequenza nucleotidica; infatti, la sequenza di CDEII non è conservata tra i cromosomi di *S. cerevisiae*.

CDEIII è una sequenza di 26 bp simmetrica intorno alla base C in posizione 14; è il segmento essenziale per il centromero la cui sequenza non può essere mutata senza inattivare il centromero stesso. Il complesso CBF3 si lega alla regione critica di CDEIII; questo complesso è composto da quattro diverse subunità che non sono più in grado di interagire con il CEN DNA se il centro di CDEIII è mutato. Al dominio CDEIII è legato anche il prodotto del gene MIF2 contenente due regioni con una limitata omologia con una proteina centromerica umana CENP-C, e ambedue svolgerebbero la stessa funzione associandosi con i nucleosomi centromero-specifici (Clarke, '98; Choo, '97a; Karpen e Allshire, '97).

Estendendo ulteriormente l'analogia con il sistema umano, la proteina centromerica dei mammiferi CENP-A trova la sua omologa nella proteina di lievito Cse4p con il 63% di identità con l'istone H3. Mutazioni nella Cse4p arrestano la cellula tra la fase G2 e M con altre gravi disfunzioni centromeriche (Clarke '98; Karpen e Allshire, '97).

1.4.2 CENTROMERO DI SACCAROMYCES POMBE

Il DNA centromerico di *Saccharomyces pombe* è considerevolmente più largo e complesso di *S. cerevisiae* e presenta molte proprietà comuni ai centromeri regionali degli eucarioti. Come negli eucarioti superiori, l'organizzazione delle sequenze ripetute al centromero può variare sostanzialmente tra i differenti cromosomi e tra ceppi strettamente correlati (Clarke, '98). Mutazioni nei segmenti di DNA centromerico non creano problemi di funzionalità nel centromero di *S. pombe* come invece accade nel centromero di *S. cerevisiae* (Karpen e Allshire, '97).

I centromeri dei tre cromosomi di *S. pombe* contengono un core centrale di 4-7 Kb e 20-100Kb di sequenze ripetute fiancheggianti di 5 kb (K, L, M). Una funzionalità

centromerica minima e' osservata per costrutti con almeno il core centrale e le sequenze ripetute piu' interne. Le sequenze ripetute esterne K-repeat, sono conservate nei diversi cromosomi, ma sono organizzate diversamente (Choo, '97a; Karpen e Allshire, '97).

Sono state utilizzate strategie biochimiche e genetiche per individuare le proteine centromeriche in *S. pombe*, individuando cosi' una proteina, Abp1p/Cbp1p che lega specifiche regioni del DNA centromerico e causa errata aggregazione dei cromosomi quando e' overespressa nella cellula di lievito. Questa proteina e' stata inizialmente isolata per via della sua affinita' al DNA ricco in A e T, e inoltre presenta un'elevata omologia con la proteina CENP-B umana specifica per le ripetizioni alfoidi del centromero. Abp1p/Cbp1p, potrebbe avere in *S. pombe* un ruolo simile a quello della CENP-B nei centromeri degli eucarioti superiori, e da' un'ulteriore conferma all'ipotesi che i lieviti (per fissione) possono essere un buon modello genetico, data l'omologia strutturale e funzionale con il centromero degli eucarioti superiori, per una maggiore comprensione dei meccanismi alla base della funzionalita' centromerica (Clarke, '98). Le proteine Abp1p/Cbp1p, insieme alle CENP-B presentano omologia con proteine trasposase-like e, inoltre, sono presenti numerosi elementi trasponibili nelle regioni pericentriche e/o centromeriche dei centromeri regionali della *Neurospora crassa* e di *Drosophila*; sembra che anche le K-repeat abbiano un'omologia seppure piu' moderata con questi elementi. Tali osservazioni suggerirebbero che l'analisi dei trasposoni potrebbe dare alcune indicazioni utili sulla funzione delle sequenze ripetute al centromero (Clarke, '98).

1.4.3 CENTROMERO DI DROSOPHILA MELANOGASTER

L'eterocromatina costituisce circa il 30% del genoma di *Drosophila melanogaster*. La maggior parte di questa eterocromatina e' situata nelle regioni pericentromeriche dei cromosomi della maggior parte delle specie di *Drosophila*, ed e' costituita principalmente di ripetizioni in tandem organizzate in lunghi blocchi omogenei; la maggior parte delle ripetizioni consistono di unita' di 5, 7 o 10bp, ma altre sono piu' complesse, come la famiglia delle ripetizioni di 359bp. Nei centromeri di *Drosophila* sono state individuate inoltre delle sequenze ripetute di 11bp ricche in G e C e sequenze di 12bp, ambedue crossibridano con altre specie di *Drosophila* separate tra loro piu' di 60 milioni di anni e crossibridano anche con *Arabidopsis thaliana*, con *Mus musculus* e uomo. Nonostante questa apparente conservazione in diversi organismi, queste ripetizioni sono individuabili solo in *Drosophila* e percio' non possono essere ritenute essenziali per la funzionalita' centromerica, anche se e' possibile che ci siano sequenze correlate simili non ancora individuate comuni a questi diversi organismi (Choo, '97a)

La costruzione di un minicromosoma Dp1187 ottenuto dal cromosoma X per irradiazione, ha permesso la localizzazione di una sequenza di 420 kb necessaria e sufficiente per ottenere un centromero funzionale che sia ereditabile (Sun et al., '97). L'85% (370Kb) del Dp1187 consiste di due diversi tipi di satelliti altamente

ripetuti AATAT e AAGAG, e alla destra di quest'ultimo, con poche variazioni di sequenza, e' localizzata una sequenza ricca in A e T (maupiti); il 10% e' composto di trasposoni interspersi, e il resto del DNA contiene sequenze specifiche del Dp1187 provenienti dal cromosoma X da cui il minicromosoma deriva. Singoli elementi trasponibili sono interspersi nel satellite AATAT ma non nel satellite AAGAG, mentre sono contenuti alla sua destra in maupiti. La frequente interruzione del satellite AATAT da parte di sequenze trasponibili potrebbe riflettere la preferenza di queste sequenze per le regioni ricche in A e T. La similarita' di sequenza tra i diversi elementi suggerirebbe inserzioni recenti di trasposoni ancora attivi, oppure inserzioni antiche conservate da spinte selettive o funzionali.

Analizzando i derivativi per delezione del minicromosoma, questi risultano instabili man mano che delezioni eliminano regioni piu' o meno ampie della regione centromerica. Pertanto il centromero di *Drosophila* consiste di un core di sequenze non ripetute e molti altri elementi ripetuti, ambedue necessari per la formazione del cinetocore (Sun et al., '97; Wiens e Sorger, '98). Non esistono derivativi funzionali mancanti di maupiti o del blocco AAGAG, suggerendo che sarebbero essenziali per la funzionalita' del centromero e per la formazione del cinetocore. Inoltre maupiti sembrerebbe essere richiesto in funzioni non centromeriche come l'inizio della replicazione. Al contrario, la regione del satellite AATAT insieme ai trasposoni (bora bora), puo' mancare nei derivativi funzionali che presentano comunque instabilita', ma non e' sufficiente compensare i componenti mancanti con eucromatina per ristabilire un centromero completamente funzionale, suggerendo che anche questa regione e' importante nel centromero (Wiens e Sorger, '98).

La regione maupiti con la sua composizione in A e T ricorda la sequenza CDEII in *S. cerevisiae*, il core centrale di *S. pombe* e le sequenze alfoidi umane, ma ibridazioni *in situ* a bassa stringenza non individuano questa regione di A e di T in tutti gli altri centromeri in *Drosophila* (Wiens e Sorger, '98). Sia i satelliti che i trasposoni non sono specifici del centromero, sono individuabili altrove nel genoma e inoltre non sono presenti in tutti i centromeri di *Drosophila*, non sembra esserci percio' in *Drosophila* come in *S. pombe* una sequenza specifica necessaria per la funzione del centromero. Nessuna di queste sequenze caratterizzate nel mini cromosoma sembra essere la sequenza "magica" del centromero, necessaria e sufficiente, come nel modello di *S. cerevisiae*, anche se una caratterizzazione piu' approfondita potrebbe dare maggiori indicazioni (Sun et al., '97).

Proteine simili alla ZW10 (cfr cinetocore), presenti nel cinetocore di *Drosophila*, importanti in anafase e in tension-sensing checkpoint, sono state individuate in una grande varieta' di organismi nonostante abbiano strutture centromeriche diverse: alcune specie di *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus* e uomo. La proteina ZW10 e' stata individuata anche nel minicromosoma derivativo di *Drosophila*, dando forza all'ipotesi che questi derivativi acentrici abbiano subito processi epigenetici che hanno portato alla formazione di centromero funzionante ereditabile dalle generazioni successive in una regione cromosomica che

nel wild type non e' normalmente marcata da anticorpi anti ZW10 (Clarke '98; Wiens e Sorger, '98).

La funzione centromerica potrebbe essere determinata dalla formazione di una struttura di ordine superiore (HOS), tridimensionale derivante dalla interazione di una speciale architettura di DNA con proteine. Sequenze diverse funzionano come componenti centromeriche in diversi organismi, e perfino in cromosomi dello stesso organismo.

La sequenza ricca in A e T sembra essere una caratteristica comune dei DNA centromerici in diversi organismi; le sequenze AATAT e AAGAG nel minicromosoma potrebbero essere un esempio di sequenza che facilita la formazione di una specifica HOS centromerica. I trasposoni potrebbero contribuire alla formazione di queste HOS; alternativamente, potrebbero semplicemente essere tollerate dal centromero se non distruggono la HOS stessa (Sun et al., '97).

1.4.4 CENTROMERO DI CAENORHABDITIS ELEGANS

I cromosomi del nematode *Caenorhabditis elegans* sono inusuali in quanto sono caratterizzati da centromeri olocentrici, dove i microtubuli del fuso si legano sul cinetocore localizzato su tutta la lunghezza del cromosoma. Questa caratteristica suggerisce che lungo tutto il cromosoma ci siano delle sequenze che agirebbero come analoghi dei segmenti localizzati al centromero degli altri organismi.

Il genoma di *C. elegans* contiene piu' di 100 distinte famiglie di ripetizioni corte e intersperse, dove ogni famiglia contiene piu' di 100 membri. La mappatura fisica di 5 di queste famiglie su differenti cromosomi indica che sebbene la distribuzione dei membri di ciascuna famiglia e' interspersa lungo il cromosoma, i membri di piu' di una famiglia tendono a essere raggruppati nella stessa regione. Molte famiglie di sequenze ripetute sono state caratterizzate, compresa una che consiste di elementi trasponibili (Tcl), e una seconda famiglia che ha una struttura ripetuta invertita che non sembra essere un trasposone attivo.

Una delle famiglie ripetute che sembrano abbiano proprieta' pertinenti con il ruolo centromerico e' CeRep3: questa famiglia e' costituita da un gruppo di elementi di DNA ripetuto di circa 1 Kb, dispersi da circa 50 a 100 volte nel genoma di *C. elegans*, con un contenuto in G e C del 34%, tipico del DNA di *C. elegans* (36%). Le sequenze CeRep3 sono omologhe alle sequenze di replicazione, ARS, e alla sequenza consensus CEN del centromero di *S. cerevisiae*; inoltre CeRep3, insieme con altri 7 frammenti di DNA (SEG o segregator sequences) isolati in *C. elegans* e presenti circa 30 volte nel genoma, intensificano la segregazione mitotica in *S. cerevisiae*, ma complessivamente queste sequenze non risultano ne' necessarie, ne' sufficienti per la segregazione dei cromosomi (Choo, '97a).

Una proteina istonica H3-like indicata come HCP-3 (holocentric protein-3), e' necessaria per la corretta segregazione del cromosoma durante la mitosi e identifica il centromero di questi cromosomi, indicando che sia i cromosomi monocentrici che quelli olocentrici richiedono una proteina istonica H3-like per la segregazione dei cromosomi in mitosi. Anticorpi anti-HCP-3 in interfase reagiscono evidenziando le proteine HCP-3 in tutto il nucleo dandogli un aspetto a grani, in profase reagiscono

con una singola linea associata ai cromosomi che si stanno condensando; in prometafase reagiscono con due distinte bande su ciascun cromosoma. Questa transizione da una a due linee e' interpretabile come una riorganizzazione dei cromatidi fratelli. In metafase e' individuabile una struttura che appare come una bacchetta corrispondente alla piastra metafasica vista di lato; in anafase la bacchetta si sdoppia. La riorganizzazione di HCP-3 tra l'interfase e la profase indica che regioni disperse del cromosoma si avvicinano durante la condensazione dei cromosomi per dare origine a centromeri funzionali; in questa maniera nucleosomi specializzati per il centromero si compattono insieme a dare origine al cinetocore (Buchwitz et al., '99). Frammenti cromosomici per induzione da radiazioni gamma segregano normalmente in mitosi, ma alcuni frammenti hanno un comportamento aberrante. Questo suggerisce che i frammenti piccoli migrano in mitosi inefficientemente probabilmente perche' la probabilità di attacco dei microtubuli al cinetocore e' proporzionale alla lunghezza del cinetocore stesso (Albertson e Thomson, '82).

1.4.5 CENTROMERO DI *ARABIDOPSIS THALIANA*

La struttura delle cinque regioni centromeriche in *Arabidopsis thaliana* e' stata identificata caratterizzando i blocchi polimorfici di sequenze ripetute di 180 bp che esibiscono similarita' >80%. E' stato possibile individuare anche altri elementi dispersi associati con questi blocchi centromerici, come le ripetizioni 106B, mentre le regioni pericentromeriche, contenenti principalmente elementi trasponibili, come Athila, sono adibite alla coesione dei cromatidi fratelli in metafase in mitosi e in meiosi II (Fransz et al., '00). Analisi genetiche e strutturali indicano che questi blocchi, ripetuti fino a raggiungere le dimensioni di 1 Mb, sono posizionati nella regione centromerica di ciascun cromosoma dove la ricombinazione e' soppressa; queste caratteristiche seppur sommarie, rimandano alle caratteristiche nelle dimensioni e nella caratterizzazione genomica dei centromeri umani (Round et al., '97).

Il cinetocore della *Arabidopsis thaliana* sembra essere riconosciuto da due sieri CREST, (siero derivante da pazienti con malattie autoimmuni, che reagisce con componenti del cinetocore) che reagiscono con almeno due epitopi indicando che i cinetocori di piante e animali condividono epitopi comuni; inoltre e' stato possibile dimostrare la transiente localizzazione del cinetocore in funzione del ciclo cellulare.

Sono stati documentati diversi neocentromeri generalmente eterocromatici in 16 diverse specie di piante e questa e' un'ulteriore conferma che i centromeri di animali e piante hanno punti in comune come alcune proteine del cinetocore, la presenza di blocchi eterocromatici vicino al centromero e sequenze ripetute non particolarmente conservate (Richards e Dawe, '98); inoltre sono richiamati anche nelle piante meccanismi epigenetici che regolerebbero il centromero (Fransz et al., '00).

1.4.6 CENTROMERO DI *MUS MUSCULUS*

Il tipico cromosoma di topo, specie *Mus musculus*, e' generalmente acrocentrico, mancante di braccio corto visibile citologicamente, ad eccezione del cromosoma Y, con un braccio corto di minute dimensioni contenente alcuni geni. In questa specie di topo, esistono due classi di DNA ripetuto: satellite minore e maggiore, posizionati al centromero o nelle sue vicinanze.

Il satellite maggiore di topo, presente in quasi tutte le specie e sottospecie del genere *Mus*, e' costituito da milioni di ripetizioni in tandem di un monomero di 234bp per genoma aploide, ed e' stato individuato in tutti i cromosomi, eccetto la Y, nelle regioni eterocromatiche e pericentriche. Mappe di restrizione indicano che i monomeri del satellite maggiore sono organizzati in blocchi ininterrotti di dimensioni variabili da 240kb a piu' di 2000kb. La sequenza di alcuni cloni di satellite maggiore ha mostrato che i monomeri appaiono ben conservati, presentando una divergenza del 4%; questo alto grado di conservazione suggerisce frequenti scambi tra cromosomi non omologhi, facilitati dalla natura acrocentrica dei cromosomi di topo.

Il satellite minore, 10-20 volte meno abbondante del maggiore, e' un'unita' ripetuta di 120bp organizzato in blocchi di 300kb, circa 2500 copie, per cromosoma; presente in tutte le specie di *Mus*, eccetto tre. Ibridazioni *in situ* hanno localizzato questo satellite esclusivamente ai centromeri eccetto sull'Y.

Come per i satelliti alfoidi umani, sono stati identificati varianti del satellite minore che mappano su uno o su un piccolo gruppo di cromosomi. Il satellite minore di topo mappa alla costrizione primaria dei cromosomi, e alcuni monomeri contengono la CENP-B box e quindi legherebbe la proteina CENP-B, e cio' attribuisce al satellite minore di topo un ruolo nella formazione del centromero e nella funzionalita' dello stesso (Choo, '97a)

1.5 IL CINETOCORE DEGLI EUCARIOTI SUPERIORI

Il centromero di un organismo superiore, riconoscibile citologicamente nei cromosomi condensati in metafase, e' una distinta costrizione primaria che comprende una struttura cromatinica differenziata di DNA e complessi proteici (il cinetocore) su cui si legano i microtubuli che permettono il movimento dei cromosomi in mitosi e meiosi (Choo, '00).

In tarda profase, la membrana nucleare e' gia' disgregata, si formano due cinetocori su ciascun centromero, uno su ogni cromatidio. I cromosomi stabiliscono connessioni con i microtubuli da ciascun polo del fuso, cosi' ogni membro della coppia di cinetocori collocato sui lati opposti del centromero cattura i microtubuli che si sono nucleati dal polo verso cui sono rivolti e questo posiziona di conseguenza i cromosomi sulla piastra equatoriale (Schaar et al., '97). In anafase, i microtubuli del cinetocore spingono, tirano i cromatidi fratelli verso i poli opposti del fuso. Il cinetocore gioca un ruolo importante in questo processo, controllando l'assemblaggio e il disassemblaggio dei

microtubuli attaccati e, attraverso la presenza di motori molecolari, guidando i movimenti cromosomici.

Durante la meiosi, sono associate al centromero proteine specifiche per la divisione riduzionale (meiosi I), in quanto deve essere conservata la coesione tra i centromeri e tra le braccia dei cromatidi fratelli, dalla metafase della prima divisione meiotica fino all'anafase della seconda divisione, ed e' solo in seconda divisione che i cromatidi fratelli e i rispettivi cinetocori possono separarsi (Pidoux e Allshire, '00).

Il cinetocore e' soggetto a un sistema di sorveglianza che monitora la eventuale presenza di cromatidi con i cinetocori non attaccati ai microtubuli e blocca la separazione dei cromatidi fratelli finche' non c'e' un corretto legame per ogni cromatidio. Il sistema di sorveglianza sembra essere sensibile alle forze di tensione ed e' regolato dalla fosforilazione (Allshire, '97).

Nel cromosoma in metafase, la cromatina forma un dominio di loop contigui impacchettati a formare una fibra di 250 nm. Questa fibra subisce un ulteriore avvolgimento ai lati del centromero a formare le braccia dei cromosomi, mentre la fibra di cromatina di 250nm di spessore rappresenta lo stadio di condensazione del centromero metafasico.

I cromatidi fratelli interagiscono e si appaiano l'uno con l'altro lungo la superficie interna del centromero attraverso due classi di proteine: le INCENP (INner CENTromere Protein) e le CLiP (Chromatid Linking Protein). Localizzati su lati opposti della costrizione primaria all'esterno, i cromosomi replicati presentano i cinetocori, i due discreti, dinamici complessi macromolecolari che la microscopia elettronica mostra nei vertebrati come una struttura a forma di disco che puo' essere descritto in domini strutturalmente differenziati (Rattner, '91): un dominio esterno, 35-40nm di spessore, separato mediante un'area (15-35nm spessa) elettrolucente agli elettroni da un dominio interno associato con la superficie dell'eterocromatina centromerica. Il dominio esterno presenta esternamente una struttura a rete con fibre di 10-20nm e una corona di materiale filamentoso che si estende verso l'esterno di questa struttura per 0.1-0.3um visibile quando i microtubuli sono assenti (Rieder e Salmon, '98).

La presenza del DNA nel cinetocore e' stata dimostrata osservando che la DNase I decondensa le piastre del cinetocore e inoltre individuando, negli strati del cinetocore, delle fibre di 30nm contenenti fosforo sensibili alla nucleasi (Rattner, '91). Un metodo utilizzato per lo studio dei centromeri prevede l'induzione di mutazioni che causano errori nella segregazione dei cromosomi per l'individuazione delle proteine implicate; un'altra possibilita' viene dall'analisi della sequenze centromeriche e quindi delle proteine interagenti. A livello dei vertebrati, (Saffery et al., '99) l'individuazione delle proteine centromeriche e' avvenuta tramite metodi immunologici, utilizzando anticorpi anti proteine centromeriche isolati da sieri di pazienti con malattie autoimmuni (sieri CREST) o da animali immunizzati (Fukagawa et al., '99).

Il cinetocore contiene proteine motorie come le CENP (centromeric protein), e la dineina citoplasmatica coinvolta nella motilita', e proteine non motorie, coinvolte nelle

regolazione della transizione metafase-anafase (Rieder e Salmon, '98). Le proteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-D, CENP-G e CENP-H sono costitutivamente presenti al centromero lungo il ciclo cellulare (He et al., '98). Le CENP-C, CENP-G e CENP-A sono associate con il dominio interno, mentre CENP-B e' individuabile nella cromatina sottostante. Le proteine come la CENP-E, la CENP-F, dineina/dinectina, ZW10, INCEP, CLIP-170 e ROD, sono proteine facoltative del centromero per le quali non ci sono evidenze di legami con il DNA (He et al., '98); ma risulta siano associate dinamicamente al cinetocore quando quest'ultimo si forma durante il ciclo cellulare, come ad esempio la CENP-E associata al dominio esterno e alla corona fibrosa in tarda fase G2 durante la mitosi, la CENP-F e la ZW10 associate al dominio esterno (Pidoux e Allshire, '00). Il legame di alcuni fattori e' codipendente, per esempio ROD e' richiesto per il reclutamento di ZW10 e della dineina (Sugata et al., '99). La CENP-A, CENP-B e la CENP-C possiedono un dominio di legame al DNA e sono potenziali candidati nel marcare le zone di "centromerizzazione" (Choo, '00).

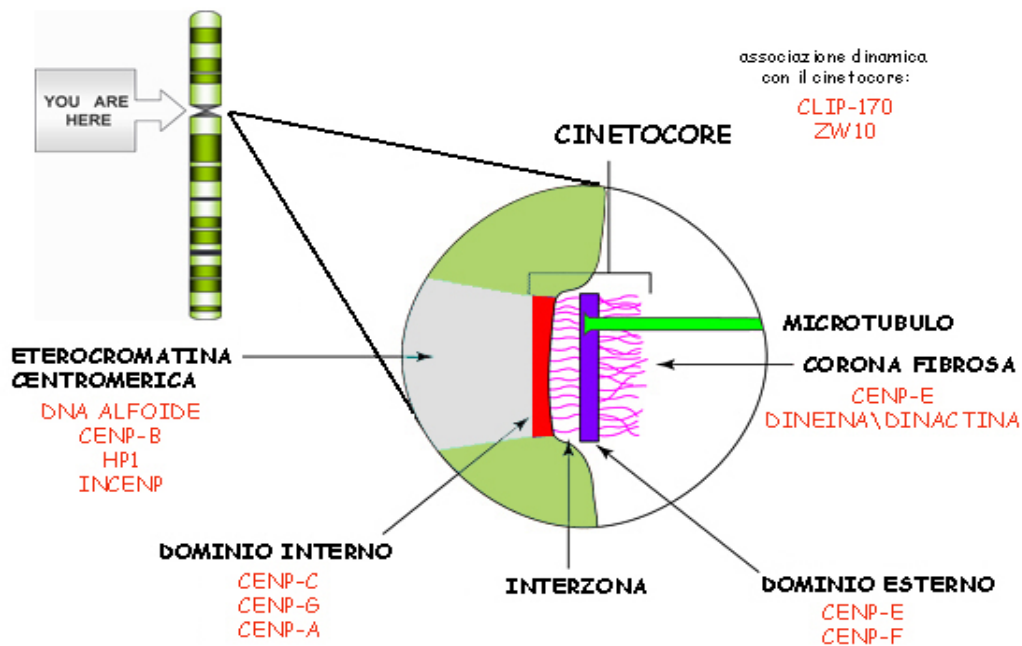


FIG. 1.4 IL CINETOCORE UMANO

La CENP-A, 17kDa, confinata nelle regioni centromeriche del cromosoma, e' una proteina istonica del tipo H3 conservata nei mammiferi, *Drosophila*, *S. cerevisiae* e si lega lungo tutto il cromosoma olocentrico di *C. elegans*. La sintesi di CENP-A e'

associata con la replicazione del centromero dalla meta' della fase S alla fase G2, mentre l'espressione dell'istone H3 e' alta all'inizio della fase S.

L'espressione ritardata del CENP-A rispetto a H3 e' importante per definire la funzione di CENP-A, e porta ad ipotizzare che le regioni che si replicano tardivamente di conseguenza si legano preferenzialmente a CENP-A, disponibile in quella fase di replicazione, portando cosi' quella regione cromosomica ad organizzarsi in modo da assemblare il centromero. Questi studi suggeriscono che esiste un controllo trascrizionale sul cinetocore e sul dominio interno del centromero e affida a CENP-A un ruolo chiave nel promuovere la formazione del cinetocore (Choo, '00). La CENP-A potrebbe cosi' essere considerata un marker epigenetico per il centromero (Dobie et al., '00), critico per il successivo legame con la CENP-C solo dopo l'impacchettamento a livello primario della cromatina ad opera della CENP-A (Howman et al., '00). La CENP-A, localizzata solo a livello dei centromeri attivi, puo' sostituire l'istone H3 nella formazione degli istoni in associazione con altre proteine (H4, H2A e H2B) e DNA (senza specificita' di sequenza) e cio' ha confermato che la CENP-A e' una proteina istonica del centromero (Yoda et al., '00). Lo studio del gene della cenpa, omologo al gene della CENP-A nel topo, ha dimostrato quanto questo gene sia essenziale (Howman et al., '00).

La proteina CENP-B, di 80kDa, e' localizzata nell'eterocromatina centromerica umana e di topo e riconosce una sequenza di 17bp, la CENP-B box, individuata in un subset di satelliti alfoidi umani e nel satellite minore di topo; questa proteina forma un complesso contenente un dimero CENP-B e due sequenze alfoidi (Haaf et al., '95). La localizzazione di questa proteina sia su centromeri attivi che inattivi nei cromosomi pseudocentrici e multidentrici suggerisce che la deposizione di questa proteina e' insufficiente per dare origine ad un nuovo centromero. L'assenza di questa proteina sui neocentromeri attivi umani e sui centromeri del cromosoma Y di uomo e topo, suggerisce che la proteina non e' indispensabile oppure e' funzionalmente ridondante (Choo, '00).

Esperimenti in cui i geni sono distrutti, hanno dimostrato che CENP-C, 140kDa, natura altamente basica, e' essenziale per la stabilita' dei cromosomi, per la loro segregazione in mitosi e per la sopravvivenza stessa delle cellule; e' una proteina centromerica evolutivamente conservata, presente nel dominio interno del centromero (Fugakawa et al., '99; Howman et al., '00). La proteina possiede un dominio di legame al DNA, ma resta da vedere se e' una sequenza o una particolare conformazione del DNA a legare la CENP-C. In aggiunta al suo ruolo in mitosi, questa proteina centromerica potrebbe essere implicata nel controllo del ciclo cellulare nella fase G1 e non meno importante, si considera la CENP-C uno dei marker epigenetici di un centromero attivo (Choo, '00), che permetterebbe la nucleazione e l'assemblamento del cinetocore. La CENP-C e' stata individuata solo nei centromeri attivi (Pidoux e Allshire, '00). Nonostante questo, la proteina CENP-C da sola non e' sufficiente per indurre la formazione del centromero (Howman et al., '00).

La CENP-E e' una proteina motoria di 312 Kda, associata ai microtubuli, concentrata nella corona fibrosa ed e' richiesta per un mantenimento stabile delle connessioni tra

i microtubuli e il cinetocore (Schaar et al., '97). Ci si aspetta quindi, a questo proposito, che proteine importanti per il movimento dei cromosomi come CENP-E, non siano strettamente indispensabili o che almeno siano ridondanti per evitare la perdita completa del movimento dei cromosomi se una di queste proteine dovesse venire a mancare nelle sue funzioni (Dobie et al., '00).

La CENP-G recentemente individuata, e' un membro delle proteine centromeriche costitutive e sembra avere un ruolo simile alla CENP-B e risulta anche colocalizzata con essa. La CENP-G e' associata alla matrice nucleare ed e' individuabile nel dominio interno del cinetocore (Pidoux e Allshire, '00). Come le CENP-B e CENP-C, ma diversamente da CENP-A, la proteina CENP-G rimane legata alla matrice nucleare anche dopo estrazioni intensive. La CENP-G, come la CENP-B e CENP-C, sembra essere coinvolta nei riarrangiamenti di ordine superiore della cromatina, risulta essere conservata nel corso dell'evoluzione ed e' stata individuata anche a livello del cromosoma Y umano, diversamente dalla CENP-B (He et al., '98).

La CENP-H e' costitutivamente associata al centromero lungo tutto il ciclo cellulare; non si conosce la funzione di CENP-H, probabilmente sono proteine coinvolte nel mantenere la struttura dei cromatidi e del cinetocore ma non si conoscono ancora le interazioni che ci sono con altre proteine centromeriche (Pidoux e Allshire, '00; Sugata et al., '99).

Di particolare rilevanza sono le proteine INCEP, inner CENP, localizzate al centromero negli stadi precoci della mitosi, presenti sulla piastra metafasica durante la transizione dalla metafase all'anafase (Howman et al., '00), e coinvolte nella coesione dei cromatidi fratelli (Sugata et al., '99).

In aggiunta a queste proteine, sono individuabili altre proteine non istoniche, localizzate nelle regioni pericentromeriche del cromosoma. Queste includono la TopoII (DNA polimerase II, importante nella condensazione dei cromosomi e nella disgiunzione dei cromatidi fratelli), HMG (high mobility group protein), proteine non istoniche della cromatina al centromero e ai telomeri, coinvolte nel posizionamento dei nucleosomi o nella messa in fase legandosi al solco minore della doppia elica del DNA in regioni ricche di A e T, HP-1 (heterochromatin protein-1 importante nella repressione della trascrizione), le proteine SU(VAR) (soppressori nell'effetto variegazione coinvolte nella repressione della trascrizione) e le proteine PARP, (poli ADP ribose polimerase, essenziale nella ribosilazione dell'ADP. Queste proteine sono coinvolte nell'organizzazione regionale della cromatina e nella regolazione dell'attivita' delle proteine cromatina-dipendente o dei geni regolatori della "centromerizzazione" o dell'attivita' centromerica (Choo, '00). Di particolare interesse la PARP, poiche' mostra affinita' di legame preferenzialmente con una sequenza a doppia elica di 9bp individuata nel DNA alfoide umano, che riconosce la pJ α , e con una ripetizione in tandem di 28bp trovata nei neocentromeri, l'AT28. L'immunofluorescenza dimostra che questa proteina e' presente nei centromeri normali di diversi mammiferi, nei neocentromeri e nei cromosomi dicentrici e' presente in quelli attivi ma non in quelli inattivi; inoltre questi esperimenti hanno evidenziato che la proteina PARP non e' presente a livello dell'eterocromatina non centromerica del genoma umano, come la

regione eterocromatica q12 del cromosoma Y (Earle et al., '00). La PARP e' essenzialmente un enzima nucleare multifunzionale e altamente conservato, catalizza le reazioni di ribosilazione dell'ADP che e' ubiquitaria negli eucarioti superiori e gioca un ruolo nei processi di riparo del DNA, nella regolazione trascrizionale, nella stabilita' del genoma, nella modulazione della struttura e funzione dello scaffold cromosomico e nell'apoptosi.

Il forte legame esistente tra la PARP e diverse sequenze di DNA centromerico (Earle et al., '00; Choo, '00) suggerisce la possibilita' di un meccanismo versatile alla base del riconoscimento del centromero di mammifero indipendente dalla sequenza primaria di DNA. La proteina PARP potrebbe modificare per poli ADP ribosilazione se' stessa o altre proteine come gli istoni, topoisomerasi, DNA polimerasi, HMG, proteine nucleari e kinasi, facendone diminuire la capacita' di legame al DNA attribuendole cosi' una funzione di controllo negativo di tipo epigenetico (Earle et al., '00).

Gaff e collaboratori (1994), nell'analizzare la giunzione tra il satellite alfa e il DNA satellite 3 sui cromosomi 13, 14 e 21 hanno individuato a livello del monomero alfoide una sequenza altamente conservata di 9bp che riconosce la proteina pJ α , 15kDa, presente negli estratti nucleari di cellule HeLa. Studi successivi dimostrano che questa sequenza e' interspersa e individuabile a livello dei blocchi alfoidi (Romanova et al., '96)

1.6 IL DNA CENTROMERICO DEGLI EUCARIOTI SUPERIORI

Se il dominio del cinetocore e' citologicamente riconoscibile nella costrizione primaria dei cromosomi in metafase in molte specie, non e' stato ancora possibile individuare una sequenza di DNA conservata fra le varie specie a cui attribuire la funzione di assemblare il cinetocore e quindi dare origine ad un centromero funzionale; in genere la funzionalita' centromerica nell'uomo e' stata associata con le sequenze alfoidi, ritenendole sufficienti come sito di nucleazione per il cinetocore (Allshire, '97).

Da piu' di 60 anni si descrive il centromero come un blocco eterocromatico di dimensioni variabili, ricco di sequenze ripetute, per la maggior parte alfoidi, in grado di sopprimere la ricombinazione a livello delle sue sequenze e di quelle vicine, probabilmente a causa dello stato altamente condensato e compattato dell'eterocromatina centromerica rispetto alla eucromatina, durante il crossing over in meiosi. Ma, come dimostrato in esperimenti su lievito, piuttosto che l'eterocromatizzazione, potrebbe essere l'attivita' in se' stesso del centromero a indurre la soppressione della ricombinazione (Choo, '98).

C'e' un limite di fondo nel cercare di definire le sequenze centromeriche negli eucarioti superiori: non si conosce bene la loro precisa localizzazione ed esistono ancora delle lacune nel cercare di definire i limiti funzionali delle sequenze di DNA cis-agenti di un centromero; ad esempio, per la sua completa funzionalita' potrebbero essere necessarie le regioni fiancheggianti di DNA centromerico, le cosiddette regioni pericentromeriche, ma la questione e' ancora aperta (Choo, '00). Prima di tutto, il centromero di un eucariote superiore contiene centinaia o migliaia di sequenze ripetute in tandem, ma analizzando queste ripetizioni in insetti, piante,

funghi, mammiferi e altri vertebrati, non c'è conservazione di sequenza, e non sembra quindi esistere la sequenza centromerica universale.

Il centromero utilizzerebbe meccanismi epigenetici per la sua regolazione allo scopo di ottenere un vantaggio evolutivo: è possibile, tollerare cambiamenti nella sequenza di DNA, non dovendo dipendere in assoluto da nessuna sequenza in particolare. Alternativamente, un meccanismo epigenetico, potrebbe essere un adattamento: se la funzionalità del centromero sopprimesse la ricombinazione, l'accumulo risultante di satelliti nelle regioni centromeriche favorirebbe l'evoluzione di meccanismi indipendenti dalla sequenza per la formazione del centromero e inoltre la plasticità centromerica *per se* faciliterebbe l'evoluzione cromosomica (Murphy e Karpen, '98).

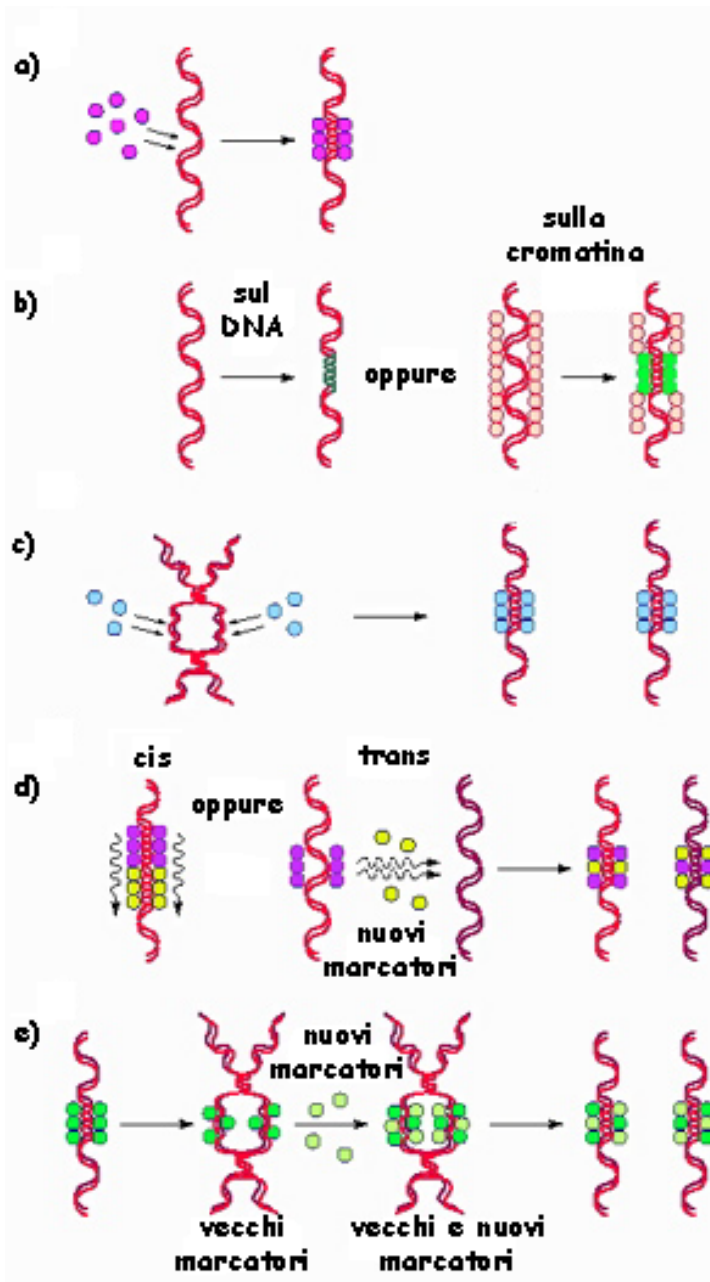
Regioni di DNA normalmente non centromeriche in *Drosophila*, *S. cerevisiae* e uomo possono dare origine a neocentromeri funzionali, e questo indica che il cinetocore può essere assemblato anche in regioni che non hanno niente a che vedere con le ripetizioni dei satelliti centromerici. Plasmidi contenenti regioni troncate del centromero, incapaci a dare origine a un centromero funzionale, se trasformati in altre linee cellulari, possono assemblare un centromero attivo, suggerendo che i meccanismi di "centromerizzazione" siano indipendenti dalla sequenza. Non è da escludere che ci siano delle preferenze per alcuni tipi di DNA, sequenze primarie con caratteristiche da permettere delle particolari strutture secondarie e terziarie per formare un centromero, come simmetrie a doppia diade (Koch, '00). Se la "centromerizzazione" non dipende dalla sequenza primaria del DNA, potrebbero però verificarsi dei cambiamenti a livello della struttura della cromatina facilitando la formazione del centromero (Choo, '00).

1.7 MECCANISMI EPIGENETICI

I cambiamenti epigenetici influenzano l'espressione fenotipica di un DNA senza coinvolgere nessun cambiamento a livello della sequenza primaria: due alleli hanno la stessa sequenza genetica, ma presentano uno stato funzionale diverso e alternativo. Ciascuno degli stati alternativi è stabile: uno è lo stato nativo, e l'altro ha qualche proprietà particolare che gli deriva da componenti assenti nello stato nativo (Lewin, '98). Le modificazioni epigenetiche spiegherebbero fenomeni come la variegazione per effetto di posizione, l'imprinting, l'inattivazione del cromosoma X e la regolazione della trascrizione tramite il ripiegamento di ordine superiore della cromatina (Barry et al., '00 e ref all'int.)

Alcuni meccanismi epigenetici potrebbero potenzialmente alterare la struttura cromatinica di una regione, uno di questi potrebbe coinvolgere le proteine CENP-A, CENP-C e PARP; il loro legame al DNA provocherebbe cambiamenti nella conformazione di ordine superiore della cromatina dando origine a un centromero (Choo, '00).

FIG.1.5 MECCANISMI EPIGENETICI



I meccanismi epigenetici che alterano la struttura della eterocromatina e faciliterebbero la formazione del centromero:

a) Vengono legate le proteine che legano il DNA centromerico (CENP-A, CENP-C, PARP) provocando cambiamenti conformazionali necessari per la "centromerizzazione".

b) Il rimodellamento della cromatina potrebbe avvenire grazie a modificazioni di tipo chimico del DNA centromerico (metilazione) o tramite l'associazione con istoni modificati (acetilazione degli istoni H3, fosforilazione e poli ADP-ribosilazione).

c) Sincronizzazione del tempo di replicazione e deposizione di proteine specifiche del centromero sul DNA nascente.

d) La cromatina centromerica preesistente diffonde fattori di attivazione del centromero in cis e in trans.

e) La cromatina centromerica preesistente spiegherebbe inoltre il modello di replicazione autonoma del centromero: durante la replicazione cromosomica i duplex nascenti avrebbero proprietà centromeriche reclutando fattori di attivazione del centromero (Choo, 2000)

I rimodellamenti cromatinici potrebbero anche avvenire grazie a vari cambiamenti di tipo chimico del DNA centromerico o delle sue proteine istoniche o non istoniche, come la metilazione della citosina nel dinucleotide CpG a dare 5-metilcitosina, modificazione in genere associata all'inattivazione della sequenza che la subisce, già individuata in maniera variabile a

livello delle sequenze alfoidi ad opera della proteina MeCP2 (Choo, '00)

La modificazione e' ereditata epigeneticamente per l'esistenza di un sistema che riconosce i filamenti emimetilati e li converte in uno stato completamente metilato (Lewin, '98). Il DNA di *Drosophila* e *S.pombe* non e' metilato, perciò in questo caso devono essere invocati altri meccanismi di modificazione (Karpen e Allshire, '97).

Studi sullo stato di acetilazione delle regioni pericentromeriche di *S. pombe*, *Drosophila* e uomo, hanno dimostrato la sottoacetilazione degli istoni H3 e H4 dei residui di lisina nelle regioni N-terminali, suggerendo che per assemblare un centromero funzionale e' necessario uno stato ipoacetilato dell'eterocromatina centromerica (Choo, '00; Karpen e Allshire, '97). La presenza di istoni acetilati fa da

segnale alle acetilasi per agire sugli istoni non modificati nello stesso nucleosoma o in quelli adiacenti perpetuando la modificazione (Lewin, '98).

La fosforilazione, in particolare quella degli istoni H1 e H3, e' richiesta per la segregazione e la condensazione dei cromosomi durante la meiosi e mitosi. La fosforilazione parte nell'eterocromatina pericentrica durante la fase G2 e prosegue attraverso tutto il genoma in associazione con la condensazione dei cromosomi fino all'anafase e termina alla mitosi. La variante centromerica di H3, la proteina CENP-A e la H3 hanno i siti di fosforilazione conservati, e cio' lascia supporre che anche la CENP-A al centromero viene fosforilata durante la mitosi (Choo, '00).

Un'altra modificazione di tipo chimico potrebbe essere la poli ADP ribosilazione ad opera della PARP.

Un meccanismo di generazione dei centromeri, indipendente dalla sequenza e da modificazioni del DNA, potrebbe essere la sincronizzazione del tempo di replicazione al centromero e la espressione e deposizione di proteine centromero-specifiche sul nascente duplex di DNA come avverrebbe con la proteina CENP-A, disponibile al legame proprio quando il DNA centromerico si sta replicando (Choo, '00).

Inoltre la cromatina centromerica preesistente potrebbe essere lo stampo cis o trans agente per attribuire a regioni adiacenti o a remote aree del genoma fattori di creazione del centromero. Questo modello puo' spiegare la propagazione autonoma di un centromero: al momento della replicazione il nascente duplex eredita alcuni marker di "centromerizzazione", perpetuando la nucleazione del centromero nella stessa regione, in questo modo ogni nuovo centromero contiene marker di "centromerizzazione" vecchi ereditati per il reclutamento di marker di nuova sintesi (Choo, '00).

1.8 I NEOCENTROMERI

Il processo di formazione dei neocentromeri e' sicuramente diverso, non si tratta di perpetuare un centromero persistente, ma di crearne uno ex-novo in regioni eucromatiche; resta da vedere se il processo di formazione avvenga casualmente o ci siano punti caldi, siti preferiti per un nuovo centromero.

L'attivazione dei neocentromeri probabilmente avviene attraverso una diffusione di proteine centromeriche da un normale centromero a regioni in cis o perfino in trans localizzate entro una certa distanza, come avviene in *Drosophila*, dove frammenti acrocentrici per irradiazione possono attivare meccanismi di formazione del centromero; oppure la propagazione dei neocentromeri puo' essere anche spiegata da uno slittamento dei tempi di replicazione (Karpen e Allshire, '97).

Il paradosso sta nella conservazione delle proteine centromeriche a livello dei neocentromeri e la mancanza di conservazione nelle sequenze; ritroviamo una situazione simile anche analizzando il centromero di specie differenti, dove le proteine del cinetocore sono conservate, ma lo stesso non si puo' dire delle sequenze centromeriche, diverse anche sui diversi cromosomi di una stessa specie (Choo, '97b).

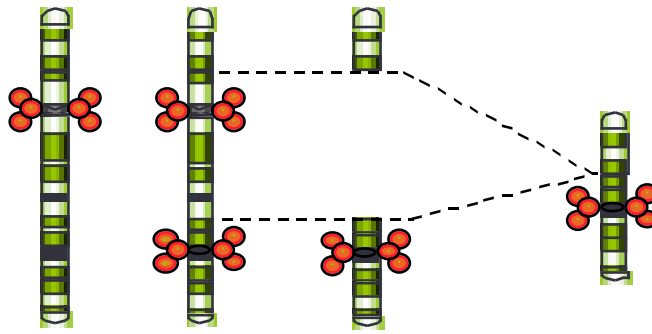
Recentemente e' stato ipotizzato che l'eterocromatina, o regioni con proprieta' simili, abbiano la tendenza piu' spiccata e forse le competenze, vedi l'affinita' di alcune proteine sia per il centromero sia per l'eterocromatina (HP1 in drosophila e HP1 simili

nei mammiferi), a dare origine a un centromero, il motivo puo' risiedere nel tempo di replicazione di queste regioni, piu' in ritardo rispetto al resto del genoma (Choo, '00; Karpen e Allshire, '97).

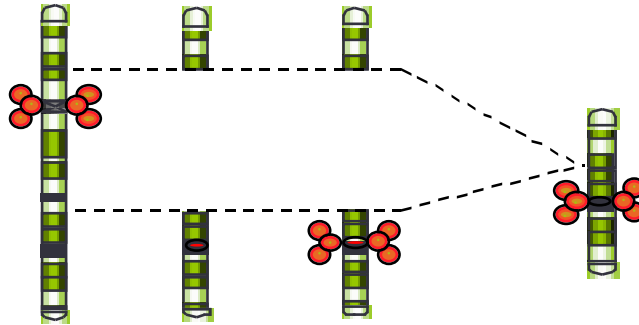
Il DNA centromerico, inteso come sequenza ripetuta, non e' sufficiente per guidare la formazione di un cinetocore. Normalmente la presenza di piu' di un centromero sullo stesso cromosoma risulta nella rottura e nella perdita di questi durante la mitosi, ma nelle traslocazioni robertsoniane alcuni cromosomi dicentrici, derivanti da braccia di due differenti cromosomi fusi insieme, sono stabili mitoticamente perche', dei due centromeri, solo uno contiene un cinetocore attivo (Karpen e Allshire, '97). Ambedue i centromeri contengono DNA alfoide e legano la proteina CENP-B ma la costrizione primaria, la manifestazione visibile al microscopio ottico della presenza di un cinetocore, e' presente solo a uno dei due centromeri. Quando i cinetocori sono visualizzati i esperimenti di immunofluorescenza con anticorpi anti CENP-A, CENP-C, CENP-E, viene marcato solo un centromero, con un segnale di lieve entita' sull'altro inattivo (Wiens e Sorger, '98).

Alcune linee cellulari con cromosomi dicentrici, possono essere considerate dei mosaici, poiche' solo uno o l'altro dei centromeri e' attivo a formare un cinetocore funzionale suggerendo l'esistenza di un meccanismo plastico di inattivazione del centromero, senza nessun cambiamento nella sequenza. Tuttavia, poiche' generalmente nelle cellule e' sempre attivo lo stesso centromero indica che, una volta stabilita, la posizione del centromero funzionale puo' essere propagata durante la divisione cellulare (Wiens e Sorger, '98, Karpen e Allshire, '97) e i meccanismi epigenetici sono la spiegazione piu' plausibile, ma e' arduo chiarire situazioni dove, come accade nel marker MY-a, e' presente sullo stesso cromosoma un neocentromero e il normale centromero del cromosoma Y conservato e' inattivo (Choo, '97b). La questione dei neocentromeri resta ancora aperta, e nonostante aumenti il numero di neocentromeri caratterizzati, si sta ancora teorizzando sui meccanismi di formazione e mantenimento.

Il primo neocentromero ad essere caratterizzato e' in 10q25.2, il DNA di questo neocentromero in FISH non crossibridizza con il DNA alfoide. In un primo tempo si e' ipotizzato, per giustificare un neocentromero, che in 10q25 ci fosse un centromero latente, attivato prima o dopo la rottura del cromosoma 10, o eventi di trasposizione, o amplificazione di sequenze ripetute, oppure meccanismi epigenetici avessero conferito funzionalita' centromerica a questa regione di tipo eucromatico. A livello citologico il neocentromero presenta un bandeggio C negativo e forma una distinta costrizione primaria. In esperimenti di immunofluorescenza sono stati usati anticorpi contro le proteine del centromero per marcare la posizione del neocentromero, individuando varie CENP, ma nessuna reazione usando anticorpi antiCENP-B (du Sart et al., '97).



A) L'attivazione del neocentromero precede la rottura del cromosoma



B) L'attivazione del neocentromero e' successiva alla rottura del cromosoma

FIG.1.6 FORMAZIONE DEL MARKER CROMOSOMICO 10q25.2

Successivamente Barry e collab. (1999), hanno caratterizzato le 80 kb corrispondenti al dominio che lega il core delle proteine del neocentromero. L'analisi ha rivelato l'assenza dei satelliti di tipo alfa, beta, gamma e delle ripetizioni 48bp e ATRS. Tuttavia, sebbene siano state identificate motivi di legame con le proteine pJ α e CENP-B e sequenze generalmente pericentriche come i satelliti classici I e III; la loro scarsa abbondanza e la mancanza di queste sequenze in tandem, indica che e' molto improbabile che abbiano qualche ruolo nell'origine del centromero e nella funzionalita' stessa. Sono stati localizzati altri motivi di legame per proteine: HMG1 e TopoII, ma non sembrano avere influenza nel meccanismo di formazione del centromero. Nonostante al centromero non siano rilevate sequenze in particolare, un tema ricorrente, l'unica nota in comune tra gli organismi, e' un alto contenuto di A e T, e il neocentromero 10q25 ha un contenuto di A e T che non si discosta dalla media, ma presenta una certa concentrazione di isole A e T, come AT28, ripetizioni in tandem di 28bp a formare dei blocchi di 600bp con un contenuto in A e T del 80%, contenente delle palindromi che potrebbero formare delle interessanti strutture secondarie, la cui funzione e' poco nota.

Il numero degli elementi trasponibili non si discosta da quelli trovati nelle altre regioni del genoma, esiste un leggero incremento di Alu e MIR e una riduzione di LINE1. Sempre Barry et al. ('00), hanno continuato nel lavoro di caratterizzazione della regione di 80 kb del neocentromero (NC DNA), confrontandola con la sequenza corrispondente del DNA di un normale cromosoma 10 (HC DNA), individuando differenze di singole basi con una media di un polimorfismo ogni 4.6kb, ma nessuna

delezione, inserzione o riarrangiamenti strutturali. Per investigare se queste mutazioni siano state alla base della "centromerizzazione", e' stato clonato e sequenziato il DNA della regione 10q25.2 del genitore del portatore del marker cromosomico (PnC DNA), e dal confronto delle due sequenze e' risultato 100% di identita', suggerendo che le differenze tra NC e HC DNA sono dei semplici polimorfismi di nucleotidi (SNP) e non sono in nessun modo coinvolti nella formazione del centromero.

Nel 1998 Wandall et al. hanno osservato un neocentromero in posizione 3q26 in un individuo e in sua figlia dove il cromosoma 3 era delemo nella regione centromerica, e alla fusione del rimanente braccio corto e lungo, era seguita l'attivazione di un neocentromero. Il neocentromero non presentava nessuna sequenza alfoide ed era debolmente positivo al siero CREST anticentromero. La microscopia elettronica mostrava le normali strutture visibili al cinetocore con microtubuli morfologicamente normali e di normali dimensioni. Il centromero delemo, mantenuto sotto forma di un piccolo marker lineare, presentava invece normale crossreazione contro il siero anticromosoma ma ridotte dimensioni del cinetocore. Il neocinetocore in 3q26 era stabile in diverse condizioni di crescita, mentre c'era la tendenza a perdere il cinetocore del piccolo marker. La perdita del cromosoma 3 e' letale nell'uomo, e poiche' la perdita del centromero significherebbe la perdita del cromosoma, una forte pressione selettiva avrebbe favorito le cellule contenenti il cromosoma 3 con il neocentromero.

Un neocentromero presente attraverso tre generazioni, diverso da quelli descritti nella maggior parte dei casi, e' stato individuato sul braccio lungo in zona eterocromatica del cromosoma Y, e sullo stesso cromosoma, senza nessun riarrangiamento citologicamente visibile, risiedono il normale centromero e il neocentromero (Tyler Smith et al., '99). Il DNA alfoide, usato come sonda in esperimenti di FISH, ibrida sul centromero, ma non sulla costrizione primaria del neocentromero, dove sono state individuate le proteine centromeriche CENP-A, CENP-C, CENP-E, mentre la CENP-B non e' presente del tutto sul cromosoma Y.

Utilizzando esperimenti di PCR ed esperimenti di ibridazione su filtro sono stati investigati 82 loci attraverso tutto il cromosoma per caratterizzare la delezione di parte del dominio alfoide ridotto a 250kb invece delle 770kb presenti su questo aplotipo, (le dimensioni del dominio alfoide sull'Y variano da 430 a 1600kb). E' probabile che questa delezione rimuovendo parte del dominio della CENP-A, probabilmente uno stabilizzante del cromosoma, abbia provocato il silenziamento del centromero normale, e l'attivazione del neocentromero e' stata la risposta che ha evitato la perdita del cromosoma. In alternativa, si e' verificato l'attivazione del neocentromero e di conseguenza il centromero normale si e' inattivato per parziale delezione. Indipendentemente dal meccanismo di formazione, il neocentromero, presente almeno in 3 generazioni successive, puo' essere trasmesso normalmente in meiosi e teoricamente potrebbe fissarsi nella popolazione (Tyler Smith et al., '99).

La lista dei neocentromeri in letteratura e' abbastanza lunga: Warburton et al., '00 hanno recentemente pubblicato un lavoro in cui e' presentato un elenco di 40

neocentromeri, con particolare risalto agli 8 presenti su una porzione del cromosoma 13q. Come già risulta dalle ricerche precedenti, non ci sono satelliti alfoidi, ma neocentromeri analfoidi in cui sono presenti le proteine del cinetocore CENP-C, CENP-E e hMAD2. All'interno del cromosoma 13q sono presenti diverse localizzazioni dove sono stati individuati dei neocentromeri come a livello delle bande citogenetiche 13q32, 13q21 e 13q31; ciò suggerisce che il cromosoma 13 è propenso alla formazione dei neocentromeri. L'analisi del cariotipo di ciascun paziente rivela tetrasomie o trisomie per segmenti discreti del frammento 13q, permettendo di definire le caratteristiche cliniche associate con le duplicazioni di questa regione cromosomica; è da considerare che in questi casi, a differenza delle trisomie complete, l'espressione dei geni potrebbe essere inattivata dalla vicinanza dei neocentromeri su questi cromosomi, influenzando così le caratteristiche cliniche.

I 40 neocentromeri sono stati individuati sui derivativi di 15 cromosomi umani: 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 20, X e Y, sia su cromosomi di fusione da frammenti acentrici terminali, sia, in altri casi, da frammenti paracentrici, in ambedue i casi, i cariotipi risultano bilanciati con perdita minima di materiale genetico; altri casi di formazione di neocentromeri, inclusi gli 8 sul cromosoma 13, presentano duplicazioni invertite di regioni cromosomiche distali. È riportato l'esempio di un neocentromero sul cromosoma X e quattro sul braccio lungo dell'Y (Warburton et al., '00 e ref. all'int.). Questa alta proporzione di neocentromeri in queste regioni cromosomiche rispetto ad altre potrebbe essere attribuita alla compatibilità della sopravvivenza fetale per le trisomie di queste regioni. Tuttavia, non sono stati osservati neocentromeri su derivativi dei cromosomi 18 o 21, a dispetto dell'alta tolleranza per le trisomie di questi cromosomi; questa differenza potrebbe essere attribuita ipoteticamente ad un alto numero di sequenze ripetute presenti nei cromosomi soggetti alla formazione dei neocentromeri.

Sono state effettuate analisi citogenetiche per caratterizzare le regioni di "centromerizzazione" rispetto ai breakpoint delle inversioni e nessuna di queste contiene neocentromeri (Warburton et al., '00 e ref. all'int.).

La costruzione dei cromosomi artificiali di mammifero (MAC) è un passo importante per lo studio degli elementi di DNA necessari per la struttura e la funzione dei cromosomi. Yang e al. '00 hanno introdotto un minicromosoma umano in linee cellulari DT40 di pollo e hanno inoltre provocato delle rotture ai telomeri per individuare la sequenza minima utile a ottenere un centromero funzionale. Questi esperimenti provano che un centromero di vertebrato con due blocchi di DNA alfoide funzionale separati da 2.5Mb può esistere come una struttura stabile in molte ma non in tutte le cellule di vertebrato. Ulteriori indagini mostrano l'incapacità di un centromero di poter funzionare se le dimensioni del blocco alfoide sono inferiori a 100kb. Linee cellulari contenenti questi minicromosomi con centromeri minimi, possono essere utili per individuare i fattori richiesti per il mantenimento dei centromeri di vertebrato (Yang et al., '00).

Nel corso degli ultimi anni nuove informazioni sono state aggiunte su quanto era già risaputo sui centromeri, cinetocori e sui neocentromeri; ma ancora non è chiaro cosa

e' richiesto a una sequenza di DNA per essere una parte funzionale di un complesso centromerico. La sequenza esatta non e' determinante, ma considerando che un centromero di una specie e' funzionale all'interno di cellule di altre specie, come avviene negli ibridi somatici, allora deve esistere un codice universale per il centromero (Koch, '00).

Piuttosto che cercare qualche motivo nascosto ricorrente all'interno della sequenza di DNA, Koch ha focalizzato la sua attenzione sul ritmo della sequenza stessa, dato dall'alternanza delle purine e pirimidine, e sulle simmetrie interne originanti delle superstrutture. Il DNA alfoide, il DNA di *S. cerevisiae* e il neocentromero 10q25 sembrano possedere almeno in parte queste simmetrie in comune, mentre non presentano questo tipo di struttura i satelliti I, II, III e il satellite maggiore di topo, e questo dimostra che le simmetrie non sono il prodotto del processo di formazione dei satelliti. Le ripetizioni AT28, considerate nella caratterizzazione del neocentromero 10q25, presentano, secondo i parametri di simmetria descritti da Koch, similitudini con le sequenze alfoidi, ma, il core di DNA necessario e sufficiente per la formazione del neocentromero potrebbe risiedere all'esterno delle 80 kb analizzate al riguardo in 10q25 e quindi sarebbero necessari nuove indagini molecolari. Le sequenze di DNA alfoide, per quanto possano essere sostituite da sequenze non correlate, come accade per i marker cromosomici, sono normalmente presenti alla costrizione primaria di ciascun cromosoma e costituisce i locus dove si forma il complesso centromero-cinetocore (Laurent et al., '99).

Sono ancora aperte questioni riguardanti l'evoluzione e la funzione delle sequenze alfoidi, e Laurent et al. focalizzano l'attenzione sull'importanza che le sequenze L1 possano avere su questi meccanismi di evoluzione. Le sequenze alfoidi contenenti elementi L1 risultano divergenti dai subset alfoidi omogenei non contenenti invece questi tipi di trasposoni. In aggiunta, un certo numero di L1, presenti alle estremita' dei blocchi alfoidi e localizzate a distanza l'uno dall'altra, possono essere presenti o assenti simultaneamente, questo puo' essere interpretato come il risultato di ricombinazioni intracromosomali, tra L1 distanti, che provocano delezioni di una certa regione che comprende le L1 contigue circondate da sequenze di DNA alfoide.

Non si conosce esattamente quale porzione di alfoide e' coinvolto nelle funzioni centromeriche, Csink e Henikoff, (1998) suggeriscono che il centromero si muova lungo sequenze potenzialmente candidate, sull'azione di alcuni parametri, come la presenza o meno di retrotrasposoni all'interno di sequenze satelliti; dai dati di Laurent et al. (1999), risulta che le sequenze di DNA alfoide coinvolte a formare il centromero sono omogenee nella sequenza e non interrotte da L1 o da altri trasposoni. Le sequenze alfoidi periferiche, al contrario, sono divergenti e interrotte da elementi L1. L'inserzione delle L1 nel monomero alfoide avviene in 7 potenziali siti specifici per l'inserzione, e puo' quindi significare la perdita delle competenze del satellite alfa danneggiando il cromosoma, impedito a formare un centromero stabile. Anche in questo caso vengono richiamati meccanismi epigenetici che influiscono sulla scelta di quale porzione del dominio alfoide sia utilizzato per la formazione del centromero e

Csink e Henikoff (1998) propongono i DNA satelliti come spaziatori passivi per mantenere separate le regioni a replicazione tardiva.

Il pieno ripristino della funzionalità del centromero, potrebbe avvenire tramite due vie alternative: tramite amplificazione *de novo* di un dominio alfoide o per crossing over ineguale tra cromatidi fratelli; Marcais et al. nel '91 proponevano un processo di replicazione saltatoria, un processo cioè, di amplificazione su larga scala, e la presenza su uno stesso cromosoma di diverse HOR appoggia questa ipotesi. Le inserzioni L1 quindi possono da un lato evitare che il dominio alfoide lievitato nelle dimensioni e dall'altro possono danneggiare l'integrità del centromero. Sono presenti in letteratura casi di L1 inserite all'interno di sequenze alfoidi per esempio sul cromosoma 10 (Jackson et al., '92), sul cromosoma 7 e sul cromosoma 21 (Mashkova et al. '98 e ref all'int.). L'esame del dominio alfoide coinvolto nella trasposizione, mostra una divergenza dalle sequenze alfoidi canoniche presenti su questo cromosoma.

Studi effettuati da Mashkova et al. (1998) hanno dimostrato una diminuita efficienza dei processi di omogenizzazione nelle regioni periferiche del dominio alfoide, risultante nella mancanza di una HOR e organizzazione monomerică, aumento delle inserzioni delle sequenze L1. Il confronto delle sequenze dei monomeri alfoidi periferici mostra una maggiore divergenza di questi monomeri rispetto a monomeri più interni nel blocco alfoide dovuta alla diminuzione degli eventi ricombinativi. La ricombinazione è meno frequente poiché le possibilità di allineamento di queste regioni periferiche con sequenze omologhe sono minori e avvengono solo in corrispondenza del blocco alfoide, mentre le sequenze fiancheggiatrici non alfoidi non sono coinvolte nella ricombinazione.

1.9 REGIONI PERICENTROMERICHE

Le sequenze satelliti, come i satelliti alfa, subiscono evoluzione concertata, dove l'identità di sequenza è mantenuta all'interno della specie grazie a frequenti scambi di sequenza inter e intracromosomici (Warburton et al., '00 e ref all'int.). Questo è in stridente contrasto con le piccole alterazioni genetiche caratteristiche dell'evoluzione genica e l'estesa conservazione di sintenia che è mantenuta tra le braccia dei cromosomi di specie anche lontanamente correlate. Un aspetto interessante riguarda le sequenze localizzate nelle regioni pericentromeriche, in quanto la loro evoluzione potrebbe essere influenzata dal peculiare comportamento delle sequenze satelliti della regione.

Un esempio è dato dalle 11 sequenze correlate al gene NF1, di cui 7 presenti nelle regioni pericentromeriche (Regnier et al., '97), queste sequenze correlate a NF1 sono pseudogeni non processati del gene e contengono numerose mutazioni. In esperimenti di FISH, utilizzando il cDNA di NF1 come sonda, si individuano vari segnali di ibridazione sui cromosomi: 15q11, 14q11, 2q21, 22q11, 12q12, 21q11, 1p32, 18p/q11 e 20p/q11.

Studi evolutivi sul macaco e gibbono per PCR e FISH individuano il gene funzionale NF1 sul cromosoma omologo al cromosoma 17 in ambedue le specie, in gibbono inoltre sono presenti altre due sequenze correlate (Regnier et al., '97). I loci omologhi di NF1

sono stati clonati e caratterizzati e nonostante l'omologia di sequenza tra il gene e i vari pseudogeni superi il 90%, in FISH le sonde derivanti dagli pseudogeni non riconoscono tutti gli altri pseudogeni e talvolta neppure il gene NF1 (Cumming et al., '96; Purandare et al., '95; Hulsebos et al., '96; Luijten et al., '00). Cumming et al. (1996) suggeriscono una possibile correlazione tra queste duplicazioni e le sequenze satelliti. Tuttavia la mancanza di mappe accurate di queste regioni, eccetto che per la regione pericentromerica del cromosoma 10, preclude ogni analisi di questo fenomeno (Jackson et al., '99 e ref. all'int.).

Paralogie intracromosomiche sono generalmente ristrette in bande citogenetiche discrete ed e' attualmente possibile citare una serie di cluster di geni dovuti a endoduplicazioni come il cluster dei recettori olfattivi, la famiglia dei geni zinc finger e il cluster HOX, il piu' antico, conservato in tutte le specie di vertebrati (Eichler et al., '98). Queste duplicazioni trasferiscono i geni in nuovi ambienti genomici, creando nuove combinazioni con elementi regolatori cis-agenti, e attribuendo ad essi nuovi ruoli funzionali. Famiglie di geni paraloghi intercromosomici come i geni delle alfa e beta globine, le due famiglie di geni insulin growth factor e i geni HOX, rappresentano i residui di eventi di poliploidizzazione (Eichler et al., '96).

In aggiunta alle ripetizioni cromosoma specifiche, o dupliconi, sono stati identificati un grande numero di segmenti genomici che mappano su diversi cromosomi non omologhi, chiamati dupliconi transcromosomici. Esistono due particolari regioni del genoma umano che sono particolarmente ricche di tali duplicazioni transcromosomiche: le regioni subtelomeriche dei cromosomi e le regioni pericentromeriche definite come la prima banda chiara o scura, definibile con la colorazione in Giemsa, fiancheggiante la costrizione primaria del centromero. Analizzando in dettaglio il DNA pericentromerico in 10q11, 16p11 e 2p11 sono state per esempio individuati dupliconi localizzati distalmente al DNA alfa satellite (Jackson et al., '92; Horvath et al., '00a; Loftus et al., '99). Queste regioni sono quasi esclusivamente costituite da segmenti genici e pseudogenici trasposte da diverse regioni nel genoma degli ominoidi.

I processi ricombinativi nelle regioni pericentromeriche produrrebbero loci paraloghi provocando instabilita' genomica come un anormale appaiamento e crossing over ineguale, infatti i dupliconi in 7q11.23, 15q11.2, 17p11.2, 17q11.2 e 22q11.2, sono associati a malattie causate da disordini genomici (Ji et al., '00).

L'analisi di sequenza di 225 Kb di cloni BAC nella regione pericentromerica 16p11.2 suggerisce la presenza di duplicazioni multiple che sono state originate da altre regioni del genoma: porzioni del gene del trasportatore della creatinina, HERC2 e geni della regione costante e variabile delle immunoglobuline; questa regione risulta cosi' composta da un complesso "patchwork" di sequenze genomiche che sono state trasposte dai rispettivi loci ancestrali in Xq28, 15q13, 2p11 e 14q32, (Loftus et al., '99) nel genoma degli ominoidi da 3 a 20 milioni di anni fa (mya). I segmenti paraloghi hanno un alto grado di similarita' di sequenza (93%-98%) ed e' possibile individuare alcuni di essi nelle varie specie di primati.

Studi di popolazione delle duplicazioni subtelomeriche hanno identificato differenze tra i diversi gruppi etnici nelle popolazioni umane, suggerendo una diffusione dinamica di questi segmenti (Trask et al., '98a; '98b).

La regione cromosomica Xq28 mostra un grado di instabilità genomica abbastanza inusuale, il gene ALD mappa in questa regione ed è stato associato all'adrenoleucodistrofia, un disordine neurovegetativo legato alla X in cui si ha accumulo di acidi grassi saturi a catena lunga e demielinizzazione del sistema nervoso centrale. Le lesioni molecolari associate con la malattia sono il risultato di mutazioni puntiformi all'interno della regione codificante del gene ALD e le diagnosi molecolari per la caratterizzazione di queste mutazioni erano fuorviate da una serie di pseudogeni troncati non processati mappanti in varie regioni pericentromeriche: 2p11, 10p11, 16p11 e 22q11. Data l'omologia del 94.6% tra questi loci, che mappano in precise locazioni del genoma vicino a sequenze ripetute eterocromatiche, si è stimato che le duplicazioni di Xq28, siano databili 5-3mya (Eichler et al., '97).

Un'altra regione di Xq28, 20 kb prossimale al locus ALD, possiede l'attitudine a duplicare e a trasporre nelle regioni pericentromeriche dei cromosomi. L'analisi della regione rivela un segmento di 26.5 kb trasposto recentemente nella banda 16p11.1. Il duplicone complessivamente 65 kb comprende tutto il gene del trasportatore della creatinina e parte del gene CDM; mappature citogenetiche nei primati superiori indicano che la regione si è duplicata molte volte nelle regioni pericentromeriche di autosomi non sintenici con il cromosoma 16 umano. Le analisi delle sequenze dei breakpoint e analisi filogenetiche fanno supporre che la trasposizione sia avvenuta in due tempi: nel primo è avvenuta una duplicazione da Xq28 a 2p11 e in seguito è avvenuta una rapida duplicazione e trasposizione di questo locus paralogo come un mosaico di segmenti duplicati più piccoli ad altre regioni pericentromeriche (pericentromeric swapping), ed è possibile che i dupliconi ALD e CTR-CDM si siano trasposti indipendentemente e la loro posizione su 16p11 sia solo coincidenza; tra l'altro le due cassette sul cromosoma 16 mappano a 500 kb l'una dall'altra. (Eichler et al., '97; Horvath et al., '00b).

Il meccanismo alla base della trasposizione di questi segmenti genomici non è ancora stato compreso, vicino ai breakpoint in Xq28 sono presenti cluster invertiti di ripetizioni Alu e inoltre l'analisi delle sequenze dei presunti siti di inserzione contengono un numero elevato di ripetizioni ricche in G e C localizzate a meno di una kilobase in prossimità dei boundary di paralogia. Una classe di ripetizioni: CAGGG, è localizzata nelle regioni pericentromeriche di molti autosomi e presenta una certa analogia con i segnali di ricombinazione delle immunoglobuline, faciliterebbe eventi ricombinativi tra sequenze non alleliche. È possibile inoltre trovare ripetizioni ricche in G e C in vicinanza di duplicazioni subtelomeriche recenti. Probabilmente queste CAGGG hanno un ruolo nelle duplicazioni pericentromeriche come segnali di integrazione di trasposizione per i dupliconi supponendo si siano evolute in queste regioni pericentromeriche prima dell'avvento dei dupliconi stessi.

Utilizzando un costrutto di 1.9 kb di ripetizioni CAGGG come sonda in esperimenti di ibridazione *in situ* su metafasi umane, sono stati ottenuti segnali sui cromosomi 1q12,

2p11, 9q12/p11, 10p11, 14q11, 15q11, 16p11, 22q11 e in condizioni di bassa stringenza sui cromosomi 7p11, 18p11 e 21q11. E' stato stimato un numero di ripetizioni CAGGG di circa 42-44 copie per cromosoma. Esperimenti di FISH condotti su quattro ominoidi e quattro cercopitecoidi, hanno mostrato forti segnali di ibridazione quasi esclusivamente sulle regioni pericentromeriche di molti cromosomi di primati, mentre le metafasi delle scimmie del vecchio mondo presentavano ibridazione solo su un cromosoma, suggerendo che questi elementi ripetuti sono esistiti all'interno delle regioni pericentromeriche prima della radiazione degli ominoidi e le scimmie del vecchio mondo, 30-35mya e hanno subito estese amplificazioni dopo la divergenza (Eichler et al., '99a)

Cinque geni conosciuti in diverse locazioni genomiche presentano strutture con CAGGG. Questo gruppo comprende la cassetta di 26.5 kb CTR-CDM dalla regione Xq28, due porzioni differenti del locus NF1 in 17q11.2 (segmenti di 10 e 1 kb), un segmento di 16 kb di otto esoni KIAA0187 da 10q11.2, un segmento di 9 kb comprendenti gli esoni dei geni per la regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline da 14q32.3 e i primi sei esoni e introni di un gene per la proteina chinase CHK2 sul cromosoma 22. In aggiunta, un cDNA non caratterizzato in 21q11 e' fiancheggiato all'estremita' 3' da ripetizioni CAGGG (Eichler et al., '99a).

Sono state analizzate in dettaglio alcune regioni pericentromeriche come 16p11 e 2p11, in particolare le 160kb di transizione tra la regione alfoide e non alfoide su 16p11. Analisi di sequenza e citogenetiche rivelano che la porzione non alfoide e' composta da segmenti duplicati e trasposti 10mya da Xq28 e 4q24, i quali a loro volta duplicati si sono distribuiti ad altre regioni pericentromeriche circa 6mya in 16p11, 22q11, 2p11 e 10p11. Questi grossi blocchi di paralogia, piu' di 62kb, presentano omologia del 97%, le inserzioni sono avvenute in regioni ricche in G e C. Altre analisi provano altri movimenti su regioni pericentromeriche quali 10q11, 14p11 e Yq11. Analisi comparative con FISH confermano che la duplicazione e trasposizione dei blocchi di paralogia siano avvenute dopo la divergenza tra uomo e orango ma prima della divergenza dello scimpanze' e gorilla. E' interessante notare come la regione alfoide non subisce lo stesso livello di riarrangiamenti, come se le sequenze alfoidi costituissero una barriera ai meccanismi di diffusione delle regioni pericentriche. L'ulteriore caratterizzazione del blocco alfoide in vicinanza dei loci paraloghi, circa 92kb di monomeri, non ha individuato nessun tipo di HOR, i singoli monomeri non presentano omologia con la sequenza consensus della soprafamiglia 1 a cui appartiene il cromosoma 16, ma presentano similarita' con i monomeri della soprafamiglia 4. Non sono state individuate CENP-B box per il legame alla proteina CENP-B, ma sono stati individuati siti di legame alla pJ α . Analisi comparative di FISH trovano che questo quadro strutturale del blocco alfoide sul cromosoma 16 e' comune a tutti i primati analizzati e si puo' ipotizzare che queste 92kb sono una struttura antica esistente in questa locazione cromosomica negli ultimi 20 milioni di anni (Horvath et al., '00a).

In un'altra strategia di indagine delle regioni pericentromeriche, la sequenza di un BAC pericentromerico di 2p11, e' stata utilizzata come punto di partenza per disegnare 24 coppie di primer utilizzate in PCR su un pannello di ibridi

monocromosomico e i prodotti delle PCR sono stati sequenziati come catalogo di STS per ciascun duplicone su ciascun cromosoma. Usando i prodotti di PCR come sonde in esperimenti di ibridazione, sono stati isolati 702 cloni BAC e 107 di questi sono stati sequenziati; di questi, 65 sono stati assegnati ad almeno 9 regioni cromosomiche pericentromeriche: 1q12, 2p11, 9p11/q12, 10p11, 14q11, 15q11, 16p11, 17p11 e 22q11.

Queste analisi confermano i dati che larghe porzioni di regioni pericentromeriche non consistono di sequenze a singola copia, ma sono un mosaico di differenti segmenti genomici propensi alla duplicazione (Horvath et al., '00b).

Analogamente a quanto già conosciuto per altre regioni centromeriche, anche il centromero e le regioni pericentromeriche del cromosoma 10, si presentano particolarmente complesse. Jackson et al. hanno presentato la migliore mappa fisica fino adesso disponibile per un centromero umano (Eichler, '99b). Jackson et al. (1996) presentano una mappa prima nel suo genere, perché lega fisicamente i geni della regione pericentromerica del cromosoma 10 con il centromero utilizzando una mappa ottenuta per PFGE e legandola ai due contig di YAC di circa 2.5 Mb ciascuno, i quali mappano uno nella regione 10p11 e l'altro in 10q11. Questa regione di circa 9.2Mb rappresenta il 6.5-7% del DNA totale del cromosoma 10 e include alcuni marker associati al centromero come (da pter a qter) D10S141A e i geni zinc finger duplicati ZNF11A, ZNF33A e ZNF37A, che mappano in 10p11; e ZNF11B, ZNF33B, ZNF37B e D10S141B che mappano in 10q11. Sul braccio corto del cromosoma, ZNF11A e ZNF37A sono gli unici geni trascritti conosciuti e mappano a 350 kb dal satellite 3 della regione centromerica. Sul braccio lungo, più geni come il proto-oncogene RET, varie isole CpG, ZNF33B a 200KB dal satellite 3 10q e altri geni associati ai marker cromosomici, indicano che questa zona è trascrizionalmente attiva, ponendo il limite tra l'eterocromatina centromerica e l'eucromatina tra la zona dei satelliti centromerici e i geni ZNF. La regione dove mappano i geni ZNF ha subito dei rimaneggiamenti nel corso dell'evoluzione. I risultati di FISH indicano che le sequenze D10S141 e i geni ZNF sono presenti su ambedue i lati del centromero filogeneticamente definito X (HSA 10) da prima della divergenza degli oranghi dalle grandi scimmie 13-18mya e ha confermato l'inversione pericentrica coinvolta nella formazione delle duplicazioni fiancheggianti il centromero.

Esistono altre evidenze che duplicazioni e inversioni avvengano frequentemente nelle regioni pericentromeriche dei primati, perciò è possibile che inversioni all'interno o vicino all'eterocromatina centromerica avvengano ad alta frequenza, e potrebbero distruggere potenzialmente sequenze contenenti geni, ma la ricombinazione al centromero è ridotta e ciò renderebbe neutre queste inversioni.

1.10 STUDI EVOLUTIVI E CLASSIFICAZIONE DEI PRIMATI

Lo studio dell'evoluzione nei primati si avvale di elementi forniti da vari campi di indagine. La biologia evolutiva, infatti, attinge informazioni da discipline tradizionali, quali l'anatomia comparata, l'antropologia, la paleontologia e l'etologia, a cui, negli ultimi decenni, si sono aggiunte la biologia molecolare e la citogenetica, grazie alle recenti conquiste tecniche e metodologiche.

I dati molecolari hanno potuto contribuire alla comprensione dei rapporti filogenetici tra primati grazie all'applicazione di tecniche altamente risolutive quali la mappatura genica, l'ibridazione del DNA, l'analisi del DNA mitocondriale, le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche. Le analisi citogenetiche, d'altro canto, assumono particolare rilievo per la posizione intermedia che il cariotipo detiene tra fenotipo e genotipo.

I cromosomi, in qualità di vettori dell'informazione genetica, passano intatti attraverso le generazioni e risultano conservativi all'interno di una specie. Inoltre le mutazioni cromosomiche raramente restano fissate nel cariotipo. Pertanto l'omologia cromosomica tra specie diverse può rappresentare un carattere ancestrale conservato indipendentemente da linee evolutive distinte o, alternativamente, può costituire una situazione derivata, la cui condivisione testimonia un percorso evolutivo comune.

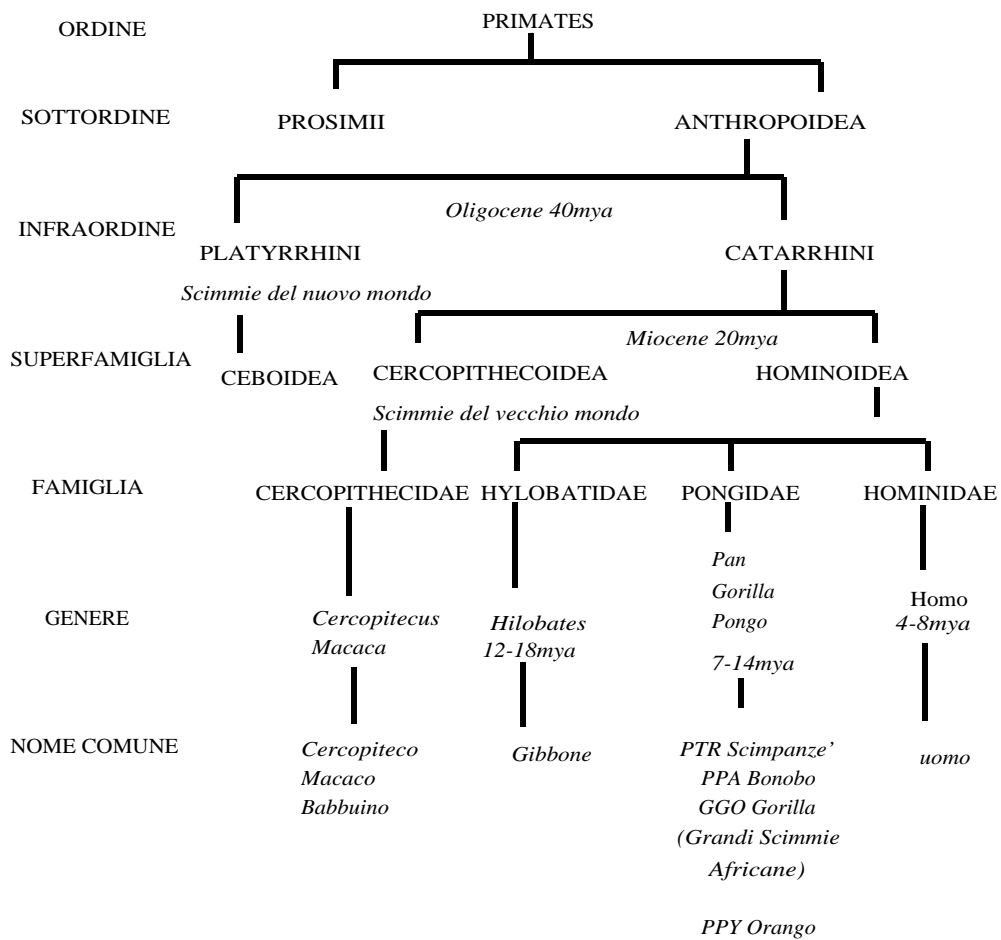
L'analisi comparativa del cariotipo, dunque, ha contribuito significativamente alla conoscenza delle relazioni evolutive tra le specie, ma anche alla comprensione dei meccanismi e dei processi evolutivi, aiutando a chiarire il ruolo dei riarrangiamenti cromosomici nella speciazione.

Sulla base degli elementi forniti da questi vari tipi di studi, i primati attualmente viventi sono stati classificati così come risulta dall'albero filogenetico mostrato in FIG.1.7 (Anapol e Fleagle, '88).

Il sottordine delle Anthropoidea, che comprende le forme più simili all'uomo, viene suddiviso nei due gruppi di primati meglio conosciuti, quello delle catarrine (scimmie del vecchio mondo) e quello delle plattirine (scimmie del Nuovo Mondo), separatisi nell'Oligocene (circa 35 mya).

Alle catarrine appartengono l'uomo e le scimmie antropomorfe (soprafamiglia delle Hominoidea), separatisi nel primo Miocene (20-24 mya) dall'altra soprafamiglia, quella delle Cercopithecoidea (scimmie del Vecchio Mondo). Nell'ambito degli Hominoidea la divergenza tra i vari generi è così datata: Hylobates, 12-18 mya; Pongo, 10-14 mya; Gorilla, 7-10 mya.; infine Pan e Homo, 4-8 mya (Koop et al., '86).

FIG.1.7 ALBERO FILOGENETICO



2 SCOPO DELLA RICERCA

I cromosomi di uomo, scimpanze' e gorilla presentano una notevole similarita' e sintenia; sono necessari relativamente pochi riarrangiamenti cromosomici per spiegarne le differenze, le quali sono soprattutto inversioni para- e pericentriche e variazioni nell'eterocromatina costitutiva (Yunis e Prakash, '82; O'Brien et al., '93). Questo è stato confermato dagli studi di ibridazione *in situ* con painting libraries cromosoma specifiche (Jauch et al., '92).

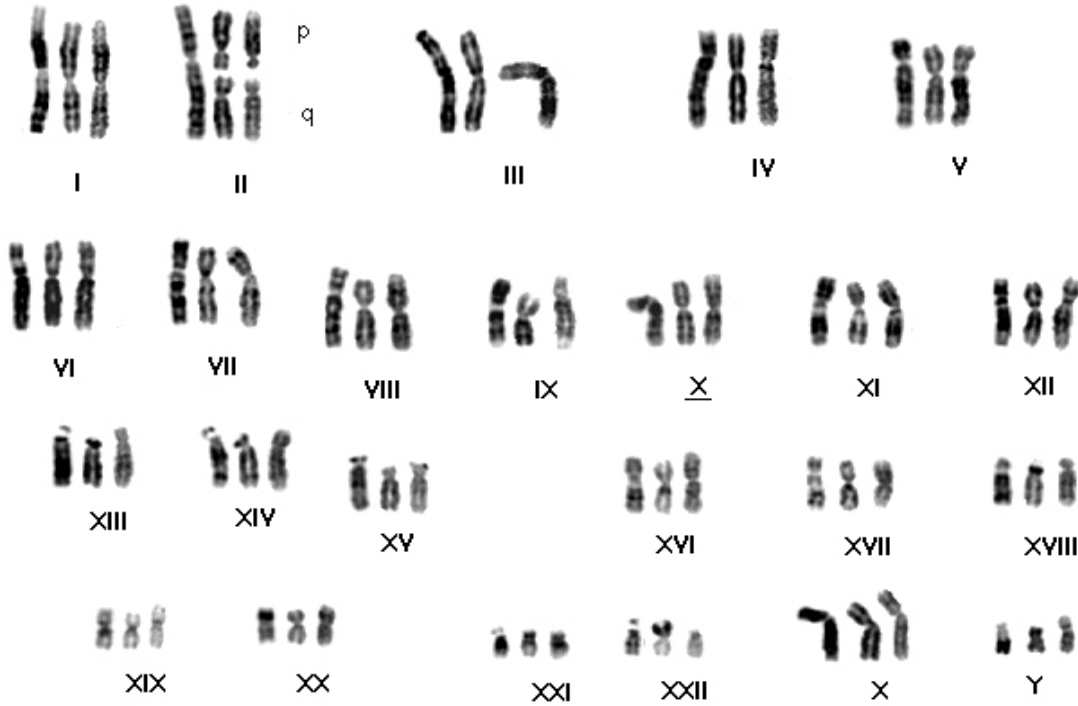


FIG.2.1 CARIOTIPO COMPARARATIVO DI HSA, PTR E GGO

Uno dei riarrangiamenti piu' studiati che differenziano l'uomo dalle grandi scimmie, e' la fusione telomerica di due cromosomi acrocentrici ancestrali presenti nelle grandi scimmie, (il 12 ed il 13 di scimpanze'; l'11 e il 12 di gorilla e orango, I1p e I1q nella numerazione filogenetica) che nell'uomo fusi insieme corrispondono al cromosoma 2. Il centromero funzionale di questo cromosoma deriva dal I1p mentre risulta inattivo il centromero I1q (Ijdo et al., '91).

HSA		PTR		GGO	
1	I	1	I	1	I
2	II	12,13	IIp,IIq	12,11	IIp,IIq
3	III	2	III	2	III
4	IV	3	IV	3	IV
5	V	4	V	4	V
6	VI	5	VI	5	VI
7	VII	6	VII	6	VII
8	VIII	7	VIII	7	VIII
9	IX	11	IX	13	IX
10	X	8	X	8	X
11	XI	9	XI	9	XI
12	XII	10	XII	10	XII
13	XIII	14	XIII	14	XIII
14	XIV	15	XIV	18	XIV
15	XV	16	XV	15	XV
16	XVI	18	XVI	17	XVI
17	XVII	19	XVII	19	XVII
18	XVIII	17	XVIII	16	XVIII
19	XIX	20	XIX	20	XIX
20	XX	21	XX	21	XX
21	XXI	22	XXI	22	XXI
22	XXII	23	XXII	23	XXII
X	X	X	X	X	X
Y	Y	Y	Y	Y	Y

TAB.2.1 NOMENCLATURA FILOGENETICA DI HSA, PTR E GGO

L'analisi delle sequenze ortologhe di DNA non ripetuto mostra un'omologia fino al 98% tra l'uomo e le scimmie antropomorfe; tuttavia l'analisi di sequenza degli pseudogeni e l'analisi della struttura delle proteine dimostra che l'uomo e lo scimpanzé sono più strettamente correlati tra loro. Queste due specie si sarebbero separate da un antenato comune da 3 a 10 mya (Koop et al., '86).

A differenza dell'elevata omologia esistente tra le regioni eucromatiche, sottoposte a stretta pressione selettiva, nell'uomo e nelle scimmie antropomorfe il DNA alfoide sembra subire un'evoluzione più rapida (Archidiacono et al., '95). Il DNA alfoide umano, di scimpanze' e gorilla presenta un'omologia sufficiente da crossibridare sia in Southern che in FISH (Warburton et al., '96). Baldini e collaboratori (1993), analizzarono una library plasmidica del cromosoma 21 in esperimenti di PCR. La sequenza della CENP-B box fu utilizzata come primer in associazione con un altro primer vettore specifico individuando un clone alfoide, p α H21. In esperimenti di FISH a bassa stringenza, con la sonda p α H21, si ottiene un segnale di ibridazione non solo in tutte le regioni centromeriche umane, di scimpanze', gorilla e orango, ma la sonda identifica anche sequenze non centromeriche in 2q21 e 9q13, dove presumibilmente sono presenti i residui di alfoidi ancestrali.

Le analisi di sequenze degli alfoidi di scimpanze' a tutt'oggi riportate in letteratura mostrano che sono correlate le une alle altre piu' di quanto non lo siano le sequenze alfoidi umane tra loro. Questo potrebbe suggerire che l'evoluzione del DNA alfoidi proceda a diversa velocita' nell'uomo e nelle grandi scimmie e non possa essere valido l'utilizzo di un orologio molecolare costante (Warburton et al., '96; Laursen et al., '92). Non e' chiaro tuttavia se il DNA di scimpanze' sia sottoposto a un maggior numero cross-over ineguali che determinano una maggiore omogenizzazione o se avvengano piu' mutazioni nell'uomo o se tutto questo rifletta una reale situazione e non sia il frutto di osservazioni ancora parziali (Warburton et al., '96).

Nel tentativo di indagare sulle relazioni evolutive tra le regioni centromeriche dei cromosomi delle grandi scimmie, Archidiacono e al. (1995), hanno effettuato la mappa comparativa di 27 sequenze alfoidi umane crossibridandole su PTR, PPA e GGO con i seguenti risultati:

- la maggioranza delle sonde non riconosce i corrispondenti cromosomi omologhi, solo la sonda specifica per il cromosoma X lo riconosce in tutte e tre le specie,
- ciascuna SF esibisce una distinta e peculiare storia evolutiva,
- la maggior parte dei membri della SF2 riconosce un singolo cromosoma,
- i cromosomi di PPA: I, IIp, IIq, IV, V, VI e XVII non presentano segnali di crossibridazione.

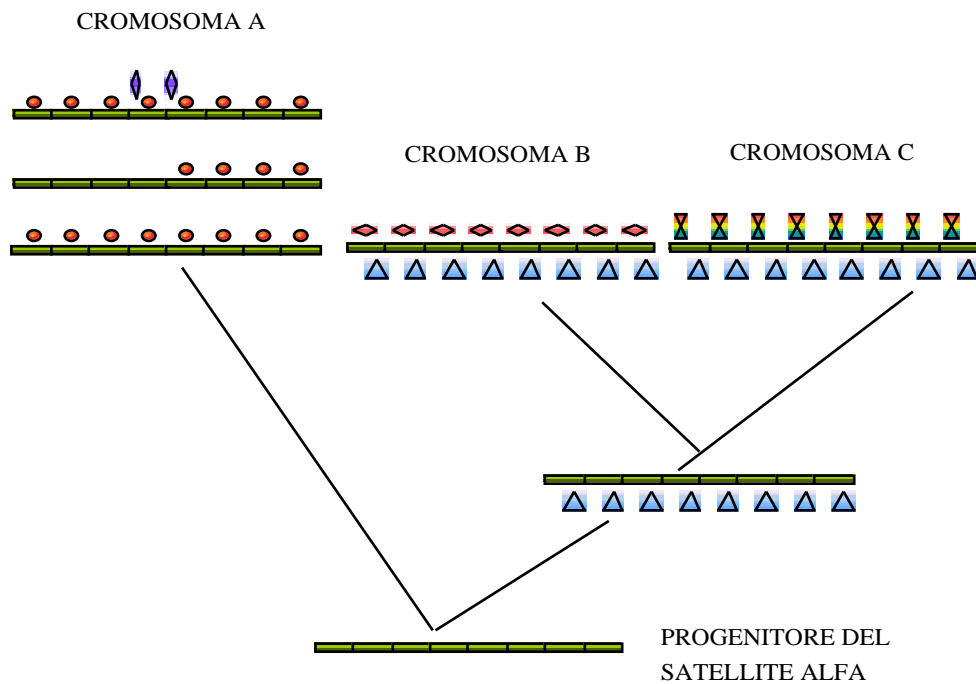
Il clonaggio e il sequenziamento di alcuni satelliti alfoidi delle grandi scimmie fanno supporre una storia evolutiva comune partendo da un monomero progenitore della SF3 disperso e fissato sui cromosomi 1, 11, 17 e X prima dello split uomo-scimpanze'-gorilla. (Haaf e Willard, '98). Su questo subsets cromosomico (SF3), ma in generale anche per altre SF, non solo i monomeri ma anche l'ordine stesso e' conservato, e questo farebbe ipotizzare l'esistenza di un multimeri comune da cui sarebbe derivato ciascun subset (Willard e Ward, '87).

L'organizzazione della sequenza a piu' alto ordine del subset alfoide sul cromosoma X e' stata conservata tra queste specie strettamente correlate e si parla di evoluzione ortologa grazie alla quale la similarita' tra unita' di ripetizione sui cromosomi omologhi corrispondenti di specie diverse e' piu' alta della similarita' presente tra unita' di ripetizione dei cromosomi della stessa specie. Una simile relazione non e' stata trovata per le altre SF che hanno subito evoluzione non ortologa; i subsets alfoidi delle SFI e II, infatti, trovati nelle grandi scimmie e uomo, non sono generalmente localizzati sui loro corrispondenti cromosomi omologhi.

Le sequenze di DNA ripetuto subiscono evoluzione concertata, o non ortologa, e "risultano piu' simili tra loro i membri di una famiglia di DNA all'interno di una specie (geni paraloghi) che gli stessi membri corrispondenti in specie diverse (geni ortologhi); questo tipo di evoluzione avviene a diversi livelli determinando un alto grado di omogeneita' specie-specifica e/o cromosoma-specifica tra unita' di ripetizione. Questi processi possono essere spiegati attraverso processi dinamici di cicli ripetuti di cross-over ineguale che risulta nella generazione, nella duplicazione e diffusione di nuove varianti e nella successiva omogenizzazione di unita' ripetute di famiglie di DNA nei genomi e nelle popolazioni all'interno di una specie" (Strachan e Ried, '99).

L'evoluzione concertata del DNA alfoide sembra avvenire su più livelli: tra specie e tra cromosomi non omologhi. L'evoluzione concertata tra specie, dimostrata tra uomo, scimpanze' e gorilla, è dovuta alla fissazione delle unità di ripetizione separatamente in ciascuna specie, e l'evoluzione concertata tra cromosomi non omologhi fissa diversi monomeri alfoidi e dà origine a subsets cromosoma-specifici all'interno di una specie.

FIG.2.2 FORMAZIONE DI SUBSET CROMOSOMA SPECIFICI



Indipendenti processi evolutivi di omogenizzazione e fissazione delle variazioni di sequenza all'interno di un dominio alfoide nella popolazione determinano la formazione di subset alfoidi cromosoma specifici.

Gli scambi intercromosomici tra omologhi determinano specificità cromosomica e gli scambi intercromosomici tra non omologhi risultano nell'emergenza di nuove subfamiglie cromosomiche dentro una specie e nell'evoluzione non ortologa tra specie (Warburton e Willard, '96). Come conseguenza, i monomeri di un tipico HOR divergono nella sequenza primaria e l'omologia tra essi non è alta più di quanto non lo sia con monomeri di cromosomi diversi o perfino con diversi genomi di primati (Willard e Ward, '87b).

Le differenze nel numero delle unità di ripetizione fra diversi aplotipi del cromosoma 17 nell'uomo, dimostrano l'evoluzione concertata avvenuta nei singoli cromosomi dovuta ad un più alto grado di scambi intracromosomici che tra interomologhi; se fosse vero il contrario (più alto grado di scambi tra interomologhi) ogni variante su un cromosoma si diffonderebbe agli altri omologhi nella popolazione, come infatti è osservato per i cromosomi acrocentrici negli umani (Warburton e Willard, '95).

Una possibile spiegazione per l'emergenza di differenti subfamiglie su cromosomi omologhi in specie differenti potrebbe essere uno scambio di subsets alfoidi tra

cromosomi non omologhi in un ancestore comune, con successiva fissazione differenziale tra specie: e' possibile individuare i monomeri W1-W5 e D1-D2 comuni nei gorilla, orango, scimpanze' e uomo, J1-J2 sono presenti in gorilla, scimpanze' e uomo (Alexandrov et al., '93).

Un ulteriore motivo d'interesse nello studio dell'organizzazione delle sequenze alfoidi nelle scimmie antropomorfe deriva dalla possibilita' di analizzare quale tipo di rapporti intercorre tra esse e le regioni pericentromeriche, dotate anch'esse di una notevole plasticita' (Jackson et al., '99; Guy et al., '00; Eichler et al., '99a). Un esempio e' dato dalle 11 sequenze correlate al gene NF1, di cui 7 presenti nelle regioni pericentromeriche di cromosomi contenenti sequenze alfoidi satelliti appartenenti alla SF2 (Regnier et al., '97), queste sequenze correlate a NF1 sono pseudogeni non processati del gene e contengono numerose mutazioni. In esperimenti di FISH, utilizzando il cDNA di NF1 come sonda, si individuano vari segnali d'ibridazione sui cromosomi: 15q11, 14q11, 2q21, 22q11, 12q12, 21q11, 1p32, 18p/q11 e 20p/q11. Tranne che per il cromosoma 12, tutti gli altri appartengono alla soprafamiglia 2. Questi dati suggeriscono un coinvolgimento delle sequenze alfoidi nel direzionare gli scambi tra le varie regioni pericentromeriche (Regnier et al., '97).

Queste sequenze correlate a NF1 sono pseudogeni non processati del gene e vengono definite "dupliconi". Con questo termine si intendono delle duplicazioni nel genoma (5-100kb) che si presentano come ripetizioni a basso numero di copie presenti in copie multiple, i segmenti paraloghi hanno un alto grado di similarita' di sequenza (93%-98%) ed e' possibile individuare alcuni di essi nelle varie specie di primati (Eichler, '98). Nel nostro laboratorio e' stato utilizzato il cDNA di NF1 come sonda, in esperimenti di FISH, sia su metafasi umane e di scimmie antropomorfe per individuare se esistono e dove mappano gli pseudogeni di NF1.

NF1						
HSA		XIV	XV	XVII	XXII	Yqter
PTR	IIp	XIV	XV	XVII		
GGO		XIV	XV	XVII		
PPY				XVII		

TAB.2.2 NF1

Il cDNA di NF1 riconosce oltre al gene espresso altre sequenze localizzate sui cromosomi omologhi nelle tre specie (Spalluto osservazione personale).

Dai dati di Archidiacono et al. (1995), risultava che i cromosomi di PTR e GGO accesi non erano riconosciuti dalle stesse sonde alfoidi umane. Per verificare se i cromosomi accesi da NF1 nelle grandi scimmie contenessero sequenze alfoidi omologhe e quindi supporre che il movimento di NF1 fosse in qualche modo correlato con la presenza di queste sequenze alfoidi omologhe, sarebbe stato necessario individuare direttamente il tipo di sequenze alfoidi presente sui cromosomi di PTR e GGO. In questo modo, sarebbe stato possibile mettere in relazione tra loro i cromosomi sulla base dell'omologia esistente a livello delle regioni alfoidi. Successivamente si sarebbe verificato se i cromosomi già accomunati da sequenze alfoidi correlate tra loro all'interno di ogni specie fossero anche riconosciuti dal cDNA di NF1.

Questo tipo di indagine ha richiesto il clonaggio di sequenze alfoidi di PTR e GGO rappresentative di tutti i cromosomi per individuare un'eventuale organizzazione in soprafamiglie, per evidenziare la storia evolutiva di questo tipo di sequenze nei primati e per individuare un'eventuale correlazione tra esse e la distribuzione degli pseudogeni del gene NF-1 nelle varie specie.

3 STRATEGIE

Abbiamo utilizzato strategie differenti per clonare le nostre sequenze di DNA alfoide.

Al fine di clonare sequenze alfoidi della specie di scimpanzé comune (PTR), sono state usate quattro diverse strategie producendo circa un migliaio di differenti cloni sia in GGO che in PTR. La validità delle strategie via PCR è stata verificata utilizzando gli stessi primers in esperimenti di PRINS. È stato così possibile evidenziare il segnale sui centromeri di tutti i cromosomi indicando che la strategia adottata permette potenzialmente di clonare cloni alfoidi provenienti da tutti i cromosomi

Per confermare la loro natura alfoide inoltre i cloni sono stati utilizzati in esperimenti di Southern blottando il DNA dei cloni su filtro e ibridando con la sonda p82H (Alexandre et al., '87), tutti hanno dato forti segnali di ibridazione.

A differenza di altre sonde alfoidi cromosoma-specifici, la sonda p82H usata in esperimenti di ibridazione radioattiva per definire la natura alfoide dei nostri cloni alfoidi di primati è un inserto plasmidico di 2.4kb contenente 14 monomeri con la caratteristica di ibridare estesamente in normali condizioni di ibridazione con tutte le sequenze alfoidi.

I monomeri della sonda p82H confrontati con la consensus dei monomeri alfoidi del cromosoma 17 di (Waye e Willard, '86) presentano una divergenza che va dal 8 al 26%.

3.1 STRATEGIE PER IL PTR

3.1.1 STRATEGIA 1

Il DNA genomico totale di PTR e' stato amplificando utilizzando i primers α -27 e α -30 derivanti dalla regione piu' conservata della sequenza consensus alfoide umana (Dunham et al., 1992). Il prodotto di amplificazione, fatto correre su gel di agarosio 1% e' una ladder multipla di 171bp. Le bande eluite dal gel sono state clonate.

Nel tentativo di clonare nuove sonde alfoidi, rappresentative di specifici cromosomi, si è pensato di ricorrere ad una strategia diversa utilizzando degli ibridi cellulari hamster-scimpanze' recentemente caratterizzati nel nostro laboratorio (Archidiacono et al., 1994). Il principio generale di questa seconda strategia di clonaggio e' quello di amplificare, mediante PCR, il DNA contenuto negli ibridi cellulari hamster-scimpanze sfruttando ancora la coppia di primers α -27 e α -30. Dal momento che il genoma dell'hamster non possiede sequenze alfoidi, i due primers riconosceranno le sequenze omologhe contenute nei cromosomi di PTR e permetteranno la sintesi di frammenti di varia lunghezza di DNA α -satellite.

I cloni ottenuti usando questa strategia di clonaggio, sono stati analizzati con i metodi di estrazione rapida di DNA plasmidico e, soprattutto, con il sistema della PCR Sp6/T7 eseguito su un certo numero di pool.

I pool risultati positivi, cioe' quelli che avevano prodotto una banda netta di amplificazione, sono stati analizzati singolarmente. La reazione di amplificazione Sp6/T7 è stata quindi ripetuta sulle colonie singole. Questo sistema di screening, per quanto piuttosto laborioso da realizzare, offre due vantaggi:

- 1) permette di analizzare un elevato numero di colonie con poche reazioni di amplificazione,
- 2) permette la successiva utilizzazione dell'amplificato dei cloni risultati positivi in esperimenti di FISH, per confermare o smentire la natura alfoide degli inserti presenti in tali cloni.

L'uso di questa strategia di clonaggio ha permesso l'isolamento della maggior parte dei cloni alfoidi di PTR ora disponibili nel nostro laboratorio.

Al fine di isolare nuove sequenze di DNA α -satellite, rappresentative di cromosomi non ancora caratterizzati, si e' pensato di ricorrere ad una variante di questa strategia. La reazione di amplificazione di alcuni ibridi e' stata ripetuta usando l'enzima Pwo Polimerasi e la coppia di primers α -27 e α -30, abbassando la temperatura di annealing fino a 55-50°C.

Lo scopo e' quello di permettere ai primers di legarsi anche a sequenze non perfettamente omologhe; infatti, se l'ibrido contiene sequenze alfoidi di PTR aventi un certo grado di divergenza rispetto alla consensus umana, i primers α -27 e α -30 difficilmente riusciranno a riconoscerle e a legarle ad elevate temperature. Tuttavia, abbassando la temperatura di annealing, si aumenta la probabilità di avere prodotti di amplificazione meno specifici.

Anche in questo caso i prodotti della reazione di PCR sono stati purificati e usati per la reazione di ligasi.

Un'aliquota della ligasi e' stata usata per trasformare cellule competenti. Le colonie sono state analizzate mediante cicli di amplificazione Sp6/T7; infine i cloni risultati positivi sono stati testati con esperimenti di FISH.

3.1.2 STRATEGIA 2

Nel tentativo di ottenere cloni alfoidi caratteristici per la maggior parte dei cromosomi, abbiamo utilizzato altre strategie per individuare le condizioni ottimali che ci permettessero di evitare troppi cloni ridondanti.

Per realizzare questo sono state approntate strategie gia' utilizzate in letteratura per il clonaggio di sonde alfoidi umane.

Il DNA genomico di PTR è stato digerito con vari enzimi di restrizione (Hind III, Eco RI, Bam HI, Xba I, Pst I) trasferito su filtro e ibridato in condizioni di bassa stringenza utilizzando come sonda un pool di prodotti di amplificazione marcati, per "random priming" con $^{32}\alpha\text{P-dATP}$. Questi prodotti sono stati ottenuti da una reazione di PCR (Polimerase Chain Reaction) eseguita sul genoma totale di scimpanze', in presenza della coppia di primers $\alpha\text{-27}$ e $\alpha\text{-30}$. Tra le bande ottenute da quest'ibridazione, e' stata scelta quella piu' intensa, (1880bp), ottenuta dal DNA digerito con l'enzima Hind III. La banda e' stata eluita e successivamente clonata.

Sono stati ottenuti numerosi cloni i quali sono stati analizzati con i metodi di estrazione rapida di DNA plasmidico, verificando la presenza di un inserto di dimensioni corrispondenti all'atteso.

I cloni risultati positivi a questo primo screening sono stati utilizzati in esperimenti di FISH su metafasi di PTR. Questo metodo consente, in un unico esperimento, sia di verificare l'effettiva natura alfoide delle sequenze clonate, sia di individuarne il pattern di ibridazione.

3.1.3 STRATEGIA 3

I cromosomi meno rappresentati nel pannello di tutte le sonde alfoidi di PTR, clonate nel nostro laboratorio, sono il V, il XII, il XV, il XVI e l'Y.

Dopo essere riusciti a clonare l'alfafoide αIB1D , ottenuto per strategia 1, specifico del cromosoma V di PTR, si e' pensato di usarlo per identificare eventuali sequenze centromeriche correlate, appartenenti ad altri cromosomi di cui non erano ancora disponibili sequenze alfoidi. Si sospettava, infatti, che i cromosomi non ancora identificati fino a quel momento avessero regioni centromeriche omologhe tra loro.

In questa terza strategia il DNA genomico totale di PTR e' stato digerito con gli enzimi di restrizione Eco RI e Hind III e ibridato con il DNA del clone alfoide αIB1D , marcato radioattivamente con $^{32}\text{P-dATP}$.

L'ibridazione ha permesso di evidenziare numerose bande; tra quelle piu' intense ne sono state scelte quattro, due per ogni lane, all'altezza di circa 2 kb e 1 kb.

La digestione del DNA genomico di PTR e' stata ripetuta nelle stesse condizioni precedenti, quindi sono state tagliate le bande di DNA all'altezza prescelta. Il DNA e' stato eluito dal gel e clonato.

L'analisi di FISH delle colonie con inserto ci ha condotto all'identificazione di alcune sequenze alfoidi gia' clonate in precedenza nel nostro laboratorio poiche' ibridavano in

FISH sugli stessi cromosomi già riconosciuti dalle sonde alfoidi precedentemente clonate.

In più sono stati identificati nuovi cloni aventi pattern di ibridazione notevolmente aspecifici sia ad alta sia a bassa stringenza.

3.1.4 STRATEGIA 4

Recentemente è stata resa disponibile nel nostro laboratorio la tecnica della microdissezione (Griffin et al., '99 e ref all'interno) che ha permesso il clonaggio di sequenze direttamente ottenute da un solo cromosoma.

La microdissezione è stata utilizzata nel tentativo di clonare sequenze alfoidi specifiche per il cromosoma Y, considerando la alta divergenza delle regioni alfoidi di questo cromosoma rispetto a tutte le altre.

Il prodotto della microdissezione del cromosoma Y è stato amplificato utilizzando come primer i già citati α -27 e α -30 ed il prodotto di PCR così ottenuto è stato clonato.

AIB76	10.03.97 PCR alfa1-alfa2 PTR HY R206-C (JONES: 3f,6f,19,22)
aIB78	
aIB50	
aIB54	
aIB19	
aIB53	
aIBB11	
aIBB3	29.04.97 PCR alfa1-alfa2 PTR HY R93-8 (JONES:13)
aIBB9	
aIBR206	11.04.97 eluito PCR alfa1-alfa2 PTR HY R206-C (JONES: 3f,6f,19,22)
aIBR48	11.04.97 eluito PCR alfa1-alfa2 PTR HY R48-7G (JONES: 4,5,9,14,20)
aIBV1	19.05.97 PCR alfa1-alfa2 PTR HY R48-33B (JONES: 12,14,22)
aIBV2	19.05.97 PCR alfa1-alfa2 PTR HY 91A3X-3CL1D2 (JONES:3)
aIBV3	19.05.97 PCR alfa1-alfa2 PTR HYR511-2B
aIBV4	(JONES:3,6,10,12,14,15,18f,21,22)
aIBV5	19.05.97 PCR alfa1-alfa2 PTR HY R93-8 (JONES:13)
aIBV6	
aIBV7	
aIBV8	
aIBV9	
aIBV10	
a8A	91A3X-3CL1D2, (Hy 3) PCR alfa1-alfa2 Pwo pol 50 C
aIBID	R48-27C (Hy 3, 12, 14f, 22) PCR alfa1-alfa2 Pwo pol 55 C
aIBS1	minilibrary da gel SOUTHERN della banda 2Kb: PTR gen dig. Hind III ibridato con prodotto di PCR alfa1-alfa2 PTR gen.
aIBS2	
aIBS3	
aIBS4	
aIB1S6	
aIBS9	
aL23	minilibrary da gel SOUTHERN R48-27C (Hy 3, 12, 14f, 22) ibridato con clone ptralfaIB1D.
aL28	
aY	microdissezione cromosoma Y

TAB.3.1 ORIGINE SONDE ALFOIDI DI PTR

3.2 STRATEGIE PER IL GGO

Le **strategie adottate per il gorilla** sono state meno laboriose in quanto il clonaggio dei prodotti di PCR con α -27 e α -30 su DNA genomico derivante da fibroblasti di gorilla maschio GGO5 e dall'ibrido GGO2 e GGO6 gorilla-hamster contenente il cromosoma 17 e altri frammenti cromosomici ha dato quasi subito una serie di cloni che ibridano sulla maggior parte dei cromosomi, anche se solo alcuni sono cromosoma specifici.

Per affinare questa strategia, e' proceduto come da strategia 1 utilizzata per il PTR utilizzando la Pwo polimerase, piu' stabile rispetto a una normale Taq polimerase, per ottenere prodotti blunt end, e particolare attenzione e' data alla temperatura di annealing, e ai tempi sia di annealing sia di estension (come da protocollo della Pwo, vedi materiali e metodi) al fine di avere un prodotto di amplificazione in PCR con frammenti piu' lunghi e ottenere cloni contenenti piu' di un monomero alfoide, utili perche' piu' rappresentativi del multimeri da cui provengono.

Le diverse bande della ladder del prodotto di amplificazione, corso su gel di agarosio, sono state eluite e poi clonate indipendentemente.

GGOalfa1	PCR alfa1-alfa2 GGO 5 genomico totale
GGOalfa2	
GGOalfa3	
GGOalfa4	
GGOalfa5	
GGOalfa6	
GGOalfa7	
GGOalfa11	
GGOalfa14	
GGOalfa15	
GGOalfa16	
1GGO IB2 a2	PCR alfa1-alfa2 ibrido GGO 2
1GGO IB2 a6	
1GGO IB2 a8	
1GGO IB2 a15	
1GGO IB2 a19	
2GGO IB2 a38	
2GGO IB2 a46	
2GGO IB2 a53	
3GGO IB2 a70	
1GGO IB6 a42	PCR alfa1-alfa2 ibrido GGO 6
1GGO IB6 a44	
1GGO IB6 a48	
1GGO IB6 a60	
2GGO IB6 a62	
2GGO IB6 a65	
2GGO IB6 a72	
4GGOIB6 a108	

TAB.3.2 ORIGINE SONDE ALFOIDI DI GGO

4 RISULTATI

Con queste diverse strategie di clonaggio, partendo da circa un migliaio di cloni, e' stato possibile isolare 37 cloni alfoidi di scimpanze' e 27 cloni alfoidi di gorilla e caratterizzarli a livello di sequenza, a livello molecolare in esperimenti di southern, e citologicamente tramite ibridazione *in situ*.

4.1 GORILLA

4.1.1 FISH

4.1.1.1 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI GGO SU METAFASI DI GGO

Sono stati individuati 27 cloni alfoidi di GGO dei quali 9 sono cromosoma specifici, mentre il resto dei cloni riconoscono da 2 fino a 15 cromosomi.

Riassumendo in una tabella tutti i risultati di FISH utilizzando come sonda i cloni alfoidi di GGO su metafasi di GGO, sia a bassa che ad alta stringenza, si e' cercato di raggruppare tra loro tutti i cloni che ibridano preferenzialmente gli stessi cromosomi e definire dei gruppi cromosomici. Alcuni dei cloni alfoidi di GGO possono essere suddivisi in due tipi chiaramente ben distinti sulla base dei risultati di FISH ad alta stringenza:

- il primo tipo di sonde ibrida sui cromosomi IIp, IIq, V, IX, XIII, XIV, XV, XVII, XVIII, XXI, XXII e X definendo il gruppo GGO A,
- il secondo tipo ibrida i cromosomi I, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XVI, XVII, XIX, XX, XXII e X definendo il gruppo GGO B,
- i cromosomi V, XVII, XIX e X, risultano in comune tra il gruppo GGO A e GGO B (**TAB.4.1 GRUPPI GGO**).

Allo scopo di verificare se l'organizzazione dei blocchi alfoidi nel gorilla e' strutturata come nell'uomo, sono state allestite ibridazioni *in situ* a bassa stringenza, per individuare i cromosomi contenenti blocchi alfoidi che presentano omologia con i diversi cloni e quindi individuare un'organizzazione in soprafamiglie.

I risultati ottenuti possono essere cosi' riassunti:

- a) 2 sonde cromosoma specifiche sia ad alta stringenza che a bassa riconoscono solo lo stesso cromosoma: IB2 α 38 (VI), α 6 (X),
- b) 7 sonde cromosoma specifiche ad alta stringenza che a bassa riconoscono da 4 a 16 coppie di cromosomi,
- c) 17 sonde che ad alta e a bassa stringenza riconoscono piu' coppie di cromosomi. Due sonde di questo gruppo a bassa stringenza accendono tutti i cromosomi (IB2 α 15, α 2),
- d) una sonda sia ad alta che a bassa stringenza riconosce tutti i cromosomi (IB2 α 2)

TAB.4.2 ALFOIDI GGO SU GGO

L'organizzazione del blocco alfoide sul cromosoma V e' stata analizzata piu' in dettaglio per comprendere meglio la sua organizzazione. Per questo scopo e' stata effettuata una coibridazione utilizzando le sonde GGO α 1 e GGO α 16 specifiche ad alta stringenza per il cromosoma V. L'analisi dei risultati di ibridazione in interfase ha evidenziato due distinti segnali (**FIG.4.1 COIBRIDAZIONE**).

4.1.1.2 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI GGO SU METAFASI DI PTR

Le sonde alfoidi di GGO ibridate a bassa stringenza su metafasi di PTR si dividono in 3 tipi:

- a) un primo tipo ibrida su tutti i cromosomi (8 sonde),
- b) il secondo tipo, 11 sonde, ibrida solo sui cromosomi I, IIp, IIq, V, VI, IX, X, XI, XVII e XIX, definendo cosi' il gruppo PTR C,
- c) il terzo tipo, 7 sonde, individua sia alcuni cromosomi del gruppo C che i restanti cromosomi (non-C),
- d) un'unica sonda IB6a72 e' specifica per la coppia XIX (**TAB. 4.3 GGO SU PTR**).

4.1.1.3 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI GGO SU METAFASI DI HSA

Dalla tabella dei risultati di ibridazione su uomo con sonde alfoidi di gorilla risulta che:

- a) 7 sonde ibridano solo sui cromosomi della SF2,
- b) un gruppo di 6 sonde ibrida aspecificatamente su tutti i cromosomi,
- c) 3 sonde sono cromosoma specifiche: IB6 α 42 (XVII), a5 (X) e IB α 38 (VI),
- d) 10 sonde ibridano su cromosomi delle diverse SF senza riconoscerli tutti,
- e) un unico clone con divergenza tale da non ibridare sui cromosomi umani e' α 3 (**TAB. 4.4 GGO SU HSA e FIG.4.2 FISH GGO**).

4.1.2 SOUTHERN

In assenza di ibridi monocromosomici i Southern sono stati eseguiti utilizzando DNA genomico totale (cfr strategia).

L'ibridazione delle sonde alfoidi su DNA genomico totale di GGO digerito utilizzando gli enzimi XbaI ed EcoRI mette in evidenza una ladder per tutti i cloni, solamente con HindIII e' stato possibile suddividere le sonde in due gruppi:

- a) nel primo gruppo HindIII evidenzia un accumulo a 5n, dove 5n indica un pentamero del monomero di 171bp,
- b) nel secondo gruppo non e' evidenziato alcun pattern di ibridazione con questo enzima, in quanto HindIII taglia al di fuori delle regioni riconosciute dalla sonda (**TAB.4.5 SOUTHERN E SEQUENZE GGO e FIG.4.3 SOUTHERN GGO**).

4.1.3 SEQUENZE

Alcuni dei cloni caratteristici per i due gruppi cromosomici di GGO sono stati sequenziati, le sequenze analizzate e comparate con i tipi monomerici umani (TAB.4.5).

La maggior parte dei cloni sono dei trimeri i cui monomeri alle estremità sono incompleti comparati con la consensus di Alexandrov e Romanova (Romanova et al. 96), perciò l'analisi comparativa tra le varie sequenze è stata effettuata con i monomeri interni. I vari monomeri tra loro hanno un'omologia che varia dal 67% al 94% con una percentuale media di omologia dell'82%.

Ogni monomero è stato confrontato con la sequenza consensus di Alexandrov, e con le consensus di tipo A e B rappresentative delle sequenze monomeriche che rispettivamente legano la Pj α e la CENP-B box. Questa analisi ha dato le prime indicazioni sui monomeri alfoidi: l'omologia con la consensus di Alexandrov varia dal 77% all'87% e con una media di omologia del 84%; i monomeri simili al tipo monomero A, presentano con la consensus l'83% di omologia, mentre i restanti monomeri simili alla consensus B, presentano con il tipo monomero B l'87% di omologia.

I monomeri sono stati confrontati inoltre con i dodici tipi monomerici delle cinque soprafamiglie umane e per ogni monomero di GGO è stata individuata la consensus con la quale il monomero presenta omologia maggiore. I risultati, riportati in tabella mettono in evidenza che

- un clone alfoide, IB2 α 70, è omologo al tipo monomero J,
- un clone, IB2 α 15, è omologo al tipo monomero W,
- 3 cloni (IB6 α 44, IB6 α 65 e α 15) sono omologhi al tipo monomero D,
- 5 cloni sono omologhi al tipo R (IB6 α 42, α 1, IB2 α 38, IB6 α 72 e α 11),
- 2 sonde, α 7 e IB6 α 108, presentano omologia con monomeri diversi.

4.2 SCIMPANZE'

4.2.1 FISH

4.2.1.1 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI PTR SU METAFASI DI PTR

Per caratterizzare citogeneticamente i cloni alfoidi di scimpanze', sono stati utilizzati come sonde in esperimenti di FISH ad alta stringenza.

Da questa analisi è emerso che 11 cloni sono cromosoma specifici mentre i restanti riconoscono un numero di cromosomi oscillante tra 2 e 24.

Per cercare di individuare operativamente una suddivisione in soprafamiglie dei cloni di DNA alfoidi ottenuti, sulla falsa riga di quello già fatto nell'uomo (Alexandrov et al., 1988; Alexandrov et al., 1989), abbiamo inoltre condotto ibridazioni a bassa stringenza su metafasi di PTR.

Possiamo distinguere le nostre sonde alfoidi in 4 tipi, sulla base delle ibridazioni *in situ* a bassa stringenza:

- a) 8 sonde riconoscono i cromosomi I, I_p, I_q, V, VI, IX, XI, XIV, XVII, X ed Y che operativamente vengono indicati come gruppo PTR E,
- b) 4 sonde riconoscono i cromosomi III, IV, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVIII, XIX, XX, XXI e XXII indicati come gruppo PTR F,
- c) 11 sonde riconoscono i cromosomi appartenenti tanto gruppo PTR E quanto al gruppo PTR F risultando aspecifiche a bassa stringenza,
- d) 4 sonde (PTR α S2, α IB76, α S3 e α S6) riconoscono aspecificatamente tutti i cromosomi sia ad alta che a bassa stringenza,

Il cromosoma XIV risulta essere condiviso dalle sonde che riconoscono entrambi i gruppi (**TAB.4.6 ALFOIDI PTR SU PTR**)

4.2.1.2 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI PTR SU METAFASI DI GGO

I cloni alfoidi di PTR se ibridati su metafasi di GGO a bassa stringenza, permettono di raggruppare i cromosomi in 5 gruppi:

- a) il gruppo GGO H e' costituito dai cromosomi I, III, IV, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XVI, XIX, XX, V, IX, XVII e X,
- b) il gruppo GGO G comprende i cromosomi I_p, I_q, XIII, XIV, XV, XVIII, XXI, XXII, Y, V, IX, XVII e X. I cromosomi, V, IX, XVII e X, sono condivisi da ambedue i gruppi cromosomici in quanto sono riconosciuti da tutte le sonde di PTR,
- c) sonde cromosoma specifiche: 4 sonde (PTR α IB38, α IB50 e α IB19) sono specifiche per il cromosoma XVII, il clone α IB14 specifico per il cromosoma V,
- d) 12 sonde ibridano su tutti i cromosomi,
- e) 5 sonde riconoscono alcuni cromosomi di entrambi i gruppi H e G. Da notare che IB α 69 riconosce tre dei quattro cromosomi condivisi dai due gruppi (XVII, V e X) (**TAB.4.7 PTR SU GGO**)

4.2.1.3 IBRIDAZIONE DI CLONI ALFOIDI DI PTR SU METAFASI DI HSA

Riassumendo i dati di FISH dei cloni alfoidi di PTR su metafasi umane, e' possibile notare come alcune sonde (7) riconoscano cromosomi appartenenti alla SF2. I cromosomi di uomo vengono raggruppati attraverso le sonde alfoidi di PTR in 4 gruppi:

- a) il primo gruppo (7), come gia' detto, riconosce la SF2,
- b) 6 sonde riconoscono cromosomi della SF1,
- c) 14 sonde riconoscono cromosomi delle tre diverse soprafamiglie,
- d) 9 sonde riconoscono aspecificatamente tutti i cromosomi,
- e) l'unica eccezione e' rappresentata dalla sonda IB α 1D che non riconosce alcun cromosoma umano (**TAB.4.8 PTR SU HSA e FIG.4.4 FISH PTR**).

4.2.2 SOUTHERN

Sono stati effettuati esperimenti di Southern utilizzando DNA genomico di PTR digerito con gli enzimi EcoRI, HindIII e XbaI e ibridato con sequenze alfoidi di PTR. Il pattern di ibridazione permette di suddividere le sonde in base al loro pattern di ibridazione:

- a) un gruppo di 12 sonde con accumulo XbaI ad altezze comprese fra 4n e 18n,
- b) 3 sonde identificano una banda predominante a 11n o 12n dopo digestione con HindIII e 10n o 12n sul digesto XbaI,
- c) una sola sonda presenta un accumulo predominante a 5n con EcoRI e 10n con XbaI,
- d) 2 sonde presentano accumuli con tutti e tre gli enzimi ad altezze diverse,
- e) una sonda identifica una banda a 11n del digesto HindIII,
- f) 8 sonde con accumulo EcoRI ad altezze comprese fra 2n e 11n,
- g) 8 sonde, infine, riconoscono un accumulo compreso fra 7n e 13n con HindIII e fra 4n e 12n con EcoRI (**TAB.4.9 SOUTHERN E SEQUENZE PTR e FIG.4.5 SOUTHERN PTR**).

4.2.2 SEQUENZE

Sono state sequenziate 13 sonde alfoidi di PTR ed è possibile individuare omologia con i tipi monomerici umani di tipo: D (2), R (9), W (1) e J (1), come risulta dalla tabella (TAB.4.9).

5 DISCUSSIONE

Il confronto dei dati derivanti dalle ibridazioni *in situ* intraspecie delle sequenze alfoidi ha permesso di studiare l'organizzazione delle sonde nelle singole specie. Operativamente si è operato avendo in mente il modello umano della suddivisione in soprafamiglie. Successivamente si è cercato di indagare se esistesse una correlazione interspecifica tra i subset riconosciuti dalle varie sonde.

5.1 ORGANIZZAZIONE DELLE SEQUENZE ALFOIDI

Utilizzando quattro diversi approcci sperimentali abbiamo clonato 37 differenti cloni alfoidi di scimpanze' e 27 distinti cloni alfoidi di gorilla. Successivamente queste sonde sono state usate in esperimenti di FISH su metafasi di gorilla, di scimpanze' e uomo e in esperimenti di Southern Blotting. I cloni più rappresentativi sono stati inoltre sequenziati per un confronto con la consensus delle sequenze alfoidi umane (Romanova et al., '96).

I risultati di FISH, l'analisi delle sequenze e i dati ottenuti dai Southern sono stati utili per chiarire l'organizzazione delle sequenze alfoidi nelle scimmie antropomorfe africane.

Attraverso esperimenti di FISH ad alta e bassa stringenza è emerso un tipo di organizzazione delle sequenze alfoidi sostanzialmente diversa da quella riscontrata nell'uomo. Le sonde alfoidi umane sono spesso cromosoma-specifiche, in quanto riconoscono un solo cromosoma umano. Poche sono le eccezioni: la sonda alfoide sui cromosomi 13-21 (Jorgensen et al., '87) o quella specifica per i cromosomi 1-5-19 (Baldini et al., '89).

Le condizioni di bassa stringenza in FISH permettono a queste sonde cromosoma-specifiche di riconoscere i cromosomi per i quali l'omologia è minore ma sufficiente a generare un segnale di ibridazione. I cromosomi sui quali la sonda si localizza a bassa stringenza costituiscono una soprafamiglia.

Le sonde alfoidi di PTR e GGO in esperimenti di FISH condotti ad alta stringenza sulle rispettive metafasi non evidenziano il tipo di organizzazione cromosoma specifico già evidenziato per l'uomo; è presente invece una maggiore omogenizzazione tra le sequenze. Va però considerato che la maggior parte dei ricercatori interessati al clonaggio di sequenze alfoidi umane avevano come scopo principale quello di individuare sequenze cromosoma-specifiche in quanto queste avevano un interesse clinico-commerciale. Sequenze non cromosoma-specifiche sono state quindi spesso trascurate per un'ulteriore caratterizzazione. Probabilmente, quindi, esiste un vizio di campionamento per le sequenze umane disponibili in letteratura difficile da quantizzare.

Sono stati individuati 8 cloni alfoidi di PTR, su un totale di 37, e 9 cloni alfoidi di GGO, su 27, che ad alta stringenza risultano cromosoma-specifici; i rimanenti cloni si localizzano su due o più cromosomi. Altri (tra questi un clone di gorilla e 4 di scimpanze) mappano su tutti i cromosomi.

Gli esperimenti di Southern condotti su DNA genomico per individuare l'organizzazione genomica dei cloni indicano un'assoluta omogeneità dei siti di restrizione. La mancanza di un pannello di ibridi monocromosomici specifico per PTR e GGO ha impedito di ottenere indicazioni più precise sul pattern di restrizione, e di conseguenza sull'HOR, del blocco alfoide da cui il clone proveniva. (FIG. 4.5 e 4.9)

Il pattern di ibridazione si presenta sotto forma di ladder con bande di dimensioni multiple di 171 bp. Sono state prese in considerazione le bande di ibridazione di intensità maggiore e per ciascun clone si è cercato di individuare l'ordine superiore dei monomeri alfoidi.

L'analisi di sequenza dei cloni di GGO ha mostrato che:

- i monomeri dei cloni cromosoma-specifici presentano omologia con le consensus dei monomeri umani di tipo R,
- i cloni GGO A (sono state sequenziate 4 sonde su 10), sono omologhi ai tipi monomerici umani D,
- i cloni appartenenti al gruppo GGO B (sequenziate 6 sonde su 8) sono omologhi ai tipi monomerici W, R e J,
- i cloni del gruppo cerniera presentano omologia con i tipi R (2 sonde sequenziate su 9).

È presente in letteratura un clone alfoide pG3.9 di gorilla, isolato nel 1991 da Baldini e collaboratori, che ibrida ad alta stringenza su 10 cromosomi di gorilla, tutti appartenenti al gruppo definito in questa tesi come GGO A. La sequenza di questo clone è omologa alle sequenze dei tipi monomerici umani D. Questo dato conferma come le sequenze dei cloni alfoidi che accendono i cromosomi del gruppo GGO A siano omologhe ai monomeri di tipo D (Baldini et al., '91). Non sono stati sequenziati tutti i monomeri alfoidi, per cui le considerazioni possibili sulle sequenze dei cloni appartenenti a uno stesso gruppo risultano parziali. Possono tuttavia essere considerate attendibili in quanto risultano coerenti con le altre analisi presenti in letteratura.

I risultati di FISH ad alta stringenza effettuate su GGO evidenziano la presenza di sequenze alfoidi cromosoma-specifiche su 5 coppie di omologhi: X, V, XVII, VI e XIX. Inoltre:

- tutti i cloni che ad alta stringenza si localizzano sui cromosomi di GGO A o di GGO B mappano sempre su almeno uno dei cromosomi in comune tra GGO A e GGO B (X, V, XVII e XXII cromosomi "cerniera").
- le sonde GGO IB6 α 42, α 1, IB2 α 46, IB2 α 6 sono cromosoma specifiche ad alta stringenza per i cromosomi "cerniera"; a bassa mappano sui cromosomi di GGO A,
- le sonde GGO α 16, GGO α 5, specifiche ad alta rispettivamente per i cromosomi V e X, e IB6 α 72 che riconosce il cromosoma XIX, a bassa stringenza si localizzano sui cromosomi di GGO B.

Si puo' percio' ipotizzare che le sonde alfoidi riconoscano sui cromosomi V, XVII, X tre diversi subset alfoidi: un subset con omologia per le sequenze alfoidi dei cromosomi appartenenti al gruppo GGO A; un secondo subset costituito da sequenze alfoidi che identificano il gruppo GGO B, e un terzo blocco costituito dalle sonde che ad alta stringenza riconoscono i cromosomi cerniera e alcuni cromosomi appartenenti ai gruppi A e B.

I dati di coibridazione (cfr. fig.), ottenuti con le sonde GGO $\alpha 1$ e $\alpha 16$, ci hanno confermato la presenza di almeno due blocchi distinti per quanto riguarda il cromosoma V. L'esistenza di piu' subset su uno stesso cromosoma e' ben documentato nell'uomo (Finelli e collaboratori, 1996; Warburton e Willard, 1996).

Le sonde GGO $\alpha 6$ e IB2 $\alpha 38$ sono cromosoma-specifiche rispettivamente per i cromosomi X e VI, sia ad alta che a bassa stringenza. Questo indica che su questi cromosomi sono presenti delle sequenze alfoidi specifiche che non hanno omologia con le sequenze alfoidi di altri cromosomi di GGO. Il cromosoma X, pertanto, conterrebbe un quarto blocco alfoide; il cromosoma VI ne conterrebbe almeno due.

Alla luce dei dati discussi non sembra esserci un'organizzazione delle sequenze alfoidi sia in PTR che in GGO riconducibile alla definizione di SF come formulata da Alexandrov. Appare invece evidente in tutte e due le specie una maggiore omogeneita' tra loro di tutte le sequenze alfoidi. In entrambe le specie solo un terzo delle sequenze alfoidi e' cromosoma-specifica; un altro terzo riconosce da due a quattro cromosomi.

Come detto, e' realistico ipotizzare che all'interno di ogni blocco alfoide delle grandi scimmie possano essere presenti sia domini cromosoma-specifici o specifici per pochi cromosomi, sia domini alfoidi comuni tra tutti i cromosomi.

5.2 EVOLUZIONE INTERSPECIFICA

Tutte le sonde riconoscono alcuni o piu' subset se ibridate sulle altre scimmie antropomorfe; questo ci permette di affermare che sono presenti regioni che hanno conservato un'omologia interspecifica. Questa conservazione di sequenza non riflette, tuttavia, una sintenia a livello di localizzazione cromosomica.

Come esempio si puo' analizzare il caso del cromosoma XIV. Questo cromosoma è riconosciuto da 13 sonde di GGO su un totale di 27. Le stesse sonde, ibridate su PTR, riconoscono questo cromosoma in 5 casi, e nell'uomo, lo stesso cromosoma viene riconosciuto 11 volte. Un comportamento analogo hanno le sonde alfoidi di PTR che ad alta stringenza riconoscono il cromosoma IIp. 9 sonde accendono il centromero ortologo, quattro volte in HSA e 5 volte in GGO. Analogamente le sonde che riconoscono il cromosoma IX di PTR accendono 11 volte il cromosoma corrispondente nel gorilla e 8 volte il corrispondente umano. Queste osservazioni confermano i dati di Archidiacono et al. (1995): non sempre una sonda alfoide riconosce il corrispondente omologo nelle altre scimmie antropomorfe.

Le varie sonde clonate riconoscono in esperimenti interspecifici tutti i cromosomi della seconda specie. Questo dato rafforza la conclusione che i pannelli di sonde da me clonate sono rappresentative delle diverse sequenze alfoidi sia di GGO sia di PTR. Questo nonostante il bias insito nelle diverse strategie utilizzate.

5.3 REGIONI PERICENTROMERICHE E ALFOIDI

Un ultimo interrogativo che ci si era riproposti di risolvere riguardava la possibile correlazione tra la localizzazione di sequenze correlate con NF1 (cfr. scopo della ricerca) e l'organizzazione in soprafamiglie di alcuni subset alfoidi. In altre parole se il movimento delle sequenze NF1 fosse stata in qualche modo guidato dalle sequenze alfoidi presenti nel cromosoma 17 ancestrale.

Come evidenziato dai risultati di FISH (utilizzando il cDNA del gene di NF1 come sonda sulle grandi scimmie; cfr. scopo della ricerca), e' possibile individuare la presenza di alcuni pseudogeni su cromosomi omologhi. Questo dato, in accordo con la datazione sull'origine degli pseudogeni fornita da Regnier et al. (1997) (25-30 mya) potrebbe essere spiegato supponendo che il movimento degli pseudogeni sia avvenuto nell'ancestore comune. Questi Autori avevano ipotizzato che la localizzazione nelle regioni pericentromeriche potesse essere collegata alla presenza di sequenze alfoidi comuni in quel momento su questi cromosomi. I dati da noi ottenuti indicano che l'organizzazione delle sequenze alfoidi e' diversa tra le specie. Purtroppo, quindi, e' tutt'altro che facile capire quale sequenza alfoide fosse presente nell'ancestore comune, ed e' ancora piu' improbabile supporre che fosse gia' presente una SF ancestrale corrispondente alla SF2 umana, tale da guidare il movimento degli pseudogeni. Nelle diverse specie questo blocco alfoide, come altri, ha subito un'evoluzione indipendente come dimostrato dal fatto che sonde alfoidi umane dei cromosomi 14 e 15 non riconoscono sempre i corrispondenti cromosomi omologhi in PTR e GGO. Le nostre conclusioni sono sostenute dal fatto che, nonostante vari studi sulla organizzazione ed evoluzione di sequenze pericentromeriche siano ora disponibili, nessuna correlazione del tipo di quella riportata da Regnier et al (1997) e' stata piu' formulata.

6 METODICHE SPERIMENTALI

6.1 FISH

I cloni alfoidi di GGO e PTR sono stati ibridati ad alta e bassa stringenza sulle rispettive metafasi per individuare ad alta stringenza il cromosoma contenente il blocco omologo al clone alfoide analizzato, e a bassa stringenza per individuare, i cromosomi correlati con la sonda alfoide.

Utilizzando i cloni alfoidi di PTR, sono stati effettuati esperimenti di FISH a bassa stringenza su metafasi di GGO e HSA, e sempre a bassa stringenza su metafasi di PTR e HSA utilizzando i cloni alfoidi di GGO come studio sistematico di mappatura comparativa e per indagare sulla loro relazione evolutiva.

6.2 SOUTHERN

I cloni di GGO e PTR sono stati ibridati radioattivamente in esperimenti di Southern su filtri blottati con DNA genomico rispettivamente di gorilla o scimpanze' digerito con Eco RI, Hind III e Xba I, enzimi che nell'uomo hanno siti di taglio all'interno dei blocchi alfoidi. Questa serie di esperimenti sono stati effettuati su DNA genomico per individuare l'organizzazione genomica dei cloni, non avendo disponibilita' nel nostro laboratorio di un pannello (di Southern) cromosoma specifico per PTR e GGO, che avrebbe dato indicazioni sul pattern di restrizione e di conseguenza sull'HOR del blocco alfoide da cui il clone proviene.

Il pattern di ibridazione si presenta sotto forma di ladder di bande di dimensioni multiple di 171 bp, e, considerando le bande di ibridazione di intensita' maggiore, per ciascun clone si e' cercato di individuare il pattern caratteristico utile per avere indicazioni sull'ordine superiore dei monomeri alfoidi.

6.3 SEQUENZE

Per analizzare a livello di sequenza i cloni di PTR e GGO, e per determinare le relazioni tra essi e i satelliti alfoidi umani, sono stati sequenziati alcuni tra i cloni alfoidi tra i piu' rappresentativi dei gruppi cromosomici di appartenenza.

Nel corso di questo lavoro sono state analizzate e confrontate le sequenze dei monomeri isolati nel laboratorio con i monomeri presenti in letteratura di GGO e PTR. Tutte le sequenze dei cloni isolati sono state suddivise in monomeri di 171 bp e allineate per ottenere la massima omologia fissando arbitrariamente come base uno il sito di taglio di BamHI della ripetizione alfoide specifica del cromosoma X umano (Romanova et al., '96). Le sequenze cosi' allineate, utilizzando il pacchetto di programmi della DNA STAR, sono state confrontate con le sequenze dei diversi tipi

monomerici umani per individuare con quale tipo di consensus umana presentano omologia maggiore.

Il confronto interspecie tra i monomeri e tra le varie sequenze consensus permetterebbe di costruire una sequenza alfoide ancestrale, da cui i diversi subset delle grandi scimmie e umani possono essersi originati (Haaf e Willard, '98).

I singoli monomeri dei cloni alfoidi sono stati confrontati con le consensus dei tipi monomerici umani per individuare l'omologia con ciascuna di esse.

I primers α -27 e α -30 usati in PCR per amplificare questi cloni di GGO e PTR derivano dalla regione conservata della sequenza consensus di (Waye e Willard, '86) e sono interni alla consensus di Alexandrov; perciò i monomeri alle estremità dei frammenti alfoidi amplificati e clonati risultano incompleti rispetto alle consensus utilizzate per il confronto.

Per ogni clone comparando i dati di sequenza, di Southern e di FISH si è cercata di stabilire l'eventuale organizzazione di ordine superiore dei monomeri alfoidi.

6.4 GEL ELETTROFORESI

Questa tecnica è utilizzata per separare la miscela di frammenti di DNA dopo la digestione con enzimi di restrizione e per valutare la concentrazione e il PM delle varie molecole di DNA dopo estrazione e/o dopo marcatura per nick translation.

A tale scopo, il DNA è posto in pozzetti di un gel orizzontale di agarosio (posto cioè su una slitta di plastica ed immerso in soluzione tampone). Alle due estremità della vasca elettroforetica sono inseriti due elettrodi a loro volta collegati ad un generatore di corrente. La corrente applicata permetterà la separazione dei frammenti di DNA in base al differente peso molecolare.

6.4.1 GEL DI AGAROSIO

L'agarosio è un polimero di D-galattosio e 3.6 anidro-L-galattosio. Viene sciolto in TBE (TRIS base, Na₂-EDTA, acido borico) ad opportune percentuali e si lascia solidificare. Si aggiunge etidio bromuro (5 μ l in 100 ml); questa molecola si intercala nella doppia elica del DNA che così diventa visibile dopo esposizione del gel a raggi UV. Il gel da noi utilizzato è ad una concentrazione di agarosio dello 0.8-1% in peso. Questa percentuale di agarosio permette una buona separazione dei frammenti sia di alto sia di basso PM.

6.4.2 MARKERS DI PESI MOLECOLARI

Accanto ai campioni di DNA caricati su gel di agarosio si pone un marker di peso molecolare per individuare il peso molecolare dei diversi frammenti di DNA, nonché determinarne la concentrazione. Quelli più frequentemente usati sono: lambda/Hind III e Phix 174/Hae III.

La digestione del fago lambda con l'enzima di restrizione Hind III genera otto frammenti la cui lunghezza va da 23.13 Kb a 125 pb. Il secondo fago è il Phix 174 (di circa 5 Kb). La sua digestione con l'enzima Hae III genera undici frammenti la cui lunghezza va da 1353 pb a 72 pb.

	Banda:	%	Banda:	%
1)	23.13 kb	47	1.353	30
2)	9.416	19	1.078	24
3)	6.557	13	0.872	19
4)	4.361	9	0.603	13
5)	2.322	5	0.310	6
6)	2.027	4	0.28-0.27	5
7)	0.564	0.234		
8)	0.125	0.194		

6.5.1 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO

Si parte da cellule in coltura; si aggiungono 10 ml di tampone Jeffrey (10 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 24 mM EDTA pH=8) e SDS ad una concentrazione finale dell'1.7%. Si mescola delicatamente e si aggiungono 100 µl di RNase concentrata 10 mg/ml. Si incuba un'ora a 37°C.

Si aggiungono 100 µl di proteinasi k (20 mg/ml) e si incuba 30 min a 60°C.

Si procede con la precipitazione delle proteine aggiungendo 3.4 ml di NaCl saturo (salting out) e agitando intensamente per 15 sec. Si centrifuga 15 min a 2500 rpm, si trasferisce il sovrantante in una nuova provetta e si procede aggiungendo due volumi di etanolo assoluto freddo. La medusa di DNA recuperata viene lavata con etanolo al 70% per eliminare i sali.

Si centrifuga per 10 min a 2000 rpm, si elimina il sovrantante, si lascia asciugare per un po' il pellet e poi si risospende in 1 ml di TE1X (Tris-base, Na₂-EDTA).

Si lascia in agitazione over-night. Il giorno dopo si può riprecipitare, sciacquare con etanolo al 70% e sciogliere ancora in TE 1X. Mediante lo spettrofotometro si può valutare la concentrazione del DNA.

6.5.2 ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Per estrarre le molecole plasmidiche contenute nei batteri e' necessario far crescere le cellule overnight in circa 3 ml di brodo in presenza dell'opportuno antibiotico (kanamicina ad una concentrazione finale di 50 µg/ml).

Dalla coltura satura vengono prelevati 1.5 ml e trasferiti in un'ependorf; i batteri vengono raccolti per centrifugazione per 30 sec a 14000 rpm e risospesi in 100 µl di GTE freddo (25 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM Na₂EDTA, 50 mM glucosio) mediante vortex. Dopo aver lasciato incubare in ghiaccio per 5 min si aggiungono 200 µl di soluzione denaturante 0.2 N NaOH, 1% SDS (preparata fresca).

Si mescola fino a far diventare la sospensione chiara e viscosa. Si lascia per 5 min in ghiaccio e quindi si aggiungono 150 μ l di una soluzione 3M di NaAcetato pH=4.8; si mescola delicatamente e si lascia in ghiaccio ancora per 5 min. Quindi si centrifuga per 5 min a 14000 rpm. Il sovrantante viene trasferito in una nuova eppendorf ; si aggiungono 450 μ l di 7.5M NH_4Ac freddo. Si mescola e si rimette in ghiaccio per 15 min. Successivamente si centrifuga a 14000 rpm per 15 min; questo passaggio precipita piu' del 90% dell'RNA ad elevato peso molecolare e una certa quantita' di proteine. Quindi si trasferisce il sovrantante in una nuova eppendorf e si aggiunge un volume di isopropanolo. Si lascia a -20°C per 10 min e si centrifuga per 10 min. Si lava il pellet con etanolo al 70%, si lascia asciugare e si risospende in circa 25 μ l di TE . Per controllare la concentrazione, un μ l di DNA estratto viene caricato su gel di agarosio accanto ad un marcatore di peso molecolare (es. lambda Hind).

6.6 PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) CON LA COPPIA DI PRIMERS $\alpha 27/ \alpha 30$ E CON LA PWO DNA POLIMERASI (Boehringer)

Gli ibridi sono stati amplificati usando delle polimerasi termostabili come la PRYMAZYME (Biometra), la DyNAZYme (Finnzymess Oy) e la Pwo DNA Polimerasi (Boehringer); la particolarita' di questi enzimi e' quella di generare molecole con estremita' piatte (blunt-end), contrariamente a quanto succede utilizzando una normale polimerasi termostabile, come la Taq, che aggiunge un residuo adeninico alle estremita' dei prodotti di amplificazione.

I frammenti amplificati di tipo blunt-end possono, quindi, essere usati direttamente per la reazione di ligazione con un vettore (nel nostro caso il pZErO-2) a sua volta digerito con un enzima di restrizione che lascia le estremita' piatte (Eco RV o Sma I). L'enzima Pwo DNA Polimerasi e' stato isolato dall'archeobatterio termofilo *Pyrococcus woesei*. L'enzima ha un peso molecolare di 90 kD, un'attivita' polimerasica in 5'-3' ed esonucleasica in 3'-5'.

La Pwo polimerasi ha una stabilita' termica maggiore rispetto alla Taq polimerasi, poiché ha una vita media superiore alle due ore se soggetta ad una temperatura di 100°C . Invece, la Taq polimerasi ha una vita media inferiore ai 5 minuti se esposta alla stessa temperatura.

La presenza di un'attivita' esonucleasica in 3'-5', inoltre, garantisce alla Pwo polimerasi una precisione nella sintesi del DNA fino a dieci volte superiore rispetto alla Taq polimerasi.

Una delle principali caratteristiche della Pwo polimerasi e' quella di generare prodotti di amplificazione con estremita' piatte, i quali potranno essere direttamente usati in reazioni di ligazione.

Questo enzima e' stato usato per reazioni di amplificazione in presenza della coppia di primers $\alpha 27$ e $\alpha 30$, ricavati dalle regioni piu' conservate della sequenza consensus alfoide umana.

Il protocollo di amplificazione prevede la preparazione di due master mix:

Componenti	Vf=100 µl	Vf=50 µl	Cf
Master Mix 1			
H ₂ O sterile	a 50 µl	a 25µl	
dATP (10mM)	2 µl	1 µl	200 µM
dCTP (10mM)	2 µl	1 µl	200 µM
dGTP (10mM)	2 µl	1 µl	200 µM
dTTP (10mM)	2 µl	1 µl	200 µM
Primers(α27-α30)	X µl	X µl	300 nM(per Vf=100µl) 600nM (per Vf=50µl)
DNA	X µl	Xµl	(0.1-0.75 µg)
Master Mix 2			
H ₂ O sterile	a 50µl	a 25µl	
10X buffer (20mM MgSO ₄)	10 µl	5µl	
Pwo Pol. (5U/µl)	0.5µl	0.5µl	2.5U

La preparazione di queste due mix elimina la necessita' della partenza a caldo e impedisce all'enzima di interagire con i primers o con il DNA in assenza dei nucleotidi; in questo caso, infatti, si potrebbe avere un'indesiderata degradazione del DNA.

CICLI TERMICI:

1X Denaturazione del DNA 2' a 94°C

denaturazione 15" a 94°C

10X annealing 30" a 45-65°C

polimerizzazione 45" -2' a 72°

denaturazione 15" a 94°C

15-20X annealing 30" a 45-65°C

polimerizzazione 45"-2' a 72°

un ciclo di polimerizzazione piu' lungo di 20" ogni volta

1X polimerizzazione prolungata fino a 7' a 72°C

La scelta del tempo di polimerizzazione dipende dalla lunghezza dei frammenti che si desidera amplificare.

6.7 ELUIZIONE DI DNA DA GEL LMP (Gene clean II)

Dopo aver tagliato il frammento di gel LMP (low melting point, a bassa temperatura di fusione) contenente il DNA, si cerca di rimuovere la maggiore quantità possibile d'agarosio e quindi si procede con la purificazione.

Nel caso in cui il tampone usato sia il TBE, si aggiungono tre volumi di una soluzione di NaI e 1/2 volume di "TBE modifier". Si incuba per 5 min a 55°C, finché il gel non sarà completamente sciolto.

Per favorire la precipitazione del DNA si aggiunge 1 µl della resina "glassmilk" per ogni µg di DNA da eluire. Si incuba 15 min a 55°C mescolando ogni 2-3 min. Quindi si centrifuga per 5 sec, si scarta il soprannatante e si lava il pellet con 400 µl della soluzione new wash fredda (Et-OH 50%, 10 mM Tris-HCl pH=7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA). Dopo aver risospeso il pellet in questa soluzione, si centrifuga per 10-20 sec e si effettuano altri due lavaggi. Quindi si centrifuga per eliminare la soluzione e si risospende il pellet in circa 10 µl di H₂O; si incuba a 55°C per 2-3 min e si centrifuga per almeno 10 min per allontanare ogni residuo di resina.

6.8 CLONAGGIO

6.8.1 VETTORE DI CLONAGGIO

Il vettore usato è il pZErO-2 (Invitrogen) che permette il clonaggio di frammenti sia ad estremità coesive sia ad estremità piatte, con uno scarso background di non ricombinanti.

Si tratta di un plasmide di 3297 pb dotato di resistenza alla kanamicina, di un'origine di replicazione f1 per DNA a singola elica, di un sito multiplo di clonaggio contenente 16 siti di restrizione, di un promotore SP6 e di un promotore T7 per la trascrizione in vitro e per il sequenziamento, di tutti i siti del primer universale M13.

Il sistema di clonaggio è basato sulla presenza, nel plasmide, del gene letale di *E. Coli* ccdB (control of cell death). La proteina codificata da questo gene agisce disturbando il complesso DNA-girasi (topoisomerasi II) che si forma per favorire il superavvolgimento negativo del DNA batterico. La proteina ccdB impedisce alla girase di svolgere regolarmente la propria funzione e, come risultato, si creano rotture nel DNA e si ha la morte delle cellule. Normalmente l'azione killer della proteina ccdB è inibita da una seconda proteina, prodotta dal gene ccdA. Una sovraespressione del gene ccdB causa la morte cellulare in quanto l'azione inibente della proteina ccdA non è più sufficiente.

Il vettore di clonaggio pZErO contiene il gene ccdB fuso con il gene LacZ α , a sua volta preceduto dal promotore Lac sensibile all'IPTG. L'inserzione del frammento esogeno di DNA nel sito polylinker altera l'espressione del gene LacZ α -ccdB; pertanto, le cellule contenenti il vettore ricombinante cresceranno normalmente, mentre le cellule con i vettori non ricombinanti saranno uccise in seguito ad induzione con IPTG.

Infatti, l'espressione del gene *ccdB* viene indotta ad una concentrazione 1 mM di IPTG presente nel terreno delle piastre.

Tuttavia, anche la chiusura imperfetta del vettore su se stesso, senza inserto, può inattivare il gene *ccdB* e causare la crescita di cloni falsi positivi.

6.8.2 PREPARAZIONE DELLE PIASTRE LB⁺

Ogni litro di LB contiene: 10 gr di Bacto Triptone, 5 gr di estratto di lievito, 5 gr di NaCl e 2 gr di MgSO₄. Si porta il pH a 7.4 con NaOH e si aggiunge Bacto Agar ad una concentrazione finale pari a 1.5%.

Dopo aver autoclavato il brodo si fa raffreddare e si aggiungono kanamicina (ad una concentrazione finale di 50 µg/ml) e IPTG (ad una concentrazione finale 1 mM).

6.8.3 DIGESTIONE DEL VETTORE

Si digerisce circa 1µg di DNA del vettore superavvolto, in un volume finale di 10-20 µl, si aggiunge la quantità appropriata del buffer 10X associato all'enzima, affinché la sua concentrazione finale sia 1X. In genere, 1 µg di DNA viene digerito da un'unità di enzima per un'ora a 37°C. Però, nel caso di DNA plasmidico e' necessaria una quantità di enzima almeno tre volte superiore; per il DNA fagico, per gli YACs o per il DNA genomico e' necessaria una quantità cinque volte superiore.

La scelta dell'enzima di restrizione con cui digerire il vettore dipende dal tipo di clonaggio che si desidera fare. Se l'inserto e' un frammento con estremità coesive (sticky-ends) si può digerire il vettore con un enzima in grado di produrre estremità compatibili con il frammento. Se, invece, il DNA da clonare ha estremità piatte (blunt-ends) il pZerO-2 viene digerito con l'enzima EcoRV.

Una digestione ottimale e' fatta in 10-30 minuti usando 10-20 unità di enzima.

Non bisogna superare un tempo di due ore, per evitare un eventuale attacco del DNA da parte di nucleasi contaminanti. Questo potrebbe rovinare le estremità del vettore e aumentare il background al momento della trasformazione.

6.8.4 REAZIONE DI LIGAZIONE

Per aumentare l'efficienza della ricombinazione, l'inserto viene aggiunto in un rapporto molare circa doppio rispetto al vettore. La formula per calcolare la quantità necessaria di inserto e' la seguente:

$$\frac{x \text{ ng di inserto}}{3297\text{pb}} = 2x \text{ (pb dell'inserto)} \times (50 \text{ ng di pZErO-2 digerito})$$

La reazione di ligazione può essere fatta in un volume finale di 10 µl o di 20 µl:

V_f = 10 µl

vettore digerito (~50 ng)	1 µl
inserto	x µl
10X buffer (con ATP)	1 µl
T4 DNA ligasi (2.5 U/µl)	0.5 µl
H ₂ O sterile	fino a 10 µl

Si incuba per 1-4 ore a 16°C oppure a 20°C. La reazione è svolta dalla ligasi del fago T4, un enzima con proprietà diverse rispetto alla ligasi di E. Coli. La ligasi del fago T4 catalizza il legame covalente tra il fosfato in 5' di una base e l'OH in 3' della base

successiva, contigua alla prima, anche senza l'aiuto dell'ibrido parziale costituito dalle estremità coesive delle molecole.

6.8.5 TRASFORMAZIONE CHIMICA

Le cellule competenti usate per la trasformazione appartengono al ceppo di E. Coli TOP10F'. Questo ceppo di batteri è consigliato dalla Invitrogen per la trasformazione con il pZErO-2, in quanto tali cellule sono prive del trasposone Tn5 portatore della resistenza alla kanamicina. Quest'antibiotico, infatti, è usato per selezionare i cloni trasformati dal plasmide pZErO-2.

Circa 100 µl di cellule competenti sono poste in eppendorf da 1.5 ml; si aggiungono circa 5 µl della reazione di ligasi e si incuba in ghiaccio per 30 min.

Poi le provette sono poste in un bagno a 42°C per 30 sec; l'heatshock permetterà l'attraversamento della parete batterica da parte del DNA plasmidico.

Le provette sono quindi poste in ghiaccio per pochi secondi e poi si aggiungono 900 µl di LB; si incuba un'ora a 37°C a 225 rpm in un agitatore, per far crescere i batteri e per fare esprimere la resistenza all'antibiotico. Infine si piastrano circa 100 µl (cioè 1/10) su piastre con kanamicina e IPTG.

6.8.6 TRASFORMAZIONE CON L'ELETTROPORATORE

Circa 2 µl della reazione di ligasi sono aggiunti a 40 µl di cellule elettrocompetenti; si lascia in ghiaccio per 1'. Ogni campione è, quindi, trasferito in una cuvetta, precedentemente raffreddata in ghiaccio. Durante il trasferimento, bisogna stare attenti ad evitare la formazione di bolle d'aria. La cuvetta è sistemata nell'apposita camera dell'elettroporatore e si fa partire la scarica elettrica; questa induce la formazione di pori nella parete cellulare, rendendo possibile l'ingresso del DNA esogeno. Si aggiungono immediatamente circa 960 µl di SOC (a temperatura ambiente), si trasferisce in una provetta e si incuba a 37°C per 60' in un agitatore. Infine, si piastra su terreno con kanamicina e IPTG.

6.8.7 SCREENING DELLE COLONIE RICOMBINANTI:

6.8.7.1 ESTRAZIONE RAPIDA DI DNA PLASMIDICO CON FENOLO-CLOROFORMIO

Si tratta di un metodo molto semplice che permette di effettuare un primo screening rapido, per riconoscere i cloni ricombinanti e distinguerli dai falsi positivi.

Il protocollo è basato su tre passaggi fondamentali:

le singole colonie sono trasferite in provette contenenti 100 µl di LB e l'appropriato antibiotico. Si lascia incubare per una notte a 37°C

ad ogni provetta si aggiungono 100 µl di una soluzione fenolo-cloroformio (1: 1) e si agita vigorosamente per pochi secondi

una piccola quantità (5-10 µl) della fase acquosa sovrastante è caricata direttamente su un gel di agarosio all'1.2-1.5%.

I plasmidi contenenti un inserto formeranno sul gel delle bande più alte, cioè a maggiore peso molecolare, rispetto al vettore privo di inserto usato come controllo.

6.8.7.2 METODO DELLO STUZZICADENTI (TOOTHPICK PLASMID ASSAY)

Questo metodo, come quello precedente, consiste in una rapida estrazione di DNA dai cloni ricombinanti, mediante tre principali passaggi:

si prepara una provetta per ogni colonia da testare; mediante uno stuzzicadenti si trasferisce un'aliquota di cellule, dalla colonia al fondo della provetta corrispondente si aggiungono subito 30 μ l del Toothpick Lysis Buffer; si lascia per poco tempo su vortex e poi si incuba per 20' in un bagno a 65°C

i campioni sono centrifugati per 15" e, quindi, caricati su un gel di agarosio allo 0.8%. Il gel viene lasciato correre per circa 3 ore ad 80 Volts, per evitare che il buffer si surriscaldi e che le bande di DNA si alterino.

Anche in questo caso i plasmidi positivi verranno riconosciuti in base alla maggiore altezza delle bande di DNA, rispetto al controllo privo di inserto.

Composizione del Toothpick Lysis Buffer: 1.25 ml 1N NaOH, 0.25 ml 0.5 ml EDTA pH 8.0, 0.625 ml 10% SDS, 1.75 g Ficoll, 250 μ l Blu di Bromofenolo.

Si porta il volume a 25 ml con H₂O demineralizzata, si filtra e si conserva a -20°C in aliquote da 1 ml.

6.8.7.3 PCR CON LA COPPIA DI PRIMERS SP6 E T7

Questo tipo di screening sfrutta le molteplici caratteristiche del sito polylinker del vettore pZErO-2; tale sito presenta alla due estremita' le sequenze dei promotori per le RNA polimerasi dei fagi SP6 e T7.

Si tratta di oligonucleotidi lunghi una quindicina di basi che sono riconosciuti con estrema specificita' dalle corrispondenti polimerasi e possono essere usati per esperimenti di trascrizione dell'inserto.

In realta', questa coppia di sequenze può essere sfruttata in molteplici modi; nel nostro caso i promotori SP6 e T7 sono stati impiegati come siti di innesco per favorire la reazione di amplificazione dell'inserto.

La reazione può avvenire in un volume finale di 20 μ l o di 50 μ l:

Mix	V _f =50 μ l	Concentrazione finale
10X PCR buffer	5 μ l	1X
10 mM dNTP	1 μ l	0.2 mM
50 mM MgCl ₂	1.5 μ l	1.5 mM
10 μ M primers	1 μ l + 1 μ l	0.2 μ M
DNA	\geq 1 μ l	variabile
Platinum Taq	0.5 μ l	2.5 unita'
H ₂ O	a 50 μ l	

Se la PCR con la coppia di primers SP6/T7 viene usata per analizzare i cloni ricombinanti cresciuti su terreno con IPTG, l'amplificazione viene fatta direttamente sulle cellule batteriche.

Queste vengono prelevate dalle rispettive colonie e inoculate con uno stuzzicadenti nelle corrispondenti provette contenenti la mix di reazione.

La temperatura superiore ai 90°C, raggiunta durante l'amplificazione, provoca la rottura della parete cellulare e permette all'enzima e ai primers di legare il DNA.

Quando il numero delle colonie da esaminare è molto alto si può procedere con un utile metodo basato sul raggruppamento dei cloni in pool e sullo screening di ogni pool.

Ad esempio, se il numero delle colonie da esaminare è pari a 100, si può disegnare, su un'ampia piastra LB⁺ contenente kanamicina e IPTG, una griglia 10×10 formata da 100 quadrati.

Ogni colonna verticale può essere indicata con un numero da 1 a 10, mentre ogni riga orizzontale con una lettera dalla A alla L.

Si preparano 20 provette, contenenti una certa quantità di LB, indicate con i numeri e le lettere della griglia.

Ogni colonia può essere, quindi, trasferita, mediante uno stuzzicadenti, in un quadrato della griglia e nella provetta dei numeri e in quella delle lettere corrispondenti alla sua posizione.

Una volta preparati, questi pool di colonie si lasciano crescere per qualche ora; si preleva poi un'aliquota di pochi µl per la reazione di PCR SP6/T7.

Caricando i campioni su gel, si valutano i pool che hanno dato risultato positivo e, per incastro, si risale alle singole colonie sulla griglia; queste verranno poi esaminate singolarmente.

Naturalmente si usa sempre un controllo negativo rappresentato dal vettore privo di inserto.

6.9 SOUTHERN BLOT

Il DNA genomico è digerito con diversi enzimi di restrizione, in un rapporto di circa 5 unità di enzima per ogni microgrammo di DNA. I prodotti delle digestioni vengono caricati e fatti correre su un gel di agarosio all'1%.

A corsa ultimata si procede con la denaturazione e la neutralizzazione del gel (soluzione denaturante: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl; soluzione neutralizzante: 0.5 M Tris, 1.5 M NaCl).

Il DNA, così denaturato, viene trasferito su una membrana di nylon MSI usando come tampone una soluzione di 20XSSC. Il DNA viene stabilmente legato esponendo i filtri ai raggi UV.

6.9.1 MARCATURA RADIOATTIVA (Random priming)

Questo metodo di marcatura prevede dapprima la denaturazione della doppia elica del DNA da marcare e poi l'ibridazione con una miscela di oligonucleotidi degenerati.

A partire dalle estremità 3'-OH di questi primers, la DNA polimerasi di Klenow sintetizza la strand complementare incorporando casualmente un deossinucleoside trifosfato coniugato con ³²P. Il DNA di partenza serve come stampo per la sintesi di DNA marcato; con questo metodo è possibile marcare minime quantità di DNA, fino a 10ng.

La miscela di oligonucleotidi rappresenta tutte le possibili sequenze, quindi si lega allo stampo in modo casuale. In questo modo viene garantita una marcatura omogenea per tutta la lunghezza della sequenza di DNA.

Il DNA da marcare, posto nella opportuna quantita' di acqua, viene denaturato per 10 min a 100°C e poi subito raffreddato in ghiaccio. Il volume finale della reazione e' di 20 µl. Si aggiungono quindi:

- 3 µl di dNTP 0.5 mM (rapporto 1:1:1 tra i nucleotidi dCTP, dGTP, dTTP)
- 2 µl della miscela di esanucleotidi 10X
- 5 µl di ³²P-dATP
- 1 µl di polimerasi di Klenow 2U/µl

Si incuba a 37°C per 1-2 ore; avvenuta la marcatura, si purifica la sonda dai nucleotidi non incorporati usando una colonnina di Sephadex G50.

6.9.2 IBRIDAZIONE RADIOATTIVA CON $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP

L'ibridazione viene fatta generalmente ad alta stringenza per permettere il legame delle sole sequenze altamente omologhe.

Le condizioni usate sono T=42°C in: 50% formamide, 6XSSC, 5X soluzione di Denhardt, 0.5% SDS, 10 mM EDTA pH=8 e 100 µg/ml di DNA di sperma di salmone.

Si preincuba il filtro per 2-3 ore con la miscela di ibridazione, poi si aggiunge la sonda precedentemente marcata e denaturata. Si incuba overnight.

I lavaggi dopo l'ibridazione sono stati eseguiti a 60°C in 2XSSC-0.1% SDS.

Alternativamente l'ibridazione e' stata fatta a 65°C in:

1 M NaH₂PO₄-2H₂O, 0.4 M Na₂HPO₄, 7% SDS, 1% BSA (Church & Gilbertson) e 100 µg/ml di sperma di salmone.

In questo caso i lavaggi sono stati effettuati a temperatura ambiente in 2XSSC.

I filtri sono stati esposti su lastre Bio-Max (Kodak) sotto schermi intensificatori a -80°C per un tempo appropriato.

6.10 IBRIDI SOMATICI

L'informazione genetica contenuta in cellule di diversa origine puo' essere combinata in un singolo nucleo attraverso la fusione cellulare. Questa richiede che delle cellule entrino in contatto e include una breve distruzione delle membrane cellulari usando agenti chimici o fisici. Quando avviene la ricostituzione delle membrane, le cellule adiacenti possono riformare insieme le loro membrane producendo una singola cellula ibrida.

Derivano dalla fusione di due tipi di cellule appartenenti alla stessa specie gli ibridi intraspecifici, da specie differenti gli ibridi interspecifici. Nel primo caso la cellula ibrida e' una cellula che conserva l'intero assetto cromosomico delle due cellule di partenza, mentre nel secondo caso la cellula fusa tende ad eliminare i cromosomi appartenenti ad un tipo di cellula.

Gli ibridi somatici usati per il clonaggio di cloni alfoidi sono preparati fondendo in presenza di PEG le cellule di primate, (gorilla e scimpanze'), pretrattate con radiazioni letali ionizzanti per rompere i cromosomi, e di hamster; gli ibridi derivanti tendono a perdere molti dei cromosomi di primate ma trattengono assetto cromosomico murino.

I frammenti cromosomici di primate sono trattenuti interamente a caso, con l'eccezione del cromosoma che porti il fattore di selezione. E' importante conoscere quali cromosomi di primate sono presenti in ciascun ibrido utilizzando tecniche

citogenetiche con la consapevolezza che non e' possibile caratterizzare tutti i frammenti e soprattutto quelli centromerici non individuabili con la FISH.

6.10.1 COLTURA DI LINFOCITI ED ALLESTIMENTO DI PREPARATI CROMOSOMICI

La qualita' dei preparati citologici sui vetrini sono uno dei punti critici per il successo dell'ibridazione *in situ*.

Per la preparazione di metafasi umane, sono stati utilizzati preparati cromosomici di una coltura sincronizzata di linfociti di sangue periferico provenienti da un donatore normale.

La coltura viene allestita in bottiglie da 25 cm³ utilizzando:

10ml di terreno di coltura RPMI 1640/10% FCS (siero bovino fetale);

200 mM L-Glutamina

100 IE/ml Penicillina

100 microgr/ml Streptomicina

0.3-0.6ml di sangue dell'individuo normale;

0.150ml di PHA (fitoemoagglutinina).

La PHA e' un mitogeno e stimola la crescita linfocitaria. La coltura e' incubata a 37°C in presenza di CO₂ al 5% per 72h. Al terzo giorno la coltura viene sincronizzata con la timidina utilizzata alla concentrazione di 0.3mgr/ml di terreno a partire da una soluzione madre 100 volte piu' concentrata. Si incuba la coltura a 37°C per circa 16-17h. L'eccesso di timidina nella coltura blocchera' la maggior parte delle cellule prima della mitosi. Il giorno dopo la timidina viene rimossa dal terreno raccogliendo e centrifugando in una provetta la coltura. Dopo aver eliminato il sovratanate, il sangue viene rimesso in coltura con terreno fresco e lasciato in termostato a 37°C per 5h nel corso delle quali i linfociti riprenderanno il loro ciclo cellulare. Successivamente si aggiunge la colchicina (0.05µgr/ml) per 30' che determinera' l'accumulo nella coltura di linfociti in metafase ma soprattutto in prometafase e profase. Quindi si recupera il sangue e si passa al trattamento che portera' all'allestimento dei vetrini. Si centrifuga la coltura a 1000-1500rpm per 7'. Si elimina il sovratanate e si aggiungono circa 5ml di soluzione ipotonica (KCl 0.075 M) per 10' a 37°C. Si aggiunge qualche goccia di una soluzione fissativa costituita da 3 parti di alcool etilico e 1 di acido acetico; si rimescola e si centrifuga per 7'. Il sovratanate e' sostituito con fissativo e si lascia per circa 15-30' a 4°C. Si centrifuga e si lava piu' volte con dell'altro fissativo fino a quando il pellet non diventa perfettamente bianco. Quindi, le cellule sono risospese in un appropriato volume di fissativo e si passa ad allestire i vetrini. Alcune gocce delle cellule in sospensione vengono fatte cadere su vetrini puliti precedentemente con alcool etilico 100%. La qualita' dei preparati viene poi controllata al microscopio con contrasto di fase; le mitosi migliori sono quelle completamente aperte, con sovrapposizioni minime e prive di contaminazioni col citoplasma.

E' inoltre possibile la conservazione delle cellule in sospensione a -20°C; questa temperatura permette di conservare le sospensioni per un anno, e di tenerle sempre pronte nel caso si necessitasse di nuovi vetrini.

6.10.2 COLTURA DI FIBROBLASTI E LINFOBLASTI

Il terreno utilizzato per i fibroblasti e' costituito da :

DMEM con 10% FCS,

100 IE/ml Penicillina

100 µg/ml Streptomina

200 mM L-Glutamina

Raggiunto lo stato di confluenza sul fondo della fiasca, quando cioe' le cellule in coltura arrivano a formare un fitto strato, le cellule sono sottoposte a passaggio, aspirando via il terreno; le cellule sono successivamente lavate con 1xPBS (37°C) o con Versene e sciacquate poi con 2 ml di tripsina (1xPBS con 0,05 Tripsina, 0,02% EDTA). Inumidite dalla tripsina, le cellule si staccano dal fondo. Con l'aggiunta di 15 ml di terreno le cellule vengono rimesse in sospensione, e separate in tre fiasche. Il terreno viene solitamente cambiato ogni tre/quattro giorni, fino a che le cellule sono nuovamente confluenti. Il tempo necessario dipende dalla qualita' e dalla vitalita' della coltura cellulare con cui si lavora. Un giorno prima della raccolta il terreno viene rinnovato, in modo che, in presenza di nutrimento fresco, le cellule siano stimolate a dividersi. Per la preparazione di cromosomi metafasici bisogna aggiungere la colchicina con un'incubazione di 10-15 min a 37°C quando tramite microscopio invertito si nota che la maggior parte delle cellule sono in mitosi (le cellule in questa fase un aspetto rotondeggiante). I passaggi successivi sono uguali a quelli già descritti per i linfociti.

Le colture di linfoblasti, costituite da linee cellulari diploidi, sono state coltivate in sospensione in terreno RPMI 1640, 10% FCS, 100IE/ml Penicillina, 100 µgr/ml Streptomina e divise ogni 3/4 giorni.

6.11 IBRIDAZIONE IN SITU NON RADIOATTIVA (FISH)

Questa tecnica consente la mappatura fisica di frammenti di DNA, marcati in modo non radioattivo, usati come sonde da ibridare su cromosomi in metafase.

6.11.1 MARCATURA PER NICK-TRANSLATION (con BIOTINA)

Si marcano 2 µg di DNA. Si aggiungono:

- 10 µl di 10x n.t. buffer: 0.5 M Tris-HCl pH 7.8-8
50 mM MgCl₂
0.5 mg/ml BSA
- 10 µl di nucleotidi stock: 0.5 mM dATP
0.5 mM dGTP
0.5 mM dCTP
- 5 µl di 0.5 mM/0.5 mM bio-11-dUTP/dTTP
- 10 µl di 0.1 M β-Mercaptoetanolo
- 2 µl di DNA polimerasi: (5u/µl)
- 20 µl di DNaseI (da 1mg/ml (2U/µl): diluire 1 µl in 1ml di H₂O al momento)
- Aggiungere H₂O fino a 100 µl.

La purezza del DNA e' molto importante per la buona riuscita della marcatura. La DNase va dosata in modo da avere frammenti di circa 2-300 bp.

Si incuba a 15°C per 2 ore, poi, si aggiungono 11µl di EDTA 0.5 M (per bloccare l'azione endonucleasica della DNase).

6.11.1.1 Precipitazione della sonda

(Le indicazioni sono per un vetrino)

Si prende la quantita' appropriata di sonda (nel caso di sonde alfoidi si precipitano circa 50 ng). Si aggiungono 3 µg di SSD (salmon sperm DNA) da 1 µg/µl, 1/10 vol. NaAc 3M e 3 vol. EtOH (freddo a -20°C). Si pone l'ependorf per 15' a -80°C, si centrifuga per 15' a +4°C e si asciuga in Savant.

6.11.1.2 Pretrattamento del vetrino

Preparare i vetrini coprioggetto facendo cadere 2-3 gocce della sospensione di cellule su un vetrino pulito con metanolo e acido acetico in un rapporto 3:1. Una volta asciugati, i vetrini possono essere riscaldati in stufa a 80°C per 1-2 ore.

Si incubano i vetrini per 30' a 37°C in 0.005% pepsina/0.01 M HCl (la concentrazione dello stock della pepsina e' del 10% in H₂O).

Si lavano con 1xPBS. Si fa avvenire un prelavaggio 5' a t.a. in una soluzione di postfissazione (100ml : 10ml 10xPBS + 10ml 0.5 M MgCl₂ + 80ml H₂O) e poi un successivo lavaggio 5' a t.a. in 4% paraformaldeide (100ml : 10ml 10xPBS + 10ml 0.5 M MgCl₂ + 30ml H₂O + 50ml 8%PFA).

Si lavano con 1xPBS 5' a t.a. Si deidratano in alcool 70%, 90%, 100% (-20°C) e si lasciano asciugare i vetrini all'aria.

6.11.1.3 Denaturazione dei vetrini

Si preriscaldano i vetrini su un termoblock a 65°C. Si aggiungono su ogni vetrino 200 µl di formamide deionizzata al 70%, 2x SSC e si denatura ad 80°C per 2'. Si disidratano i vetrini per 3' in alcool 70%, 90%, 100% (-20°C); si lasciano asciugare i vetrini all'aria.

6.11.1.4 Ibridazione

La mix di ibridazione va aggiunta alla eppendorf che contiene la sonda precipitata. La mix di ibridazione (10µl) per un singolo vetrino e' composta da:

5 µl formamide deionizzata (c.f. 50%);

4 µl dextran-solfato 25% in H₂O (autoclavato);

1 µl 20xSSC.

Si denatura la mix a 80°C per 8' in bagnomaria. Poi si pone la provetta per pochi minuti in ghiaccio. Si mettono i 10 µl sul vetrino, si copre con coprioggetto 24x24 e si sigilla con Rubber Cement. Si incuba ON a 37°C.

6.11.1.5 Risciacqui

Si possono usare due tipi di stringenza: standard (o alta) e bassa.

Per l'alta si risciacquano i vetrini

5' per 3 volte in una sol. 50% formamide/2xSSC a 42°C,

5' per 3 volte in 0.1xSSC a 60°C.

Per la bassa stringenza, invece: si risciacquano i vetrini per

5' per 3 volte in una soluzione al 50% formamide/2xSSC a 37°C,

5' per 3 volte in 2xSSC a 42°C.

6.11.1.6 Bloccaggio

Si incuba 30' a 37°C in 3% BSA/4xSSC/0.1% Tween 20 (200 µl per vetrino).

6.11.1.7 Detection

Per ogni vetrino si aggiungono 200 µl di soluzione di detection (4xSSC/1%BSA/0.1Tween 20) e, per le marcature in biotina, si diluiscono avidina-FITC o avidina-Cy3 in rapporto 1:300. Si incuba a 37°C per 30'.

6.11.1.8 Risciacqui

Si risciacquano i vetrini 5' per 3 volte a 42°C in 4xSSC/0.1% Tween 20.

6.11.1.9 Colorazione con DAPI

Si colora per 5' in DAPI in 2xSSC. Si monta in antifade (30 µl circa) e si conserva a +4°C al buio. ANTIFADE (x 10 ml): 0.233 g DABCO, 800 µl H₂O, 200 µl 1M Tris-HCl, 9 ml glicerolo.

6.11.2 OSSERVAZIONE DEI VETRINI

L'analisi delle immagini di ibridazione *in situ* e' stata fatta collegando il microscopio a fluorescenza con un apparecchio molto sofisticato denominato CCD. Camera (Charge Couple Device). Questo e' un rivelatore del segnale luminoso che possiede una sensibilita' molto alta (dell'ordine di 50000 Asa) e che e', quindi, capace di rilevare anche deboli segnali luminosi, altrimenti difficilmente osservabili. Questo strumento viene collegato all'uscita fotografica del microscopio. Le immagini digitalizzate vengono trasmesse ad un computer grafico provvisto di un monitor ad altissima risoluzione. Dal momento che i cromosomi e le sonde sono evidenziati con fluorocromi diversi, e' necessario usare filtri appropriati. Ognuna delle immagini e' registrata singolarmente dal computer, in scala di grigi, ed in un secondo momento e' possibile poi sovrapporle per avere una visione unitaria dell'ibridazione. Con il software grafico di cui disponiamo e' stato inoltre possibile migliorare la qualita' delle immagini, andando ad operare sul contrasto dell'immagine e sulla stessa scelta dei colori che sono infatti pseudocolori.

6.12 PRINS (Primed *In situ*)

Questa tecnica permette di rilevare la presenza di una data sequenza di DNA direttamente su preparati metafasici, usando una coppia di primers specifica. Il principio alla base della PRINS consiste nella possibilita' che i primers, legandosi a sequenze specifiche del cromosoma denaturato, possano essere utilizzati dalla Taq Polimerasi per la sintesi di una nuova strand di DNA avendo come stampo proprio il DNA cromosomico. Durante la polimerizzazione la Taq incorpora un nucleotide coniugato con la biotina perciò, al termine della reazione, la presenza di una data sequenza puo' essere rilevata tramite una semplice detection e visione del vetrino al microscopio a fluorescenza. La PRINS e' una tecnica molto sensibile.

Sul vetrino, deidratato con le stesse modalita' valide per la FISH, sono posti 50 µl di mix avente la seguente composizione:

REAGENTI	C_f
10xPCR buffer	1x
MgCl ₂	1.5mM
dGTP	200µM
dTTP	200µM
dCTP	200µM
dATP	150µM
biotina-dATP	50µM
α27-α30	6µM
Taq polimerasi	2 U

Si copre il vetrino con un coprioggetto 24x50, si sigilla con Rubber Cement e si denatura, su piastra, per 5' a 94°C. Si trasferisce, poi, il vetrino in una camera umida preriscaldata e si incuba a 65°C per 30'. Al termine, si pone il vetrino in una soluzione (50 mM NaCl, 50 mM EDTA pH = 8) a 65°C per 5', per bloccare la reazione.

Si lava il vetrino 5' per 3 volte in 0.1xSSC a 65°C e 5' per 2 volte in 4xSSC/0.1% Tween 20 a RT. Si procede, infine, con le stesse operazioni valide per la FISH dal bloccaggio in poi.

6.13.1 MICRODISSEZIONE

6.13.1.1 Preparazione dei microaghi

I microaghi si preparano a partire da un tubo capillare di vetro borosilicato usando un Pipette Puller verticale standard. L'intervallo di calore, il tempo di caduta e il settaggio del solenoide sono aggiustati empiricamente fino ad ottenere un ago di appropriate dimensioni.

Gli aghi successivamente vengono trattati con UV in un UVcrosslinker.

6.13.1.2 Dissezione del DNA cromosomico

Si preparano i vetrini coprioggetto facendo cadere 2-3 gocce della sospensione di cellule su un vetrino pulito con metanolo e acido acetico in un rapporto 3:1. Una volta asciugati, i vetrini possono essere riscaldati in stufa a 80°C per 1-2 ore e quindi bandeggiati in soluzione salina bilanciata al 2% GIEMSA dopo essere stati trattati con la tripsina 0.25% diluita 1/10.

Si monta il vetrino coprioggetto bandato G sul tavolino ruotante e si localizzano le metafasi a basso ingrandimento, quindi si passa ad un obiettivo con ingrandimento maggiore per identificare i cromosomi da dissezionare e si ruota il piatto rotante in modo da orientare il vetrino in posizione verticale al centro del campo visivo.

S'inscrive un ago da microdissezione nel micromanipolatore e si posiziona la punta dell'ago verso il centro del campo posizionandolo in direzione del cromosoma bersaglio.

Si striscia lentamente la punta attraverso la regione cromosomica con piccoli movimenti del micromanipolatore. Si solleva l'ago e si stacca dal supporto.

Si trasferiscono i frammenti cromosomici microdissezionati in un tubo da PCR contenente 5µl di una "goccia da collezione" (GC) inserendo la punta dell'ago nella GC.

S'inscrive un altro ago nel micromanipolatore per raccogliere un numero sufficiente di frammenti cromosomici, da 10 a 20.

GC

40 mM Tris-Hcl, pH7.5

20 mM MgCl₂,

50 mM NaCl

200 µM dNTP

5 pmol primer DOP (CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG), (Telënus et al., '92).

6.13.2 AMPLIFICAZIONE ENZIMATICA **CATALIZZATA DA SEQUENASE E TAQ** **POLIMERASE**

Si copre la GC con una goccia d'olio minerale e riscaldare a 94°C per 5'.

Si effettua una prima PCR iniziale di 6 cicli con denaturazione a 94°C per 1', annealing a 30°C per 1' ed estensione a 37°C per 3' aggiungendo a ciascun ciclo circa 0.3 unita' di DNA polimerase T7 diluita 1:8 in un tampone di diluizione, mentre 0.3µl (1.6U/µl) sono aggiunti ai 5µl della miscela di reazione (SEQUENASE version 2.0, USB Amersham).

Si aggiunge alla GC, dopo questa prima PCR, una miscela di reazione per PCR di 45 µl contenente:

200 µM dNTP
100 pmol DOP primer
10 mM Tris-HCl pH 8.3
1.5mM MgCl₂
50mM KCl
1.25U Taq DNA polimerase.

Si denatura a 94°C per 3' e si procede per altri 30 cicli:

94°C per 1',

annealing a 56°C per 1',

estensione a 72°C per 3' con una estensione finale a 72°C per 5'.

Questo prodotto di PCR iniziale si sottopone ad ulteriore amplificazione e viene marcato per essere ibridato su vetrino come controllo e successivamente si clona (cfr).

BIBLIOGRAFIA

- Albertson, D.G. and J.N. Thomson. 1982. The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* 86 : 409-28.
- Alexandre, C., D.A. Miller, A.R. Mitchell, D.A. Warburton, S.L. Gersen, C. Disteche, and O.J. Miller . 1987. p82H identifies sequences at every human centromere. *Hum.Genet.* 77: 46-50.
- Alexandrov, I.A., T.D. Mashkova, T.A. Akopain, L.I. Medvedev, L.L. Kisselev, S.P. Mitkevich, and Y.B. Yurov . 1991. Chromosome-specific alpha satellites: two distinct families on human chromosome 18. *Genomics* 11: 15-23.
- Alexandrov, I.A., L.I. Medvedev, T.D. Mashkova, L.L. Kisselev, L.Y. Romanova, and Y.B. Yurov . 1993. Definition of a new alpha satellite suprachromosomal family characterized by monomeric organization. *Nucleic Acids Res.* 21: 2209-2215.
- Alexandrov, I.A., L.I. Medvedev, S.P. Mitkevich, and Y.B. Yurov . 1989. Molecular and cytogenetic characterization of alpha satellite suprachromosomal family located mainly in chromosomes 2,4,8,9,13,14,15,18,20,21,22. *Cytogenet.Cell Genet.* 51: 949-950.
- Allshire, R.C. 1997. Centromeres, checkpoints and chromatid cohesion. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 7: 264-273.
- Ananiev, E.V., R.L. Phillips, and H.W. Rines . 1998. Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* 149: 2025-37.
- Anapol, F. and J.G. Fleagle . 1988. Fossil platyrrhine forelimb bones from the early miocene of Argentina. *Am J Phys Anthropol* 76: 417-28.
- Archidiacono, N., R. Antonacci, R. Marzella, P. Finelli, A. Lonoce, and M. Rocchi . 1995. Comparative mapping of human alphoid sequences in great apes using fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 25: 477-484.
- Archidiacono, N., R. Marzella, P. Finelli, R. Antonacci, C. Jones, and M. Rocchi . 1994. Characterization of chimpanzee-hamster hybrids by chromosome painting. *Somat Cell Mol Genet* 20: 439-442.
- Baldini, A., D.A. Miller, V. Shridhar, M. Rocchi, O.J. Miller, and D.C. Ward . 1991. Comparative mapping of a gorilla-derived alpha satellite DNA clone on great ape and human chromosomes. *Chromosoma* 101: 109-114.
- Baldini, A., T. Ried, V. Shridhar, K. Ogura, L. D'Aiuto, M. Rocchi, and D.C. Ward . 1993. An alphoid DNA sequence conserved in all human and great ape chromosomes: evidence for ancient centromeric sequences at human chromosomal regions 2q21 and 9q13. *Hum. Genet.* 90: 577-583.
- Baldini, A., D.I. Smith, M. Rocchi, O.J. Miller, and D.A. Miller . 1989. A human alphoid DNA clone from the EcoRI dimeric family: genomic and internal organization and chromosomal assignment. *Genomics* 5: 822-828.

- Barry, A.E., M. Bateman, E.V. Howman, M.R. Cancilla, K.M. Tainton, D.V. Irvine, R. Saffery, and K.H. Choo . 2000. The 10q25 Neocentromere and its Inactive Progenitor Have Identical Primary Nucleotide Sequence: Further Evidence for Epigenetic Modification. *Genome Res* 10: 832-838.
- Barry, A.E., E.V. Howman, M.R. Cancilla, R. Saffery, and K.H.A. Choo . 1999. Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere. *Hum. Mol. Genet.* 8: 217-227.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science* 151: 417-25.
- Buchwitz, B.J., K. Ahmad, L.L. Moore, M.B. Roth, and S. Henikoff . 1999. A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* 401: 547-8.
- Choo, K.H. 2000. Centromerization. *Trends Cell Biol* 10: 182-188.
- Choo, K.H. 1998. Why is the centromere so cold? *Genome Res* 8: 81-2.
- Choo, K.H.A. 1997a: The centromere. Oxford University Press.
- Choo, K.H.A. 1997b. Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am.J.Hum.Genet.* 61: 1225-1233.
- Clarke, L. 1998. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 8: 212-8.
- CSHL/WUGSC/PEB Arabidopsis Sequencing Consortium 2000. The complete sequence of a heterochromatic island from a higher eukaryote. The Cold Spring Harbor Laboratory, Washington University Genome Sequencing Center, and PE Biosystems Arabidopsis Sequencing Consortium. *Cell* 100: 377-86.
- Csink, A.K. and S. Henikoff . 1998. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet.* 14: 200-204.
- Cummings, L.M., J.M. Trent, and D.A. Marchuk . 1996. Identification and mapping of type 1 neurofibromatosis (NF1) homologous loci. *Cytogenet.Cell Genet.* 73: 334-340.
- Dernburg, A.F., J.W. Sedat, and R.S. Hawley . 1996. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* 86: 135-46.
- du Sart, D., M.R. Cancilla, E. Earle, J. Mao, R. Saffery, K.M. Tainton, P. Kalitsis, J. Martin, A.E. Barry, and K.H.A. Choo . 1997. A functional neo centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nature Genet.* 16: 144-153.
- DuPraw, E.J. (1968): Cell and Molecular Biology. Accademic Press, New York.
- Earle, E., A. Saxena, A. MacDonald, D.F. Hudson, L.G. Shaffer, R. Saffery, M.R. Cancilla, S.M. Cutts, E. Howman, and K.H. Choo . 2000. Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres and neocentromeres at metaphase. *Hum Mol Genet* 9: 187-194.
- Eichler, E.E. 1998. Masquerading repeats: paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res* 8: 8: 758-62.

- Eichler, E.E. 1999b. Repetitive conundrums of centromere structure and function. *Hum. Mol. Genet.* 8: 151-155.
- Eichler, E.E., N. Archidiacono, and M. Rocchi . 1999a. CAGGG Repeats and the Pericentromeric Duplication of the Hominoid Genome. *Genome Res* 9: 1048-1058.
- Eichler, E.E., M. Budarf, M. Rocchi, L. Deaven, N. Doggett, A. Baldini, D.L. Nelson, and H.W. Mohrenweiser . 1997. Interchromosomal duplication of the Adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentric plasticity. *Hum. Mol. Genet.* 6: 991-1002.
- Eichler, E.E., F. Lu, Y. Shen, R. Antonacci, V. Jurecic, N.A. Doggett, R.K. Moyzis, A. Baldini, R.A. Gibbs, and D.L. Nelson . 1996. Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum Mol Genet* 5: 899-912.
- Finelli, P., R. Antonacci, R. Marzella, A. Lonoce, N. Archidiacono, and M. Rocchi . 1996. Structural organization of multiple alphoid subsets coexisting on human chromosomes 1, 4, 5, 7, 9, 15, 18, and 19. *Genomics* 38: 325-330.
- Forozan, F., ..., and O.-P. Kallioniemi . 1997. Genome screening by comparative genome hybridization. *Trends Genet.* 13: 405-409.
- Fransz, P.F., S. Armstrong, J.H. de Jong, L.D. Parnell, C. van Drunen, C. Dean, P. Zabel, T. Bisseling, and G.H. Jones . 2000. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* 100: 367-76.
- Fukagawa, T., C. Pendon, J. Morris, and W. Brown . 1999. CENP-C is necessary but not sufficient to induce formation of a functional centromere. *EMBO J* 18: 4196-209.
- Gaff, C., D. du Sart, R. Iannello, A. Nagy, and K.H.A. Choo . 1994. A novel nuclear protein binds centromeric alpha satellite DNA. *Hum.Mol.Genet.* 3: 711-716.
- Garrick, D., S. Fiering, D.I. Martin, and E. Whitelaw . 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals . *Nat Genet* 18: 56-9.
- Gondo, Y., T. Okada, N. Matsuyama, Y. Saitoh, Y. Yanagisawa, and J.E. Ikeda . 1998. Human megasatellite DNA RS447: copy-number polymorphisms and interspecies conservation. *Genomics* 54: 39-49.
- Grady, D.L., R.L. Ratliff, D.L. Robinson, E.C. McCanlies, J. Meyne, and R.K. Moyzis . 1992. Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 1695-1699.
- Griffin, D.K., F. Haberman, J. Masabanda, P. O'Brien, M. Bagga, A. Sazanov, J. Smith, D.W. Burt, M. Ferguson-Smith, and J. Wienberg . 1999. Micro- and macrochromosome paints generated by flow cytometry and microdissection: tools for mapping the chicken genome. *Cytogenet Cell Genet* 278-281.
- Gruss, P. and G. Sauer . 1975. Repetitive primate DNA containing the recognition sequences for two restriction endonucleases which generate cohesive ends. *FEBS Lett* 60. 60: 85-8.

- Guy, J., C. Spalluto, A. McMurray, T. Hearn, M. Crosier, L. Viggiano, V. Miolla, N. Archidiacono, M. Rocchi, C. Scott, P.A. Lee, J. Sulston, J. Rogers, D. Bentley, and M.S. Jackson . 2000. Genomic sequence and transcriptional profile of the boundary between pericentromeric satellites and genes on human chromosome arm 10q. *Hum Mol Genet* 9: 2029-2042.
- Haaf, T., A.G. Mater, J. Wienberg, and D.C. Ward . 1995. Presence and abundance of CENP-B box sequences in great ape subsets of primate-specific alpha-satellite DNA. *J.Mol.Evol.* 41: 487-491.
- Haaf, T. and H.F. Willard. 1997. Chromosome-specific alpha-satellite DNA from the centromere of chimpanzee chromosome 4. *Chromosoma* 106: 226-232.
- Haaf, T. and H.F. Willard . 1998. Orangutan alpha-satellite monomers are closely related to the human consensus sequence. *Mamm. Genome* 9: 440-447.
- He, D., C. Zeng, K. Woods, L. Zhong, D. Turner, R.K. Busch, B.R. Brinkley, and H. Busch . 1998. CENP-G: a new centromeric protein that is associated with the alpha-1 satellite DNA subfamily. *Chromosoma* 107: 189-97.
- Henikoff, S. 2000b. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* 1470: O1-8.
- Henikoff, S., K. Ahmad, J.S. Platero, and B. van Steensel. 2000a. Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 716-21.
- Henikoff, S. and M.A. Matzke . 1997. Exploring and explaining epigenetic effects . *Trends Genet* 13 : 293-5.
- Hennig, W. 1999. Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9.
- Holmquist, G.P., V.V. Kapitonov, and J. Jurka . 1998. Mobile genetic elements, chiasmata, and the unique organization of beta-heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* 80: 113-6.
- Horvath, J.E., S. Schwartz, and E.E. Eichler . 2000b. The Mosaic Structure of Human Pericentromeric DNA: A Strategy for Characterizing Complex Regions of the Human Genome. *Genome Res* 10: 839-852.
- Horvath, J.E., L. Viggiano, B.J. Loftus, M.D. Adams, N. Archidiacono, M. Rocchi, and E.E. Eichler . 2000a. Molecular structure and evolution of an alpha satellite/non-alpha satellite junction at 16p11. *Hum. Mol. Genet.* 9: 113-123.
- Howman, E.V., K.J. Fowler, A.J. Newson, S. Redward, A.C. MacDonald, P. Kalitsis, and K.H. Choo . 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1148-53.
- Ijdo, J.W., A. Baldini, D.C. Ward, S.T. Reeders, and R.A. Wells . 1991. Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9051-9055.
- Jackson, M.S., S.E. Mole, and B.A.J. Ponder . 1992. Characterisation of a Boundary Between Satellite-III and Alphoid Sequences on Human Chromosome-10. *Nucleic Acids Res.* 20: 4781-4787
- Jackson, M.S., M. Rocchi, G. Thompson, T. Hearn, M. Crosier, J. Guy, D. Kirk, L. Mulligan, A. Ricco, S. Piccininni, R. Marzella, L. Viggiano, and N. Archidiacono . 1999. Sequences flanking the centromere of human chromosome 10 are a complex patchwork of arm-specific sequences, stable duplications and

- unstable sequences with homologies to telomeric and other centromeric locations. *Hum. Mol. Genet.* 8: 205-215.
- Jackson, M.S., C.G. See, L.M. Mulligan, and B.F. Lauffart . 1996. A 9.75Mb map across the centromere of human chromosome 10. *Genomics* 33: 258-270.
- Jackson, M.S., P. Slijepcevic, and B.A.J. Ponder . 1993. The Organisation of Repetitive Sequences in the Pericentromeric Region of Human Chromosome 10. *Nucleic Acids Res.* 21: 5865-5874.
- Jauch, A., J. Wienberg, R. Stanyon, N. Arnold, S. Tofaneli, T. Ishida, and T. Cremer . 1992. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 8611-8615.
- Ji, Y., E.E. Eichler, S. Schwartz, and R.D. Nicholls . 2000. Structure of Chromosomal Duplicons and their Role in Mediating Human Genomic Disorders. *Genome Res* 10: 597-610.
- Johnson, D.H., P.M. Kroisel, H.J. Klapper, and W. Rosenkranz . 1992. Microdissection of a human marker chromosome reveals its origin and a new family of centromeric repetitive DNA [see comments]. *Hum.Mol.Genet.* 1: 741-747.
- Jorgensen, A.L., C.J. Bostock, and A.L. Bak . 1987. Homologous subfamilies of human alphoid repetitive DNA on different nucleolus organizing chromosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 1075-1079.
- Jorgensen, A.L., H.B. Laursen, C. Jones, and A.L. Bak . 1992. Evolutionarily different alphoid repeat DNA on homologous chromosomes in human and chimpanzee. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 3310-3314.
- Karpen, G.H. and R.C. Allshire . 1997. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 13: 489-496.
- Koch, J. 2000. Neocentromeres and alpha satellite: a proposed structural code for functional human centromere DNA. *Hum Mol Genet* 9: 149-154.
- Koop, B.F., M. Goodman, P. Xu, K. Chan, and J.L. Slightom . 1986. Primate eta-globin DNA sequences and man's place among the great Apes. *Nature* 319: 234-238.
- Laurent, A.M., J. Puechberty, and G. Roizes . 1999. Hypothesis: for the worst and for the best, L1Hs retrotransposons actively participate in the evolution of the human centromeric alphoid sequences. *Chromosome Res* 7: 305-17.
- Laursen, H.B., A.L. Jorgensen, C. Jones, and A.L. Bak . 1992. Higher Rate of Evolution of X-Chromosome alpha-Repeat DNA in Human Than in the Great Apes. *EMBO J.* 11: 2367-2372.
- Lee, C., R. Stanyon, C.C. Lin, and M.A. Ferguson-Smith . 1999. Conservation of human gamma-X centromeric satellite DNA among primates with an autosomal localization in certain Old World monkeys. *Chromosome Res* 7: 43-7.
- Lee, C., R. Wevrick, R.B. Fisher, M.A. Ferguson-Smith, and C.C. Lin . 1997. Human centromeric DNAs. *Hum.Genet.* 100: 291-304.
- Lewin, B. 1998. The mystique of epigenetics. *Cell* 93: 301-3.

- Loftus, B.J., U.J. Kim, V.P. Sneddon, F. Kalush, R. Brandon, J. Fuhrmann, T. Mason, M.L. Crosby, M. Barnstead, L. Cronin, A. Deslattes Mays, Y. Cao, R.X. Xu, H.L. Kang, S. Mitchell, E.E. Eichler, P.C. Harris, J.C. Venter, and M.D. Adams . 1999. Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q. *Genomics* 60: 295-308.
- Luijten, M., Y. Wang, B.T. Smith, A. Westerveld, L.J. Smink, I. Dunham, B.A. Roe, and T.J. Hulsebos . 2000. Mechanism of spreading of the highly related neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogenes on chromosomes 2, 14 and 22. *Eur J Hum Genet* 8: 209-14.
- Maio, J.J. 1971. DNA strand reassociation polyribonucleotide binding in African green monkey, *Cercopithecus aethiops*. *J. Mol. Biol.* 56: 579-595.
- Manuelidis, L. 1978. Chromosomal location of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma* 66: 23-32.
- Manuelidis, L. 1978. Complex and simple sequences in human repeated DNAs. *Chromosoma* 66: 1-21.
- Manuelidis, L. 1980. Novel classes of mouse repeated DNAs. *Nucleic Acids Res* 8: 3247-58.
- Manuelidis, L. 1976. Repeating restriction fragments of human DNA. *Nucleic Acids Res* 3: 3063-76.
- Manuelidis, L. and J.C. Wu . 1978. Homology between human and simian repeated DNA. *Nature* 276: 92-4.
- Marcais, B., M. Bellis, A. Gerard, M. Pages, Y. Boublik, and G. Roizes . 1991. Structural organization and polymorphism of the alpha satellite DNA sequences of chromosomes 13 and 21 as revealed by pulse field gel electrophoresis. *Hum.Genet.* 86: 311-316.
- Marcais, B., J.P. Charlieu, B. Allain, E. Brun, M. Bellis, and G. Roizes . 1991. On the mode of evolution of alpha satellite DNA in human populations. *J.Mol.Evol.* 33: 42-48.
- Marcais, B., A. Gerard, M. Bellis, and G. Roizes . 1991. TaqI reveals two independent alphoid polymorphisms on human chromosomes 13 and 21. *Hum.Genet.* 86: 307-310.
- Mashkova, T., N. Oparina, I. Alexandrov, O. Zinovieva, A. Marusina, Y. Yurov, M.H. Lacroix, and L. Kisselev . 1998. Unequal cross-over is involved in human alpha satellite DNA rearrangements on a border of the satellite domain. *FEBS Lett* 441: 451-7.
- Murphy, T.D. and G.H. Karpen . 1998. Centromeres take flight: alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell* 93: 317-20.
- Musich, P.R., F.L. Brown, and J.J. Maio . 1980. Highly repetitive component alpha and related alphoid DNAs in man and monkeys. *Chromosoma* 80: 331-48.
- O'Brien, S.J. and et al. 1993. Anchored reference loci for comparative mapping in mammals. *Nature Genet.* 3: 103-112.
- Pidoux, A.L. and R.C. Allshire . 2000. Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol* 12: 308-19.
- Popescu, N.C. and J.A. DiPaolo . 1979. Heterogeneity of constitutive heterochromatin in somatic Syrian hamster chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 24: 53-60.

- Purandare, S.M., H. Huntsman Breidenbach, Y. Li, X.L. Zhu, S. Sawada, S.M. Neil, A. Brothman, R. White, R. Cawthon, and D. Viskochil . 1995. Identification of neurofibromatosis 1 (NF1) homologous loci by direct sequencing, fluorescence in situ hybridization, and PCR amplification of somatic cell hybrids. *Genomics* 30: 476-85.
- Rattner, J.B. 1991. The structure of the mammalian centromere. *Bioessays* 13: 51-56.
- Regnier, V., M. Meddeb, G. Lecointre, F. Richard, A. Duverger, V.C. Nguyen, B. Dutrillaux, A. Bernheim, and G. Danglot . 1997. Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition. *Hum Mol Genet* 6: 9-16.
- Richards, E.J. and R.K. Dawe . 1998. Plant centromeres: structure and control. *Curr Opin Plant Biol* 1: 130-5.
- Rieder, C.L. and E.D. Salmon . 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 8: 310-8.
- Romanova, L.Y., G.V. Deriagin, T.D. Mashkova, I.G. Tumeneva, A.R. Mushegian, L.L. Kisselev, and I.A. Alexandrov . 1996. Evidence for selection in evolution of alpha satellite DNA: the central role of CENP-B/pJa binding region. *J.Mol.Biol.* 261: 334-340.
- Rosenberg, H., M. Singer, and M. Rosenberg . 1978. Highly reiterated sequences of simian. *Science* 200: 394-402.
- Rosenberg, M., S. Segal, E.L. Kuff, and M.F. Singer . 1977. The nucleotide sequence of repetitive monkey DNA found in defective simian virus 40. *Cell* 11: 845-57.
- Round, E.K., S.K. Flowers, and E.J. Richards . 1997. *Arabidopsis thaliana* centromere regions: genetic map positions and repetitive DNA structure [see comments]. *Genome Res* 7: 1045-53.
- Saffery, R., E. Earle, D.V. Irvine, P. Kalitsis, and K.H. Choo . 1999. Conservation of centromere protein in vertebrates. *Chromosome Res* 7: 261-5.
- Schaar, B.T., G.K. Chan, P. Maddox, E.D. Salmon, and T.J. Yen . 1997. CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J Cell Biol* 139: 1373-82.
- Seuanez, H.N., H.J. Evans, D.E. Martin, and J. Fletcher . 1979. An inversion of chromosome 2 that distinguishes between Bornean and Sumatran orangutans. *Cytogenet Cell Genet* 23: 137-40.
- Smit, A.F. and A.D. Riggs . 1996. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1443-8.
- Strachan, T. and Read, A.P. (1999): *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Sugata, N., E. Munekata, and K. Todokoro . 1999. Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H. *J Biol Chem* 274: 27343-6.

- Sullivan, B.A., L.S. Jenkins, E.M. Karson, J. Leana-Cox, and S. Schwartz . 1996. Evidence for structural heterogeneity from molecular cytogenetic analysis of dicentric Robertsonian translocations. *Am J Hum Genet* 59: 167-75.
- Sun, X.P., J. Wahlstrom, and G. Karpen . 1997. Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91: 1007-1019.
- Tagarro, I., A.M. Fernandez-Peralta, and J.J. Gonzalez-Aguilera . 1994. Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum Genet* 93: 383-8.
- Tagarro, I., J. Wiegant, A.K. Raap, J.J. Gonzalez-Aguilera, and A.M. Fernandez-Peralta . 1994. Assignment of human satellite 1 DNA as revealed by fluorescent in situ hybridization with oligonucleotides. *Hum Genet* 93: 125-8.
- Telenius, H., N.P. Carter, C.E. Bebb, M. Nordenskjold, B.A. Ponder, and A. Tunnacliffe . 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-25.
- Trask, B.J., C. Friedman, A. Martin-Gallardo, L. Rowen, C. Akinbami, J. Blankenship, C. Collins, D. Giorgi, S. Iadonato, F. Johnson, W.L. Kuo, H. Massa, T. Morrish, S. Naylor, O.T. Nguyen, S. Rouquier, T. Smith, D.J. Wong, J. Youngblom, and G. van den Engh . 1998a. Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 7: 13-26.
- Trask, B.J., H. Massa, V. Brand-Arpon, K. Chan, C. Friedman, O.T. Nguyen, E. Eichler, G. van den Engh, S. Rouquier, H. Shizuya, and D. Giorgi . 1998b. Large multi-chromosomal duplications encompass many members of the olfactory receptor gene family in the human genome. *Hum Mol Genet* 7: 2007-20.
- Tunnacliffe, A., M.S. Jackson, E. Gardner, D.R. Love, J.K. Moore, S.E. Mole, L.M. Mulligan, A. Graham, G. Finocchiaro, S. Orstavik, et al . 1994. A multiple interval physical map of the pericentromeric region of human chromosome 10. *Hum Genet* 93: 313-8.
- Tunnacliffe, A., L. Liu, J.K. Moore, M.A. Leversha, M.S. Jackson, L. Papi, M.A. Ferguson-Smith, H.J. Thiesen, and B.A. Ponder . 1993. Duplicated KOX zinc finger gene clusters flank the centromere of human chromosome 10: evidence for a pericentric inversion during primate evolution. *Nucleic Acids Res* 21: 1409-17.
- Tyler-Smith, C., G. Gimelli, S. Giglio, G. Floridia, A. Pandya, G. Terzoli, P.E. Warburton, W.C. Earnshaw, and O. Zuffardi . 1999. Transmission of a fully functional human neocentromere through three generations [In Process Citation]. *Am J Hum Genet* 64: 1440-4.
- Vissel, B. and K.H. Choo . 1991. Four distinct alpha satellite subfamilies shared by human chromosomes 13, 14 and 21. *Nucleic Acids Res.* 19: 271-277.
- Wahls, W.P., L.J. Wallace, and P.D. Moore . 1990. Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell* 60: 95-103.
- Wallrath, L.L. 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* 8: 147-53.
- Wandall, A., L. Tranebjaerg, and N. Tommerup . 1998. A neocentromere on human chromosome 3 without detectable alpha- satellite DNA forms morphologically normal kinetochores. *Chromosoma* 107: 359-65.

- Warburton, P.E., M. Dolled, R. Mahmood, A. Alonso, S. Li, K. Naritomi, T. Tohma, T. Nagai, T. Hasegawa, H. Ohashi, L.C. Govaerts, B.H. Eussen, J.O. Van Hemel, C. Lozzio, S. Schwartz, J.J. Dowhanick-Morrisette, N.B. Spinner, H. Rivera, J.A. Crolla, C.y. Yu, and D. Warburton . 2000. Molecular Cytogenetic Analysis of Eight Inversion Duplications of Human Chromosome 13q That Each Contain a Neocentromere. *Am J Hum Genet* 66: 1794-1806.
- Warburton, P.E., T. Haaf, J. Gosden, D. Lawson, and H.F. Willard . 1996. Characterization of a chromosome specific chimpanzee alpha satellite subset: evolutionary relationship to subsets on human chromosomes. *Genomics* 33: 220-228.
- Warburton, P.E. and Willard, H.F. (1996): Evolution of centromeric alpha satellite DNA. In: *Human Genome Evolution*. Edited by M.S. Jackson, et al, pp. 121-145. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Warburton, P.E. and H.F. Willard . 1995. Interhomologue sequence variation of alpha satellite DNA from human chromosome 17: evidence for concerted evolution along haplotypic lineages. *J.Mol.Evol.* 41: 1006-1015.
- Waye, J.S. and H.F. Willard . 1986. Structure, organization, and sequence of alpha satellite DNA from human chromosome 17: evidence of evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome. *Mol.Cell.Biol.* 6: 3156-3165.
- Wiens, G.R. and P.K. Sorger . 1998. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 93: 313-6.
- Willard, H.F. and J.S. Waye . 1987a. Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J.Mol.Evol.* 25: 207-214.
- Willard, H.F. and J.S. Waye . 1987b. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet.* 3: 192-198.
- Wu, J.C. and L. Manuelidis . 1980. Sequence definition and organization of a human repeated DNA. *J Mol Biol* 142: 363-86.
- Yang, J.W., C. Pendon, J. Yang, N. Haywood, A. Chand, and W.R.A. Brown . 2000. Human mini-chromosomes with minimal centromeres . *Hum Mol Genet* 9: 1891-902.
- Yoda, K., S. Ando, S. Morishita, K. Houmura, K. Hashimoto, K. Takeyasu, and T. Okazaki . 2000. Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7266-71.
- Yu, H.G., E.N. Hiatt, A. Chan, M. Sweeney, and R.K. Dawe . 1997. Neocentromere-mediated chromosome movement in maize. *J Cell Biol* 139: 831-40.
- Yunis, J.J. and O. Prakash . 1982. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 215: 1525-1530.

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI

J. Guy, C. Spalluto, A. McMurray, T. Hearn, M. Crosier, L. Viggiano, V. Miolla, N. Archidiacono, M. Rocchi, C. Scott, P.A. Lee, J. Sulston, J. Rogers, D. Bentley and M. S. Jackson. Genomic sequence and transcriptional profile of the boundary between pericentromeric satellites and genes on human chromosome arm 10q. *Human Molecular Genetics* 2000; 9, 2029-2042

Archidiacono N, Marzella R, Spalluto C, Pennacchia M, Viggiano L, Rocchi M. Preparation of human partial chromosome paints from somatic cell hybrids. *Methods Mol Biol.* 2000;123:3-13 *In situ Hybridization Protocols* Edited by Darby Humana Press Inc. Totowa, NJ (eds)

Vacca M, Matarazzo MR, Jones J, Spalluto C, Archidiacono N, Ma P, Rocchi M, D'Urso M, Chen EY, D'Esposito M, Mumm S. Evolution of the X-specific block embedded in the human Xq21.3/Yp11.1 homology region. *Genomics.* 1999 Dec 1;62(2):293-6.

Calamita G, Spalluto C, Mazzone A, Rocchi M, Svelto M. Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse aquaporin-8 water channel gene (Aqp8). *Cytogenet Cell Genet.* 1999;85(3-4):237-41.

Montini E, Buchner G, Spalluto C, Andolfi G, Caruso A, den Dunnen JT, Trump D, Rocchi M, Ballabio A, Franco B. Identification of SCML2, a second human gene homologous to the Drosophila sex comb on midleg (Scm): A new gene cluster on Xp22. *Genomics.* 1999 May 15;58(1):65-72.

D'Esposito M, Strazzullo M, Cuccurese M, Spalluto C, Rocchi M, D'Urso M, Ciccodicola A. Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21--q22. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;83(1-2):46-7.

Archidiacono N, Storlazzi CT, Spalluto C, Ricco AS, Marzella R, Rocchi M. Evolution of chromosome Y in primates. *Chromosoma.* 1998 Sep;107(4):241-6.

Jackson, M.S., Rocchi, M., Hearn, T., Crosier, M., Guy, J., Viggiano, L., Piccininni, S., Ricco, A., Marzella, R., Archidiacono, N., McMurray, A., Sulston, J., Rogers, J., Bentley, D. and Spalluto, C. (1999) *Am J Hum Genet*, 65 SS, A56. "Characterisation of the heterochromatin/euchromatin boundary at 10q11 and identification of novel transcripts formed by repeat-induced instability".

L.Viggiano, C.Spalluto, L.Anelli, N.Archidiacono, M.Rocchi. SECC congress, July 1999 Vienna, Austria "Alphoid sequences in chimpanzee"

C. Spalluto, J.Guy, M. Rocchi, T. Hearn, M. Crosier, L. Viggiano, S. Piccininni, A. Ricco, R. Marzella, N. Archidiacono, A. McMurray, J. Sulston, J. Rogers, D. Bentley and M.S. Jackson HUGO Human genome meeting - March 1999, Brisbane, Australia "1mb of genomic sequence spanning a human centromere/chromosome arm boundary"



THE END