

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E AMBIENTALI

Sezione di Biologia Animale "M. La Greca"

Laboratorio di Genetica

ROBERTA PICCIOTTO

**I riarrangiamenti cromosomici nell'evoluzione del
genoma dei Primati**

Tesi di dottorato

Coordinatore: Ch.ma Prof. Maria Teresa Vinciguerra

Tutor: Ch.mo Prof. Salvatore Saccone

Dottorato di ricerca in **Biologia Evoluzionistica**

XXIV ciclo

A.A. 2008÷2011

Indice

PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	5
RIASSUNTO.....	7
1. INTRODUZIONE.....	11
1.1 - I CROMOSOMI METAFASICI.....	12
1.2 – I CROMOSOMI NEI NUCLEI INTERFASICI.....	19
<i>Il nucleo cellulare.....</i>	<i>19</i>
<i>I territori cromosomici e i domini intercromosomici.....</i>	<i>21</i>
<i>Il nucleo interfaseico nei Vertebrati.....</i>	<i>28</i>
1.3 - I CROMOSOMI DEI PRIMATI	30
<i>L'evoluzione dei Primati.....</i>	<i>30</i>
<i>Il cariotipo dei Primati.....</i>	<i>32</i>
<i>Il territori cromosomici nelle cellule dei Primati.....</i>	<i>54</i>
1.4 - EFFETTO DEI RIARRANGIAMENTI SUI TERRITORI CROMOSOMICI.....	56
2. MATERIALI E METODI.....	63
2.1 – COLTURE CELLULARI	64
<i>Coltura di linfociti da sangue periferico.....</i>	<i>64</i>
<i>Coltura di cellule linfoblastoidi e linfoblastoidi.....</i>	<i>64</i>
PREPARAZIONE DI CROMOSOMI METAFASICI	65
2.2 - PREPARAZIONE DNA	67
<i>Colture batteriche.....</i>	<i>67</i>
<i>Preparazione DNA da cloni BAC.....</i>	<i>68</i>
<i>Preparazione DNA genomico.....</i>	<i>69</i>
2.3 - IBRIDAZIONE <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE	71
<i>Marcatura delle sonde.....</i>	<i>71</i>
<i>Pretrattamento dei cromosomi.....</i>	<i>72</i>
<i>Denaturazione sonda/ cromosomi e ibridazione.....</i>	<i>73</i>
<i>Rilevazione del segnale.....</i>	<i>74</i>
2.4 - LOCALIZZAZIONE INTRANUCLEARE RADIALE	78
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	81
3.1 - IL CROMOSOMA HSA9	82
<i>Localizzazione intranucleare del cromosoma HSA9.....</i>	<i>82</i>
<i>Descrizione di una inversione pericentrica del cromosoma 9.....</i>	<i>87</i>
<i>Analisi del cariotipo mediante bandeggio cromosomico.....</i>	<i>87</i>
<i>Definizione dei punti di rottura dell'inversione del cromosoma 9.....</i>	<i>90</i>
<i>Il cromosoma 9 con l'inversione pericentrica nel nucleo interfaseico.....</i>	<i>93</i>

<i>Il cromosoma HSA9 negli altri Primati</i>	95
3.2 - IL CROMOSOMA HSA16	97
<i>Localizzazione intranucleare</i>	97
<i>Il cariotipo 46,XX,inv(16)(p11.2q23.3)</i>	102
<i>Analisi dei breakpoints</i>	102
<i>Localizzazione intranucleare nel cromosoma 16 con inversione pericentrica</i>	105
<i>Effetto posizione e fenotipo patologico</i>	106
<i>Il cromosoma HSA16 negli altri Primati</i>	107
3.3 - I CROMOSOMI HSA21 E HSA22	109
<i>Definizione del punto di fusione</i>	109
<i>Analisi del cromosoma derivato</i>	115
<i>Localizzazione radiale intranucleare</i>	115
<i>La traslocazione robertsoniana</i>	117
3.4 - TRASLOCAZIONI X;AUTOSOMA	118
<i>Localizzazione intranucleare dei loci traslocati</i>	120
3.5 – LE REGIONI PERICENTROMERICHE	123
<i>Descrizione delle sonde</i>	123
<i>La posizione cromosomica in HSA e MMU delle sonde utilizzate</i>	125
<i>Localizzazione delle sonde BAC di macaca nei cromosomi di altri Primati</i>	129
<i>Localizzazione intranucleare delle regioni pericentromeriche di MMU nei Primati</i>	137
4. CONCLUSIONI	139
5. BIBLIOGRAFIA	143

Premessa e scopo del lavoro

La presente tesi descrive il lavoro da me svolto durante il triennio 2008-2011 nell'ambito del dottorato di ricerca in Biologia Evoluzionistica (XXIV ciclo). L'attività di ricerca è stata svolta nel laboratorio di Genetica del Dipartimento di Biologia Animale “*M. La Greca*” (oggi sezione del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali) dell'Università di Catania, sotto la supervisione del prof. Salvatore Saccone. Il lavoro è stato svolto in collaborazione con altri laboratori italiani tra cui quello del Prof. M. Rocchi e quello del dott. Mario Ventura dell'Università di Bari.

L'obiettivo generale del lavoro consiste nello studio della localizzazione intranucleare dei cromosomi e gli effetti che riarrangiamenti cromosomici di vario tipo potrebbero determinare a livello evolutivo. E' stata quindi analizzata la posizione intranucleare di specifici *loci* di cromosomi umani normali e di loro riarrangiamenti intraspecifici e interspecifici (all'interno dell'ordine dei Primati) per valutarne l'effetto sull'alterazione o conservazione della loro organizzazione intranucleare. Un ulteriore aspetto del lavoro ha riguardato lo studio delle regioni eucromatiche confinanti con l'eterocromatina centromerica per valutarne le caratteristiche posizionali nel nucleo di differenti specie di Primati, in particolare in quei casi in cui si siano verificati eventi di neocentromerizzazione evolutiva.

Utilizzando tecniche di citogenetica molecolare è stata studiata l'organizzazione nei nuclei interfasiche dei cromosomi umani HSA9, HSA16, HSA21 e HSA22 sia nella loro configurazione normale sia dopo eventi di traslocazione/inversione, estendendo anche lo studio ai cromosomi omologhi di altri Primati. Per quanto riguarda lo studio delle regioni pericentromeriche, sono state analizzate le regioni di confine eucromatina/eterocromatina centromerica dei cromosomi di *Macaca mulatta* e in particolare di quelle regioni associate ad eventi di “neocentromerizzazione”, un fenomeno che, quando si verifica, potrebbe determinare alterazioni della funzionalità delle regioni coinvolte, anche per riposizionamento nel nucleo dei *loci* coinvolti.

Riassunto

Il genoma umano può essere suddiviso in tre grandi compartimenti a seconda del contenuto in GC: uno ad elevata densità in GC e in geni, uno a bassa densità in GC e in geni e uno a contenuto in GC e in geni intermedio. Questi compartimenti sono visibili sia nei cromosomi metafasici che nei nuclei in interfase. Nei cromosomi metafasici i due compartimenti con composizione opposta solo raramente sono contigui. Nel nucleo in interfase queste regioni mostrano diversa localizzazione e grado di compattazione: le regioni povere in GC e in geni si localizzano verso la periferia del nucleo e mostrano una cromatina altamente compatta, le regioni ricche in GC e in geni verso il centro del nucleo e mostrano una cromatina più despiralizzata e le regioni a contenuto intermedio in GC e in geni fanno da ponte tra le due regioni del nucleo.

Il lavoro descritto nella presente tesi ha avuto come obiettivo principale la valutazione dell'effetto che i riarrangiamenti cromosomici hanno nell'alterazione o nella conservazione dell'organizzazione della cromatina all'interno del nucleo, in modo da potere definire un possibile "effetto posizione" sulla base delle caratteristiche genomiche dei *loci* interessati dal riarrangiamento. Per tale studio sono stati analizzati riarrangiamenti cromosomici, alcuni dei quali conseguenza di eventi casuali ed improvvisi osservati in individui della specie umana e altri invece conseguenti a processi più estesi nel tempo osservabili come trasformazioni evolutive di alcuni cromosomi dei Primati. Tra questi ultimi sono stati anche inclusi casi di neocentromerizzazione evolutiva, cioè eventi che hanno portato, in alcune linee evolutive, alla formazione di nuovi centromeri.

Sono stati studiati i cromosomi umani HSA9, HSA16, HSA21, HSA22 sia nella loro configurazione normale che in presenza di riarrangiamenti. In particolare sono state analizzate due inversioni pericentriche, una del cromosoma HSA9 e una del cromosoma HSA16, una traslocazione robertsoniana tra i cromosomi HSA21 e HSA22 e alcuni riarrangiamenti tra il cromosoma X e i cromosomi HSA1, HSA2 e HSA4.

I risultati ottenuti dall'analisi dei riarrangiamenti di cromosomi umani hanno indicato che traslocazioni che coinvolgono bande composizionalmente simili non mostrano significative differenze nella localizzazione intranucleare dei cromosomi derivativi, come

nel caso della traslocazione robertsoniana dove il cromosoma der(21;22) non modifica la localizzazione nucleare se confrontato con i cromosomi normali. Invece, se le traslocazioni coinvolgono bande a composizione diversa, come nel caso della traslocazione tra il cromosoma HSAX e il cromosoma HSA2, si osserva una rilocalizzazione di una delle due regioni coinvolte.

L'analisi delle varianti evolutive dei cromosomi HSA9 e HSA16 nei nuclei delle cellule di Primati non umani ha messo in evidenza che durante l'evoluzione i *loci* considerati non hanno modificato la loro localizzazione. Infatti, i *loci* del cromosoma 9 analizzati nei Primati non umani non mostrano cambiamenti di localizzazione intranucleare eccetto in rari casi dove i *loci* mostrano una localizzazione ancora più periferica rispetto al corrispettivo umano; per quanto riguarda i *loci* del cromosoma 16 si osserva che tutti si localizzano verso il centro del nucleo così come gli omologhi umani.

L'analisi delle regioni pericentromeriche del genoma di *Macaca mulatta* sia nel genoma di macaca che in quello di altri Primati compreso l'uomo ha messo in evidenza, che durante l'evoluzione, *loci* che in una specie individuano un centromero e che in altre individuano regioni eterocromatiche lungo il cromosoma non mostrano cambiamenti nella loro localizzazione nucleare (si trovano alla periferia del nucleo) in accordo con l'ipotesi che durante l'evoluzione i diversi *loci* mantengono le stesse caratteristiche funzionali. Infatti molti dei *loci* presi in considerazione sono coinvolti nella formazione di neocentromeri evolutivi.

I riarrangiamenti analizzati hanno indicato che quando le traslocazioni comportano riarrangiamenti tra regioni composizionalmente differenti si assiste ad un riposizionamento intranucleare dei *loci* coinvolti mentre, quando i riarrangiamenti avvengono tra regioni composizionalmente simili tra di loro non si osserva riposizionamento delle regioni coinvolte nel nucleo. In quest'ultimo caso, non essendo alterata la funzionalità dei geni coinvolti, le mutazioni cromosomiche con le caratteristiche suddette possono essere trasmesse alla progenie senza alcuna conseguenza nella fitness della popolazione e quindi, con il trascorrere del tempo, può aumentare il numero di individui portatori del riarrangiamento e, possibilmente, fissarsi nella popolazione. Anche i dati ottenuti con le regioni pericentromeriche di *Macaca mulatta* hanno messo in evidenza che le regioni cromosomiche capaci di formare neocentromeri con elevato successo evolutivo sono quelle in cui il nuovo centromero non comporta scompensi rilevanti nella funzionalità della regione cromosomica interessata.

Durante l'evoluzione, quindi, un dato *locus* cromosomico può andare incontro a diversi tipi di eventi mutazionali in genere dannosi per l'individuo in cui avvengono. Altri eventi possono invece avere un successo evolutivo e sono quelli che alterano poco o non alterano affatto la funzionalità del genoma e tra questi possono essere inseriti i riarrangiamenti tra regioni cromosomiche composizionalmente simili tra loro e che non alterano la posizione intranucleare dei *loci* coinvolti.

1. Introduzione

1.1 - I CROMOSOMI METAFASICI

I cromosomi sono le strutture visibili al microscopio ottico del materiale genetico. Essi ne consentono la corretta distribuzione durante la divisione cellulare. Inoltre contribuiscono al rimescolamento del materiale genetico durante la formazione delle cellule gametiche.

Ciascun cromosoma metafaseico è costituito da un centromero, due telomeri e numerose origini di replicazione.

Il centromero ha la funzione di tenere insieme i cromatidi fratelli e consentirne la corretta segregazione durante la divisione cellulare. Per poter svolgere correttamente le sue funzioni un cromosoma deve possedere un solo centromero funzionante; cromosomi acentrici (nessun centromero) o dicentrici (due centromeri) si dividono nelle cellule figlie in modo scorretto portando ad un corredo genico sbilanciato.

I telomeri sono strutture specializzate localizzate all'estremità dei cromosomi costituiti da DNA e proteine che hanno la funzione di mantenere l'integrità strutturale del cromosoma e di assicurare la replicazione completa del DNA che si trova alle estremità impedendone l'accorciamento.

Le origini di replicazione consentono la corretta replicazione del DNA; proprio da questi punti ha inizio l'apertura della doppia elica e la formazione della forca replicativa grazie a specifiche proteine che riconoscono le sequenze caratteristiche di questa regione.

Per migliorare la comprensione dell'organizzazione del genoma degli eucarioti sono stati utilizzati due approcci diversi: il bandeggio cromosomico e l'ultracentrifugazione in gradiente di densità.

Il primo approccio prevedeva la colorazione con Quinacrine (bandeggio Q) dei cromosomi metafaseici (Caspersson et al. 1968, 1970). Attraverso questo approccio si ha il riconoscimento dei singoli cromosomi metafaseici per il loro specifico pattern di bandeggio. Questo metodo è stato seguito dalla messa a punto di altre metodiche di bandeggio: il bandeggio G ottenuto mediante colorazione con Giemsa dopo digestione proteolitica (bandeggio sovrapponibile al bandeggio Q) e il bandeggio R ottenuto mediante colorazione

con Giemsa dopo denaturazione al calore (bandeggio opposto al bandeggio G) (Dev et al. 1972).

Il secondo approccio prevedeva l'utilizzo dell'ultracentrifugazione in gradiente di densità di Cs_2SO_4 in presenza di ligandi sequenza specifici (ad esempio il BAMD che si lega specificamente alle sequenze ricche in AT rendendole più dense). Questo approccio consente il frazionamento ad alta risoluzione del DNA in base alla composizione nucleotidica (Corneo et al. 1968). Questo metodo ha permesso di mettere in evidenza che il genoma dei Vertebrati omeotermi è caratterizzato da elevata eterogeneità compositiva (Filipski et al. 1973; Thiery et al. 1976), giustificando il fatto che il genoma di questi Vertebrati è caratterizzato da un mosaico di isocore (Macaya et al. 1976), lunghe regioni di DNA a composizione omogenea, che possono essere divise in cinque famiglie in base al loro contenuto in GC (L1, L2, H1, H2 e H3 secondo il loro incrementato contenuto in GC). Queste famiglie sono caratterizzate oltre che da differente composizione in basi, anche da diverse proprietà funzionali e strutturali, come la densità genica, il timing di replicazione e la struttura cromatinica (Bernardi 2004).

I dati ottenuti dai due approcci hanno permesso di ipotizzare che ci possa essere una correlazione tra isocore povere in GC e bande G, e tra le isocore ricche in GC e bande R (Cuny et al. 1981).

L'ipotesi proposta da Cuny è stata confermata da numerosi studi successivi (Bernardi 1989):

- Le bande G sono più povere in GC in media del 3,2% rispetto alle bande R (Holmquist et al. 1982);
- Le bande G mostrano in media replicazione tardiva durante la fase S del ciclo cellulare mentre le bande R mostrano replicazione precoce, così come i geni contenuti nelle rispettive bande (Comings 1978; Furst et al. 1981; Goldman et al. 1984);
- I geni sono localizzati preferenzialmente nelle bande R così come le isocore ricche in GC (Goldman et al. 1984; Korenberg and Engels 1978; Bernardi et al. 1985);
- I geni localizzati nelle bande G sono poveri in GC mentre i geni localizzati nelle bande R sono ricchi in GC (Aota and Ikemura 1986; Ikemura and Aota 1988), così

come i geni localizzati nelle isocore ricche in GC e povere in GC (Bernardi et al. 1985);

- Le bande G possono essere ottenute mediante digestione dei cromosomi metafasici con l'enzima di restrizione HaeIII (Lima-de-Faria et al. 1980); come atteso, il taglio si osserva più frequentemente nelle isocore ricche in GC dal momento che l'enzima taglia specificatamente la sequenza GGCC. Invece, le bande R possono essere ottenute mediante digestione dei cromosomi, protetti precedentemente con cromomicina A3 (che si lega specificatamente alle regioni ricche in GC), con DNase pancreatica (Schweizer 1977).

È stato, però, sottolineato che l'associazione tra isocore ricche in GC e bande R e isocore povere in GC e bande G è solo un'approssimazione della situazione reale, in quanto le isocore ricche in GC (H1, H2, H3) e quelle povere in GC (L1, L2) si trovano in un rapporto di 1:2 mentre le bande R e le bande G si trovano in un rapporto di 1:1 (Bernardi 1989).

Un ulteriore passo avanti è stato fatto con il cosiddetto “*chromosomal compositional mapping*”, procedura che prevede l'ibridazione di frazioni di DNA appartenenti alla famiglia di isocore H3 (le più ricche in GC) e alla famiglia di isocore L1 (le più povere in GC) su cromosomi metafasici, prometafasici e interfasicci (Saccone et al. 1992, 1993, 1996, 1999, 2002; Federico et al. 2000).

A livello di risoluzione di 400 bande, le bande G possono essere suddivise in due grandi classi in base alla capacità di ibridare o no con le isocore della famiglia L1: le bande L1⁺ e le bande L1⁻. Le bande R, invece, possono essere suddivise in tre grandi classi in base alla capacità di ibridare con le famiglie di isocore H2-H3: le bande H3⁺ (con forte ibridazione), le bande H3* (con debole ibridazione) e le bande H3⁻ (con nessuna ibridazione).

A livello di risoluzione di 850 bande, le bande G sono sempre suddivise in L1⁺ e L1⁻ come quelle a più bassa risoluzione descritte in precedenza. Le bande R, invece, possono essere classificate in due categorie: le bande H3⁺ che ibridano con le isocore H3 e le bande H3⁻ che non ibridano con le isocore H3 (Saccone et al. 1996, 1999, 2002). L'ammontare delle bande R è del 52,2% mentre quello delle bande G è del 47,8%. Il contenuto in GC delle bande è molto ampio, dal 36,3% al 47,7%, inoltre c'è una piccola differenza tra il

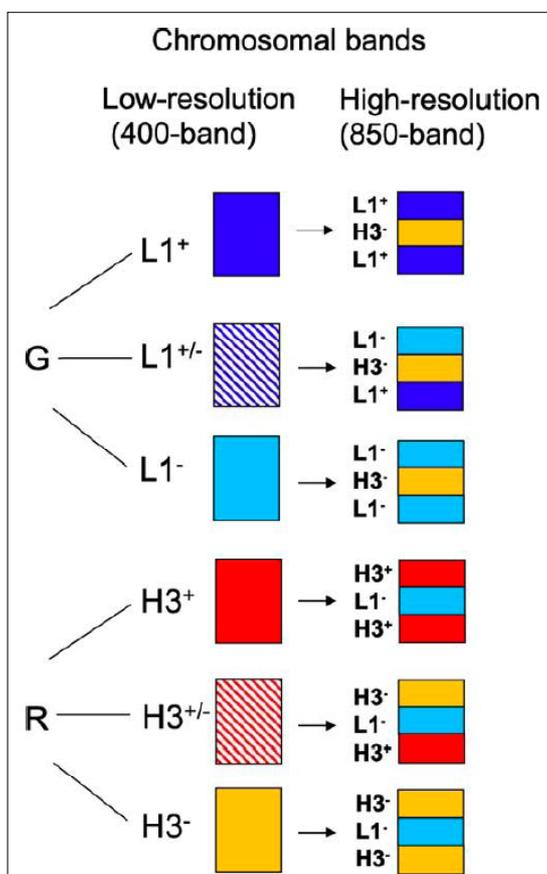


Fig. 1: Correlazione tra le bande a bassa ed alta risoluzione. Le bande a bassa risoluzione sono classificate, in base alla loro composizione, in sei categorie: L1⁺ (in blu), L1^{+/-} (sbarrato blu), L1⁻ (in azzurro), H3⁺ (in rosso), H3^{+/-} (sbarrato rosso) e H3⁻ (in giallo). Le bande ad alta risoluzione sono caratterizzate da tre bande dove le due più esterne rappresentano la rispettiva banda a bassa risoluzione e quella interna è una banda intermedia (Costantini et al. 2007).

contenuto in GC delle “bande intermedie” L1⁻ e H3⁻, che mostrano infatti livello in GC medio rispettivamente del 40,1% e del 41,5%.

Le bande, che a bassa risoluzione appaiono come un'unica banda, ad una risoluzione più alta possono apparire sia come singole bande sia come bande multiple che nell'83,5% delle volte sono rappresentate da tre bande. Analizzando il caso in cui una banda a bassa risoluzione sia formata da tre bande ad alta risoluzione si può affermare che la banda a bassa risoluzione è dotata di una specifica organizzazione. Infatti, nel caso in cui le due bande ad alta risoluzione esterne sono bande G o R in base a come era la banda a bassa risoluzione, la banda interna è sempre una banda intermedia opposta alle bande fiancheggianti. Più precisamente le caratteristiche delle tre bande ad alta risoluzione permettono la classificazione delle bande a bassa risoluzione (Fig. 1). Tra le bande G, le bande L1⁺, L1^{+/-} e L1⁻ sono quelle in cui ad alta risoluzione le bande esterne sono entrambe L1⁺, una L1⁺ e l'altra L1⁻ o entrambe L1⁻ rispettivamente; la corrispondente banda interna è

sempre una banda R intermedia del tipo $H3^-$. Allo stesso modo, tra le bande R ad alta risoluzione, le bande $H3^+$, $H3^{+/-}$ e $H3^-$ comprendono, ad alta risoluzione, rispettivamente due bande esterne del tipo $H3^+$, una $H3^+$ e l'altra $H3^-$ o entrambe $H3^-$, e la banda interna è sempre una banda G intermedia del tipo $L1^-$.

Nel caso in cui la banda a bassa risoluzione corrisponde a più di tre bande (da cinque a sette) in quelle ad alta risoluzione le bande esterne e le bande interne seguono lo stesso comportamento di quelle viste in precedenza: le bande esterne $L1^+$, $L1^-$, $H3^+$ o $H3^-$ e le bande interne del tipo opposto.

La classificazione delle bande R a bassa risoluzione può essere messa a confronto con altri risultati ottenuti da lavori precedenti. La comparazione con il risultato delle ibridazioni con le isocore (Saccone et al. 1996) mostra che 17 delle 20 bande $H3^+L1^+H3^+$ dopo l'ibridazione si vedono come $H3^+$ e tre come $H3^*$, e che tutte le 43 $H3^-L1^-H3^-$ si vedono come $H3^-$. Nel caso delle bande $H3^+L1^-H3^-$ 16 sono classificate come $H3^*$, mentre otto sono mal classificate come $H3^-$ e una come $H3^+$. Complessivamente, si può affermare che c'è una buona correlazione tra le due classificazioni alle due risoluzioni. La comparazione con le bande T (temperatura resistenti) di Dutrillaux (1973), una porzione di

bande R localizzate principalmente ai telomeri, ha messo in evidenza che a queste corrispondono essenzialmente le bande $H3^+$.

Esiste una forte correlazione tra i differenti tipi di bande G ($G1$, $G2$, $G3$ e $G4$) identificati da Francke (1994) ed il livello di GC, come dimostrato mediante ibridazione *in situ* con le isocore L1 (DNA a più basso contenuto in GC) (Federico et al. 2000). La media di GC delle bande in $G1$ è del 36,5%, in $G2$ è del 37,7%, in $G3$ è del 39,9% e in $G4$ è del 41,5%. In tal modo, le bande $L1^+$ nel genoma umano sono in predominanza bande $G1$ o $G2$, mentre le bande $L1^-$ sono prevalentemente $G3$ o $G4$.

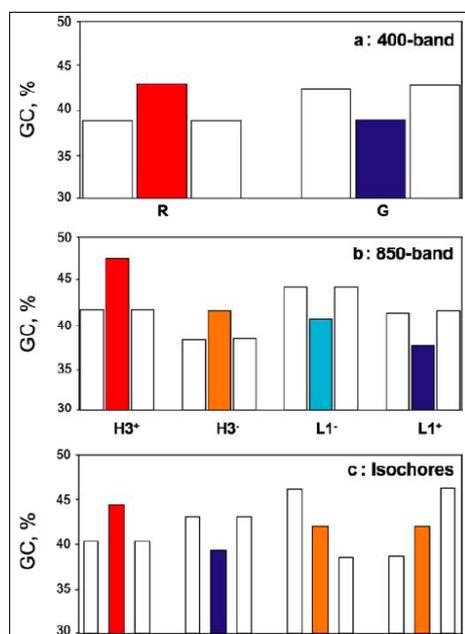


Fig. 2: Salti composizionali con le bande fiancheggianti. I diagrammi mostrano i salti composizionali nel contenuto in GC delle bande precedenti e successive alla banda presa in considerazione: (a) a bassa risoluzione, (b) ad alta risoluzione e (c) a livello di isocore (Costantini et al. 2007).

La vicinanza composizionale delle bande intermedie $L1^-$ e $H3^-$, così come l'esistenza di bande G intermedie a contenuto in GC maggiore delle bande R, suggerisce che la base composizionale di per se non potrebbe essere la ragione per la formazione di una banda G o R (Saccone et al. 2001). La ragione può essere trovata piuttosto nel salto composizionale tra bande fiancheggianti, infatti ogni banda (sia a bassa che ad alta risoluzione) è fiancheggiata da due bande adiacenti che sono entrambe più povere in GC nel caso della formazione di bande R, o entrambe più ricche in GC nel caso della formazione di una banda G (Fig. 2). Ad elevatissima risoluzione possono esserci alcune eccezioni (Fig. 2c) (Costantini et al. 2006).

Osservando la distribuzione composizionale delle bande ad alta risoluzione nei cromosomi umani si può subito notare che le bande intermedie $L1^-$ e $H3^-$ mostrano un'ampia sovrapposizione composizionale, mentre le bande $L1^+$ e $H3^+$ non mostrano sovrapposizioni. Inoltre, osservando le bande nei cromosomi metafasici si nota subito che le isocore sono fiancheggiate da famiglie di isocore più vicine alla famiglia che forma la banda. In particolare le bande $H3^+$, che hanno localizzazione prevalentemente telomerica, e le bande $L1^+$, che sono presenti lungo tutto il cromosoma fatta eccezione per i telomeri, solo raramente sono contigue (Fig. 3).

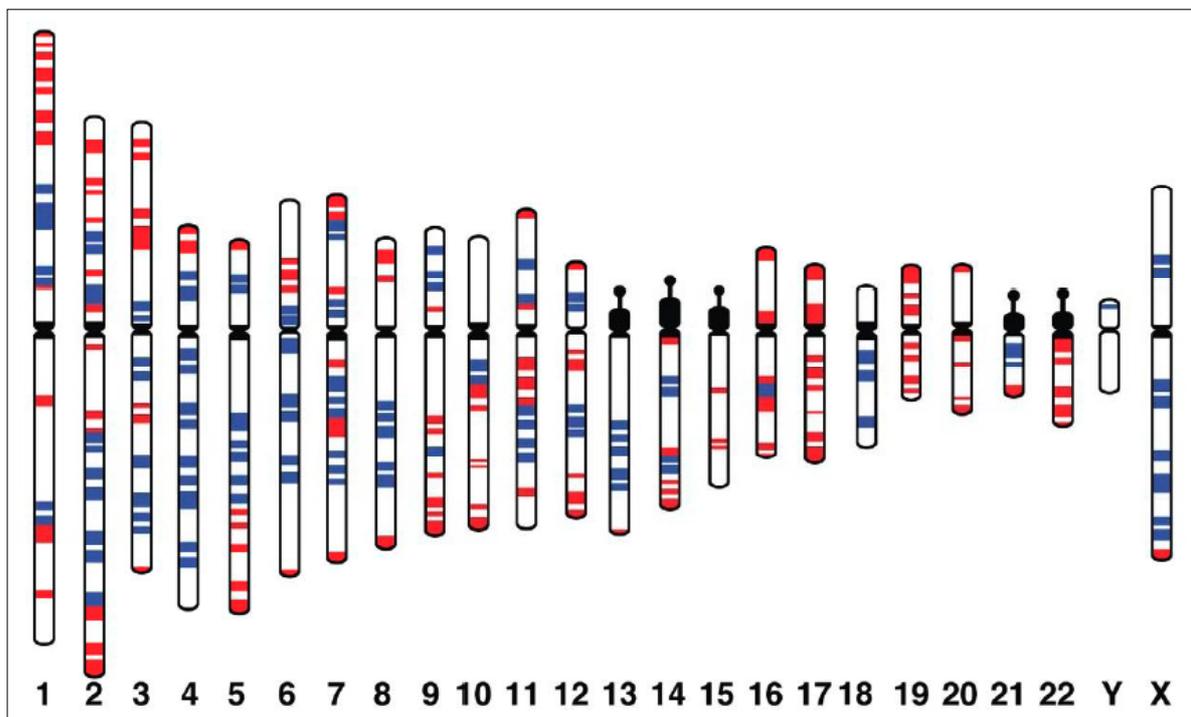


Fig. 3: Ideogramma dei cromosomi umani in cui è mostrata la localizzazione delle bande $H3^+$ (rosso) e delle bande $L1^+$ (blu) (Saccone et al. 2002).

Un'altra differenza tra le bande $L1^+$ e le bande $H3^+$ sta nella densità genica e nella compattazione della cromatina. In particolare, alle bande $H3^+$, quelle più ricche in GC, è associata la più alta densità genica, alle bande $L1^+$, quelle a più basso contenuto in GC, la più bassa densità genica, e alle bande $L1^-$ e $H3^-$, a contenuto intermedio in GC, densità genica media. Da dati ottenuti mediante il sequenziamento del genoma umano è possibile affermare che le bande $H3^+$ hanno densità genica superiore ai 15 geni/Mb, le bande $L1^+$ hanno densità genica inferiore ai 5 geni/Mb, le bande $L1^-$ e $H3^-$ hanno densità genica compresa tra questi valori.

Oltre che per la densità genica le diverse bande differiscono anche per il periodo in cui si replicano durante la fase S del ciclo cellulare. Grazie all'incorporazione durante la replicazione del DNA di BrdU può essere messo in evidenza il tempo di replicazione delle diverse regioni del DNA. In particolare, possiamo dire che le bande R si replicano nel primo periodo della fase S mentre le bande G replicano nel secondo periodo della fase S (Dutrillaux et al. 1976). Dutrillaux ha individuato 18 gruppi di replicazione: 9 a replicazione precoce, in cui si replicano le bande R, e 9 a replicazione tardiva, in cui si replicano le bande G. In particolare nei primi 3 gruppi si replicano le bande $H3^+$, nei gruppi che vanno da 4 a 9 le bande $H3^-$, nei gruppi che vanno da 10 a 13 si replicano le bande $L1^-$ ed infine nei gruppi che vanno da 14 a 18 le bande $L1^+$.

1.2 – I CROMOSOMI NEI NUCLEI INTERFASICI

Il nucleo cellulare

Il nucleo è un organulo cellulare, centro regolatore della vita della cellula in quanto contiene il materiale genetico. Per fare ciò il nucleo è separato dal resto della cellula da un involucro nucleare composto da due membrane fosfolipidiche a decorso parallelo separate da uno spazio perinucleare di 10-50 nm. Queste membrane separano il materiale genetico dal resto della cellula e svolgono, inoltre, funzione di organizzazione cromatinica e regolazione genica. La membrana esterna è collegata alla membrana interna attraverso proteine che formano il complesso del poro nucleare. Questi pori consentono il trasferimento di molecole dal nucleo al citoplasma e viceversa (Fig. 4).

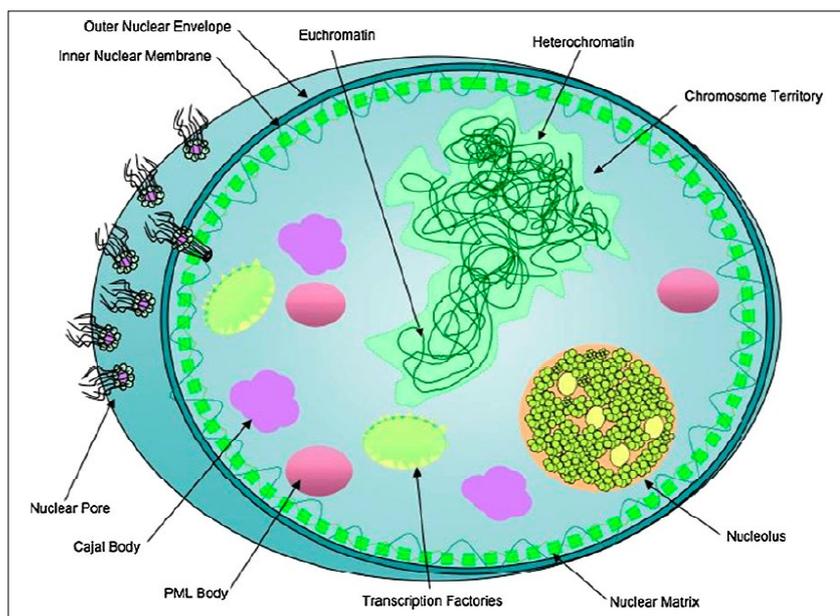


Fig. 4: Struttura e organizzazione nucleare (Rynearson et al. 2011).

La membrana nucleare esterna prende contatto con il reticolo endoplasmatico, mentre la membrana interna è associata alla matrice nucleare, una impalcatura proteica per lo più costituita da lamine, che formano una struttura definita nucleoscheletro. Il nucleoscheletro consente di mantenere la struttura del nucleo ed inoltre favorisce: l'ancoraggio del DNA, giocando un ruolo indiretto nella sua replicazione e organizzazione,

e l'arrangiamento spaziale dei pori nucleari e di altre proteine nucleari. La matrice nucleare definisce uno spazio detto spazio intranucleare. Lo spazio intranucleare contiene, oltre al genoma, tutta una serie di organuli e componenti preposti a diverse attività nucleari: i nucleoli, preposti alla sintesi dell'rRNA e all'assemblaggio dei ribosomi, i fattori di trascrizione, i sistemi coinvolti nella riparazione del DNA, gli speckle, preposti al processamento dei pre-mRNA, i corpi di Cajal, preposti al processamento e all'assemblaggio con proteine dei snRNA, e i corpi PML, preposti a molteplici funzionalità tra le quali riparazione del DNA e regolazione del ciclo cellulare (Fig. 4).

Il materiale genetico è ben visibile al microscopio ottico durante la metafase sotto forma di cromosomi; nel nucleo in interfase le molecole di DNA sono molto meno condensate e prendono il nome di cromatina. Al microscopio elettronico la cromatina appare in una struttura definita a "filo di perle", dello spessore di 10 nm, costituita dal ripetersi di nucleosomi (che costituiscono le perle) legati da un filamento di DNA, definito DNA linker (che costituisce il filo). Si pensa, però, che in vivo la cromatina si trovi ad un livello di compattazione più elevato rispetto alla fibra da 10 nm, definita fibra da 30 nm. Per spiegare la formazione della fibra da 30 nm è stato considerato che sei nucleosomi si avvolgano tra loro a formare una struttura definita solenoide. Per definire i livelli superiori di compattazione sono stati proposti diversi modelli che prevedono la formazione di anse più o meno grandi che si attaccano, mediante sequenze ricche in AT, a una struttura proteica definita scaffold.

La fibra da 30 nm è la forma in cui la maggior parte della cromatina si trova durante l'interfase, anche se una porzione della cromatina rimane in uno stato più condensato definito eterocromatina. L'eterocromatina si distingue in eterocromatina costitutiva, caratterizzata da DNA a sequenza ripetuta (DNA satellite, retrotrasposoni), e in eterocromatina facoltativa, caratterizzata da bassissima densità genica, per lo più tessuto specifica, e replicazione tardiva durante la fase S del ciclo cellulare. L'eterocromatina costitutiva è visibile nei cromosomi metafasici nelle bande C a livello dei centromeri, mentre l'eterocromatina facoltativa nelle bande G. I geni attivi si trovano nell'eucromatina, porzione della cromatina non impacchettata che consente l'attiva trascrizione, caratterizzata da replicazione precoce durante la fase S del ciclo cellulare ed è visibile nel bandeggio R dei cromosomi mitotici.

In recenti studi, condotti su fibroblasti umani, è stato osservato che la cromatina interagisce sia con la lamina nucleare sia con il complesso del poro nucleare ed inoltre si trova associata a livello dei nucleoli.

La cromatina si lega a livello della lamina nucleare in specifiche regioni denominate domini associati alla lamina (LAD), grandi da 80 kb a 30 Mb, caratterizzati dalla presenza di migliaia di geni che mostrano una bassissima espressione e modificazioni istoniche favorevoli la repressione (Peric-Hupkes et al. 2010). Di contro, la cromatina che si lega a livello del complesso del poro nucleare tende ad essere più eucromatica e più attivamente trascritta. È stato osservato, inoltre, che le porine del poro nucleare interno si associano a particolari sequenze promotrici del DNA consentendo l'espressione genica; questo potrebbe essere dovuto al fatto che la localizzazione della cromatina in questo ambiente potrebbe favorire il trasporto dei trascritti nel citoplasma (Schmid et al. 2006; Taddei et al. 2006; Ahmed et al. 2010; Blobel 1985; Ishii et al. 2002; Kylberg et al. 2008; Krull et al. 2010; Strambio-De-Castilla et al. 2010). Discorso a parte va fatto per i nucleoli, organuli nucleari che sono dovuti all'associazione delle ripetizioni del DNA ribosomiale presente nei satelliti dei cromosomi acrocentrici. Questi sono i siti per la trascrizione dell'RNA ribosomiale da parte dell'RNA polimerasi I, il processamento e l'assemblaggio delle subunità ribosomiali. La regione perinucleolare è caratterizzata dall'aver bassa trascrizione da parte dell'RNA polimerasi II e quindi le regioni cromatiniche a questo livello sono per la maggior parte trascrizionalmente inattive e ricche in modificazioni istoniche che favoriscono la repressione. Eccezione è fatta per i geni che codificano per i tRNA trascritti dall'RNA polimerasi III (Németh et al. 2010).

I territori cromosomici e i domini intercromosomici

A partire dal secolo scorso numerosi studi di microscopia sono stati volti a determinare la struttura nucleare e la posizione dei cromosomi nel nucleo in interfase. Il primo a coniare il termine “territorio cromosomico” (CT) fu Boveri nel 1909. Egli condusse uno studio su *Parascaris aequorum* e osservò che i cromosomi mantengono la loro individualità durante l'interfase occupando posizioni distinte all'interno del nucleo. Per quanto riguarda l'organizzazione della cromatina propose tre ipotesi:

- L'organizzazione del territorio cromosomico è stabilmente mantenuta durante l'interfase;

- Lo schema dei cromosomi che si fiancheggiano cambia nel passare da profase a metafase;
- Nei nuclei delle due cellule figlie i movimenti dei territori cromosomici riflettono i movimenti durante l'anafase e la telofase facendo sì che l'organizzazione dei territori nelle due cellule sia piuttosto simmetrica.

In uno studio successivo condotto su cellule di *Allium cepa* e di ovario di criceto cinese (CHO) è stata utilizzata una modificazione della colorazione Giemsa (Stack et al. 1977) ed è stato osservato che durante il ciclo cellulare i cromosomi attraversano fasi di condensazione e decondensazione, ma durante l'interfase occupano domini distinti.

Il primo a dare prove sperimentali sull'esistenza dei CT fu Thomas Cremer già nel 1982; egli studiò nuclei diploidi di CHO trattati con un microfascio laser che induceva danni da UV al DNA e osservando che i danni erano indotti solo in piccole porzioni del nucleo e quindi in piccole parti dei cromosomi mitotici, suppose che i cromosomi nel nucleo in interfase si organizzano in regioni distinte.

Ma solo grazie all'utilizzo di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), tecnica sviluppata intorno agli anni '80, si è potuta avere una visualizzazione diretta dei singoli territori cromosomici. I primi esperimenti sono stati effettuati mediante l'utilizzo di DNA genomico umano su uno o pochi cromosomi. Grazie allo sviluppo della citofluorimetria sono stati separati i singoli cromosomi portando allo sviluppo di sonde painting cromosoma specifiche; questo ha fatto sì che durante una ibridazione venisse rilevato

distintamente ogni cromosoma sia in una piastra metafasica sia nei nuclei in interfase, dando così la localizzazione dei singoli territori cromosomici.

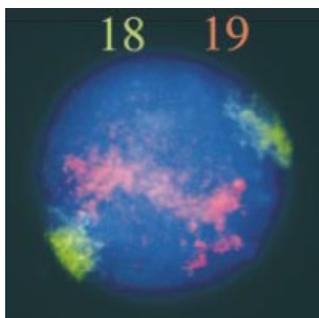


Fig. 5: Localizzazione dei cromosomi 18 (in verde) e 19 (in rosso) nel nucleo interfase (Croft et al. 1999).

Attraverso l'utilizzo dei painting cromosomici, Croft et al. nel 1999 stabilirono la localizzazione dei cromosomi umani 18 e 19 che, pur essendo simili in dimensioni, hanno contenuto genico diverso. Essi dimostrarono che il cromosoma 19, più ricco in geni, si localizza verso il centro del nucleo mentre il cromosoma 18, povero in geni, si localizza alla periferia del nucleo (Fig. 5).

Allo stesso modo nel 2001 Boyle et al. utilizzarono le sonde *painting* per ibridazioni su tutti i cromosomi dei linfoblasti umani dimostrando che i cromosomi con più alta concentrazione genica si localizzano verso il centro del nucleo mentre i cromosomi con più bassa concentrazione genica e cromatina inattiva si localizzano verso la periferia nucleare.

È stato, inoltre, possibile clonare porzioni di DNA genomico all'interno di vettori BAC permettendo la localizzazione di singoli *loci* genici sia a livello di cromosomi metafasici sia a livello di territori cromosomici, permettendo così di conoscere più dettagliatamente dove si localizzano i singoli *loci* all'interno del territorio cromosomico. Infatti, dato che gli altri cromosomi sono in genere più eterogenei dei cromosomi 18 e 19, anche se il baricentro del territorio si localizza in una data regione del nucleo non è detto che da esso non possano estendersi delle regioni verso il centro o la periferia del nucleo. Per una più approfondita analisi dei CT è necessario analizzare i singoli *loci* che compongono un cromosoma e ricostruire così l'esatta localizzazione del territorio. Esempio dell'utilizzo di questa metodologia di studio si ha con l'analisi in dettaglio del territorio cromosomico del cromosoma umano 7. Attraverso studi condotti con l'utilizzo del *painting* esso si localizzava alla periferia del nucleo ma utilizzando sonde BAC che ibridano *loci* di diversa composizione in basi è stato osservato che le regioni ricche in geni si discostano dal territorio cromosomico per spingersi verso il centro del nucleo dove possono essere trascritte (Federico et al., 2008).

Per poter analizzare in modo generale la frequenza d'interazione tra due *loci* genomici qualunque e quindi l'organizzazione nucleare generale, nel 2002 (Dekker et al., 2002) è stata messa a punto la tecnica *Chromosome Conformation Capture* (3C). Il principio di questa tecnica si basa sulla fissazione delle cellule con formaldeide, che consente il legame di proteine con altre proteine o con il DNA. Per quantificare la frequenza d'interazione, il DNA legato alle proteine è digerito con un enzima di restrizione e quindi sottoposto a ligazione in condizioni di diluizione. Sotto queste condizioni viene favorito il legame dei frammenti intramolecolari piuttosto che dei frammenti intermolecolari. Quindi i singoli prodotti di ligazione sono rilevati attraverso PCR con l'uso di primer *locus* specifici.

Una variazione di questa tecnica, Hi-C, permette di analizzare l'organizzazione nucleare ad un livello più globale. Essa sonda l'organizzazione spaziale dell'intero genoma attraverso sequenziamento massivo parallelo di frammenti genomici ottenuti attraverso taglio con enzimi di restrizione e successiva costruzione di mappe di prossimità (Fig. 6). Le mappe confermano la presenza dei CT, la vicinanza spaziale di piccoli cromosomi ricchi in geni e la segregazione spaziale della cromatina aperta e chiusa a formare due compartimenti distinti dove le maggiori interazioni avvengono all'interno di un dato compartimento piuttosto che tra i due compartimenti. Per testare l'interazione tra *loci* su uno stesso cromosoma o su cromosomi diversi è stata calcolata in primo luogo la probabilità di contatto intracromosomico per coppie di *loci* separati da una data distanza genomica su un dato cromosoma e si è visto che questa diminuisce monotonicamente su ogni cromosoma suggerendo che la distanza 3D tra i *loci* aumenta all'aumentare della distanza genomica; quindi è stata calcolata la probabilità di contatto intercromosomico tra coppie di cromosomi ed è stato osservato che piccoli cromosomi ricchi in geni interagiscono preferenzialmente tra loro (questi dati sono coerenti con studi FISH che dimostrano la localizzazione interna al nucleo in interfase di questi cromosomi).

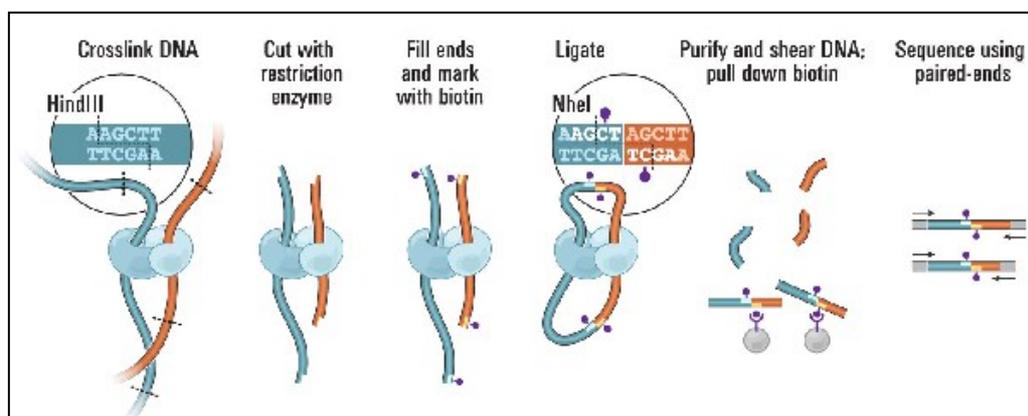


Fig. 6: Schematizzazione del protocollo Hi-C. Le cellule sono fissate con formaldeide, con conseguente legame della cromatina spazialmente adiacente (frammenti blu e rossi) mediato da proteine (in azzurro). La cromatina è digerita con enzimi di restrizione e le estremità riempite con nucleotidi marcati. Viene fatta avvenire la ligazione in condizioni di diluizione e il DNA purificato e quindi sequenziato (Lieberman-Aiden et al. 2009).

Infine, gli autori hanno esplorato l'architettura cromatinica all'interno di ogni compartimento ed hanno assunto che essa si organizza come un globulo frattale (Grosberg et al. 1988, 1993), cioè una struttura che si organizza su se stessa a formare una serie di globuli in una configurazione a filo di perle senza nodi che consente il *folding* e l'*unfolding* di tratti genomici (Fig. 7).

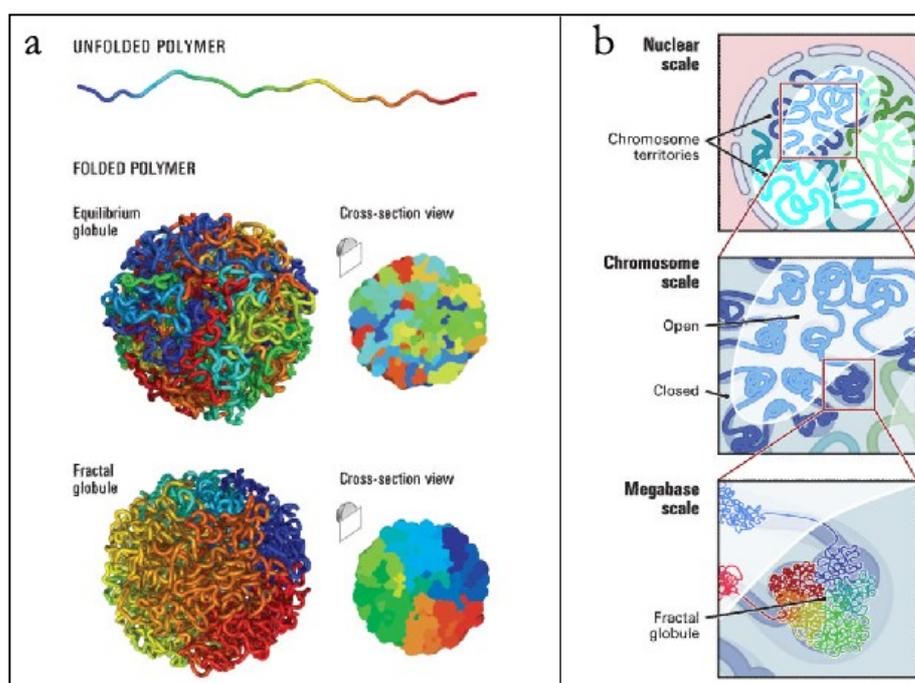


Fig. 7: L'impacchettamento della cromatina è coerente con un globulo frattale. Nella parte a della figura: in alto una catena polimerica *unfolded*, in mezzo un globulo all'equilibrio, una struttura molto contorta dove sequenze che si trovano vicine alla periferia non lo sono all'interno, in basso un globulo all'equilibrio, dove sequenze che si trovano vicine alla periferia tendono a trovarsi vicine anche all'interno. La struttura manca di nodi. Nella parte b della figura architettura genomica in tre diverse scale. In alto: l'organizzazione nucleare in territori cromosomici, nel mezzo: l'organizzazione di un singolo cromosoma in cromatina aperta e chiusa, in basso: a livello di Mb il cromosoma è costituito da una serie di globuli frattali (Lieberman-Aiden et al. 2009).

Che i cromosomi nel nucleo di ogni essere vivente, sia esso animale o vegetale, si organizzino a formare un territorio cromosomico è un concetto ormai generalmente accettato come principio base di organizzazione nucleare (Cremer e Cremer, 2010). Negli anni passati sono stati proposti diversi modelli di cui due prevalenti per l'organizzazione dei territori cromosomici nel nucleo interfaseico.

Il primo modello di architettura nucleare proposto da Lichter et al. nel 1993 è quello del dominio intercromosomico (ICD) (Fig. 8A). La versione originale di questo modello

prevede che i territori cromosomici hanno una superficie liscia e sono separati dagli altri mediante domini intercromosomici. Questo fa pensare che i geni attivamente trascritti si troverebbero alla periferia del territorio cromosomico per essere a contatto con i complessi trascrizionali presenti al confine di ogni territorio. Successivamente è stato suggerito che la superficie del territorio cromosomico può essere aumentata attraverso loop all'interno dello stesso territorio; questo cambiamento presuppone che anche la parte interna del territorio cromosomico possa avere attività genica. Con queste supposizioni Cremer e colleghi proposero il modello CT-comparto intercromosomico (IC) nel quale all'interno del territorio cromosomico si vengono a creare dei canali che permettono ai geni di essere trascritti. Questi stessi canali si formano anche tra territori cromosomici vicini permettendo interazioni intra- e inter-cromosomiche. Il modello CT-IC si basa su cinque presupposti:

- il comparto intercromosomico comincia al poro nucleare e si estende, come un canale, tra i vari territori cromosomici e anche all'interno di un unico territorio tra regioni di cromatina compatta. All'interno di questi spazi sono contenuti gli speakles e una varietà di corpi nucleari non cromatinici preposti al processamento dei pre-mRNA;
- i territori cromosomici sono costituiti da piccoli loop di cromatina (definiti domini loop cromatinici di ~100 kbp) che possono variare a seconda dello stato di attività dei geni;
- una serie di piccoli loop di cromatina si organizzano a formare una struttura cromatinica simile ad una rosetta che è in grado di comprimere da molte centinaia di kbp a molte Mbp (chiamato dominio cromatinico di ~1Mbp);
- ogni dominio di ~1Mbp è connesso da cromatina linker ai due domini vicini;
- i geni attivamente trascritti sono direttamente esposti dalla cromatina che ricopre lo spazio intercromatinico.

Visto che il modello ICD non è in grado di spiegare la frequenza di aberrazioni cromosomiche complesse o il dinamismo della cromatina, Branco e Pombo (2006) proposero il modello dei network intercromosomici (ICN) (Fig. 8B). Questo modello prevede che le fibre e i loop di cromatina si intreccino in modo uniforme sia all'interno di ogni territorio sia tra territori vicini, dando origine in quest'ultimo caso a regioni di sovrapposizione. Queste interazioni hanno conseguenze dirette per la stabilità dei

cromosomi, infatti la prossimità delle rotture a doppio filamento nelle regioni di mescolamento potrebbe facilitare gli arrangiamenti intercromosomali.

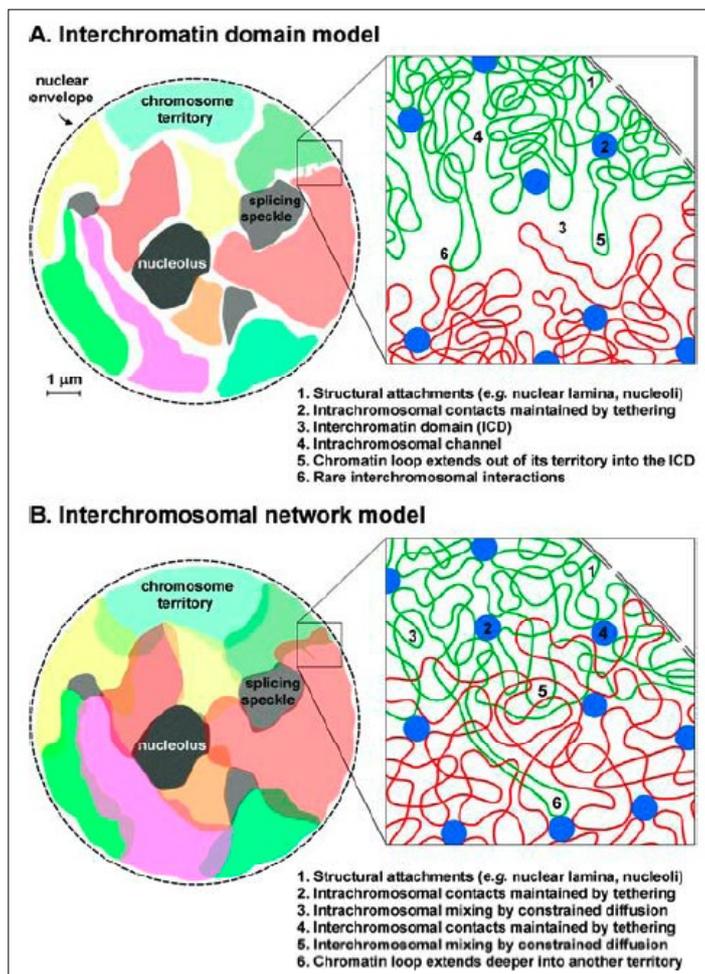


Fig. 8: Modelli di organizzazione della cromatina nei nuclei dei Mammiferi. A. Nel modello ICD la cromatina dei diversi cromosomi è separata dagli spazi intercromatinici ricchi di apparati nucleari. I geni attivi sono a diretto contatto con gli ICD in quanto si trovano alla superficie dei CT. In rari casi la cromatina si estende in loop che invadono i ICD che invece si ritiene restino liberi da cromatina. B. Nel modello ICN la cromatina dei diversi cromosomi non è separata da un compartimento ma si estende nel territorio vicino; l'interazione è limitata dalla presenza di cromosomi adiacenti, membrana nucleare e grandi compartimenti nucleari. Le sequenze di DNA lungo i cromosomi hanno proprietà diverse che determinano la loro compattazione, mobilità e affinità a specifiche componenti nucleari. Nelle regioni in cui la cromatina si mescola si ha maggiore probabilità che avvengano riarrangiamenti intra- e intercromosomali (Branco e Pombo 2006).

Da studi condotti sulla localizzazione nucleare di sequenze geniche e sequenze non trascritte è stato osservato che le sequenze non trascritte, che costituiscono i blocchi di eterocromatina, si localizzano alla periferia del nucleo o a livello dei nucleoli, mentre le sequenze geniche tendono a localizzarsi alla superficie del territorio esposti verso l'interno del nucleo, dove si pensa ci sia un'alta concentrazione dei fattori che consentono l'inizio della trascrizione, la sintesi e il processamento dell'RNA trascritto (Scheuermann et al. 2004).

Il nucleo interfaseico nei Vertebrati

La diversa distribuzione spaziale dei geni nel nucleo e il diverso grado di compattazione della cromatina, largamente legata all'attività trascrizionale, non sono caratteristiche tipiche dei Primati ma accomunano tutti i Vertebrati siano essi omeotermi o eterotermi.

Il genoma umano è caratterizzato da due distinti compartimenti caratterizzati da diversa densità genica: il paleogenoma o *empty quarter*, che rappresenta circa l'85% dell'intero genoma e il neogenoma o *genome core* che rappresenta il restante 15% (Bernardi 2000). Il neogenoma è caratterizzato da elevata densità genica, replicazione precoce durante la fase S del ciclo cellulare, alta frequenza di ricombinazione e da una cromatina aperta, mentre il paleogenoma mostra caratteristiche esattamente opposte. Questo tipo di organizzazione del genoma caratterizza tutti i vertebrati omeotermi; più precisamente il DNA caratterizzato da un elevato contenuto in GC e in geni si localizza verso il centro del nucleo con cromatina più despiralizzata, mentre quello con più basso contenuto in GC e in geni si localizza verso la periferia del nucleo con cromatina più compatta.

La diversa compattazione delle varie componenti del genoma nel nucleo interfaseico suggerisce un modello per la transizione composizionale dal neogenoma ancestrale, modestamente ricco in GC, dei vertebrati eterotermi al neogenoma dei vertebrati

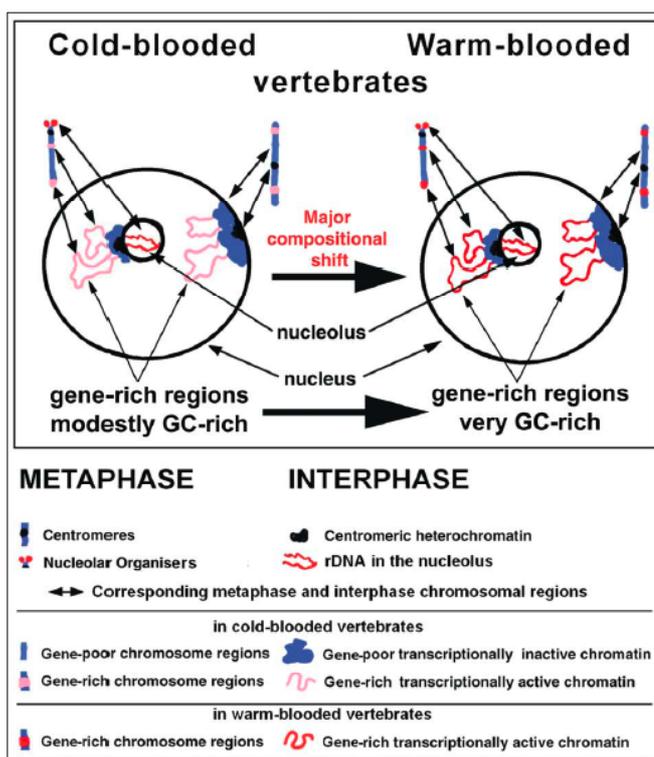


Fig. 9: Ipotesi sulla formazione delle isocore ricche in GC. Nei Vertebrati omeotermi le regioni più in geni sono colorate in rosso. Nel nucleo queste regioni sono caratterizzate da cromatina più aperta rispetto alle regioni povere in geni. Se si considera che questa poteva essere la situazione presente nei Vertebrati eterotermi, le isocore ricche in GC si sono formate in queste regioni per ottenere maggiore stabilità non necessaria nei vertebrati eterotermi a causa della loro bassa temperatura corporea e nel paleo genoma stabilizzato dalla sua conformazione (Saccone et al. 2002).

omeotermi, molto ricco in GC (Fig. 9). Infatti, con l'aumento della temperatura corporea nel passaggio da eterotermia a omotermia, avvenuto negli antenati di Mammiferi e Uccelli, si suppone che la cromatina più aperta, localizzata verso il centro del nucleo, abbia avuto bisogno di un incremento nel contenuto in GC per potersi stabilizzare, incremento non avvenuto nella cromatina più compatta stabilizzata già dalla sua conformazione.

Ibridazioni *in situ* con frazioni più ricche e più povere in geni del genoma di pollo su nuclei interfasicci di quest'ultimo hanno messo in evidenza che le frazioni più ricche in GC si localizzano verso il centro del nucleo, mentre le frazioni più povere in GC si localizzano verso la periferia del nucleo (Saccone et al. 2002).

Un'ibridazione *in situ* eterologa è stata utilizzata per caratterizzare il comportamento della cromatina nel nucleo interfasicco di vertebrati eterotermi. Infatti, essendo il genoma dei rettili poco eterogeneo per caratterizzare la frazione del genoma più ricca e più povera in GC sono state utilizzate come sonda le frazioni a più alto e a più basso contenuto in GC del genoma di pollo (Federico et al. 2006). I risultati ottenuti ricalcano quelli ottenuti per i vertebrati omeotermi: la frazione del DNA più ricca in GC e in geni si localizza verso il centro del nucleo con una cromatina più despiralizzata, mentre la frazione del DNA più povera in GC e in geni si localizza verso la periferia del nucleo con una cromatina più compatta.

Quanto descritto dimostra che sia negli Uccelli che nei Vertebrati eterotermi viene mantenuta la stessa organizzazione nucleare della cromatina a discapito del diverso contenuto in GC, supportando il fatto che l'organizzazione nucleare non dipende molto dal contenuto in GC ma piuttosto da un'organizzazione funzionale (trascrizione genica, replicazione del DNA, ecc.).

1.3 - I CROMOSOMI DEI PRIMATI

L'evoluzione dei Primati

Il primo Primate apparve durante la prima parte dell'era Cenozoica, molto probabilmente discendendo da un piccolo mammifero placentato che viveva sugli alberi e si nutriva di insetti come i toporagni dei giorni nostri. Le caratteristiche comuni di tutti i Primati derivano dal loro adattamento ad una vita arboricola. Le mani e i piedi si sono trasformati in cinque dita prensili di cui il pollice opponibile e questo ha reso i Primati capaci di afferrare oggetti come i rami. Gli artigli si sono trasformati in unghie fornendo una copertura protettiva alle estremità delle dita che hanno funzione tattile. Gli arti sono diventati lunghi e sottili capaci di ruotare intorno alle spalle e alle anche, consentendo loro piena motilità per arrampicarsi e cercare cibo sugli alberi. Gli occhi si sono spostati sulla parte frontale della testa e si è avuta una riduzione della lunghezza del muso consentendo una visione stereoscopica. Insieme alla vista si è sviluppato il senso dell'udito mentre è rimasto scarso il senso dell'odorato.

I numerosi stimoli sensoriali associati con la vista acuta, con l'aumento dell'agilità e con la manipolazione degli oggetti hanno portato alla crescita in complessità e in dimensioni del cervello.

I Primati hanno comportamenti sociali molto complessi, partoriscono in genere un solo figlio che viene protetto e nutrito per lungo tempo.

Secondo una recente classificazione l'ordine dei Primati è suddiviso in due sottordini: le Proscimmie e gli Antropoidi (Fig. 10).

Le Proscimmie sono stati i primi primati ad evolversi circa 60 milioni di anni fa durante il Paleocene. A questo sottordine appartengono i lemuri del Madagascar, i lori dell'Africa e del Sud-Est asiatico e i tarsi dell'Indonesia e delle Filippine.

Sia i lemuri che i lori hanno conservato qualche caratteristica dei mammiferi primitivi come il muso allungato ed una certa lateralizzazione degli occhi; essi possiedono zampe prensili e artigli quasi trasformati in unghie.

I tarsi sono dei piccoli primati notturni che vivono sugli alberi, sono abili saltatori e come gli avanzati Antropoidi hanno il muso più corto e gli occhi rivolti completamente in avanti.

Gli Antropoidi si sono evoluti da un gruppo di Proscimmie circa 38 milioni di anni fa, durante l'Oligocene.

Gli Antropoidi sono generalmente più grandi delle Proscimmie, sono adattati a vivere una vita diurna e vivono sugli alberi anche se hanno una dieta più varia rispetto alle Proscimmie. La differenza maggiore con le Proscimmie sta nella grandezza del cervello che è molto più sviluppato, specialmente nelle scimmie antropomorfe.

Agli Antropoidi appartengono le Scimmie del Vecchio Mondo o Catarrhini e le Scimmie del Nuovo Mondo o Platyrrhini.

Le Scimmie del Nuovo Mondo sono arboricole e possiedono lunghi arti che gli consentono di muoversi tra gli alberi, molti hanno la coda prensile, hanno un naso schiacciato con le narici aperte di lato. Esse vivono nell'America Centrale e Meridionale e comprendono le uistiti, le cappuccine, le scimmie urlatrici, le scimmie scoiattolo e le scimmie ragno.

Le Scimmie del Vecchio Mondo sono arboricole, anche se alcune vivono a terra e camminano sulle quattro zampe, non hanno una coda prensile mentre alcune ne sono completamente prive. Si differenziano dalle Scimmie del Nuovo Mondo perché hanno un naso piccolo con narici rivolte verso il basso e più vicine. Vivono nelle zone tropicali dell'Africa e dell'Asia. Alla superfamiglia dei Cercopithecoidea appartengono i langur, i cercopitechi verdi, i macachi, i babuini ed i mandrilli. Alla superfamiglia degli Hominoidea appartengono le scimmie antropomorfe e l'Uomo. Esse sono tra gli Antropoidi le scimmie

Classificazione dei Primati viventi (R.D. Martin)

<i>Sottordine</i>	<i>Infraordine</i>	<i>Superfamiglia</i>	<i>Famiglia</i>	<i>Sottofamiglia</i>
PROSIMII	LEMURIFORMES (Madagascar)	LEMUROIDEA	Cheirogaleidae	
			Lemuridae	Lemurinae Lepilemurinae
			Indridae	
			Daubentoniidae	
	LORISIFORMES (Asia e Africa)	LORISOIDEA	Lorisidae	Lorisinae Galaginae
	TARSIFORMES (Asia)	TARSIOIDEA	Tarsiidae	
ANTHROPOIDEA	PLATYRRHINI (Nuovo Mondo)	CEBOIDEA	Cebidae	Cebinae
				Aotinae
				Atelinae
				Alouattinae
				Phiteciinae
				Callimiconinae
	Callitrichidae			
	CATARRHINI (Vecchio mondo)	CERCOPITHECOIDEA	Cercopithecidae	Cercopithecinae Colobinae
HOMINOIDEA		Hylobatidae	Hylobatinae	
		Pongidae	Ponginae	
		Hominidae	Homininae	

Fig. 10: Classificazione dei Primati

di più grandi dimensioni e possono temporaneamente assumere la posizione eretta. Esistono quattro generi di scimmie antropomorfe classificate in due famiglie: Hylobatidae, a cui appartengono il gibbono ed il congenerico siamango; Pongidae a cui appartengono l'orango, il gorilla, lo scimpanzé ed il congenerico bonobo.

Il cariotipo dei Primati

In seguito alla scoperta da parte di Tjio e Levan (1956) del vero numero dei cromosomi umani, le tecniche citogenetiche sono state usate per la comparazione del cariotipo umano con quello dei Primati evolutivamente più vicini, in particolare con i Pongidae: *Pan troglodytes* PTR, *Pan paniscus* PPA, *Gorilla gorilla* GGO, *Pongo pygmaeus* PPY (Bender et al., 1963; Ruffié et al., 1970) (Fig. 11).

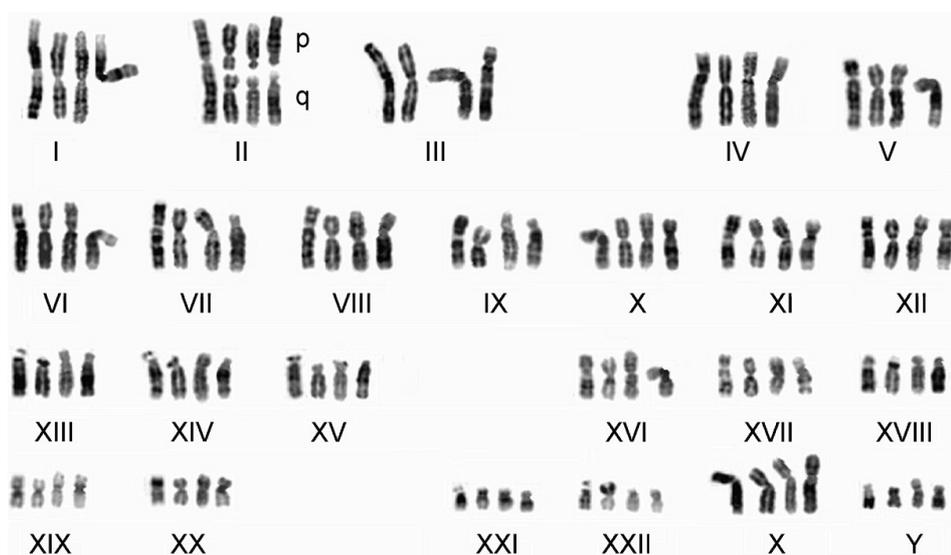


Fig. 11: Comparazione dei cariotipi di HSA (*Homo sapiens*), PPA (*Pan paniscus*), GGO (*Gorilla gorilla*) e PPY (*Pongo pygmaeus*) (Seuáñez, 1979).

Le tecniche iniziali prevedevano semplicemente l'intera colorazione del cromosoma, quindi l'unica comparazione possibile era di numero, posizione del centromero e lunghezza delle braccia. Successivamente sono state messe a punto tecniche di bandeggio che hanno consentito di studiare la filogenesi dei cromosomi dei Primati in modo più dettagliato.

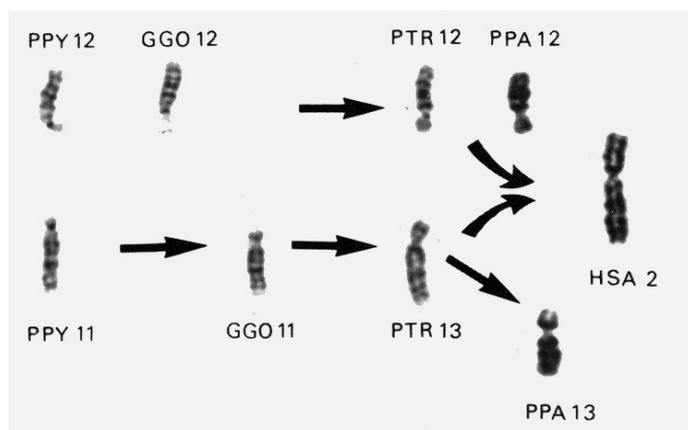


Fig. 12: Fusione telomerica che ha dato origine al cromosoma 2 umano (Seuánez, 1979).

La prima informazione che emerge da tale comparazione riguarda la riduzione del numero cromosomico da 48 nelle grandi scimmie a 46 nell'uomo; questa riduzione è associata alla fusione telomerica di due cromosomi acrocentrici presenti nei Pongidae che ha portato alla

formazione del cromosoma 2 umano (Fig. 12). Questa fusione porta come conseguenza l'inattivazione di uno dei due centromeri, in quanto in un cromosoma normale deve essere presente un solo centromero funzionante. Non essendo presenti al bandeggio C due organizzazioni eterocromatiche tipiche del centromero si deduce che la regione del centromero che si è inattivato ha subito un processo di eucromatizzazione.

Differenze nella comparazione del pattern di bandeggio G (o R) mettono in evidenza che i cromosomi umani differiscono da quelli degli altri Primati a causa di riarrangiamenti riconducibili a inversioni para- e pericentriche, traslocazioni, fusioni telomeriche e fissioni.

Mettendo a confronto i diversi cariotipi è possibile osservare che il cromosoma 1 umano è omologo con quello degli altri Pongidae se non fosse che nell'uomo il cromosoma ha acquisito un blocco eterocromatico subito sotto il centromero nel suo braccio q, e sembra essersi originato per fusione telomerica di due piccoli cromosomi, di cui uno acrocentrico, presenti in CAE (*Cervopithecus aethiops*).

I primi esperimenti di comparazione dei cromosomi delle diverse specie di Primati mediante ibridazione *in situ* fluorescente sono stati condotti mediante l'utilizzo di *painting* cromosoma specifici ibridate su metafasi umane e di Primati non umani.

Attraverso questa metodica è stato possibile supporre che il cariotipo del primate ancestrale era $2n=50$ (Müller et al 1999), ed alcuni di questi cromosomi si sono notevolmente conservati durante l'evoluzione.

È stata inoltre osservata una traslocazione reciproca tra i cromosomi sintenici ai cromosomi umani 5 e 17; in particolare, il cromosoma umano 5 è sintenico ai cromosomi

4q e 19 di GGO e il cromosoma umano 17 è sintenico ai cromosomi 4 e 19q di GGO (Jauch et al 1992).

I dati ottenuti attraverso FISH con *painting* cromosoma specifici mettono in evidenza solo riarrangiamenti a livello intercromosomico senza considerare se l'ordine dei *locus* si è mantenuto e se ci sono stati riarrangiamenti intercromosomici. Per meglio definire, quindi, l'evoluzione dei cromosomi è stata utilizzata la FISH con l'utilizzo di sonde puntiformi derivanti dal genoma umano, per lo più BAC, che hanno consentito di definire più in dettaglio i rapporti di sintenia tra i cromosomi umani e quelli degli altri Primati. Attraverso questa metodologia sono state analizzate le storie evolutive di diversi cromosomi.

Riarrangiamenti intraspecifici

Il numero dei cromosomi e l'organizzazione dei geni all'interno di essi sono gli stessi per tutti i membri di una stessa specie. Eventuali deviazioni vengono indicate come mutazioni cromosomiche o aberrazioni cromosomiche. Le mutazioni cromosomiche sono variazioni rispetto alla situazione selvatica, sia della struttura sia del numero dei cromosomi.

Le mutazioni cromosomiche possono verificarsi spontaneamente o possono essere indotte sperimentalmente mediante agenti mutageni chimici o fisici. Negli eucarioti, le mutazioni cromosomiche possono essere spesso visualizzate a livello citologico durante la mitosi e la meiosi, e la possibilità di identificare i diversi tipi di mutazione dipende dalla dimensione, dalla struttura e dal numero di cromosomi interessati. Le mutazioni cromosomiche possono essere distinte in variazioni della struttura e variazioni di numero, a seconda se esse implicano cambiamenti di parti di cromosomi o variazioni del numero di singoli cromosomi o di interi assetti cromosomici di un genoma.

Variazioni della struttura dei cromosomi

Le variazioni della struttura dei cromosomi implicano cambiamenti di parti di cromosomi, ed esistono cinque tipi più frequenti di questo tipo di aberrazioni: le delezioni, le duplicazioni, le inversioni, le inserzioni e le traslocazioni.

Mentre le prime due, comportano cambiamenti nella quantità di DNA di un cromosoma, le inversioni determinano un cambiamento nella disposizione di un tratto cromosomico, le inserzioni e le traslocazioni comportano variazioni nella localizzazione di un dato segmento cromosomico.

Le duplicazioni, le inversioni, le inserzioni e le traslocazioni possono revertire attraverso un processo inverso rispetto a quello che le ha inizialmente prodotte, mentre le

delezioni non possono revertire perché un intero tratto cromosomico è andato perduto. Tutti i tipi di mutazioni cromosomiche sopra citati si originano da almeno due rotture all'interno di un cromosoma, e in qualsiasi punto avvenga tale rottura, l'evento genera delle estremità tronche prive di sequenze specializzate atte ad impedire la degradazione delle stesse da parte delle esonucleasi cellulari e l'attacco di queste estremità su altri cromosomi; pertanto, queste estremità "appiccicose" possono attaccarsi all'estremità tronca su un altro cromosoma o alle estremità normali di altri cromosomi.

Delezioni

Si definisce delecto un cromosoma che ha perso una sua parte, terminale o interstiziale; il tratto delecto può essere più o meno esteso e può comprendere o non comprendere la regione centromerica. Le delezioni delle porzioni terminali dei cromosomi sono più frequenti rispetto a quelle interstiziali perché richiedono un singolo evento mutazionale (una rottura singola), mentre per le delezioni interstiziali sono richiesti più eventi (rottura su due tratti di un dato segmento cromosomico e successivo riarrangiamento del tratto distale al resto del cromosoma).

Il frammento delecto viene perso dalla cellula nei successivi cicli di divisione poiché è sprovvisto di centromero. Una delectione terminale isocromatidica può essere all'origine della formazione di un isocromosoma, mentre la perdita delle estremità telomeriche può portare alla formazione di un cromosoma ad anello.

Una delectione può derivare da un evento di crossing-over ineguale oppure da una inserzione inter- o intracromatidica o dal prodotto di segregazione di traslocazioni bilanciate.

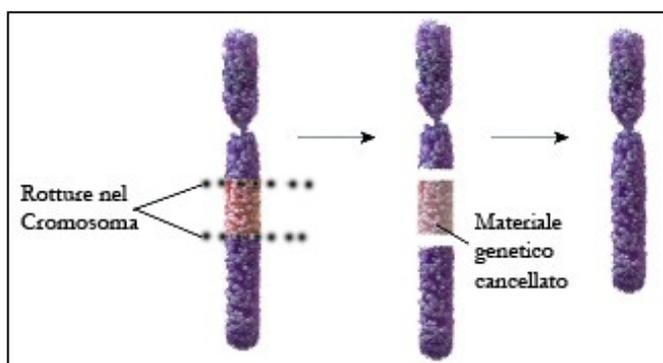


Fig. 13: Esempio di delectione

La delectione di un tratto cromosomico comporta sempre delle anomalie fenotipiche e la gravità del quadro clinico dipende dalla quantità e dall'importanza funzionale del materiale che viene perso con la delectione (Fig. 13).

Negli organismi diploidi gli effetti di una delectione possono essere attenuati dalla presenza, sul cromosoma omologo, di una copia del tratto

cromosomico deleto; d'altro canto, se l'omologo contiene in quel dato segmento cromosomico dei geni recessivi deleteri, le conseguenze possono essere molto gravi. Negli individui eterozigoti, le delezioni hanno come conseguenza la formazione di anse non appaiate visibili al momento dell'appaiamento degli omologhi alla meiosi; inoltre la delezione dell'allele dominante in un eterozigote ha come conseguenza la manifestazione dell'allele recessivo, e tale condizione viene definita pseudo dominanza e ha consentito la costruzione di mappe citologiche.

Nell'uomo, un certo numero di malattie è causato da delezioni di tratti cromosomici; in molti casi le anomalie sono presenti in individui eterozigoti, e gli omozigoti per la delezione sono spesso letali se la delezione è sufficientemente estesa.

Una delle più note sindromi da delezione autosomica è la sindrome del cri-du-chat, una delezione eterozigote visibile del braccio p del cromosoma 5 (5p). I bambini affetti dalla sindrome del cri-du-chat possono presentare malformazioni multiple, e ritardo psicomotorio più o meno grave.

Nel caso in cui la delezione interstiziale riguarda piccoli tratti cromosomici al limite della risoluzione ottica si parla di microdelezioni. Le microdelezioni possono comportare la perdita di uno o più geni, dando luogo a patologie conosciute come malattie da geni contigui. Le due malattie genetiche da microdelezione meglio conosciute sono la sindrome di Angelmann e la sindrome di Prader-Willi, due patologie con espressione fenotipica completamente diversa, anche se la regione della microdelezione è sempre la banda 15p12.

Duplicazioni

Una duplicazione è una mutazione cromosomica che comporta il raddoppiamento di un determinato tratto cromosomico ed è piuttosto rara; la dimensione del tratto duplicato

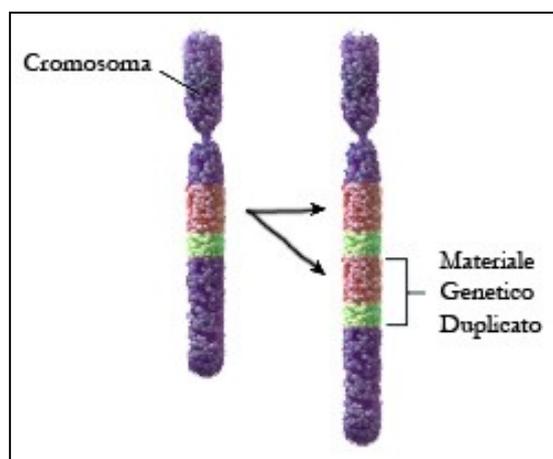


Fig. 14: Esempio di duplicazione

può variare considerevolmente (Fig. 14). Si distinguono duplicazioni dirette e duplicazioni inverse a seconda che il segmento invertito conservi l'originale disposizione rispetto al centromero o ruoti di 180°; quando il segmento duplicato è adiacente al segmento originale si parla di duplicazioni in tandem, e se il segmento duplicato è

disposto in tandem all'estremità di un cromosoma si tratta di una duplicazione in tandem terminale. Le duplicazioni eterozigoti danno origine ad anse non appaiate analoghe a quelle descritte per le delezioni e pertanto possono essere identificate dal punto di vista citologico.

I meccanismi che portano ad una duplicazione sono molteplici:

- crossing-over ineguale tra due cromosomi omologhi;
- inserzione intracromatidica di un segmento cromosomico da un cromatide al cromatide fratello: la successiva divisione darà origine ad un cromosoma duplicato ed uno deieto;
- crossing-over meiotico in portatori di inversione pericentrica, di inserzione, di traslocazione reciproca o di cromosomi ad anello.

Le duplicazioni hanno svolto un ruolo molto importante nell'evoluzione delle famiglie multigeniche; infatti si ritiene che ogni famiglia si sia evoluta da un unico gene ancestrale mediante duplicazione della sequenza e successiva divergenza.

Inversione

Si definisce inversione la rottura di una parte di un cromosoma, seguita da rotazione

di 180° del segmento compreso tra i punti di rottura e ricongiungimento dei suoi estremi al resto del cromosoma. Si possono distinguere due differenti modelli d'inversione: l'inversione pericentrica e l'inversione paracentrica a seconda che il segmento invertito comprenda o meno il centromero.

Le inversioni pericentriche conseguono a due rotture e successiva rotazione di 180°, una sul braccio corto e l'altra sul braccio lungo di uno stesso

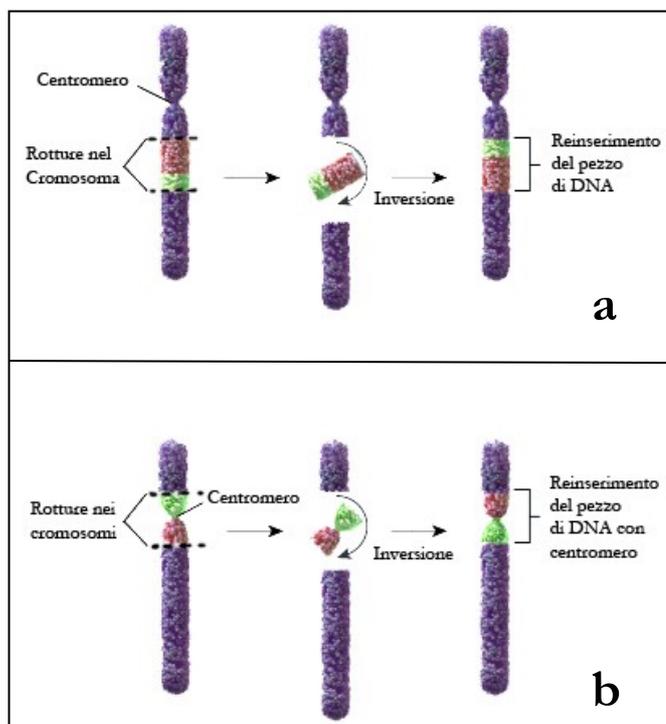


Fig. 15: Esempio di inversione (a) paracentrica e (b) pericentrica

cromosoma; pertanto la regione centromerica è sempre compresa nel tratto invertito, ma la morfologia del cromosoma può modificarsi se i due punti di rottura si trovano a distanze diverse dal centromero. L'ordine dei geni contenuti nel tratto invertito, naturalmente, sarà invertito rispetto al resto del cromosoma, e questo potrà occasionalmente comportare degli effetti svantaggiosi sul fenotipo non per deficienza/eccesso di materiale genetico, ma per effetto di posizione (Fig. 15b).

Le inversioni paracentriche conseguono a due rotture e successiva rotazione di 180° di un tratto di cromosoma compreso su un solo braccio, pertanto il centromero non è mai compreso nel tratto invertito (Fig. 15a).

In questo caso, la morfologia del cromosoma, come pure l'indice brachiale e quello centromerico, non risultano alterati. Come per l'inversione pericentrica, l'ordine dei geni contenuti nel segmento invertito sarà capovolto ed i geni che prima si trovavano vicino al centromero, adesso si trovano più distanti da esso.

Le conseguenze meiotiche di una inversione dipendono dal fatto che l'inversione sia omozigote od eterozigote. Se l'inversione è omozigote, la meiosi avviene normalmente e non vi sono problemi in conseguenza di duplicazioni o delezioni.

Un crossing-over entro un'inversione eterozigote, invece, ha delle gravi conseguenze genetiche; inoltre, i cromosomi ricombinanti sono diversi a seconda che l'evento di crossing-over si verifichi in individui eterozigoti per un'inversione pericentrica o paracentrica.

La presenza di un tratto invertito su uno dei due omologhi richiede la formazione di anse che comprendono i tratti invertiti affinché si possa avere l'appaiamento degli omologhi, e tali strutture prendono il nome di anelli o anse d'inversione.

Inserzione

Si definisce inserzione l'inserimento di un segmento cromosomico, terminale o interstiziale, all'interno dello stesso cromosoma o all'interno di un altro. Possono essere distinte in inserzioni dirette o inverse a seconda che il segmento inserito conservi o meno l'orientamento originale rispetto al centromero; nel passaggio da un braccio ad un altro diverso da quello di origine (da p a q, o viceversa), se il frammento ruota di 180° si avrà una inserzione di tipo diretto, mentre la mancata rotazione determinerà una inversione di tipo inverso.

Il trasferimento di un frammento di cromosoma in altra sede richiede, se il frammento è interstiziale, tre rotture: due sul cromosoma da cui il frammento proviene, e

una sul cromosoma che lo riceve; se il frammento è terminale, le rotture richieste solo soltanto due.

Si possono distinguere sette differenti modelli di inserzione:

1. Inserzione diretta tra cromosomi non omologhi; si origina un cromosoma con delezione interstiziale, ed uno con inserzione che conserva la disposizione delle bande rispetto al centromero.
2. Scambio isocromatidico intercromosomico, ovvero una inserzione da un cromosoma all'omologo corrispondente; si origina un cromosoma con delezione interstiziale e un cromosoma con duplicazione per il tratto deleto nell'omologo corrispondente.
3. Inserzione isocromatidica tra cromosomi non omologhi; in questo caso si ha l'inserzione di un tratto da un cromosoma di una coppia a quello di un'altra portando alla formazione di un cromosoma deleto in una coppia ed uno con inserzione nell'altra.
4. Shift cromatidico o monocromatidico, ovvero inserzione di un segmento da un braccio all'altro dello stesso cromatide; si origina un cromosoma normale ed uno di uguale lunghezza ma con rapporto fra i bracci diverso rispetto all'omologo.
5. Shift isocromatidico; determina l'inserzione di un tratto cromosomico da un braccio all'altro di entrambi i cromatidi e porta alla formazione di due cromosomi di uguale lunghezza ma con diverso rapporto fra i bracci.
6. Scambio intracromatidico, ovvero l'inserzione di un frammento di un cromatide nel cromatide fratello; come risultato si originano un cromosoma deleto ed uno duplicato.
7. Scambio intercromatidico, ovvero l'inserzione di un tratto cromosomico da un cromatide ad un cromatide del cromosoma omologo corrispondente; come risultato si origina una coppia di omologhi in cui un cromosoma è normale ed uno è deleto, oppure un cromosoma normale ed uno duplicato.

Traslocazioni

Si definisce traslocazione una mutazione cromosomica in conseguenza della quale vi è un cambiamento di posizione di segmenti cromosomici e delle sequenze geniche in essi contenute.

Se il segmento cromosomico cambia posizione entro lo stesso cromosoma si parla di traslocazione intracromosomica, mentre se si sposta da un cromosoma ad un altro non omologo si parla di traslocazione intercromosomica. Se lo spostamento prevede il trasferimento di un frammento in una sola direzione da un cromosoma all'altro, si parla di traslocazione non reciproca (Fig. 16b), mentre se si ha uno scambio di segmenti fra due cromosomi, allora avremo una traslocazione reciproca (Fig. 16a). Le traslocazioni reciproche possono comportare variazioni nella lunghezza dei due cromosomi, che restano sempre monocentrici.

Raramente possono essere coinvolti nella traslocazione più di due cromosomi e tali eventi prendono il nome di traslocazioni complesse e *jumping translocation*; in particolare le *jumping translocation* sono dei riarrangiamenti rari e complessi che richiedono contemporaneamente più di un evento mutazionale e che conduce a tre o più differenti linee cellulari.

Le traslocazioni differiscono dalle inserzioni in quanto nelle traslocazioni il frammento si trasferisce da un cromosoma all'estremità terminale di un altro.

Le traslocazioni tipicamente influenzano i prodotti della meiosi; in molti casi i gameti prodotti sono sbilanciati in quanto presentano duplicazioni e/o delezioni e possono essere

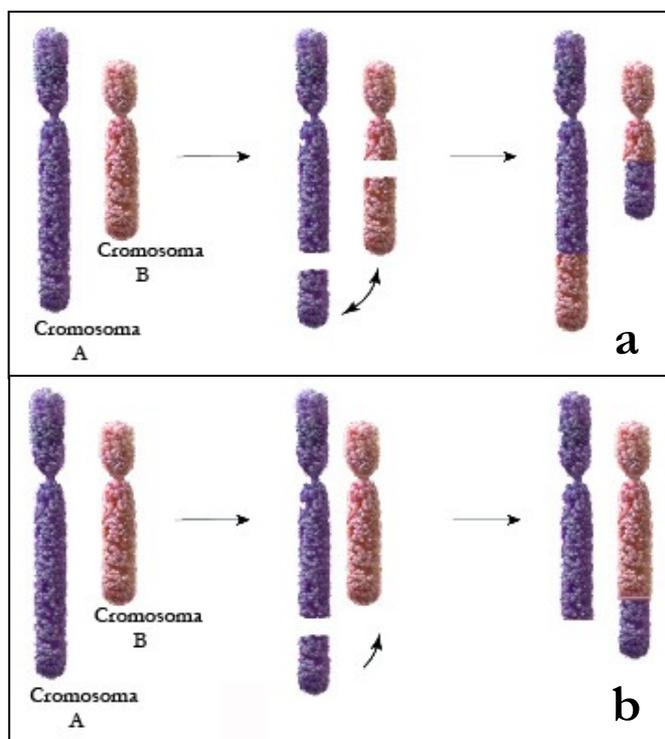


Fig. 16: Esempio di traslocazione (a) reciproca e (b) non reciproca.

non vitali. In caso di omozigosi per una traslocazione reciproca la meiosi avviene normalmente, dato che tutti i cromosomi possono appaiarsi normalmente e il crossing-over non produce alcun cromatidio anormale; in eterozigosi, invece, le diverse parti dei cromosomi omologhi si appaiano, assumendo generalmente una disposizione a croce dove ogni cromosoma è parzialmente omologo ad altri due cromosomi del gruppo.

Un particolare tipo di traslocazione reciproca in cui la rottura avviene, su entrambi i cromosomi, in prossimità del centromero prende il nome di traslocazione robertsoniana.

Il riarrangiamento impegna, per definizione, i cromosomi acrocentrici e porta alla fusione dei centromeri (fusione centrica): interessa pertanto esclusivamente i cromosomi del gruppo D e G. L'anomalia ha origine da una rottura centromerica o paracentromerica con successiva fusione dei bracci lunghi; da ciò ne risulta un cromosoma anomalo che è metacentrico se la traslocazione avviene tra cromosomi dello stesso gruppo (Dq/Dq o Gq/Gq), oppure sub metacentrico se la traslocazione avviene fra cromosomi di gruppi diversi (Dq/Gq o Gq/Dq). Il piccolo cromosoma metacentrico che si origina dalla fusione dei bracci corti generalmente viene perso per cui le cellule dei portatori bilanciati sono quasi sempre ipodiploidi (45 cromosomi). Altre volte, se presenta il centromero, viene conservato e indicato come marker.

In base a quanto avviene nella regione centromerica si possono distinguere tre tipi di traslocazioni robertsoniane:

1. Centromero singolo, di origine non identificata;
2. Centromero singolo, di origine nota;
3. Centromero doppio (cromosoma dicentrico).

Le traslocazioni robertsoniane sono il riarrangiamento cromosomico umano più frequente, con una frequenza superiore a 1:1000 nati, e costituiscono, seppur raramente, uno dei meccanismi con cui si originano le disomie uniparentali. Se bilanciate, le traslocazioni robertsoniane determinano un fenotipo normale, mentre le condizioni sbilanciate per monosomie o trisomie sono letali; i portatori di traslocazioni robertsoniane fra cromosomi omologhi possono concepire solo zigoti monosomici o trisomici. Alcune sindromi di Down sono dovute a traslocazioni robertsoniane che coinvolgono il cromosoma 21.

Isocromosoma

Un isocromosoma è un cromosoma perfettamente metacentrico in quanto è costituito dall'esatta duplicazione di uno dei due bracci di un cromosoma (p o q) che ha conservato l'unità centromerica (Fig.: 17).

Un isocromosoma si origina in anafase, quando la separazione dei due cromatidi che costituiscono il cromosoma si separano lungo un piano trasversale che passa per il centromero piuttosto che su un piano longitudinale, in modo che si separano i due bracci (p o q) di uno stesso cromosoma anziché i due cromatidi fratelli; ovviamente, solo uno dei

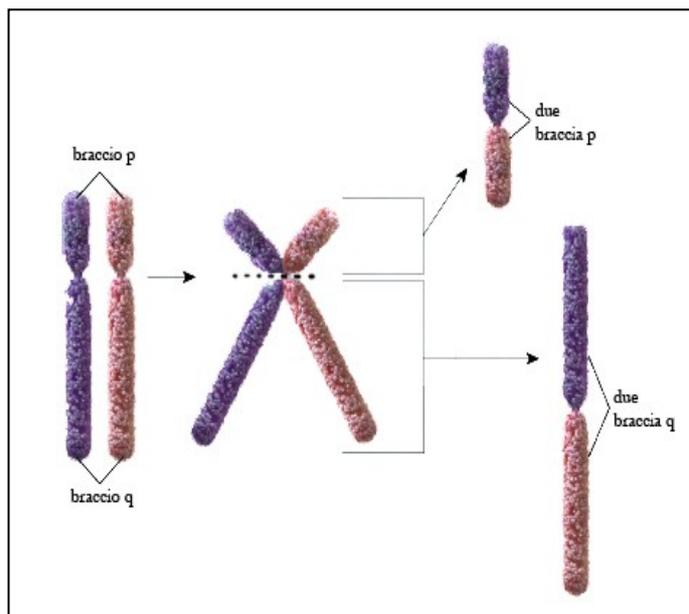


Fig. 17: Meccanismo di formazione di un isocromosoma.

bracci manterrà il centromero. L'osservazione di isocromosomi dei bracci lunghi è più frequente rispetto a quella di isocromosomi dei bracci corti, forse perché quest'ultima offre una minore capacità replicativa e conservativa. I più comuni isocromosomi sono quelli sessuali: $i(Xq)$, $i(Yq)$ e $i(Yp)$.

Un isocromosoma si può anche originare a seguito di rottura/ricongiungimento

telomerico; in questo caso si forma un isocromosoma isodicentrico che funzionalmente si comporta come pseudodicentrico, in quanto solo uno dei due centromeri rimane attivo. Questa aberrazione è stata riscontrata nei cromosomi acrocentrici e nel cromosoma Y.

La relativa instabilità degli isocromosomi porta alla loro perdita durante la disgiunzione meiotica e rende conto della loro frequente condizione a mosaico; inoltre è stato osservato che alcuni isocromosomi hanno espressione tessuto-specifica.

Anche se gli isocromosomi sono compatibili con la vita, inducono sterilità negli individui che ne sono portatori e sindromi denominate Turneriane.

Variazioni del numero dei cromosomi

Un organismo o una cellula con un assetto di cromosomi completo o un multiplo esatto di assetti completi viene definito euploide. Mutazioni cromosomiche che determinano variazioni del numero di singoli cromosomi o variazioni di parti di essi sono esempi di aneuploidie; un organismo aneuploide è caratterizzato da un numero cromosomico che non è un multiplo esatto dell'assetto cromosomico aploide, o dal possedere cromosomi con una o più parti duplicate o delete.

La formazione di gameti con numero cromosomico anormale è da attribuire tipicamente ad una non-disgiunzione di uno o più cromosomi durante la meiosi I o la meiosi II, ma nel caso di una non-disgiunzione in meiosi I non vengono prodotti gameti

normali, mentre una non disgiunzione in meiosi II porta alla formazione di due gameti normali e due gameti anomali.

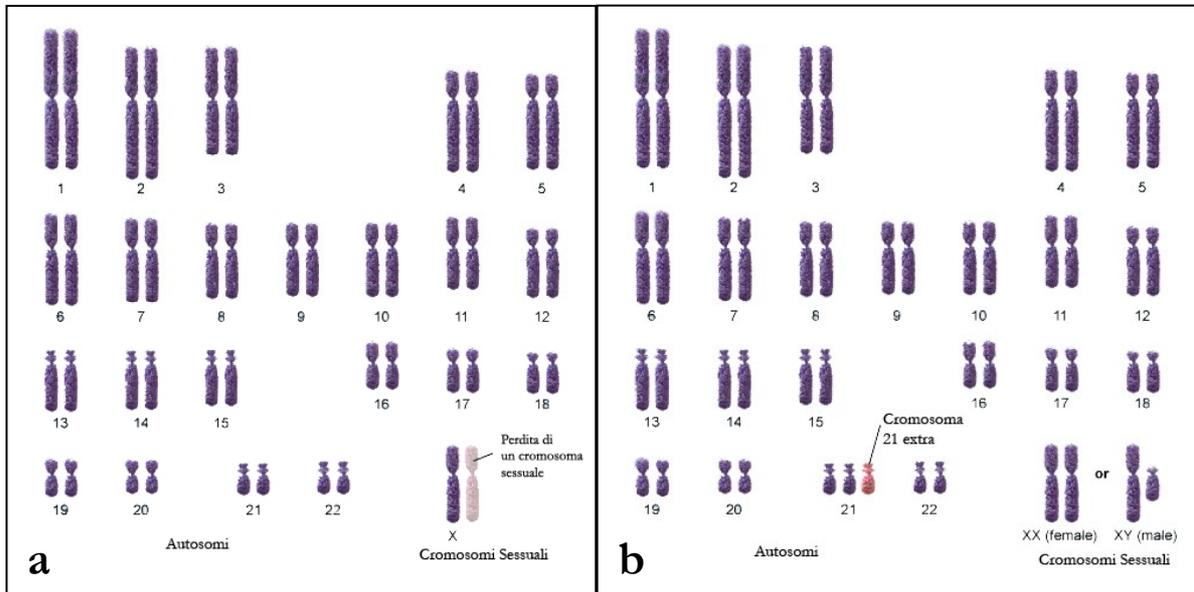


Fig. 18: Esempio di (a) monosomia (nell'immagine è rappresentata una monosomia per il cromosoma X) e di (b) trisomia (nell'immagine è rappresentata una trisomia per il cromosoma 21).

Aneuploidia

Nell'aneuploidia uno o più cromosomi vengono persi o aggiunti rispetto all'assetto cromosomico normale; è una condizione spesso letale nella maggior parte degli animali, per cui nei Mammiferi viene riscontrata principalmente in feti abortiti.

Negli organismi diploidi, le aneuploidie rientrano in quattro categorie principali:

1. Nullisomia; questa condizione implica la perdita di una coppia di cromosomi omologhi quindi la cellula ha corredo cromosomico $2N-2$;
2. Monosomia; una cellula monosomia è una cellula che ha perso un singolo cromosoma e quindi avrà un corredo cromosomico $2N-1$ (Fig. 18a);
3. Trisomia; questa condizione implica la presenza di un singolo cromosoma in più, quindi la cellula avrà tre copie di un determinato cromosoma e avrà corredo cromosomico $2N+1$ (Fig. 18b);
4. Tetrasomia; in questo caso è presente una coppia di cromosomi in più per cui, relativamente ad una coppia di omologhi avremo quattro cromosomi e la cellula avrà corredo cromosomico $2N+2$.

L'aneuploidia può comportare la perdita o l'aggiunta di più di un cromosoma o di una coppia di cromosomi, per cui una cellula con doppia monosomia sarà una cellula $2N-1-1$, mentre una cellula con doppia tetrasomia sarà una cellula $2N+2+2$; in entrambi i casi la non-disgiunzione meiotica potrebbe aver interessato due diversi cromosomi nella produzione di un gamete in uno dei genitori. Tutte le forme di aneuploidia hanno delle conseguenze gravi alla meiosi, e un gamete aneuploide se fecondato può portare alla formazione di zigoti monosomici, trisomici, tetrasomici, pentasomici, ecc.

Le monosomie degli autosomi sono quasi sempre incompatibili con la vita, per cui si trovano solo in prodotti abortivi; invece, le trisomie di alcuni autosomi, quali il cromosoma 21 (Sindrome di Down) (Fig. 18b), il 13 (Sindrome di Patau), il 18 (Sindrome di Edwards) e l'8 (Sindrome di Warkany), possono consentire la sopravvivenza, anche se a volte è piuttosto limitata.

Le aneuploidie dei cromosomi sessuali sono quasi sempre compatibili con la vita e le ripercussioni sul fenotipo possono essere variabili ma mai gravi, anche se la capacità riproduttiva è generalmente sempre compromessa (Fig. 18a).

Cambiamenti relativi ad interi assetti cromosomici

La monoploidia e la poliploidia implicano variazioni rispetto alla condizione normale, del numero di interi assetti cromosomici; dato che in entrambi i casi è interessato il numero di assetti cromosomici completi, i monoploidi e i poliploidi sono entrambi euploidi.

La monoploidia e la poliploidia sono letali per la maggior parte degli animali, ma sono molto più tollerate nelle piante dove spesso sono la regola.

Cambiamenti relativi ad interi assetti cromosomici completi possono derivare da una non-disgiunzione meiotica che coinvolge tutti i cromosomi; se la non-disgiunzione avviene alla meiosi I, metà dei gameti non avrà alcun assetto cromosomico e l'altra metà ne avrà due. Se invece la non-disgiunzione avviene alla meiosi II, metà dei gameti avrà un unico assetto normale di cromosomi, un quarto avrà due assetti cromosomici e un quarto non avrà alcun assetto cromosomico.

La fusione di un gamete con due assetti cromosomici con un gamete normale darà origine ad uno zigote poliploide che, nello specifico, avendo tre assetti cromosomici completi sarà un triploide ($3N$); se si fondono due gameti aventi ognuno due assetti cromosomici completi, lo zigote risultante sarà tetraploide ($4N$).

La poliploidia può verificarsi anche in cellule somatiche a seguito di una non-disgiunzione mitotica di interi assetti cromosomici, mentre individui monoploidi si sviluppano generalmente da uova non fecondate.

Un individuo monoploide ha un solo assetto cromosomico e tale condizione viene spesso definita aploidia, anche se tale termine è più corretto se riferito allo status delle cellule gametiche. La monoploidia si osserva raramente negli organismi diploidi, poiché in questi organismi sono presenti numerose mutazioni letali recessive, che determinano la morte prematura di molti monoploidi, impedendone la rilevazione.

La poliploidia è una condizione per cui una cellula o un organismo possiede un numero di assetti cromosomici superiore al normale; nella maggior parte degli animali non si osservano casi di poliploidia e i migliori esempi di questa condizione sono forniti dalle piante.

I poliploidi possono insorgere spontaneamente oppure possono essere indotti sperimentalmente; spesso derivano da alterazioni dell'apparato del fuso in una o più divisioni mitotiche o meiotiche.

Esistono due classi di poliploidi: quelli che hanno un numero di assetti cromosomici pari, e quelli che hanno un numero di assetti cromosomici dispari. I poliploidi con un numero pari di assetti hanno una maggior probabilità di essere almeno parzialmente fertili, dato che c'è la possibilità che i cromosomi omologhi possano appaiarsi durante la meiosi ed avere una buona segregazione.

I poliploidi con numero dispari di assetti cromosomici hanno sempre un cromosoma

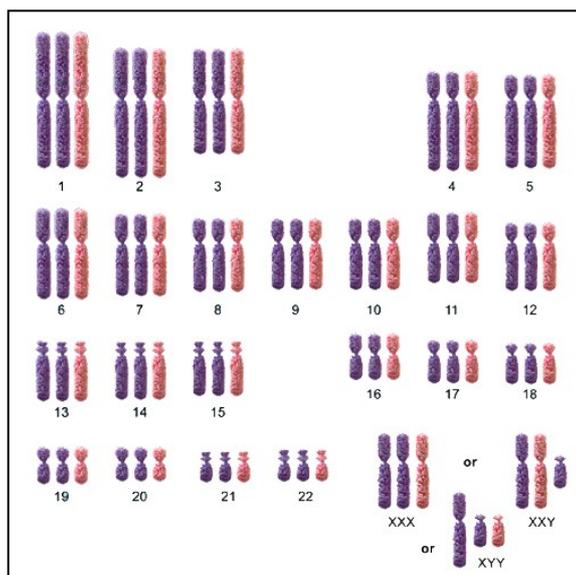


Fig. 19: Esempio di cariotipo triploide

spaiato per ogni coppia e quindi la probabilità che si formi un gamete bilanciato è estremamente bassa e questi organismi sono generalmente sterili.

Nell'uomo il tipo di poliploidia più comune è la triploidia (69,XXX; 69,XXY; 69,XYY), ma questa condizione è sempre letale (Fig. 19); si osserva triploidia nel 15-20% di aborti spontanei e in circa 1 caso su 10.000 nati vivi, anche se la maggior parte di

essi muore entro un mese. La tetraploidia (92,XXXX; 92,XXYY; 92,XXXY; 92,XYYY) nell'uomo è sempre letale, generalmente prima della nascita, e si osserva in circa il 5% degli aborti spontanei; molto raramente si osserva un neonato tetraploide, ma tale individuo non può sopravvivere a lungo.

Mentre una completa tetraploidia si osserva quasi esclusivamente in feti con sviluppo non superiore a tre settimane, sono stati segnalati casi di neonati malformati, di entrambi i sessi, con mosaicismo 46/92. Questo particolare quanto insolito mosaicismo si verifica quando, durante le prime divisioni mitotiche, un blastomero si replica senza che si abbia la successiva divisione. La diversità d'espressione fenotipica dipende dalla percentuale di cellule tetraploidi che può variare considerevolmente a seconda del momento in cui è insorto l'errore: più è precoce, maggiore è la presenza nei tessuti del clone anomalo. Se l'errore insorge in un momento più tardivo, il mosaicismo può riscontrarsi solo in alcuni tessuti e mancare negli altri.

I riarrangiamenti interspecifici

Negli ultimi anni l'utilizzo di FISH con sonde BAC ha permesso di definire l'ordine dei marcatori lungo i cromosomi e di meglio definire i punti di rottura dei riarrangiamenti intercromosomici e l'eventuale formazione di neocentromeri evolutivi. Attraverso questa metodica è stato possibile ipotizzare cinque diversi ipotetici cariotipi ancestrali:

- Cariotipo ancestrale di tutti i primati (APK);
- Cariotipo ancestrale dei primati Anthroidea (AAK);
- Cariotipo ancestrale dei Platyrrhini (APIK);
- Cariotipo ancestrale dei Catarrhini (ACK);
- Cariotipo ancestrale degli Hominoidea (AHK).

Precedenti ricostruzioni del cariotipo ancestrale attraverso l'utilizzo di sonde painting cromosoma specifiche ipotizzavano un numero diploide da 48 a 50 cromosomi (Muller et al., 1999; O'Brien et al., 1999; Murphy et al., 2001). Diversi autori hanno trovato nelle Proscimmie segmenti sintenici ai cromosomi umani 10p, 10q e un'associazione 7/16p identica a quella proposta per il cariotipo ancestrale degli euteri (AEK). Quindi questi cromosomi potrebbero essere tutti inclusi nel APK. Il genoma dell'ultimo antenato comune a tutti i primati viventi aveva numero diploide $2n=50$, composto dai seguenti cromosomi: 1, 2p-q, 2q, 3/21, 4, 5, 6, 7B, 7a/16p, 8, 9, 10p, 10q, 11,12a/22a, 12b/22b, 13, 14/15, 16q, 17, 18, 19p, 19q, 20, X e Y (Fig. 20).

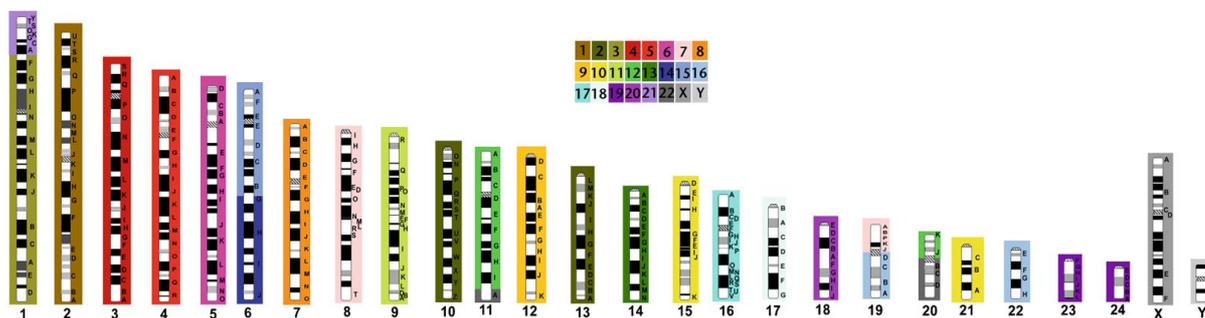


Fig. 20: Ideogramma del cariotipo del primate ancestrale (APK) $2n=50$; le parti colorate si riferiscono ai cromosomi umani (modificato da Stanyon et al. 2008).

Gli Anthroidea comprendono le scimmie del Nuovo Mondo (NWM o Platyrrhini), le scimmie del Vecchio Mondo (OWM o Catarrhini), le scimmie propriamente dette e l'uomo.

Da dati citogenetici è chiaro che l'origine degli antropoidi è delineata da: i) una fissione dell'associazione sintenica 7/16p presente sia in AEK che in APK; ii) una traslocazione reciproca che ha dato origine ai cromosomi 12 e 22; iii) la fusione tra i cromosomi 19p e 19q, quindi il cariotipo dell'antropoide ancestrale ha numero diploide $2n=50$ composto dai seguenti cromosomi: 1, 2p-q, 2q, 3/21, 4, 5, 6, 7a, 7b, 8, 9, 10p, 10q, 11, 12, 13, 14/15, 16p, 16q, 17, 18, 19, 20, X e Y (Fig. 21).

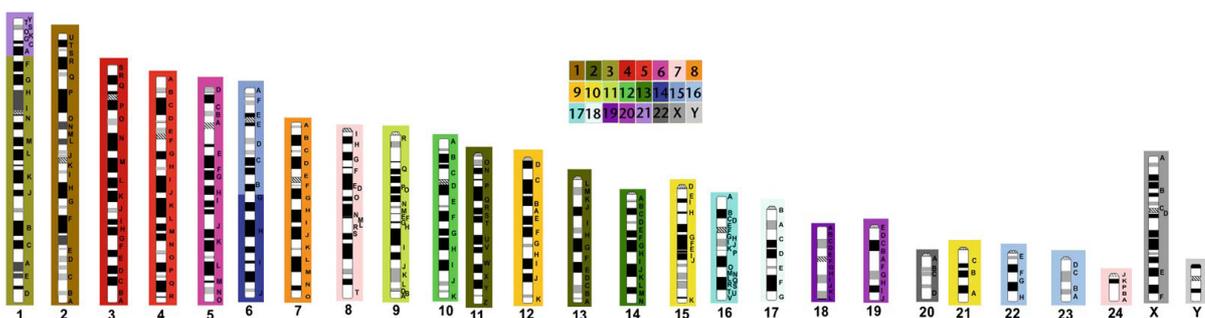


Fig. 21: Ideogramma del cariotipo dell'ancestrale dei primati Anthroidea (AAK) $2n=50$; le parti colorate si riferiscono ai cromosomi umani (modificato da Stanyon et al. 2008).

Il cariotipo ancestrale dei Platyrrhini ha numero diploide $2n=54$, caratterizzato da sei fissioni in quattro cromosomi (1, 3/21, 8 e 14/15) e da quattro fusioni (2/16, 5/7, 8/18 e 10/16). Quindi il cariotipo è costituito dai seguenti cromosomi: 1a, 1b, 2a, 2b/16, 3a, 3b, 3c/21, 4, 5/7a, 6, 7b, 8a, 8b/18, 9, 10p, 10q/16, 11, 12, 13, 14/15a, 15b, 17, 19, 20, 22, X e Y (Fig. 22).

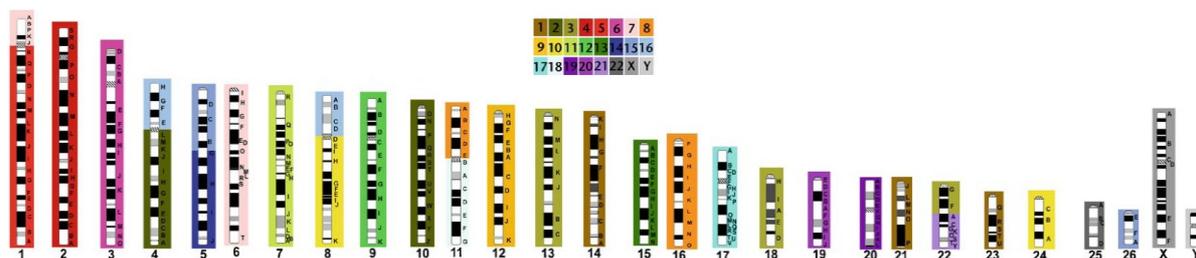


Fig. 22: Ideogramma del cariotipo dell'ancestrale dei Platyrrhini (APIK) $2n=54$; le parti colorate si riferiscono ai cromosomi umani (modificato da Stanyon et al. 2008).

Tutte le OWM sono legate da tre fusioni che danno origine ai cromosomi omologhi ai cromosomi umani 7, 10 e 16. È presente inoltre una fissione dell'associazione 3/21, dando un cariotipo ancestrale dei Catarrhini con numero diploide $2n=46$ composto dai seguenti cromosomi: 1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14/15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X e Y (Fig. 23).

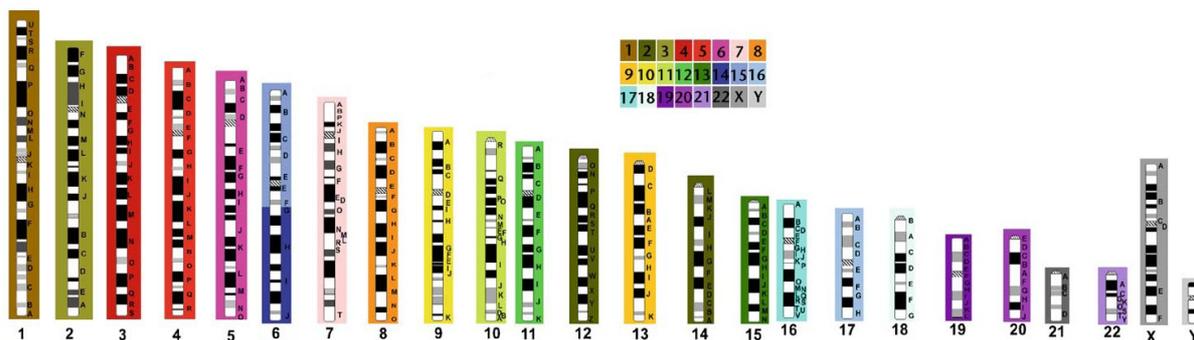


Fig. 23: Ideogramma del cariotipo dell'ancestrale dei Catarrhini (ACK) $2n=46$; le parti colorate si riferiscono ai cromosomi umani (modificato da Stanyon et al. 2008).

Gli Hominoidea includono le scimmie minori, le grandi scimmie e l'uomo. Da dati ottenuti attraverso l'utilizzo di sonde painting cromosoma specifiche si può affermare che tutti sono legati da una fissione del blocco sintenico 14/15 che porta il numero diploide dei cromosomi del cariotipo ancestrale degli Hominoidea a $2n=48$ (Fig. 24).

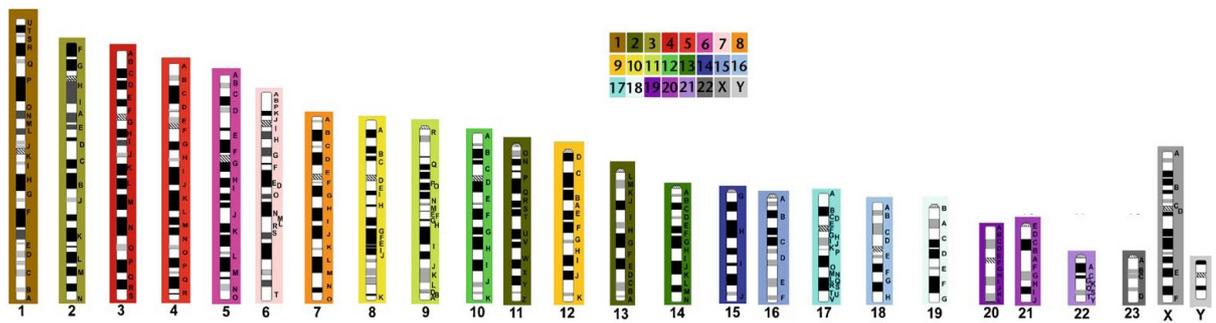


Fig. 24: Ideogramma del cariotipo dell'ancestrale degli Hominoidea (AHK) $2n=48$; le parti colorate si riferiscono ai cromosomi umani (modificato da Stanyon et al. 2008).

Analizzando singolarmente l'evoluzione di ogni singolo cromosoma umano possiamo affermare che:

- Il cromosoma 1 è sintenico sia in AEK che in APK. Le differenze esistenti tra il cromosoma umano e quello dell'ancestrale sono l'acquisizione di una larga regione eterocromatica e una piccola inversione pericentrica avvenuta nell'uomo. Questo cromosoma è presente in tutti i cariotipi ancestrali fatta eccezione per APIK, che presenta, invece, tre frammenti: un segmento è omologo a tutto il braccio q mentre l'ancestrale braccio p è diviso in due segmenti di uguale grandezza.
- Il cromosoma 2 è il recente risultato di una fusione telomerica individuata nel cromosoma umano nella banda 2q13. Tutti gli altri primati hanno come omologo a questo cromosoma due cromosomi. I due cromosomi di AHK sono acrocentrici e mantengono lo stesso ordine dei marcatori presente nel cromosoma umano come è possibile osservare nell'orango. Lo stesso ordine di marcatori e posizione del centromero si osserva nei cromosomi acrocentrici di ACK, AAK e APK. Invece, gli omologhi 2p-q e 2q dello scimpanzé sono derivati da AHK per una inversione pericentrica. Il cromosoma 2 umano deriva per fusione dei due cromosomi presenti nello scimpanzé, in quanto ordine dei marcatori e posizione del centromero coincidono e questo fa capire che le due specie sono evolutivamente legate. L'omologo presente nelle OWM è inoltre derivato da indipendenti inversioni pericentriche con punti di rottura diversi da quelli trovati nello scimpanzé. In APIK il segmento 2p-q è fuso con 16q e l'ordine dei marcatori è derivato da una inversione paracentrica.

- Il cromosoma 3 è intatto in tutti i cariotipi ancestrali eccetto per APIK, anche se è stato soggetto a riarrangiamenti inter- e intracromosomali. In APK e in AEK questo cromosoma era fuso con il cromosoma 21, questa situazione è presente anche in AAK. In ACK si assiste alla fissione del cromosoma 21, mentre in AHK si osserva una inversione paracentrica e la formazione di un neocentromero evolutivo. In APIK questo grande blocco è separato in tre segmenti di diversa grandezza, che si formano a causa di una inversione paracentrica seguita da due fissioni e la formazione di un neocentromero evolutivo.
- Il cromosoma 4 è caratterizzato dal mantenere l'ordine dei marcatori in APK, AAP e APIK, ma il centromero si trova nella regione terminale del braccio q quindi nei cariotipi ancestrali questo cromosoma appare invertito. La formazione di un neocentromero evolutivo giustifica il cromosoma submetacentrico di ACK e AHK e quello presente tuttora nell'uomo. Varie inversioni spiegano le differenze osservabili nei cromosomi delle grandi scimmie e di molti Catarrhini.
- Il cromosoma 5 è estremamente conservato in tutti i primati. In AHK, ACK e APK si trovano lo stesso ordine dei marcatori e la medesima posizione del centromero del cromosoma umano. In APIK questo cromosoma ha subito una fusione con un frammento omologo al cromosoma 7. Il centromero di questo cromosoma deriva dal segmento 7 mentre quello del cromosoma 5 è inattivato. Nel cromosoma 5 di APIK l'ordine dei marcatori è conservato ma invertito.
- Il cromosoma 6 mantiene l'ordine dei marcatori in APK, AAK e APIK, mentre nel cromosoma di ACK è avvenuta un'inversione. La posizione originale del centromero era nella regione distale del braccio q del cromosoma umano 6 (6q). In AHK e nei Catarrhini si sono formati neocentromeri evolutivi differenti.
- Il cromosoma 7 è andato incontro a una complessa evoluzione. Negli ancestrali APK, AAK e APIK sono presenti due cromosomi (7a e 7b). Il cromosoma più piccolo (7a) è equivalente al braccio p del cromosoma presente nell'orango mentre il cromosoma più grande (7b) è equivalente al suo braccio q. Il cromosoma trovato in orango si conserva identico per ordine di marcatori e posizione del centromero in ACK e in AHK. Nel APK il cromosoma 7a è associato con 16q. In APIK si ha un'associazione sintenica 5/7, il segmento 7 mantiene lo stesso ordine dei marcatori

e la stessa posizione del centromero presente in APK, AAK. Nel ACK è avvenuta un'inversione pericentrica seguita da un'inversione paracentrica che portano il cromosoma presente in AHK a quello osservabile nell'uomo.

- Il cromosoma 8 è un cromosoma altamente conservato in tutti i primati, sia per quanto riguarda l'ordine dei marcatori sia per la posizione del centromero. Infatti l'organizzazione del cromosoma osservabile nell'uomo si osserva anche in APK, AAK, ACK e AHK. Nell'antenato delle NWM il cromosoma appare diviso in due segmenti: il braccio p si fonde con il cromosoma 18 e il braccio q forma un cromosoma indipendente che mantiene l'ordine dei marcatori. Quindi la posizione del centromero appare modificata, anche se non può essere definito se questo è dovuto ad inversioni o alla formazione di un neocentromero.
- Il cromosoma 9 risulta identico in tutti i cariotipi ancestrali per quanto riguarda l'ordine dei marcatori anche se la posizione del centromero risulta variata. In APK è presente un cromosoma acrocentrico che risulta conservato in AAK, ACK e APIK. Il cromosoma presente in AHK differisce dagli altri per una estesa inversione paracentrica che forma il cromosoma osservabile in gorilla e orango. Il cromosoma umano differisce per un'ulteriore inversione pericentrica e l'acquisizione di un grande blocco etero cromatico pericentromerico. Il cromosoma umano fa da intermedio per quello presente nello scimpanzè, che presenta un'ulteriore inversione pericentrica. La diversa posizione del centromero nelle diverse specie può essere giustificata dalle numerose inversioni o per la formazione di neocentromeri.
- Il cromosoma 10 con diverso ordine dei marcatori rispetto a quello umano è presente in ACK e AHK e si mantiene intatto in macaca e orango. In APK, AAK e APIK sono invece presenti due segmenti. In APK sono rappresentati da due cromosomi acrocentrici che rappresentano il braccio p e il braccio q di quello presente nei Catarrhini. In APIK il braccio p rimane intatto mentre il braccio q forma un cromosoma derivato fondendosi con 16p. Nelle diverse linee evolutive si osservano varie inversioni, traslocazioni e formazioni di neocentromeri.
- Il cromosoma 11 umano così come quello delle scimmie africane deriva dal cromosoma ancestrale, un cromosoma acrocentrico che mantiene ordine dei

marcatori e posizione del centromero in ordini di mammiferi anche distanti tra loro, attraverso un'inversione pericentrica e la formazione di un neocentromero. Si osservano neocentromeri anche in orango, scimmie minori e OWM.

- Il cromosoma 12 in APK mostra due associazioni sinteniche con segmenti del cromosoma 22. Un submetacentrico di medie dimensioni (APK 11) e un cromosoma metacentrico abbastanza piccolo (APK 20). La fusione reciproca nel AAK porta alla formazione di un cromosoma submetacentrico sintenico al cromosoma 12 (AAK 10) e un piccolo cromosoma acrocentrico sintenico al cromosoma 22 (AAK 20), entrambi conservano l'ordine dei marcatori presente nei cromosomi umani. Questi due cromosomi sono presenti in ACK e AHK. Negli omologhi al cromosoma 12 delle NWM sembra sia avvenuta un'inversione pericentrica, molto probabilmente già presente in APIK. Il cromosoma 22 in diverse specie di NWM appare riarrangiato e frammentato quindi non è possibile definire se l'ordine dei marcatori è rimasto invariato, ma è probabile credere che in APIK l'ordine dei marcatori fosse diverso.
- Il cromosoma 13 è un cromosoma acrocentrico altamente conservato durante l'evoluzione dei primati. L'ordine dei marcatori presenti in APK (APK 13) rimane invariato in tutti gli ordini di Primati compreso l'uomo.
- Il cromosoma 14 e il cromosoma 15 mostrano associazione sintenica in APK, AAK e ACK. Quindi la posizione del centromero nel cromosoma del Primate ancestrale era diversa, formando un cromosoma submetacentrico con un piccolo braccio p. In NWM la fissione di questa associazione produce un piccolo cromosoma 15. Un'altra fissione porta alla formazione degli omologhi 14 e 15 in AHK. Sono presenti diverse fissioni e la formazione di neocentromeri evolutivi nelle differenti linee di primati compreso l'uomo.
- Il cromosoma 16 in APK si trova scisso in due cromosomi distinti, uno omologo al 16p umano e l'altro al 16q. Il segmento 16p è sintenico al piccolo segmento fuso con il cromosoma 7 (vedi sopra). In AAK si assiste alla fissione del cromosoma 7/16p. In NWM il segmento 16p è fuso con il segmento 10q mentre il segmento 16q è fuso con il segmento 2p, si formano così le associazioni sinteniche 16p/10q e 2p/16q di APIK. Il cromosoma 16 omologo a quello presente nell'uomo si forma

in ACK. Il cromosoma umano ha acquisito un blocco eterocromatico pericentromerico facendo diventare il cromosoma umano più grande rispetto a quello presente in ACK o AHK.

- Il cromosoma 17 appare altamente conservato in tutte le specie di primati sia per quanto riguarda l'ordine dei marcatori sia per la posizione del centromero. La forma ancestrale del cromosoma si trova oggi in molte OWM e nell'orango. Questo cromosoma differisce dall'omologo umano per un'inversione paracentrica. L'ordine dei marcatori presente nel cromosoma umano si osserva in AHK. Il cromosoma dello scimpanzé deriva da quest'ultimo per un'inversione pericentrica mentre quello di gorilla è coinvolto in una traslocazione reciproca con l'omologo del cromosoma 5.
- Il cromosoma 18 nel primate ancestrale formava un cromosoma acrocentrico con l'ordine dei marcatori che possiamo osservare oggi nelle grandi scimmie. L'ordine dei marcatori del cromosoma umano differisce da questo a causa di un'inversione pericentrica. In APIK questo cromosoma mostra associazione sintenica con 8p.
- Il cromosoma 19 nel primate ancestrale appare separato in due segmenti: 19p e 19q. Nella maggior parte dei primati questi segmenti rappresentano due cromosomi distinti, la loro fusione avviene nell'ancestrale degli antropoidi (AAK) e rimane altamente conservata nelle specie evolute da questo punto in poi.
- Il cromosoma 20 è altamente conservato in tutti i primati; il cromosoma ancestrale è un acrocentrico presente in tutti i cariotipi ancestrali. Nelle diverse linee evolutive il cromosoma cambia di conformazione a causa di inversioni, traslocazioni, e formazione di neocentromeri.
- Il cromosoma 21 si trova associato al cromosoma 3, si separa nell'ancestrale dei Catarrhini. L'ordine dei marcatori è altamente conservato in tutti i Primati.
- Il cromosoma sessuale X è altamente conservato in tutti i primati. L'ordine dei marcatori e la posizione del centromero sono tipiche per i mammiferi euteri. In alcune linee di primati l'ordine dei marcatori e la posizione del centromero possono variare e questo può essere spiegato con inversioni pericentriche. In altri casi si ha solo la formazione di neocentromeri evolutivi come è possibile osservare in NWM.

- Il cromosoma sessuale Y mostra un grande blocco eterocromatico terminale del braccio q. Il cromosoma Y ancestrale era sicuramente più piccolo in tutti i cariotipi ancestrali ed è stato soggetto a numerosi riarrangiamenti durante l'evoluzione degli Hominoidea (Wimmer et al., 2005). Sono necessari più lavori per definire l'evoluzione dell'ordine dei marcatori.

I territori cromosomici nelle cellule dei Primati

Studi condotti su linee linfoblastoidi e fibroblastoidi di primati non umani hanno messo in evidenza la medesima organizzazione nucleare presente nei nuclei interfascici umani facendo supporre che questa sia un carattere necessario ed evolutivamente conservato. Infatti, uno studio condotto da Mora e collaboratori (2006) su linee cellulari fibroblastoidi provenienti da uomo e da due scimmie del Nuovo Mondo (*Lagothrix lagothricha*, LLA e *Saimiri sciureus*, SSC) si prefiggeva di verificare se l'organizzazione nucleare dei cromosomi dipendesse dalla loro grandezza o dalla densità genica. Per fare questo condussero esperimenti di FISH 3D con sonde painting dei cromosomi umani 6, 12, 13 e 17 ed ottennero i seguenti risultati:

- per quanto riguarda la grandezza del cromosoma osservarono che i cromosomi più piccoli si localizzano verso il centro del nucleo a differenza di quelli più grandi, che si trovano invece verso la periferia. Fa eccezione il cromosoma 17 che nell'uomo si trova invece più in periferia di rispetto a quanto atteso;
- per quanto riguarda la densità genica, supposto che i cromosomi omologhi abbiano mantenuto invariata la loro densità durante l'evoluzione, è stato osservato che i cromosomi si localizzano secondo densità genica: i più ricchi verso il centro del nucleo, i più poveri verso la periferia. Fa eccezione il cromosoma umano 13 che si localizza verso il centro del nucleo ma questo può essere spiegato dal fatto che porta la regione organizzante il nucleolo (NOR) e che la sua posizione può essere influenzata dagli altri cromosomi portanti NOR.

Uno studio successivo condotto su linee cellulari linfoblastoidi e fibroblastoidi di grandi scimmie e scimmie del Vecchio e del Nuovo Mondo ha messo in evidenza che nei nuclei dei linfoblasti, di forma sferica, di tutte le specie analizzate i cromosomi si dispongono secondo una polarità composizionale: le regioni ricche in GC e in geni verso il centro del nucleo, le regioni povere in GC e in geni verso la periferia e le regioni con

caratteristiche intermedie in posizione intermedia. Per quanto riguarda i nuclei dei fibroblasti, di forma ellissoide, i cromosomi si dispongono secondo la grandezza del cromosoma. È importante notare che si osservano cambiamenti specie-specifici della distribuzione radiale dei CT nel nucleo quando avvengono eventi di fusione o fissione evolutivi che portano alla formazione rispettivamente di cromosomi più grandi o più piccoli (Fig. 25). In particolare nel caso di una fusione che conduce alla formazione di un cromosoma più grande rispetto al suo omologo ancestrale si osserva una localizzazione più periferica, mentre una fissione che porta alla formazione di cromosomi più piccoli porta invece ad una localizzazione più interna (Neusser et al. 2007).

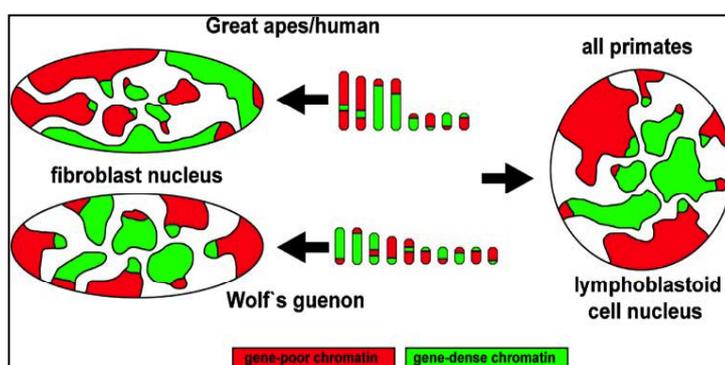


Fig. 25: Modello sulla conservazione evolutiva e specie-specifica degli arrangiamenti cromatinici. In nuclei di fibroblasti di tutte le specie di Primati l'arrangiamento spaziale della cromatina è collegato alla densità genica, mentre nei nuclei ellissoidali dei fibroblasti l'arrangiamento spaziale della cromatina è associato alla grandezza dei cromosomi (Neusser et al. 2007).

Successivamente è stata analizzata anche la posizione di sequenze a replicazione precoce e tardiva in linee cellulari linfoblastoidi e fibroblastoidi umane, di gorilla, di orango e del gibbono dal ciuffo. In particolare sono stati presi in considerazione i cromosomi 2, 5, 7 e 17 che durante l'evoluzione del cariotipo hanno subito diverse modificazioni. Infatti il cromosoma 2 è il prodotto della fusione di due cromosomi distinti presenti nel gorilla; i cromosomi 5 e 17 nel gorilla hanno subito una traslocazione reciproca $t(5;17)$, mentre nel gibbono dal ciuffo i *loci* del cromosoma 5 hanno subito traslocazione su tre cromosomi e quelli del cromosoma 17 su due; il cromosoma 7 ha nel tempo subito diverse inversioni para e pericentriche, come si osserva per l'omologo nei cromosomi di orango e gorilla, mentre nel gibbono dal ciuffo il cromosoma omologo è costituito da tre diversi cromosomi. È stato osservato che le regioni genomiche a replicazione precoce si localizzano verso il centro del nucleo e le regioni a replicazione tardiva si localizzano attraverso l'intero nucleo prediligendo la localizzazione periferica. Questo comportamento si osserva anche nei nuclei delle cellule dei primati non umani, in particolare è stato

osservato che le inversioni influenzano maggiormente la topologia nucleare rispetto alle traslocazioni (Grasser et al. 2008).

1.4 - EFFETTO DEI RIARRANGIAMENTI SUI TERRITORI CROMOSOMICI

Volendo analizzare la correlazione tra il timing di replicazione e l'organizzazione spaziale della cromatina nel nucleo interfase di cellule di primati non umani e di cellule cancerose e per capire l'impatto di inversioni, traslocazioni e iso-cromosomi sull'organizzazione della topologia nucleare, sono stati presi in considerazione 33 *loci* a replicazione precoce e 31 *loci* a replicazione tardiva dei cromosomi 2, 5, 7 e 17.

È noto in letteratura che il timing di replicazione di specifici *loci* durante la fase S del ciclo cellulare è correlato con caratteristiche particolari del genoma, quali il contenuto in GC, la densità genica e l'attività trascrizionale (Craig and Bickmore, 1993; Dutrillaux et al., 1976; Holmquist et al., 1982; Schwaiger and Schubeler, 2006; Zink, 2006). Inoltre a facilitare l'attività trascrizionale è anche il grado di impacchettamento della cromatina (Gilbert et al., 2004). Infatti, i *loci* a replicazione precoce sono caratterizzati da cromatina despiralizzata, elevato contenuto in GC e in geni ed elevata attività trascrizionale, rispetto ai *loci* a replicazione tardiva caratterizzati da cromatina più compatta, basso contenuto in GC e in geni e scarsa attività trascrizionale.

Inizialmente è stata valutata la localizzazione dei *loci* a replicazione precoce e a replicazione tardiva in linfociti umani normali ed è stato visto che i *loci* a replicazione

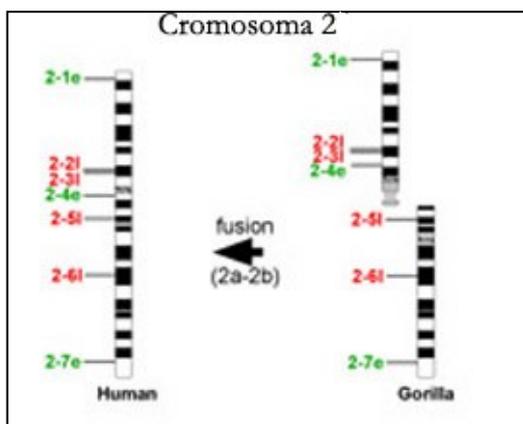


Fig. 26: Formazione del cromosoma 2 umano dai due omologhi di Gorilla per fusione telomericamente. In verde sono indicate le sonde a replicazione precoce e in rosso quelle a replicazione tardiva (modificato da Grasser et al. 2008).

precoce si localizzano verso il centro del nucleo escludendo completamente il bordo, mentre i *loci* a replicazione tardiva si localizzano verso la periferia del nucleo.

Per definire la topologia nucleare del cromosoma 2 umano in linfoblasti umani e di gorilla e in fibroblasti umani sono stati presi in considerazione quattro *loci* a replicazione precoce e tre *loci* a replicazione tardiva in combinazione con la sonda *painting* specifica del cromosoma 2 (Fig. 27A-D). Il cromosoma 2 umano è il prodotto di una fusione telomerica di due cromosomi presenti in gorilla (GGO11 e GGO12) (Fig. 26).

Valutando la distribuzione radiale media non si osservano differenze significative tra *loci* a replicazione precoce e a replicazione tardiva in nuclei delle cellule linfoblastoidi di uomo e gorilla (Fig. 27E-G). Inoltre è stato osservato che non esiste alcuna differenza statisticamente significativa tra i *loci* a replicazione precoce e quelli a replicazione tardiva per quanto riguarda la loro localizzazione all'interno del CT. Sia la cromatina a replicazione precoce che quella a replicazione tardiva si trova localizzata in tutto il CT (Fig. 27H,I).

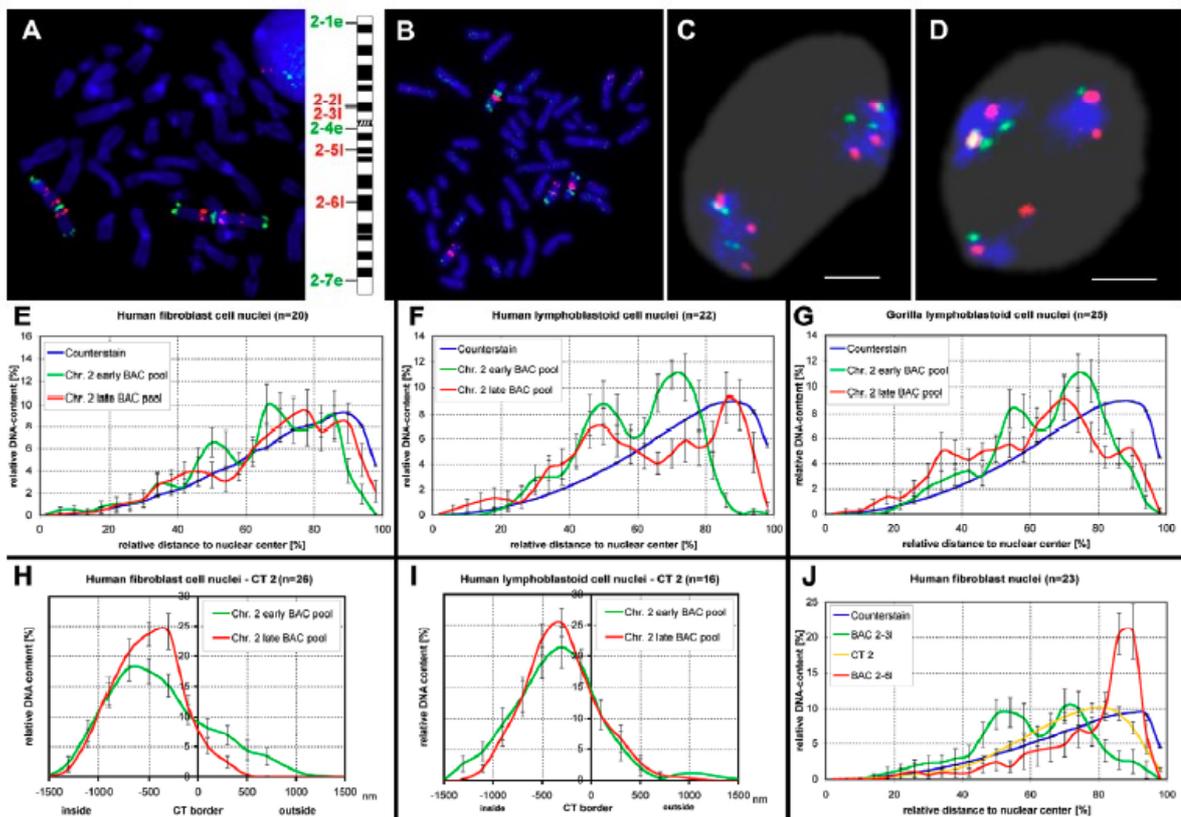


Fig. 27: (A-D) FISH con un pool di sonde del cromosoma umano 2 per *loci* a replicazione precoce (verde) e *loci* a replicazione tardiva (rosso) su (A) metafase umana, (B) metafase di gorilla, (C,D) nuclei 3D di fibroblasti umani e di linfoblasti di gorilla rispettivamente. (E-J) valutazione quantitativa della distribuzione radiale delle sonde utilizzando i software 3D-RRD o eADS (n= numero di nuclei), in fibroblasti umani (E), in linfoblasti umani (F) e in fibroblasti di gorilla (G). (H-I) distribuzione radiale della sonda rispetto al territorio del cromosoma umano 2 e (J) la localizzazione dei singoli cloni 2-3l e 2-6l e il territorio del cromosoma 2 in nuclei di fibroblasti umani (Grasser et al. 2008).

I cromosomi 5 e 17 sono analizzati in combinazione, come esempi di cromosomi che contengono rispettivamente solo *loci* a replicazione tardiva e solo *loci* a replicazione precoce, rispettivamente. Per l'analisi su fibroblasti e linfoblasti umani e di gorilla, su fibroblasti di gibbono e su linee cellulari tumorali (Mel Juso e SW620) sono stati utilizzati un pool di sonde a replicazione tardiva per il cromosoma 5 e un pool di sonde a replicazione precoce per il cromosoma 17 insieme alle rispettive sonde *painting* cromosoma-specifiche (Fig. 29 A-F). Nel gorilla questi due cromosomi hanno subito una traslocazione reciproca t(5;17), mentre nel gibbono i cromosomi 5 e 17 umani si sono rispettivamente separati a formare tre e due cromosomi (Fig. 28). La linea cellulare Mel Juso mostra un cromosoma derivato der(17)t(17;17;17) oltre ad un cromosoma 17 normale, mentre la linea cellulare SW620 mostra due cromosomi derivati der(5;7)(p11;p11) e der(5)t(5;20)(q15;p12).

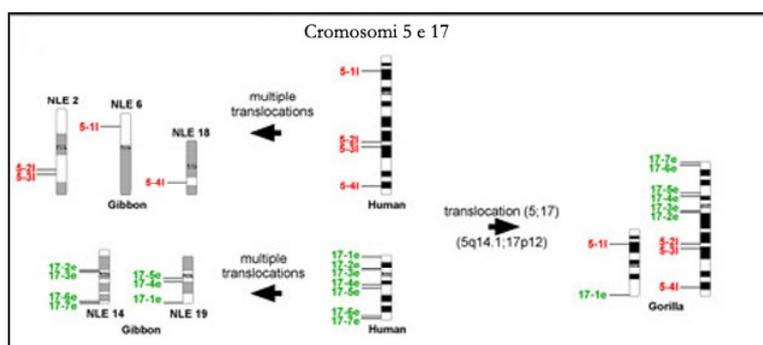


Fig. 28: Formazione degli omologhi ai cromosomi 5 e 17 in Gibbono e Gorilla. In rosso sono indicate le sonde a replicazione tardiva, in verde quelle a replicazione precoce (modificato da Grasser et al. 2008).

Nei linfoblasti umani, di gorilla e del gibbono i *loci* a replicazione precoce del cromosoma 17 sono sempre localizzati più internamente rispetto ai *loci* a replicazione tardiva del cromosoma 5. Queste differenze sono molto pronunciate nell'uomo e diventano minori nel gorilla e nel gibbono. La stessa situazione si osserva per quanto riguarda i fibroblasti di uomo e gorilla (Fig. 29 G, F).

Nelle linee cellulari tumorali Mel Juso e SW620 l'intero cromosoma 5 mostra localizzazione periferica sia nel cromosoma normale sia nel derivato (Fig. 29 J, K). Nella linea cellulare Mel Juso i *loci* a replicazione precoce del der(17) sono localizzati significativamente più centralmente rispetto al cromosoma 17 normale, mentre il CT del der(17) si localizza significativamente alla periferia rispetto al CT del cromosoma normale (Fig. 29 I). Questo comportamento può essere spiegato a causa dell'elevata densità dei *loci* a replicazione precoce nel der(17) rispetto al cromosoma normale.

Per quanto riguarda la localizzazione rispetto al CT è stato visto che i *loci* a replicazione tardiva del cromosoma 5 sono localizzati più internamente rispetto a quelli a replicazione precoce del cromosoma 17 che si localizzano, invece, rivolti verso la periferia del territorio stesso. In particolare, nei due prodotti della traslocazione reciproca t(5;17) di gorilla i *loci* a replicazione precoce sono localizzati molto vicino alla superficie del territorio ed in particolare alcuni di questi *loci* escono dal territorio stesso (Fig. 29 L).

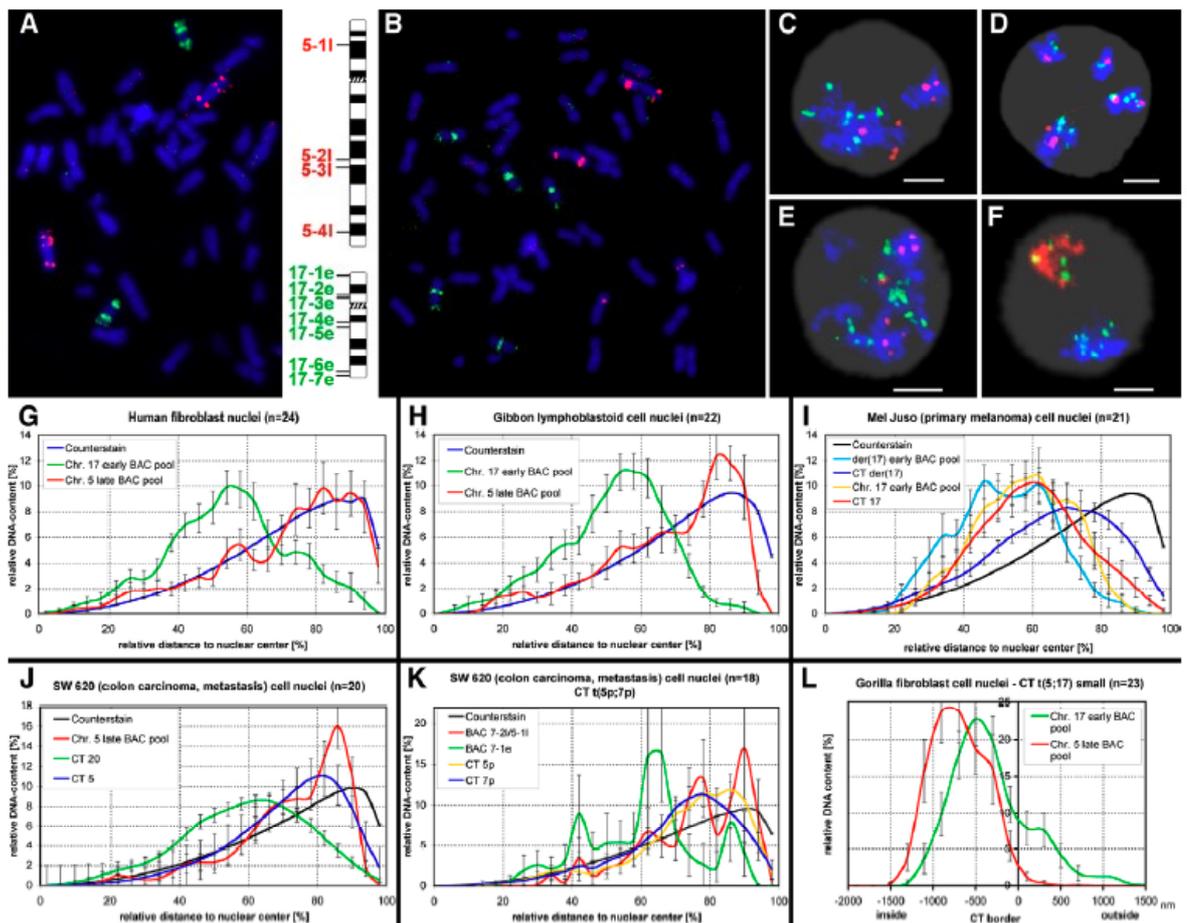


Fig. 29: FISH con sonde rappresentanti i loci a replicazione precoce del cromosoma 17 (verde) e i loci a replicazione tardiva del cromosoma 5 (rosso) su metafasi umane (A) e di gibbono (B) e su nuclei 3D di uomo (C), gorilla (D), gibbono (E) e cellule tumorali Mel Juso (F). (G-L) valutazione quantitativa della distribuzione radiale delle sonde nel nucleo in interfase o rispetto al relativo territorio cromosomico con l'utilizzo dei software 3D-RRD o eADS (n= numero di nuclei) (Grasser et al. 2008).

Per localizzare i *loci* a replicazione tardiva e quelli a replicazione precoce del cromosoma 7 in nuclei di cellule linfoblastoidi di uomo, orango e gibbono e in nuclei di cellule fibroblastoidi umane e in linee cellulari cancerose quali Karpas 384 e Mel Juso sono stati presi in considerazione due cloni per *loci* a replicazione precoce e quattro cloni per *loci*

a replicazione tardiva insieme alla sonda *painting* specifica per il cromosoma 7 (Fig. 31 A-D, F, G). Nelle grandi scimmie il cromosoma 7 ha subito durante l'evoluzione inversioni para- e pericentriche. L'orango presenta il cromosoma ancestrale con entrambe le inversioni, l'uomo mostra il cromosoma derivato evolutivamente, mentre il gibbono presenta il cromosoma 7 traslocato (Fig. 30). La linea cellulare cancerosa Mel Juso presenta un iso (7p) e la linea Karpas 384 un der(7)del(7)(p13)inv(7)(p13;q22.1).

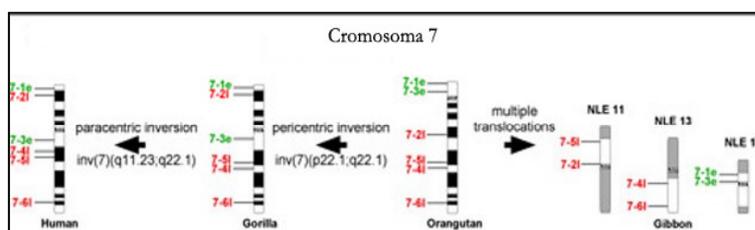


Fig. 30: Formazione degli omologhi al cromosoma 7 in Gorilla, Gibbone e Orango. In rosso sono indicate le sonde a replicazione tardiva e in verde quelle a replicazione precoce (modificato da Grasser et al. 2008).

I risultati ottenuti mostrano che i *loci* a replicazione precoce sono significativamente più interni al nucleo che i *loci* a replicazione tardiva, senza differenze per quanto riguarda la specie o il tipo di tumore considerato. L'orango e il gibbono mostrano una simile distribuzione dei *loci* indicando che nel gibbono le traslocazioni nei tre cromosomi non producono nessun cambiamento nell'organizzazione nucleare (Fig. 31 I, J). Differenze, invece, si osservano se si mettono a confronto i risultati ottenuti nell'uomo e nell'orango, infatti i risultati ottenuti sembrano seguire la posizione dei *loci* lungo il cromosoma: nell'uomo un'alternanza di *loci* a replicazione precoce e tardiva su entrambe le braccia, mentre nell'orango sia i *loci* a replicazione precoce che quelli a replicazione tardiva si localizzano nel braccio p (Fig. 31 K).

Misurando la distanza nel nucleo in interfase dei cinque *loci* considerati nell'uomo e in orango si osserva un riposizionamento nucleare dei *loci* che hanno subito un'inversione evolutiva (Fig. 31 L, M). Si può, quindi, affermare che il cromosoma 7 dell'orango mostra una conformazione molto simile all'organizzazione del cromosoma metafasico, mentre il cromosoma umano mostra un'organizzazione più compatta. Quindi questi risultati dimostrano che *loci* a replicazione tardiva sono più propensi a modificare la loro localizzazione nucleare a causa di inversioni evolutive.

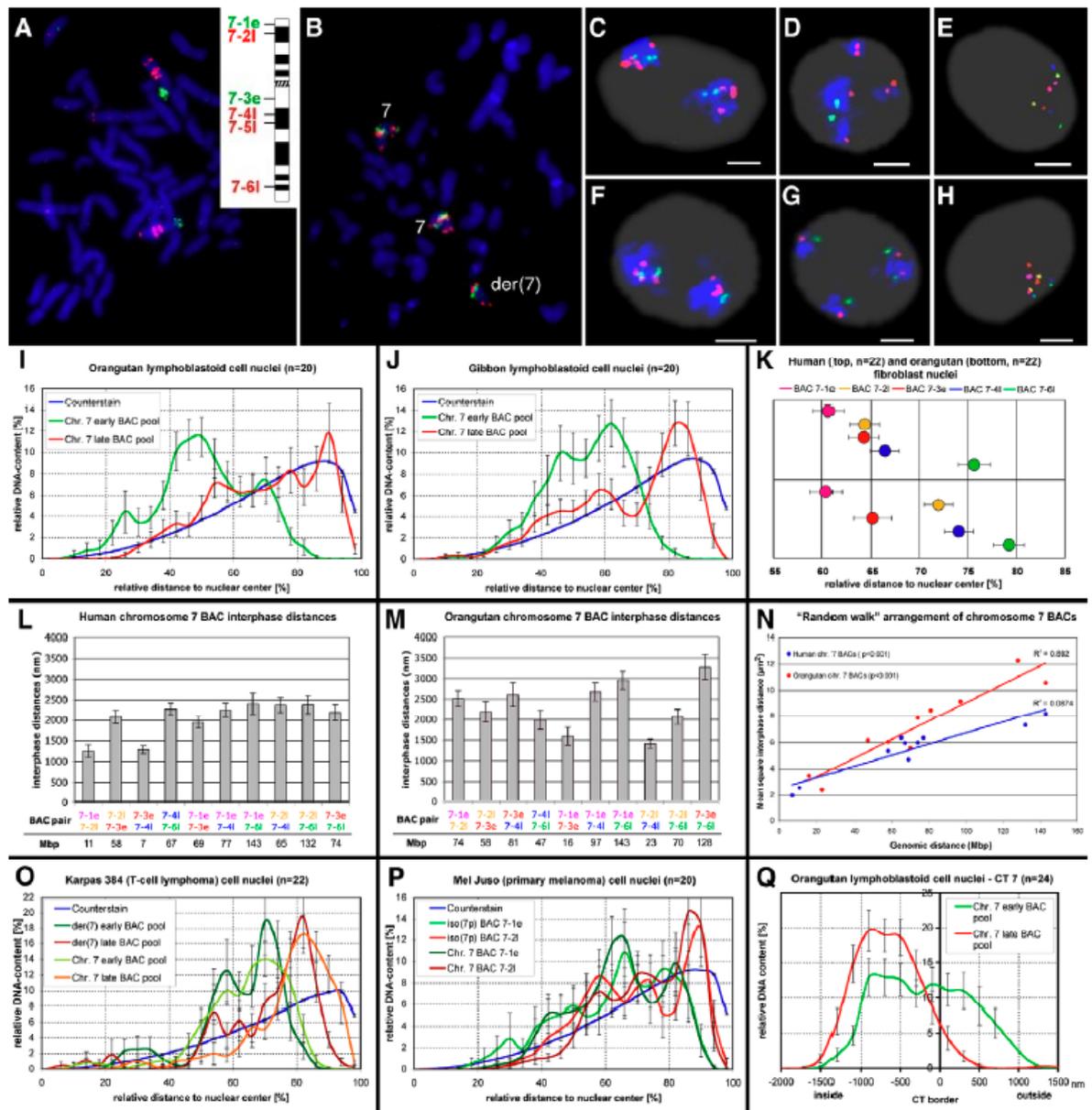


Fig. 31: FISH con sonde per loci a replicazione precoce (verde) e a replicazione tardiva (rosso) in metafasi di orango (A) e cellule Karpas 384 (B) e in nuclei di fibroblasti umani (C), di linfoblasti di gibbono (D), di linfoblasti di orango (F) e della linea cellulare Mel Juso (G). (E) nuclei di fibroblasti umani e (H) di orango con 3D-FISH multicolor con cinque cloni BAC. I cinque cloni con i rispettivi colori sono mostrati nel pannello K. I-K, O-Q valutazione quantitativa della distribuzione radiale delle sonde nei nuclei in interfase o rispetto al territorio cromosomico usando i software 3D-RRD o eADS ($n =$ numero di nuclei). L-M media delle misurazioni della distanza tra coppie di cloni in nuclei di fibroblasti di uomo e orango (Grasser et al. 2008).

Così come le inversioni evolutive, la presenza di un cromosoma $der(7)del(7)(p13)inv(7)(p13;q22.1)$ nella linea cellulare tumorale Karpas 384 potrebbe essere correlata con uno scivolamento statisticamente significativo della posizione dei *loci* a replicazione tardiva verso il centro del nucleo se comparati con quelli del cromosoma 7

normale, mentre i *loci* a replicazione precoce mantengono la loro localizzazione al centro del nucleo. Di contro, nella linea cellulare Mel Juso la duplicazione del braccio p nell'isocromosoma 7p mantiene lo stesso orientamento dei cloni che si osservano nel braccio p del cromosoma 7 normale (Fig 31 O, P).

Considerando quanto detto fin d'ora si può affermare che i *loci* a replicazione precoce si localizzano verso il centro del nucleo in tutti i tipi cellulari considerati, mentre i *loci* a replicazione tardiva si localizzano verso la periferia del nucleo. Questa differente posizione è più pronunciata per i *loci* dei cromosomi 5, 7 e 17 che per il cromosoma 2. Inoltre è possibile osservare che inversioni evolutive o legate a tumori, come nel caso del cromosoma 7, influenzano la topologia nucleare in modo più marcato rispetto a quanto avviene per le traslocazioni.

Inoltre è possibile affermare che sia i *loci* a replicazione tardiva che quelli a replicazione precoce si localizzano sia alla superficie sia all'interno del CT, fatta eccezione per quei *loci* a replicazione precoce che si trovano vicini a regioni ricche in geni che si localizzano verso il bordo del CT.

2. Materiali e Metodi

2.1 – COLTURE CELLULARI

Coltura di linfociti da sangue periferico

Il sangue prelevato viene posto in una provetta con eparina 5000 UI/ml, che ne impedisce la coagulazione, successivamente seminato in fiasche da 25 o 75 cm² in rapporto 1:10 in terreno di coltura completo, precedentemente preparato e preriscaldato, e posto in incubatore umidificato a 37°C e fatte crescere per 72°C.

I terreni utilizzati sono stati:

- RPMI 1640, soluzione salina isotonica contenente aminoacidi compreso L-glutamina, vitamine, glucosio, glutatione, HEPES e come indicatore di pH il rosso fenolo. Questo viene addizionato con il 20% di siero fetale bovino, contenente fattori di crescita e vitamine necessarie alla crescita in vitro delle cellule, 1% di antibiotico (Pennicillina 5000 UI/ml-Streptomicina 5000 µg/ml), allo scopo di evitare una contaminazione batterica, e il 3% di PHA (fitoemoagglutinina), che consente la proliferazione in vitro dei linfociti trasformandoli in blasti. La preparazione avviene sotto cappa a flusso laminare con materiale sterile monouso allo scopo di preservare la sterilità.
- LYMPHOCROME (Lonza), un terreno completo appositamente ideato per la coltura di linfociti da sangue periferico.

Coltura di cellule linfoblastoidi e fibroblastoidi

Le linee cellulari linfoblastoidi e fibroblastoidi dei Primati non umani utilizzate in questo lavoro sono state fornite dal Prof. M. Rocchi (Università di Bari). In particolare sono state utilizzate linee linfoblastoidi di MMU2, PPY6, CJA98, GGO5, PTR8 e PCR1 e linee fibroblastoidi di LCA e CMO. Entrambe le linee crescono in terreno RPMI 1640 addizionato con il 10% di siero fetale bovino, 1% di antibiotico (Pennicillina 5000UI/ml-Streptomicina 5000 µg/ml) in un incubatore umidificato a 37°C in presenza di CO₂ al 5%, che consente di tamponare il pH alterato dal metabolismo cellulare.

Le linee cellulari possono essere conservate per anni se poste in azoto liquido, alla temperatura di -195°C. Per il congelamento è necessario un passaggio di 2-3 giorni a -80°C

in terreno completo addizionato con il 10% di DMSO (dimetilsolfossido, un crioprotettore che evita la formazione di cristalli di ghiaccio durante il congelamento).

Le cellule prelevate da -80°C o dall'azoto liquido vengono fatte scongelare velocemente e risospese in terreno completo freddo, per evitare che il DMSO, tossico a temperatura ambiente, danneggi le cellule. A questo punto la sospensione viene centrifugata a 1100 rpm per 8 minuti, eliminato il sopranatante e il pellet risospeso in 5ml di terreno completo preriscaldato a 37°C posto in una fiasca da 25 cm² e incubata a 37°C in presenza di CO₂.

PREPARAZIONE DI CROMOSOMI METAFASICI

Il protocollo per la preparazione dei cromosomi metafisici da linfociti da sangue periferico e da linee cellulari linfoblastoidi e fibroblastodi prevede il blocco della coltura con l'aggiunta di Colcemid, un derivato della colchicina che impedisce la polimerizzazione dei microtubuli bloccando le cellule in metafase.

Procedura:

- Bloccare la coltura con colcemid 0,05 µg/ml e riporla in incubatore per circa 30 minuti per il sangue periferico e da 1 a 3 ore per le linee cellulari linfoblastoidi e fibroblastoidi.
- Preriscaldare la soluzione ipotonica (KCl 0,075M o Citrato Sodico 1%) a 37°C .
- Preparare il fissativo (metanolo: acido acetico in rapporto 3:1) e porlo a -20°C .
- Mettere 5 ml di sospensione di cellule in provette a fondo tondo da 10 ml.
- Centrifugare a 1200 rpm per 10 minuti.
- Aspirare il sopranatante facendo molta attenzione.
- Rompere il pellet e aggiungere molto lentamente la soluzione ipotonica preriscaldata.
- Risospesione delicatamente e incubare per 20 minuti.
- Centrifugare a 1200 rpm per 10 minuti.

- Aspirare il sopranatante, rompere il pellet delicatamente ed aggiungere il fissativo freddo facendo cadere prima qualche goccia sulla parete agitando delicatamente e poi riempire la provetta quasi completamente.
- Risospendere delicatamente e incubare per 30 minuti.
- Centrifugare a 1200 rpm per 10 minuti.
- Aspirare il sopranatante, rompere il pellet e aggiungere altro fissativo e incubare per 10 minuti.
- A questo punto la provetta può essere conservata a -20°C o centrifugata come sopra ed il pellet risospeso in una quantità idonea di fissativo e strisciato nei vetrini.

2.2 - PREPARAZIONE DNA

Le sonde BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) utilizzate per le ibridazioni *in situ* fluorescenti vengono estratte da cloni batterici contenenti inserti derivati dal genoma di *Macaca mulatta* e dal genoma umano. I batteri vengono fatti crescere su piastre Petri in terreno Luria Broth (LB) addizionato con Agar e antibiotico specifico, nel nostro caso il Cloramfenicolo che consente la crescita selettiva del batterio di nostro interesse, per una notte a 37°C. Per poter estrarre il BAC una colonia batterica viene fatta crescere in terreno LB liquido con l'aggiunta dell'antibiotico specifico per una notte a 37°C con agitazione vigorosa. L'estrazione del BAC avviene attraverso kit specifici che consentono la lisi della cellula batterica e la separazione del BAC dal DNA genomico.

Colture batteriche

Crescita in terreno solido

- Sciogliere 25g di LB in 1 litro di acqua bidistillata.
- Aggiungere 15g di Agar.
- Autoclavare.
- A una temperatura di circa 50°C aggiungere l'antibiotico specifico alla concentrazione di lavoro (Cloramfenicolo 12,5 µg/ml).
- Colare in piastre Petri.
- Lasciare solidificare.
- Piastrare i batteri mediante striscio con ansa.

Crescita in terreno liquido

- Sciogliere 25g di LB in 1 litro di acqua bidistillata.
- Autoclavare.

- Quando il terreno si è raffreddato aggiungere l'antibiotico specifico alla concentrazione di lavoro (Cloramfenicolo 12,5 µg/ml).
- Prelevare una singola colonia batterica dalla piastra Petri ed effettuare l'inoculo in terreno.
- Fare crescere per una notte a 37°C a 220 rpm.

Preparazione DNA da cloni BAC

Metodo di preparazione utilizzando il kit Qiagen (cod. 12125):

- Centrifugare 5 ml di coltura batterica a 2500 rpm per 30 minuti.
- Eliminare il sopranatante, risospendere il pellet in 300 µl di P1 (soluzione di risospensione) e travasare in una eppendorf.
- Aggiungere 300 µl di P2 (soluzione di lisi). Agitare delicatamente invertendo l'eppendorf 5 volte. Non vortexare.
- Incubare per 5 min a temperatura ambiente.
- Aggiungere 300 µl di P3 (soluzione di precipitazione). Agitare subito delicatamente, invertendo l'eppendorf 5 volte. Non vortexare. Incubare 5 min in ghiaccio.
- Centrifugare a 12000 rpm per 10 min.
- Equilibrare la colonnina con 1 ml di buffer QBT
- Inserire il sopranatante nella colonnina.
- Lavare la colonnina con 2x2 ml di buffer QC.
- Eluire il DNA con 800 µl di buffer QF preriscaldato a 65°C.
- Raccogliere l'eluato in una eppendorf.
- Precipitare il DNA aggiungendo 0,7 volumi di isopropanolo a temperatura ambiente.
- Miscelare e centrifugare immediatamente a 12000 rpm per 30 min per precipitare.
- Lavare il pellet con 1 ml di etanolo 70%, centrifugare a 12000 rpm per 10 min e risospendere in TE.

Dopo l'estrazione, un'elettroforesi con gel di agarosio all'1% insieme a dei marcatori di peso consente di verificare l'efficienza di estrazione attraverso quantizzazione del DNA estratto.

Preparazione DNA genomico

Metodo di preparazione utilizzando il kit GE Healthcare (cod. 28-9042-65):

Dal momento che le sonde BAC CH250 sono costituite da DNA proveniente dal genoma di *Macaca mulatta* per ottenere un'efficiente ibridazione è necessario ottenere un competitore che possa annullare l'ibridazione aspecifica (background) dovuta a sequenze ripetute presenti nella sonda. Per ottenere, quindi, il competitore è stato estratto il genoma di *Macaca* a partire da una linea cellulare linfoblastoide, quantificato mediante gel d'agarosio 1% e quindi sonicato per ottenerne frammenti che possano legarsi più facilmente alle sequenze ripetute della sonda.

Procedura:

- Centrifugare, in una eppendorf da 1,5 ml, a 14000 rpm per 10 min la coltura cellulare con circa 2×10^6 cellule;
- Togliere il soprannatante;
- Risospendere in 200 μ l di PBS 1X;
- Aggiungere 20 μ l di proteinasi K (20 mg/ml) al fondo di un tubo da microcentrifuga da 1,5 ml;
- Aggiungere i 200 μ l di risospensione cellulare;
- Di seguito aggiungere 400 μ l di Lysis solution al tubo. Vortexare per 15 sec;
- Incubare il tubo a TA per 10 min. Vortexare ad intermittenza per aiutare al lisi.
- Centrifugare a 11000 rpm per 30 sec;
- Assemblare una mini colonna nel tubo di raccolta fornito
- Aprire il tappo della colonna e carica il lisato al centro della colonna;
- centrifugare la colonna a 11000 rpm per 1 min;

- Rimuovere il tubo di raccolta ed eliminare la soluzione presente senza toccare la base della colonna;
- Aggiungere 500 µl di Lysis solution alla colonna e centrifugare a 11000 rpm per 1 min;
- Eliminare il contenuto del tubo di raccolta e riassemblare;
- Aggiungere 500 µl di Wash buffer (Wash buffer: etanolo assoluto in rapporto 1:4) alla colonna e centrifugare a 11000 rpm per 3 min;
- Eliminare il tubo di raccolta con il suo contenuto;
- Trasferire la mini colonna di purificazione in un nuovo tubo da microcentrifuga da 1,5 ml;
- Aggiungere 200 µl di Elution buffer (pre-riscaldato a 70°C) direttamente al centro della colonna;
- Incubare la colonna a TA per 1 min;
- Centrifugare a 11000 rpm per 1 min per recuperare il DNA genomico eluito

Per verificare la quantità del DNA estratto è stata effettuata una corsa elettroforetica con gel di agarosio all'1%, successivamente il DNA è stato sonicato mediante l'utilizzo di una siringa da insulina e precipitato per essere risospeso alla concentrazione desiderata nella miscela di ibridazione (50% formammide/2X SSC/10% destran solfato/50mM tampone fosfato pH 7).

2.3 - IBRIDAZIONE *IN SITU* FLUORESCENTE

Marcatura delle sonde

Per poter ibridare le sonde BAC estratte, queste devono essere prima marcate in modo da poter visualizzare il punto in cui è avvenuta l'ibridazione. La marcatura viene effettuata mediante nick-traslazione utilizzando kit commerciali (DIG-Nick Translation Mix, Biotin Nick Translation Mix, Roche) che contengono nelle giuste proporzioni i reagenti necessari: Dnasi, che opera tagli casuali a singola elica, DNA polimerasi I, che ha attività esonucleasica e polimerasica, e nucleotidi trifosfato, in parte modificati con apteni non fluorescenti come biotina e digoxigenina. Quest'ultimi nucleotidi vengono riconosciuti da specifici anticorpi legati a fluorocromi che consentono di rilevare il segnale di ibridazione.

La reazione di marcatura avviene incubando la miscela di reazione con il DNA da marcare a 15°C per 90 minuti. Trascorso questo tempo il DNA viene precipitato utilizzando sodio acetato ed etanolo con un eccesso di carrier (salmon sperm DNA e yeast tRNA).

Materiali occorrenti

- ◆ Kit Nick Translation (Roche);
- ◆ Yeast tRNA 25 mg/ml;
- ◆ Deoxyribonucleic acid, single stranded, from Salmon testes 10 mg/ml;
- ◆ Sodio acetato 3M, pH 5,2;
- ◆ Etanolo 100%;
- ◆ Acqua sterile;
- ◆ EDTA 0,5M, pH 8,0;
- ◆ Miscela di ibridazione (50% formammide/2X SSC/10% destran solfato/50 mM tampone fosfato pH 7,0).

Procedura:

- Qualche tempo prima della marcatura porre a 37°C il DNA da marcare.

- Mettere la quantità di DNA da marcare (500-1000 ng) in una eppendorf portando ad un volume finale di 16 μ l.
- Aggiungere 4 μ l di kit di marcatura (5x).
- Miscelare il tutto.
- Incubare a 15°C per 90 minuti.
- Stoppare la reazione con 1 μ l di EDTA 0,5 M a pH8.
- Incubare a 65°C per 10 minuti.
- Aggiungere il DNA carrier in funzione di quanto DNA si è marcato
- Precipitare aggiungendo sodio acetato (1/10 di volume) ed etanolo 100% (2,5 volumi)
- Incubare a -20°C per tutta la notte
- Il giorno dopo centrifugare a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C
- Aspirare il sopranatante.
- Fare asciugare il pellet e risospendere nella opportuna quantità di miscela di ibridazione, al fine di ottenere la sonda alla concentrazione desiderata (50 ng/ μ l)

Pretrattamento dei cromosomi

La FISH è una tecnica che prevede il legame di sonde a nuclei in interfase e a cromosomi in metafase fissati su un vetrino portaoggetto mediante striscio. Prima di ogni ibridazione è necessario pretrattare il preparato facendo una prima incubazione con RNasi, che elimina le tracce di RNA presenti sul vetrino che potrebbero influenzare la specificità dell'ibridazione, un successivo passaggio in formaldeide 1%, che consente di mantenere integre le strutture cromatiniche, infine una disidratazione attraverso la serie di alcoli.

Materiali occorrenti:

- ◆ RNAsi 10 mg/ml;
- ◆ PBS 10X;
- ◆ 20X SSC;
- ◆ MgCl₂ 1M;

- ◆ Formaldeide 37%;
- ◆ Alcool 70%, 85%, 95%;
- ◆ Miscela di ibridazione (50% formammide/2X SSC/10% destran solfato/50 mM tampone fosfato, pH 7,0);
- ◆ Miscela di denaturazione (70% formammide/2X SSC/50 mM tampone fosfato, pH 7,0).

Procedura:

- Mettere sul vetrino coprioggetto 100 µl di RNAsi 100 µg/ml in 2X SSC a pH 7,0 e incubare a 37°C per 1 ora in camera umidificata.
- Lavare 2 x 5 min in 2X SSC con agitazione.
- Lavare 1 x 5 min in PBS 1X con agitazione.
- Incubare 10 min in formaldeide 1% (formaldeide 37%/ PBS 10X/ MgCl₂ 1M/ H₂O).
- Lavare 2 x 5 min in PBS 1X con agitazione.
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5 min cadauno.
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria.

Denaturazione sonda/cromosomi e ibridazione

La sonda prima dell'utilizzo deve essere diluita alla concentrazione opportuna e miscelata con opportune quantità di competitore, che impedisce il legame della sonda con sequenze di DNA ripetuto. Nel nostro caso il competitore è costituito da Cot1 umano (H-Cot1: frazione del DNA umano che si riassocia per primo costituito da sequenze ripetute) e da DNA genomico di *Macaca mulatta* sonificato nel caso in cui le sonde utilizzate per gli esperimenti derivano dal genoma di macaca, e di solo H-Cot1 nel caso in cui le sonde utilizzate derivano dal genoma umano.

Procedura:

- Un paio di ore prima della denaturazione dei cromosomi, porre la sonda a 37°C per 10-15 min, in modo da farla sciogliere bene, agitare e centrifugare per 3 sec ripetutamente.

- Diluire la sonda con la miscela di ibridazione (50% formammide/ 2X SSC/ 10% destran solfato/ 50mM tampone fosfato pH 7,0) fino alla concentrazione voluta; agitare e centrifugare per 3 sec e poi porre a 37°C per 10-15 min.
- Denaturare la sonda a 82°C per 8 min.
- Mettere in ghiaccio 1 min, centrifugare qualche secondo e incubare 90 min a 37°C per il preannealing delle sequenze ripetute
- Denaturare i cromosomi incubandoli a 72°C per 2,5 min in 100 µl di miscela di denaturazione (70% formammide/ 2X SSC/ 50mM tampone fosfato pH 7,0)
- Sciacquare brevemente in 2X SSC a 4°C.
- Deidratare in etanolo 70% freddo 2 x 3 min, 85% 1 x 5 min, 95% 1 x 5 min.
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria.
- Mettere sul vetrino la sonda (10 µl), coprire con il coprioggetto 18x18 e sigillare con rubber cement.
- Incubare i vetrini a 37°C in camera umidificata overnight.
- Incubare i vetrini a 37°C per 16 ore.

Rilevazione del segnale

Dal momento che le sonde sono marcate con l'utilizzo di apteni e non di coloranti fluorescenti, l'ibridazione costa di due giorni: il primo in cui avviene la vera e propria ibridazione, il secondo in cui, dopo i lavaggi di stringenza effettuati con concentrazione salina e temperatura diverse a seconda che l'ibridazione sia omologa o eterologa, si effettua la rilevazione del segnale mediante l'utilizzo di anticorpi specifici rivolti contro i diversi apteni.

Sonde marcate con biotina

Materiali occorrenti:

- ◆ PBS 10X;
- ◆ 20X SSC;
- ◆ 4T: 4X SSC/Tween 0,05%;
- ◆ Alcool 70%, 85%, 95%;

- ◆ 4M: 5% latte scremato in polvere /4XSSC;
- ◆ Avidina Texas-red o FITC 2 mg/ml; diluire 1:800 in 4M;
- ◆ Anticorpo anti-Avidina biotinilato 0,5 mg/ml; diluire 1:100 in 4M;
- ◆ DAPI 1,5 µg/ml in Vectashild.

Procedura:

- Lavare in 2X SSC a 37°C fino alla caduta del coprioggetto
- Lavare 3 x 10 min in 0,1X SSC a 60°C per ibridazioni omologhe e in 0,5X SSC a 42°C per ibridazioni eterologhe
- Lavare 1 x 5 min in 4T con agitazione
- Incubare per 30 min con 100 µl di 4M (latte scremato in polvere 5%/ 4X SSC) per vetrino in camera umidificata a temperatura ambiente
- Lavare 1 x 5 min in 4T con agitazione
- Incubare per 30 min a 37°C in camera umidificata con 100 µl di Avidina FITC o Texas-Red
- Lavare 3 x 5 min in 4T con agitazione
- Incubare per 30 min a 37°C in camera umidificata con 100 µl di anticorpo anti-avidina biotinilato
- Lavare 3 x 5 min in 4T con agitazione
- Incubare per 30 min a 37°C in camera umidificata con 100 µl di Avidina FITC o Texas-Red
- Lavare 3 x 5 min in 4T con agitazione
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5 min cadauno
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria
- Colorare i vetrini con DAPI (25 µl per vetrino)
- Fissare il coprioggetto con il rubber cement in ambo i lati

Sonde marcate con digoxigenina

Materiali occorrenti

- ◆ 20X SSC;
- ◆ PBS 10X;
- ◆ Alcool 70%, 85%, 95%;
- ◆ Blocking solution 1X: diluizione 1:10 dello stock blocking solution in PBS 1X (mantenere in condizioni sterili);
- ◆ Soluzione di lavaggio PBS-Tw: PBS 1X/0,2% Tween;
- ◆ Anticorpo 1: anticorpo monoclonale anti-digoxigenina, prodotto in topo (SIGMA cod. D8156); diluire 1:500 in blocking solution;
- ◆ Anticorpo 2: anticorpo anti- IgG di topo-FITC, prodotto in coniglio (SIGMA cod. F9137); diluire 1:700 in blocking-solution;
- ◆ Anticorpo 3: anticorpo monoclonale anti-immunoglobulina di coniglio-FITC, prodotto in topo (SIGMA cod. F4890); diluire 1:100 in blocking solution;
- ◆ DAPI 1,5 µg/ml in Vectashild.

Procedura:

- Lavare in 2X SSC a 37°C fino alla caduta del coprioggetto
- Lavare 3 x 10 min in 0,1X SSC a 60°C per ibridazioni omologhe e in 0,5X SSC a 42°C per ibridazioni eterologhe
- Lavare 1 x 5 min in PBS 1X con agitazione
- Incubare per 30 min in camera umida a temperatura ambiente con 500 µl di blocking solution 1X
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl di anticorpo 1 in blocking solution
- Lavare 3 x 3 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl di anticorpo 2 in blocking solution
- Lavare 3 x 3 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100 µl di anticorpo 3 in blocking solution

- Lavare 3 x 5 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37°C
- Deidratare in alcool 70%, 85%, 95% 1 x 5 min cadauno
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria
- Colorare i vetrini con DAPI (25 µl per vetrino)
- Fissare il coprioggetto con il rubber cement in ambo i lati

Sonde marcate con biotina-digoxigenina

Materiali occorrenti:

- ◆ 20X SSC;
- ◆ PBS 10X;
- ◆ 4T: 4X SSC/Tween 0,05%;
- ◆ Alcool 70%, 85%, 95%;
- ◆ 4M: 5% latte scremato in polvere /4X SSC;
- ◆ Blocking solution 1X: diluizione 1:10 dello stock blocking solution in PBS 1X (mantenere in condizioni sterili);
- ◆ Soluzione di lavaggio PBS-Tw: PBS 1X/0,2% Tween;
- ◆ Avidina Texas-red 2 mg/ml; diluire 1:800 in 4M;
- ◆ Anticorpo anti-Avidina biotinilato 0,5 mg/ml; diluire 1:100 in 4M;
- ◆ Anticorpo 1: anticorpo monoclonale anti-digoxigenina, prodotto in topo (SIGMA cod. D8156); diluire 1:500 in blocking solution;
- ◆ Anticorpo 2: anticorpo anti- IgG di topo-FITC, prodotto in coniglio (SIGMA cod. F9137); diluire 1:700 in blocking-solution;
- ◆ Anticorpo 3: anticorpo monoclonale anti-immunoglobulina di coniglio-FITC, prodotto in topo (SIGMA cod. F4890); diluire 1:100 in blocking solution;
- ◆ DAPI 1,5 µg/ml in Vectashild.

Procedura:

- Lavare in 2xSSC a 37°C fino alla caduta del coprioggetto
- lavare 3 x 10 min in 0,1xSSC a 60°C

- lavare in 1 x 5 min in 4T
- incubare per 30 min in camera umida a T.A. con 100µl di 4M
- lavare in 1 x 5 min in 4T
- incubare per 30 min con 100µl di avidina Texas-red in camera umida a 37°C
- lavare in 1 x 5 min in 4T
- lavare in 2 x 3 min in PBS-Tw a 37° C
- incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100µl di anticorpo 1 in blocking solution e anticorpo anti avidina biotinilato
- lavare 3 x 3 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37° C
- incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100µl di anticorpo 2 in blocking solution e avidina Texas-red
- lavare 3 x 3 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37° C
- incubare per 1 ora a 37°C in camera umida con 100µl di anticorpo 3 in blocking solution
- lavare 3 x 5 min con soluzione di lavaggio PBS-Tw a 37° C
- deidratare in alcool 70% 85% 95% 1 x 5 min cadauno
- lasciare asciugare i vetrini all'aria
- colorare i vetrini con DAPI (25 µl per vetrino)
- fissare il coprioggetto con il rubber cement in ambo i lati

2.4 - LOCALIZZAZIONE INTRANUCLEARE RADIALE

Per poter localizzare un dato *locus* all'interno del nucleo in interfase ogni nucleo ibridato viene acquisito attraverso un microscopio a fluorescenza collegato ad una fotocamera. I due spot di ibridazione vengono localizzati all'interno del nucleo interfase secondo la loro distanza dal centro, infatti uno specifico software, costruito appositamente

nel nostro laboratorio, è in grado di assegnare allo spot di ibridazione un valore compreso tra 0 e 1 (0 al centro del nucleo e 1 al bordo del nucleo) dipendente dalla sua distanza dal centro del nucleo. Il raggio misurato è indipendente dalla grandezza del nucleo; questo fa sì

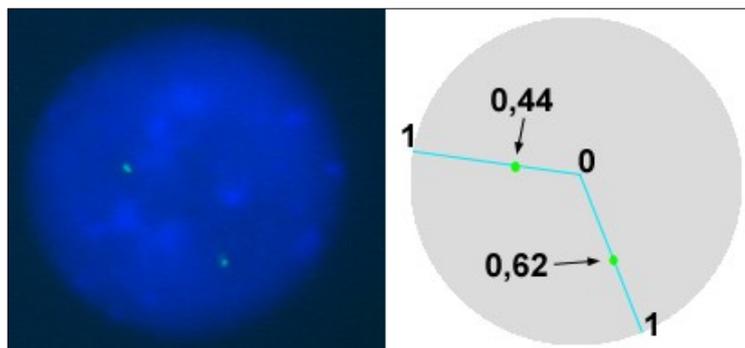


Fig. 32: Esempio di localizzazione dei segnali d'ibridazione in un nucleo interfascico (a sinistra). La distanza dei segnali rispetto al centro del nucleo viene misurata come frazione del raggio.

che i valori ottenuti possano essere paragonabili (Fig. 32).

Dal momento che l'immagine acquisita di ciascun nucleo è un'immagine bidimensionale di una struttura tridimensionale non è sufficiente l'analisi di pochi nuclei per dare la corretta localizzazione di un *locus*. Infatti un *locus* che si trova al centro del nucleo potrebbe trovarsi sia al centro sia nella regione sommitale del nucleo stesso. Per rendere, quindi, il risultato ottenuto statisticamente significativo è necessario analizzare un numero elevato di nuclei (circa 300).

Per l'analisi sono stati considerati sia i segnali singoli (*locus* non replicati) sia i segnali doppi (*locus* in replicazione) in quanto non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa nella loro localizzazione intranucleare.

I risultati relativi alle misurazioni dei segnali d'ibridazione vengono analizzati in diversi modi (Fig. 33):

- Mediante un grafico radiale viene valutata la disposizione dei segnali osservati;
- Mediante un grafico della distribuzione di frequenza di tutti i segnali osservati, viene valutata la proporzione di segnali presenti alla periferia del nucleo, e la proporzione di segnali presenti nella parte più interna del nucleo;

- Viene calcolato il valore mediano della distribuzione dei segnali e il relativo intervallo di confidenza.

Dati derivanti dall'analisi di numerose sonde hanno dimostrato che segnali d'ibridazione con mediana superiore a 0,65 sono indicativi di una localizzazione più periferica del *locus*, mentre valori di mediana inferiori a 0,65 sono indicativi di una localizzazione nella parte più interna del nucleo.

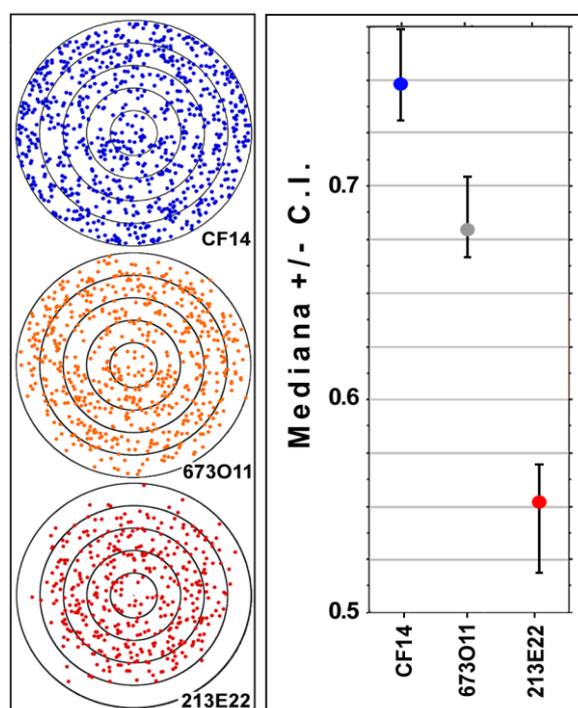


Fig. 33: Analisi statistica della distribuzione dei segnali d'ibridazione osservati in centinaia di nuclei. A sinistra è rappresentata la distribuzione radiale di tutti i segnali. A destra sono indicati i valori della mediana (con relativo intervallo di confidenza) delle misurazioni ottenute per ciascun segnale (modificata da Federico et al. 2008).

3. Risultati e discussione

3.1 - IL CROMOSOMA HSA9

Localizzazione intranucleare del cromosoma HSA9

Il cromosoma HSA9 è un cromosoma composizionalmente molto eterogeneo, formato da bande L1⁺ molto povere in GC, da bande H3⁺ molto ricche in GC e da bande composizionalmente intermedie. Il territorio del cromosoma HSA9, nel nucleo, occupa una posizione intermedia, come precedentemente descritto (Boyle et al., 2001). Tale localizzazione si riferisce però al “centroide” dell’intero territorio e rappresenta quindi una localizzazione alquanto grossolana perchè non definisce in modo preciso la posizione delle diverse parti del cromosoma 9. Un maggiore dettaglio è stato parzialmente ottenuto con la parte terminale del braccio corto, che è localizzata nelle regioni più periferiche del nucleo interfaseico, e con la parte terminale del braccio lungo, localizzata nella parte più interna del nucleo (Saccone et al., 2002).

Utilizzando la medesima procedura già utilizzata per definire l’organizzazione intranucleare del cromosoma umano HSA7 (Federico et al., 2008), sono state selezionate alcune sonde di tipo BAC, contenenti DNA genomico di diverse regioni del cromosoma HSA9 (Tab. 1), e ciò al fine di definire con maggiore dettaglio la posizione che le diverse parti di tale cromosoma occupano nei nuclei interfaseici dei linfociti umani. Essendo il cromosoma HSA9 un cromosoma composizionalmente molto eterogeneo, ci si aspetta, così come osservato per il cromosoma HSA7 (Federico et al., 2008), un andamento intranucleare a zig-zag che prevede una disposizione delle bande più povere in GC nella zona periferica del nucleo e delle bande più ricche in GC nella porzione più interna. La posizione delle bande telomeriche è già nota (v. sopra) e indica chiaramente come le due estremità del cromosoma si trovino in posizioni estremamente differenti: il telomero p nella regione periferica e il telomero q nella regione interna.

Tab. 1: Caratteristiche genomiche delle sonde BAC utilizzate

BAC	band	start	end	size	band, GC%
1 RP11-457P10	9p24.3	1.187.517	1.354.838	167.322	40,6591
2 RP11-120A3	9p23	10.370.430	10.545.273	174.844	35,3639
3 RP11-809P2	9p22.1	19.072.636	19.247.469	174.834	40,1641
4 RP11-607P10	9p21.1	29.112.608	29.297.757	185.150	36,2161
5 RP11-752M5	9p13.3	34.431.290	34.615.381	184.092	44,4016
6 RP11-978F22	9p11.2	46.661.426	46.823.850	162.425	39,8978
7 RP11-348K24	9q13	65.978.548	66.154.401	175.854	39,2151
8 RP11-657P1	9q21.13	76.026.759	76.172.883	146.125	38,0839
9 RP11-51N4	9q22.32	95.743.355	95.916.922	173.568	43,1880
10 RP11-940E14	9q31.1	105.629.338	105.807.783	178.446	37,1888
11 RP11-626G6	9q33.2	120.726.216	120.895.698	169.483	43,1222
12 RP11-24K1	9q34.12	130.871.935	131.055.020	183.086	50,3151
13 RP11-673E5	9q34.3	139.826.569	140.038.471	211.903	54,4126

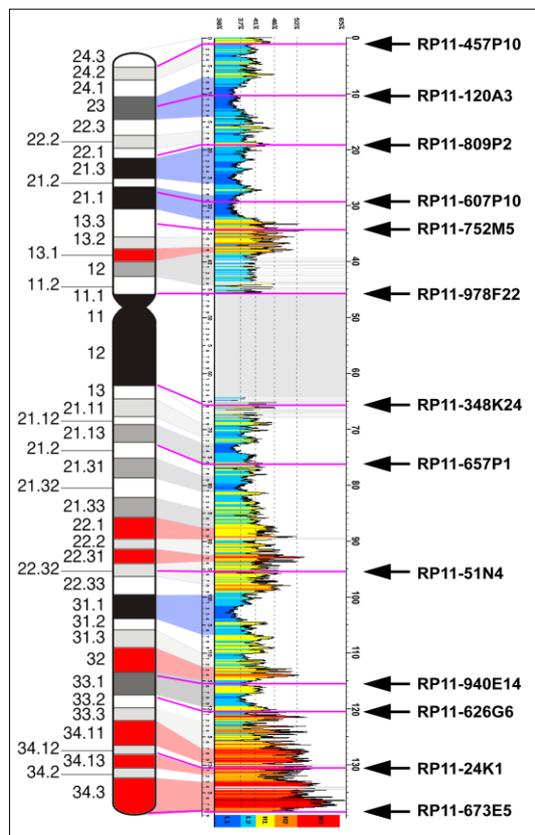


Fig. 34: Ideogramma del cromosoma 9 umano. Sono indicate, a destra, le sonde BAC utilizzate per la localizzazione intranucleare del cromosoma. In rosso sono indicate le bande H3+. Il profilo a destra del cromosoma mostra la variazione del livello di GC lungo il cromosoma e la corrispondenza della sequenza con le bande citogenetiche (modificato da Costantini et al., 2007).

Le sonde utilizzate sono ampiamente distribuite lungo il cromosoma e sono rappresentative di bande appartenenti alle diverse categorie composizionali (Fig. 34). Alcune sonde non hanno dato segnali d'ibridazione che potessero consentire la corretta localizzazione intranucleare in quanto la presenza di ulteriori segnali oltre a quelli specifici determinano l'impossibilità, nel nucleo interfase, di identificare i segnali corretti. Ad esempio, la sonda RP11-978F2 ha dato, nei cromosomi metafasici, segnali d'ibridazione sia nella posizione corretta (banda 9p11.2) sia in una regione del braccio lungo corrispondente alla banda 9q13 (Fig. 35).

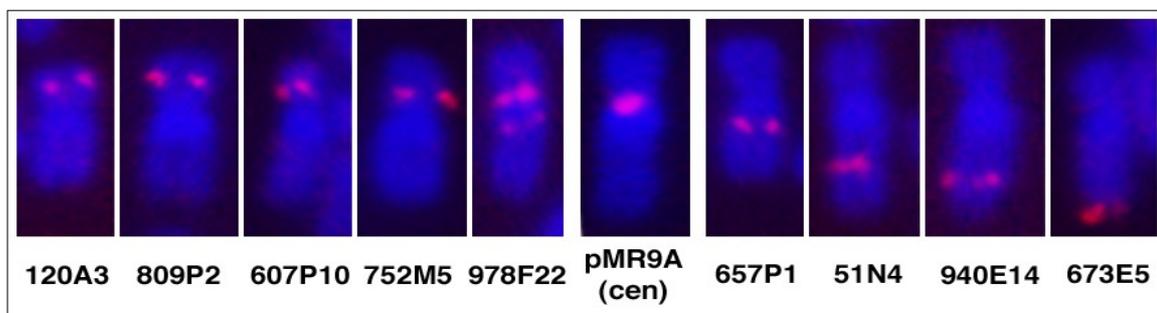


Fig. 35: Localizzazione delle sonde BAC, descritte nella tabella 1, nei cromosomi metafasici. Tutte mostrano un segnale d'ibridazione in un unico *locus*, eccetto la sonda 978F22 che presenta anche dei segnali nel braccio lungo.

I *loci* identificati dalle sonde descritte nella Tabella 1 e nella Figura 34 sono stati quindi localizzati nel nucleo dei linfociti stimolati con PHA. Almeno 300 nuclei per ciascuna sonda ibridata sono stati acquisiti mediante CCD camera e i segnali d'ibridazione presenti sono stati localizzati radialmente mediante l'apposito software progettato per tale scopo. I valori di localizzazione ottenuti per tutti i segnali sono quindi stati analizzati statisticamente ed è stato calcolato il valore della mediana per ciascuna sonda ibridata. La mediana ci indica se un *locus* è posizionato nella parte periferica del nucleo o nella parte più interna, avendo definito come valore di confine 0,65. I valori ottenuti sono riportati nella Tabella 2.

I risultati dimostrano che il cromosoma 9, così come il cromosoma 7 già studiato nei dettagli in precedenza (Federico et al., 2008), è organizzato nel nucleo a zig-zag, in modo radiale, con le regioni più ricche in GC nella parte più interna del nucleo e quelle più povere in GC nella parte più periferica. Tale dato è confermato dal valore del coefficiente

di correlazione $R=0,90758$ tra la localizzazione intranucleare e il livello di GC delle bande in cui sono localizzate le sonde (Fig. 36).

Tab. 2: Localizzazione intranucleare radiale dalle sonde BAC utilizzate.

BAC	band	start	end	size	band, GC% RNL (46,XX)
1	RP11-457P10	9p24.3	1.187.517	1.354.838	167.322 40,6591 ND
2	RP11-120A3	9p23	10.370.430	10.545.273	174.844 35,3639 0,756
3	RP11-809P2	9p22.1	19.072.636	19.247.469	174.834 40,1641 0,697
4	RP11-607P10	9p21.1	29.112.608	29.297.757	185.150 36,2161 0,688
5	RP11-752M5	9p13.3	34.431.290	34.615.381	184.092 44,4016 0,591
6	RP11-978F22	9p11.2	46.661.426	46.823.850	162.425 39,8978 ND
7	RP11-348K24	9q13	65.978.548	66.154.401	175.854 39,2151 ND
8	RP11-657P1	9q21.13	76.026.759	76.172.883	146.125 38,0839 0,704
9	RP11-51N4	9q22.32	95.743.355	95.916.922	173.568 43,1880 0,564
10	RP11-940E14	9q31.1	105.629.338	105.807.783	178.446 37,1888 0,702
11	RP11-626G6	9q33.2	120.726.216	120.895.698	169.483 43,1222 0,683
12	RP11-24K1	9q34.12	130.871.935	131.055.020	183.086 50,3151 ND
13	RP11-673E5	9q34.3	139.826.569	140.038.471	211.903 54,4126 0,491

ND: localizzazione non determinata.

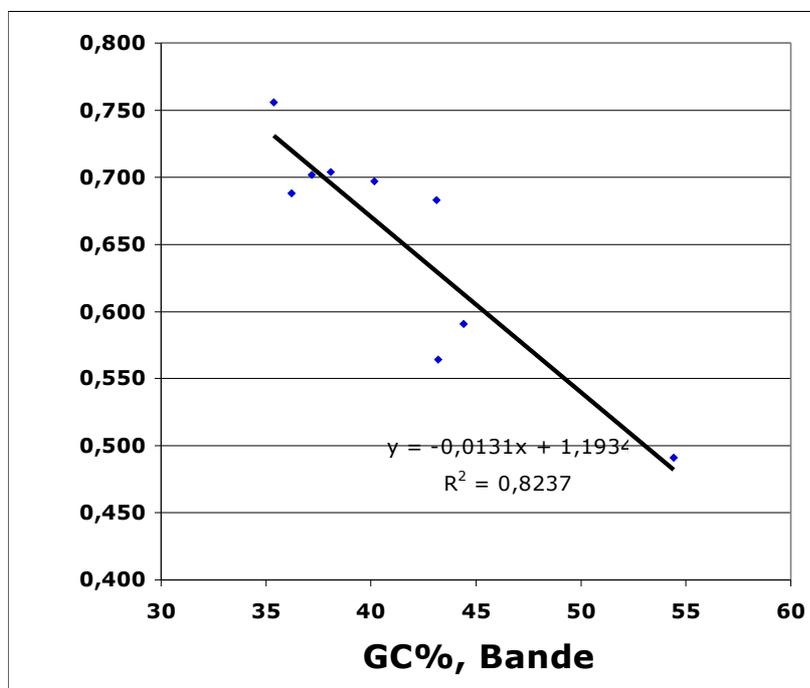


Fig. 36: Correlazione tra la localizzazione intranucleare radiale (RNL) e il livello di GC delle bande in cui sono localizzate le sonde.

Descrizione di una inversione pericentrica del cromosoma 9

Analisi del cariotipo mediante bandeggio cromosomico

Il cariotipo di un individuo di sesso femminile con sospetta inversione eterozigote a livello del cromosoma 9 è stato analizzato mediante bandeggio Q e bandeggio G. I cromosomi metafasici sono stati ottenuti mediante procedura standard in citogenetica (v. materiali e metodi), cioè trattamento con colcemid per bloccare le cellule in metafase, utilizzo di una soluzione ipotonica per una ottimale dispersione dei cromosomi e fissazione con acido acetico/metanolo. Successivamente sono stati colorati sia con la procedura per ottenere il bandeggio Q (Fig. 37) che con quella per ottenere il bandeggio G (Fig. 38). L'analisi delle metafasi bandeggiate ha messo in evidenza la presenza di una inversione pericentrica in uno dei due cromosomi 9, una inversione che coinvolge l'eterocromatina della regione 9q12. Infatti, uno dei due cromosomi 9 si presenta quasi metacentrico, con l'eterocromatina posizionata sopra il centromero anziché sotto. Tale cambiamento di morfologia è dovuto al fatto che i punti di rottura dell'inversione, rispetto al centromero sono asimmetrici: nel braccio corto sembra essere molto vicino al centromero mentre nel braccio lungo sembra essere distale rispetto al blocco di eterocromatina in 9q12.

Il bandeggio non è comunque una metodica sufficientemente precisa per identificare i punti di rottura dell'inversione e per avere maggiori dettagli sulla inversione è stata utilizzata l'ibridazione *in situ* con sonde BAC.

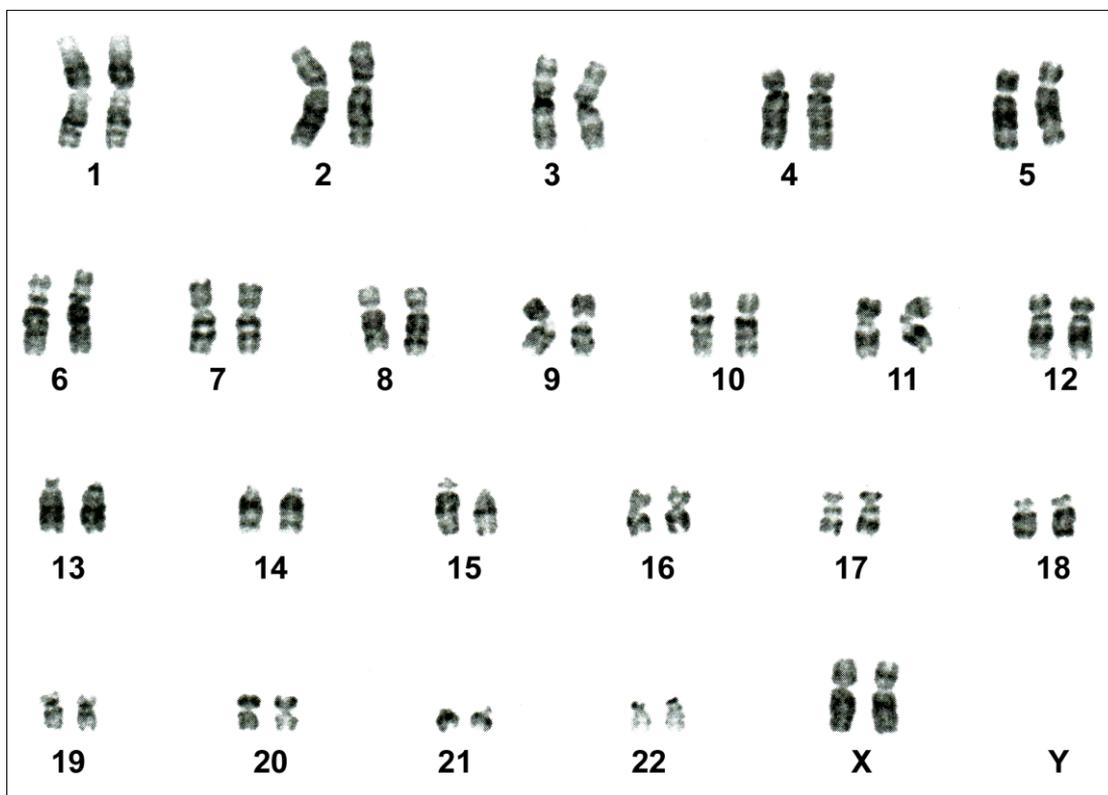


Fig. 37: Cariotipo con l'inversione pericentrica del cromosoma 9 con bandeggio Q. L'immagine è stata ottenuta mediante inversione della colorazione standard (cioè cromosomi di colore chiaro su fondo nero).

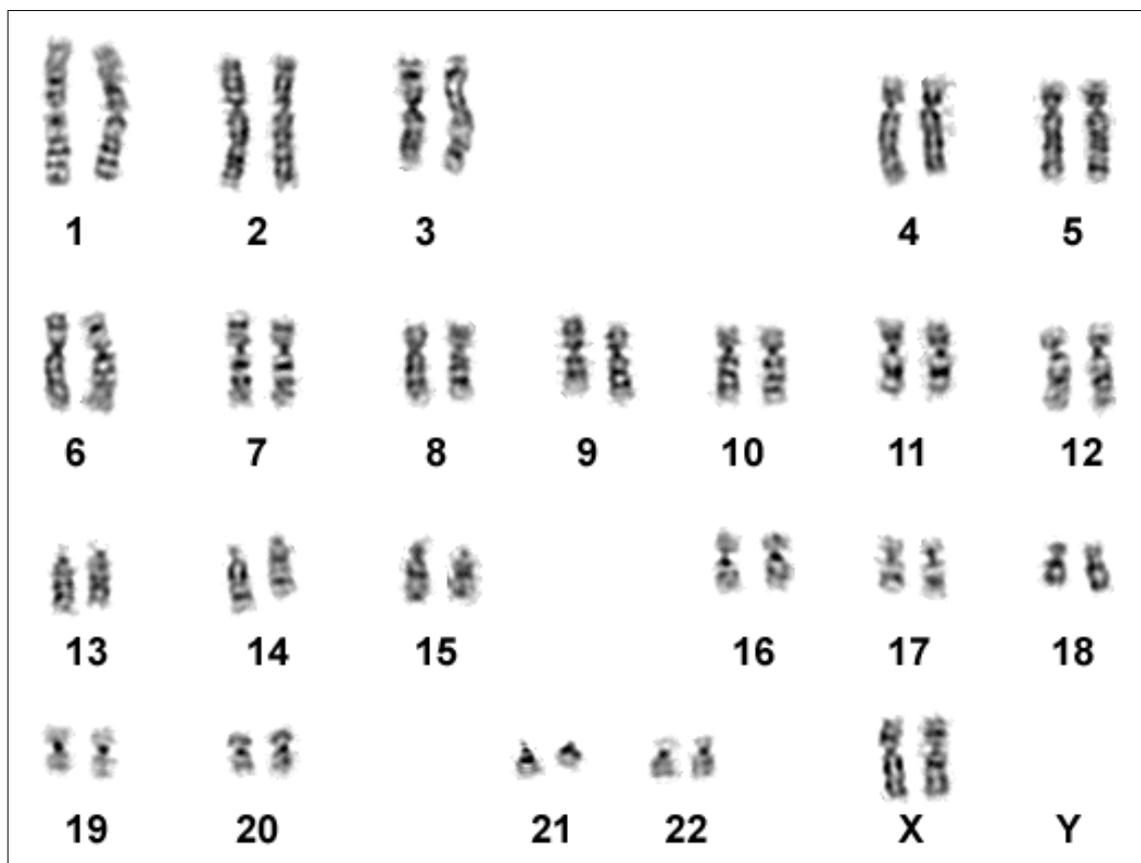


Fig. 38: Cariotipo con bandeggio G del cariotipo con l'inversione pericentrica del cromosoma 9.

Definizione dei punti di rottura dell'inversione del cromosoma 9

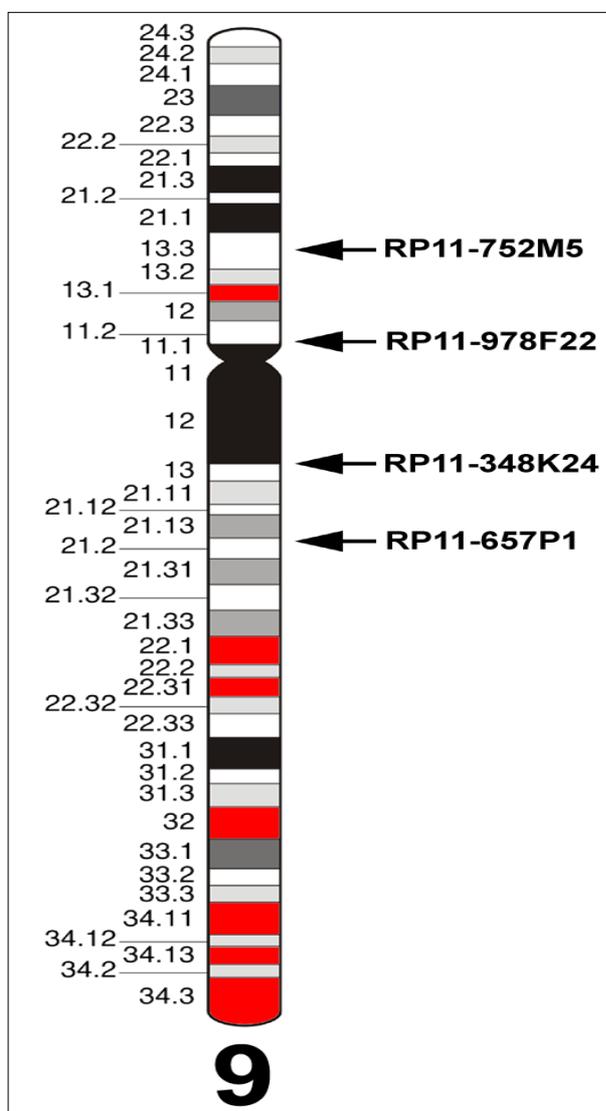


Fig. 39: Ideogramma del cromosoma 9 con la posizione delle sonde utilizzate per definire i punti di rottura dell'inversione pericentrica osservata.

Per definire la posizione dei break-points sul cromosoma 9 sono state utilizzate alcune delle sonde BAC descritte sopra (Tab. 1) contenenti DNA umano di *loci* localizzati nelle bande più vicine alla regione centromerica. Le sonde utilizzate sono state: RP11-752M5, RP11-978F22, RP11-348K24 e RP11-657P1 localizzate rispettivamente nelle bande p13.3, p11.2, q13 e q21.13 (Fig. 39).

L'ibridazione con le sonde più distali (RP11-752M5 e RP11-657P1) ha mostrato che i punti di rottura si trovano all'interno della regione compresa tra tali sonde poiché, rispetto al cromosoma 9 normale, i segnali d'ibridazione non cambiano di posizione lungo il cromosoma (Fig. 40 e 41).

L'ibridazione *in situ* ha mostrato che i punti di inversione sono molto vicini

all'eterocromatina centromerica, infatti i segnali delle due sonde rimangono nella loro posizione originaria, nonostante l'inversione determini la rotazione dell'intero blocco di eterocromatina pericentromerica.

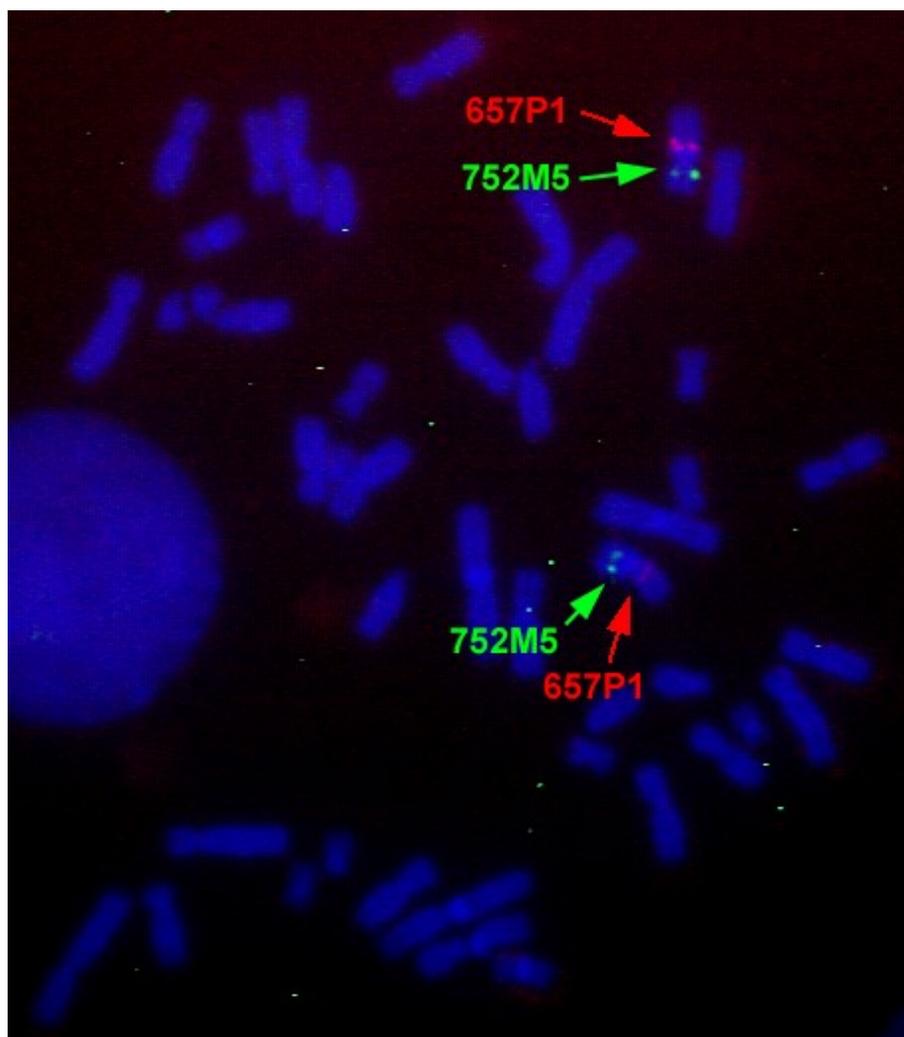


Fig. 40: Ibridazione *in situ* con le sonde localizzate nelle bande p13.3 e q21.13.

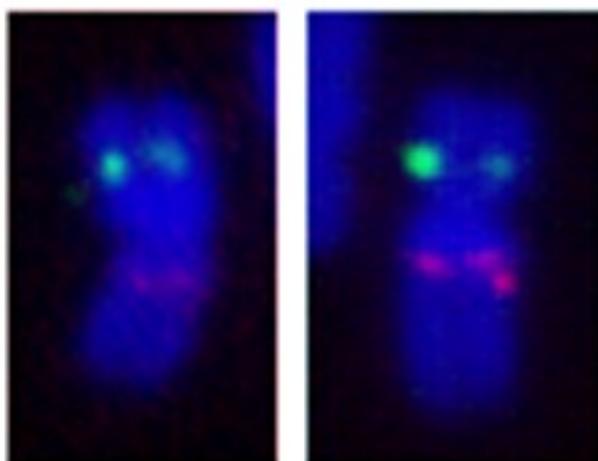


Fig. 41: Particolare dei cromosomi 9 della figura 40. Si nota che il cromosoma di sinistra è metacentrico e presenta l'inversione del blocco di eterocromatina pericentromerica.

L'analisi dei risultati dell'ibridazione con le sonde più vicine al centromero è stata più problematica in quanto i segnali d'ibridazione delle sonde RP11-978F22 e RP11-348K24 sono presenti anche in altre posizioni rispetto al *locus* principale (Fig. 42). I risultati, comunque, sembrano mostrare una inversione i cui break-points sono interni a tali sonde e sembrano quindi interessare solo la regione eterocromatica o, al massimo, poche kb di DNA della banda q13 in quanto il segnale accessorio della sonda 978F22 presente nella banda q13 sembra essere più piccolo rispetto a quello del cromosoma 9 normale, indicandone una delezione conseguente all'inversione.

I dati ottenuti hanno quindi consentito di posizionare in modo sufficientemente preciso i due breakpoints, evidenziando che l'inversione riguarda esclusivamente, o quanto meno quasi esclusivamente, l'eterocromatina della regione centromerica e sottocentromerica, una delle condizioni non patologiche di mutazione cromosomica molto diffusa nella popolazione umana.

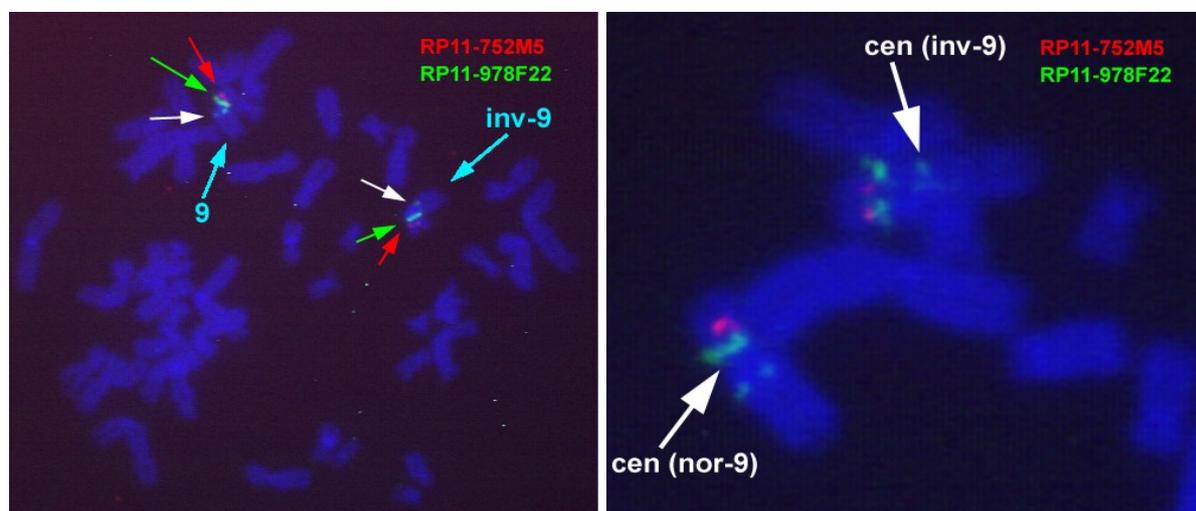


Fig. 42: Ibridazione *in situ* nelle metafasi con l'inversione pericentrica del cromosoma 9 (inv-9) con le sonde indicate. La sonda RP11-978F22 presenta, oltre al segnale nella posizione corretta (freccie di colore verde nel pannello a sinistra), nella banda p11.2, anche dei segnali ulteriori (di dimensione più ridotta) in posizione sottocentromerica, nella banda q13 (freccie di colore bianco nel pannello a sinistra). E' evidenziato il cromosoma 9 con l'inversione, riconoscibile per la posizione del centromero che rende tale cromosoma quasi metacentrico.

Il cromosoma 9 con l'inversione pericentrica nel nucleo interfascico

L'organizzazione del cromosoma 9 nei nuclei interfascici è stata quindi studiata nel caso in cui sia presente l'inversione pericentrica descritta nei paragrafi precedenti. Per tale lavoro sono state utilizzate sonde BAC localizzate in bande adiacenti ai punti di rottura e, in particolare le sonde RP11-607P10, RP11-752M5, RP11-657P1 e RP11-940E4. I valori della mediana delle localizzazioni radiali ottenute per le quattro sonde, mostrati nella tabella 3, sono stati rispettivamente 0,745 - 0,615 - 0,662 e 0,766. I valori ottenuti dalla localizzazione intranucleare dei *loci* che sono stati analizzati ha dimostrato che l'inversione non determina alterazioni rilevanti nella posizione intranucleare dell'intero cromosoma (Fig. 43).

Tab. 3: RNL delle sonde BAC nel cromosoma 9 con l'inversione pericentrica.

BAC	band	start	end	size	band, GC%	RNL (46,XX)	RNL (inv9)
RP11-607P10	9p21.1	29.112.608	29.297.757	185.150	36,2161	0,688	0,745
RP11-752M5	9p13.3	34.431.290	34.615.381	184.092	44,4016	0,591	0,615
RP11-657P1	9q21.13	76.026.759	76.172.883	146.125	38,0839	0,704	0,662
RP11-940E14	9q31.1	105.629.338	105.807.783	178.446	37,1888	0,702	0,766

RNL: Localizzazione nucleare radiale. Valori in blu: localizzazione periferica. Valori in rosso: localizzazione nel compartimento più interno.

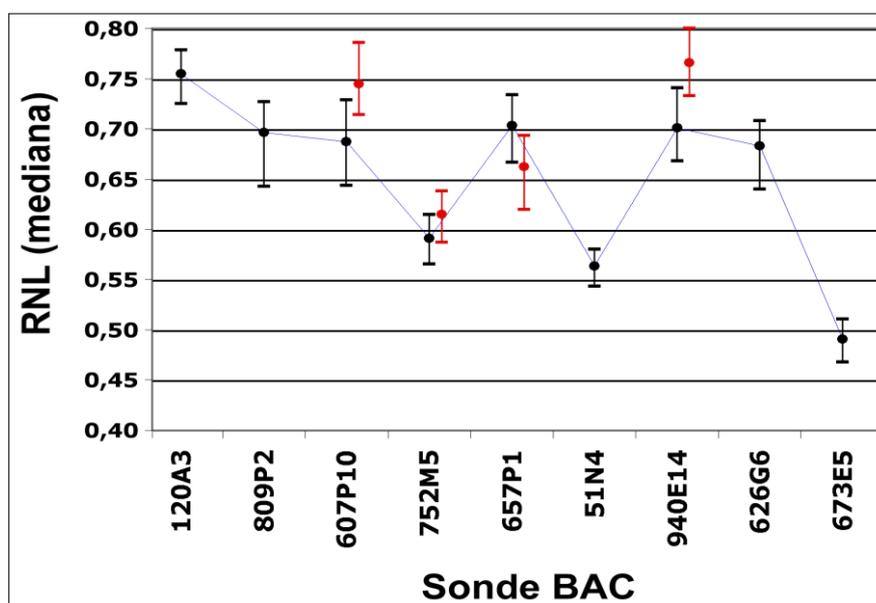


Fig. 43: RNL delle sonde BAC nel cromosoma 9 normale (colore nero) e nel cromosoma 9 con l'inversione pericentrica (in rosso).

E' invece da rilevare che le regioni contigue al segmento invertito hanno mostrato un cambiamento della loro posizione radiale; la sonda RP11-752M5 è leggermente più periferica rispetto allo stesso *locus* del cromosoma normale mentre la sonda RP11-657P1 è più interna rispetto al controllo normale (Fig. 43 e Fig. 44). Questi dati potrebbero avere una spiegazione nella posizione dell'eterocromatina sottocentromerica che nel cromosoma 9 normale è localizzata vicino alla sonda RP11-657P1 mentre nel cromosoma 9 con l'inversione si sposta verso la sonda RP11-752M5. Questo potrebbe fare ipotizzare che la posizione molto periferica dell'eterocromatina tenda a far posizionare i *loci* vicini nella sua stessa posizione intranucleare. Tra l'altro, i dati di localizzazione dei *loci* analizzati nel cromosoma 9 con l'inversione sono la media dei valori dovuti all'allele sul cromosoma normale e all'allele sul cromosoma con l'inversione, che non sono distinguibili nei nuclei interfascici, quindi lo spostamento potrebbe essere di entità maggiore rispetto a quanto rilevato. La suddetta modificazione sembra comunque, allo stato attuale, essere poco rilevante dal punto di vista funzionale, essendo l'individuo portatore dell'inversione con un fenotipo normale.

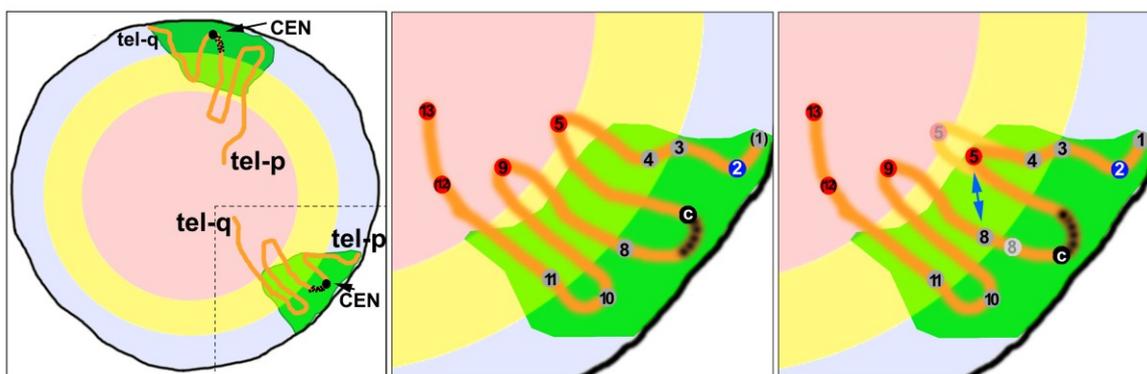


Fig. 44: Organizzazione del cromosoma 9 nel nucleo interfascico. A sinistra: schema dell'organizzazione radiale del DNA rispetto al relativo territorio cromosomico. Al centro: dettaglio di uno dei due cromosomi omologhi con l'indicazione della posizione radiale di ogni *locus* desunta dal valore della mediana indicata nella tab. 3. A destra: l'organizzazione del cromosoma 9 con l'inversione pericentrica: sono indicati loci 5 e 8 la cui posizione radiale varia, anche se in modo non significativo.

Il cromosoma HSA9 negli altri Primati

Il cromosoma HSA9 è il risultato di una storia evolutiva che dal cromosoma ancestrale dei Primati ha condotto all'attuale cromosoma umano attraverso due eventi di inversione cromosomica con riposizionamento del centromero e formazione, per ultimo, del blocco di eterocromatina sottocentromerica (Fig. 45). Le specie più vicine all'uomo (GGO/PPY e PTR) presentano il rispettivo cromosoma omologo con un'inversione che determina lo spostamento del centromero in posizione telomerica, in gorilla e orango, o in posizione metacentrica, nello scimpanzè. Anche le specie di Primati più distanti presentano vari tipi di riarrangiamenti cromosomici che comportano il riposizionamento di numerose regioni, rispetto alla condizione presente nell'uomo.

Per ottenere informazioni, nei nuclei dei Primati, relative alla localizzazione radiale intranucleare di regioni omologhe del cromosoma HSA9, cloni BAC contenenti DNA umano del cromosoma HSA9 sono stati ibridati nei cromosomi e nei nuclei di CJA, GGO, LCA.

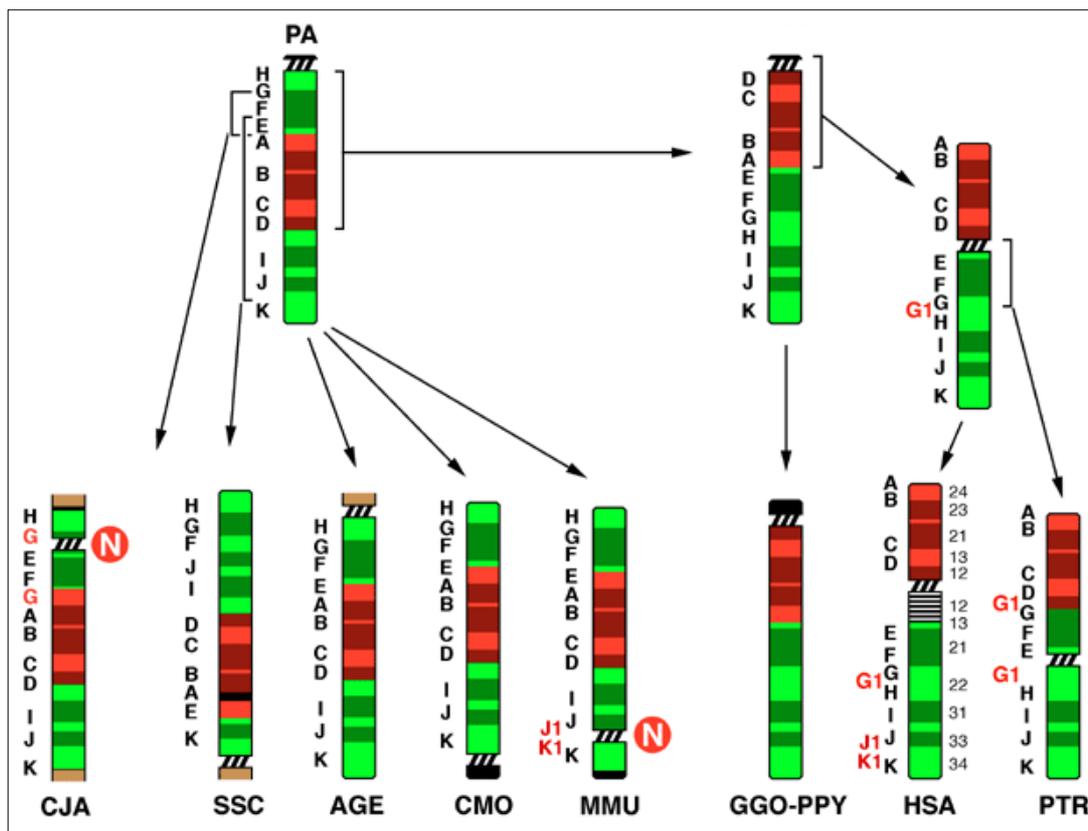


Fig. 45: La storia evolutiva del cromosoma HSA9.

Le ibridazioni sono risultate leggibili in tutte le specie considerate, anche se non tutte le sonde hanno dato risultati utilizzabili per la loro localizzazione intranucleare come nel caso di LCA vista la maggiore distanza evolutiva dall'uomo. La localizzazione radiale intranucleare, per le sonde la cui ibridazione ha consentito di calcolare il valore della mediana, è mostrata nella tabella 4. Nella maggior parte dei casi la posizione intranucleare dei *loci* è conservata nelle specie considerate. Fa eccezione la sonda 752M5, che in CJA si presenta più periferica rispetto al controllo umano.

Tab. 4: Localizzazione nucleare radiale delle sonde BAC di HSA9 in individui normali, con inversione del cromosoma 9 e nelle altre specie di Primati.

	BAC	band	band, GC%	Localizzazione Radiale Nucleare			
				HSA	HSA inv9	GGO	CJA
1	RP11-457P10	9p24.3	40,6591				
2	RP11-120A3	9p23	35,3639	0,756		0,785	0,752
3	RP11-809P2	9p22.1	40,1641	0,697			
4	RP11-607P10	9p21.1	36,2161	0,688	0,745		
5	RP11-752M5	9p13.3	44,4016	0,591	0,615	0,638	0,709
6	RP11-978F22	9p11.2	39,8978				
7	RP11-348K24	9q13	39,2151				
8	RP11-657P1	9q21.13	38,0839	0,704	0,662	0,650	
9	RP11-51N4	9q22.32	43,1880	0,564			
10	RP11-940E14	9q31.1	37,1888	0,702	0,766		
11	RP11-626G6	9q33.2	43,1222	0,683			0,694
12	RP11-24K1	9q34.12	50,3151				
13	RP11-673E5	9q34.3	54,4126	0,491		0,616	0,616

3.2 - IL CROMOSOMA HSA16

Localizzazione intranucleare

Il cromosoma 16 è un piccolo cromosoma composizionalmente molto ricco in GC. E' infatti composto in prevalenza da bande H3⁺, e solo da alcune bande molto povere in GC (le bande L1⁺), oltre alle bande composizionalmente intermedie. Il cromosoma 16 è uno dei cromosomi prevalentemente localizzato nella parte più interna del nucleo (Boyle et al., 2001).

Per analizzare più in dettaglio la posizione del cromosoma 16 nel nucleo interfaseico dei linfociti umani sono state utilizzate delle sonde BAC localizzate in tale cromosoma (Tab. 5 e Fig. 46). La scelta delle sonde è stata effettuata in funzione della posizione dei breakpoints associata ad un caso di inversione pericentrica del cromosoma 16 (v. oltre)

Tab. 5: Descrizione delle sonde prese in esame.

BAC	band	start	end	size	band, GC%
1 RP11-846C9	16p13.3	2.144.245	2.364.301	220.057	49,5200
2 RP11-2M20	16p12.3	17.167.205	17.343.377	176.173	43,9419
3 RP11-915B15	16p11.2a	28.151.216	28.296.477	145.262	49,3972
4 RP11-104C4	16p11.2b	33.454.726	33.648.422	193.697	41,4370
5 RP11-1088B6	16p11.2b	34.279.064	34.449.270	170.207	41,4370
6 RP11-37K19	16q23.2	79.888.041	80.078.372	190.332	42,8125
7 RP11-81M17	16q24.2	87.873.730	87.873.730	153.813	52,2436
8 RP11-830F9	16q24.3	88.833.664	89.063.953	230.290	54,1900

Le sonde utilizzate identificano *loci* specifici lungo il cromosoma 16 e tutte hanno dato come risultato, nei cromosomi metafasici, un unico segnale d'ibridazione puntiforme in corrispondenza di ciascuno dei due cromosomi omologhi (Fig. 47), indispensabile per potere effettuare la localizzazione nel nucleo mediante ibridazione *in situ* ed analisi di centinaia di nuclei ibridati.

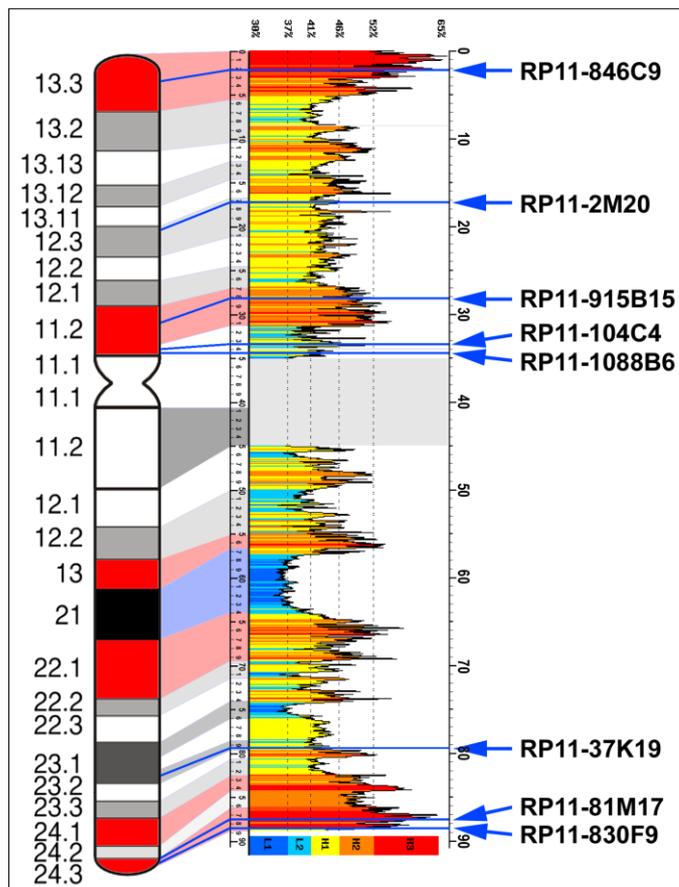


Fig. 46: Il cromosoma 16 con l'indicazione delle bande H3⁺ e delle sonde utilizzate nel presente lavoro.

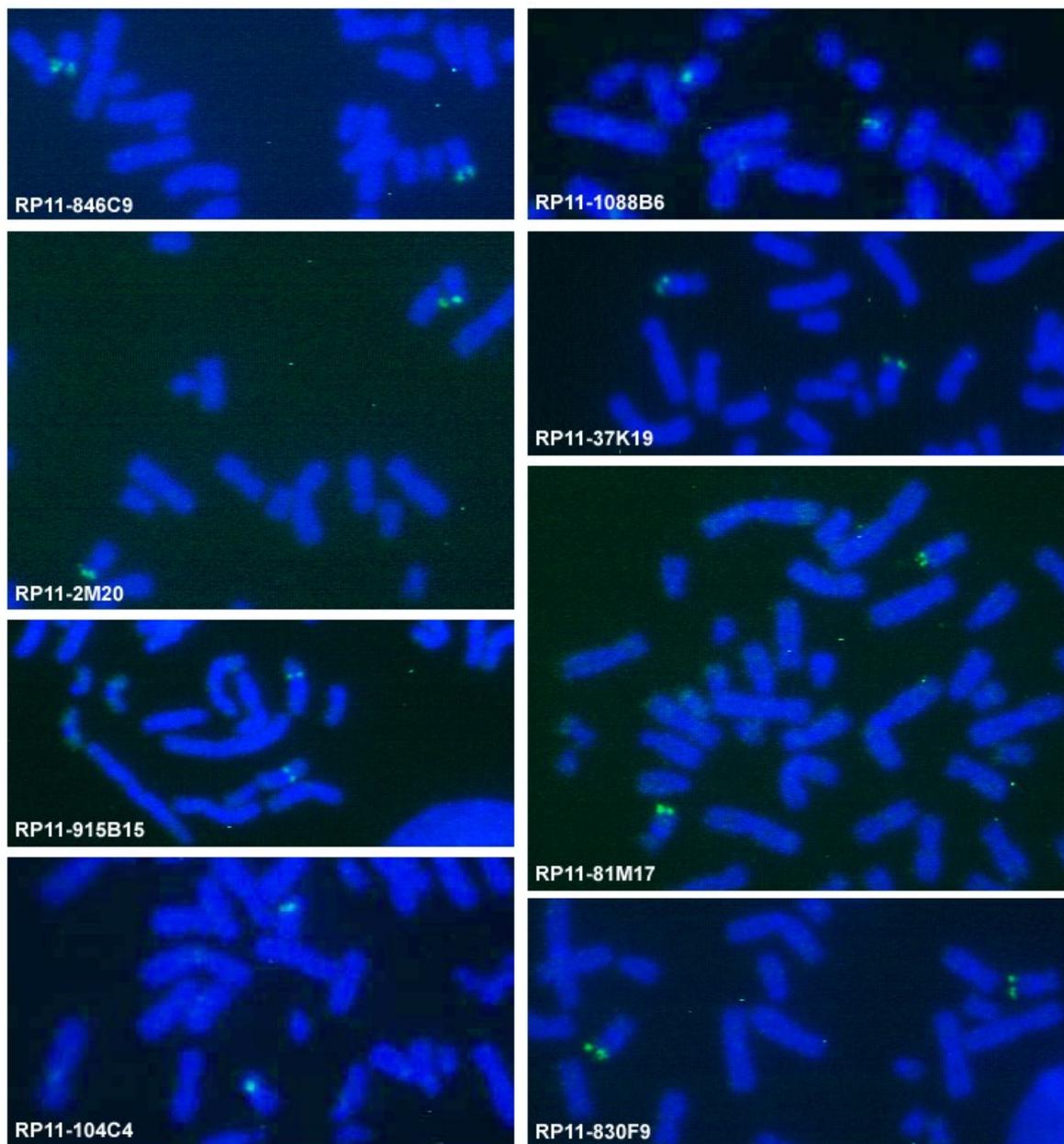


Fig. 47: Metafasi parziali con i segnali d'ibridazione delle sonde utilizzate.

Come per il cromosoma HSA9, la localizzazione nei nuclei interfascici è stata effettuata utilizzando il sistema messo a punto nel nostro laboratorio che prevede la rilevazione e digitalizzazione di centinaia di nuclei ibridati, seguita dall'analisi statistica dei dati di localizzazione in 2D di tutti i segnali rilevati (v. Materiali e Metodi).

I *loci* identificati dalle sonde descritte nella tabella 5 e nella figura 46, sono stati quindi localizzati nel nucleo dei linfociti stimolati con PHA dove i segnali d'ibridazione sono sempre stati solo due per ciascun nucleo (Fig. 48).

I segnali d'ibridazione di centinaia di nuclei per ciascuna sonda sono stati quindi analizzati statisticamente calcolando poi il valore della mediana per ciascuna di tali sonde.

I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella 6. Dal pool di sonde analizzato, è emerso che il cromosoma 16, in accordo con i dati di letteratura (Boyle et al, 2001), è localizzato nella regione più interna del nucleo, essendo stati osservati anche *loci* con valori di mediana anche inferiori a 0,5, quindi posizionati molto internamente nel nucleo.

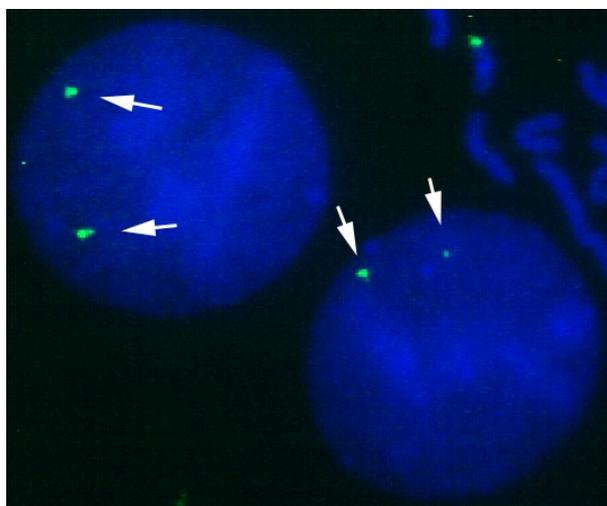


Fig. 48: Esempio di ibridazione *in situ* nei nuclei interfascici, dove vengono generalmente osservati due segnali per ciascuna sonda ibridata.

Tab. 6: Valori della mediana ottenuti dall'analisi delle ibridazioni con le sonde indicate.

BAC	band	start	end	size	band, GC%	RNL (46,XX o 46,XY)	
1	RP11-846C9	16p13.3	2.144.245	2.364.301	220.057	49,5200	0,474
2	RP11-2M20	16p12.3	17.167.205	17.343.377	176.173	43,9419	0,501
3	RP11-915B15	16p11.2a	28.151.216	28.296.477	145.262	49,3972	0,495
4	RP11-104C4	16p11.2b	33.454.726	33.648.422	193.697	41,4370	0,630
5	RP11-1088B6	16p11.2b	34.279.064	34.449.270	170.207	41,4370	0,560
6	RP11-37K19	16q23.2	79.888.041	80.078.372	190.332	42,8125	0,631
7	RP11-81M17	16q24.2	87.873.730	87.873.730	153.813	52,2436	0,518
8	RP11-830F9	16q24.3	88.833.664	89.063.953	230.290	54,1900	0,487

Il cariotipo 46,XX,inv(16)(p11.2q23.3)

Il cromosoma 16 è stato anche studiato nel caso in cui la sua struttura risulti modificata da una inversione pericentrica. Due individui appartenenti alla stessa famiglia, portatori di un'inversione pericentrica eterozigote del cromosoma 16, sono stati precedentemente identificati mediante bandeggio G e bandeggio Q. I due individui sono padre e figlio e quest'ultimo presenta un lieve ritardo mentale la cui causa potrebbe essere associata all'inversione cromosomica che è stata rilevata. I cromosomi metafasici sono stati ottenuti mediante procedura standard in citogenetica. Per avere informazioni più precise, rispetto all'analisi del cariotipo bandeggiato, è stato però necessario utilizzare procedure differenti quali ad esempio l'ibridazione *in situ* con sonde puntiformi.

Analisi dei breakpoints

Le sonde utilizzate hanno consentito di assegnare i punti di rottura alle bande 16p11.2 e 16q24.1 (Fig. 49).

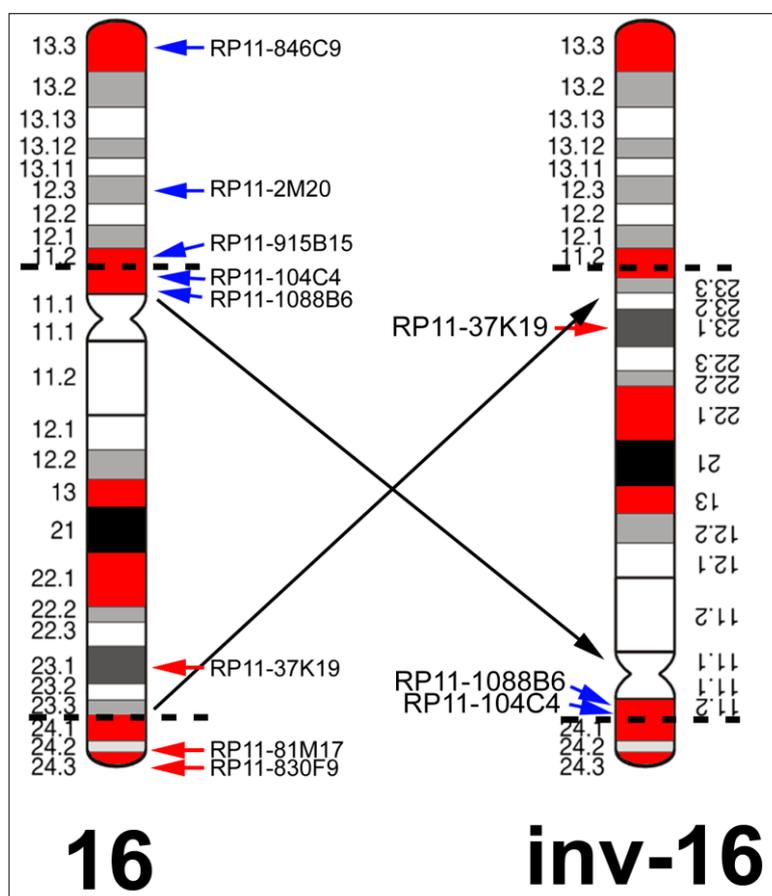


Fig. 49: Ideogramma del cromosoma 16. Le linee tratteggiate indicano i siti di breakpoints e le frecce indicano le bande in cui ibridano le sonde prese in esame. In rosso sono rappresentate le bande H3+.

In dettaglio, le ibridazioni con le sonde descritte nella tabella 6 (Fig. 50) hanno fornito le seguenti informazioni.

- Le sonde RP11-2M20 e RP11-915B15, sono localizzate al di fuori del segmento invertito, in quanto conservano la posizione originaria nel cromosoma con l'inversione.

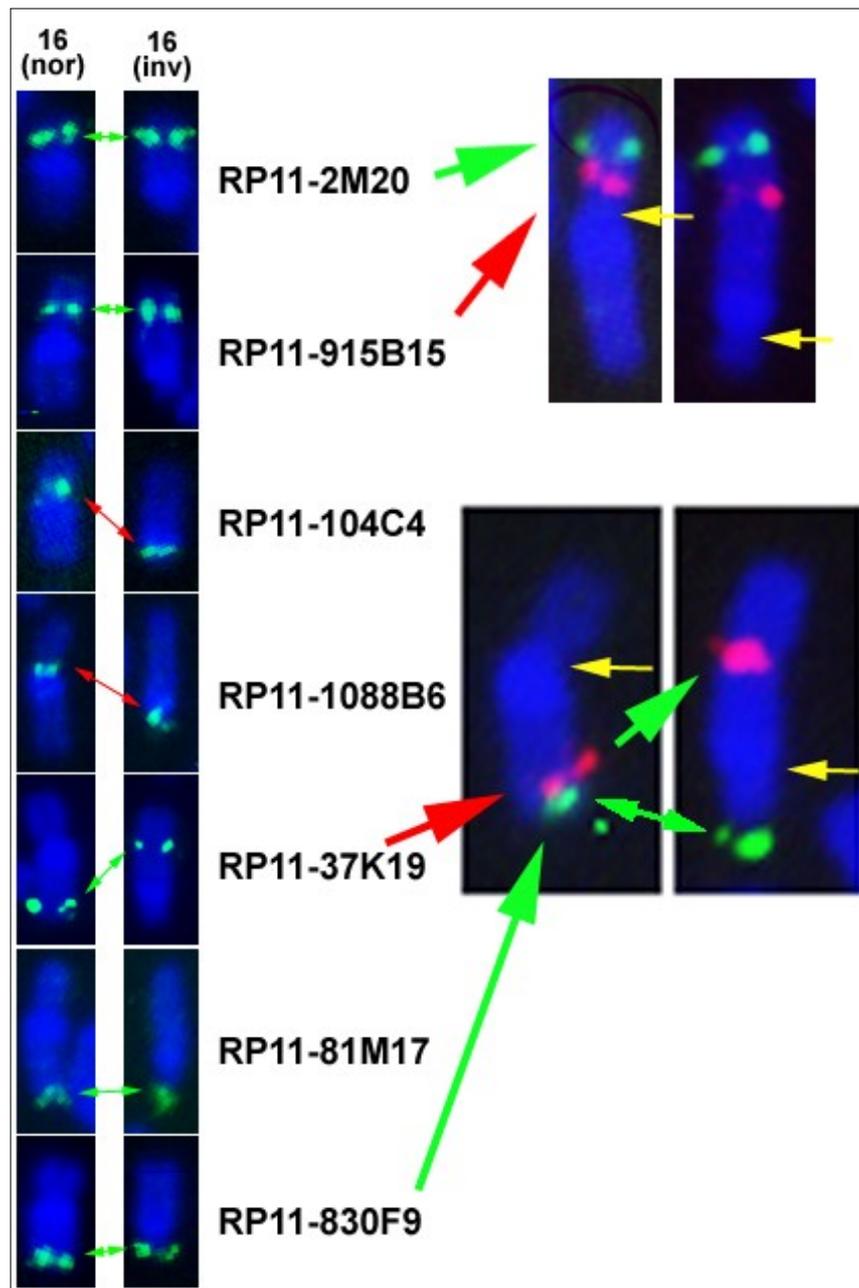


Fig. 50: Coppie di cromosomi 16 omologhi con i segnali d'ibridazione delle sonde indicate. Le frecce gialle indicano la posizione del centromero.

- Le sonde RP11-104C4 e RP11-1088B6, nel cromosoma 16 con l'inversione, non si trovano nella posizione originaria, indicando che esse si trovano all'interno del segmento invertito.
- La sonda RP11-37K9, nel cromosoma 16 con l'inversione, non si trova più nella posizione originaria, indicando quindi che anch'essa si trova all'interno del segmento invertito.
- Le sonde RP11-81M17 e RP11-830F9, nel cromosoma 16 con l'inversione, conservano la posizione originaria, indicando che esse si trovano all'esterno del segmento invertito.

I risultati ottenuti hanno quindi dimostrato che i due punti di rottura si trovano nella banda 16p11.2 e nella banda 16q24.1. Considerando poi la localizzazione delle sonde utilizzate, i punti di rottura possono essere posizionati, nel braccio corto, tra i nucleotidi 28.151.216 (posizione del BAC RP11-915B5) e 33.454.726 (posizione del BAC RP11-104C4) e, nel braccio lungo, tra i nucleotidi 80.0783.72 (posizione del BAC RP11-37K19) e 87.719.918 (posizione del BAC RP11-81M17). I risultati ottenuti con le sonde descritte non hanno evidenziato ulteriori riarrangiamenti cromosomici a carico del cromosoma 16.

Localizzazione intranucleare nel cromosoma 16 con inversione pericentrica

La localizzazione intranucleare dei *loci* del cromosoma 16 descritti in precedenza è stata effettuata nei nuclei con uno dei due cromosomi 16 portatori dell'inversione eterozigote pericentrica descritta sopra. L'analisi è stata effettuata su nuclei di due individui portatori dell'inversione (indicati con le sigle S73 e S74), parenti tra di loro (S73 e S74 sono, rispettivamente, padre e figlio). I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 7.

Tab. 7: Valori di mediana ottenuti con le sonde prese in esame e localizzate in individui con cariotipo normale e in cariotipi con inversione del 16 (S73 e S74).

BAC	band	start	end	size	band, GC%	RNL (46,XX o 46,XY)	RNL(inv16)	
							S73	S74
1 RP11-846C9	16p13.3	2.144.245	2.364.301	220.057	49,5200	0,474	ND	ND
2 RP11-2M20	16p12.3	17.167.205	17.343.377	176.173	43,9419	0,501	ND	0,501
3 RP11-915B15	16p11.2a	28.151.216	28.296.477	145.262	49,3972	0,495	0,534	ND
4 RP11-104C4	16p11.2b	33.454.726	33.648.422	193.697	41,4370	0,630	ND	0,625
5 RP11-1088B6	16p11.2b	34.279.064	34.449.270	170.207	41,4370	0,560	0,564	0,573
6 RP11-37K19	16q23.2	79.888.041	80.078.372	190.332	42,8125	0,631	ND	ND
7 RP11-81M17	16q24.2	87.873.730	87.873.730	153.813	52,2436	0,518	0,532	0,497
8 RP11-830F9	16q24.3	88.833.664	89.063.953	230.290	54,1900	0,487	0,514	ND

Anche se nei nuclei portatori dell'inversione non è possibile distinguere il segnale d'ibridazione presente sul cromosoma 16 normale da quello presente nel cromosoma con l'inversione, dai dati ottenuti emerge che non sembrano esserci variazioni significative nella posizione dei *loci* analizzati all'interno del nucleo degli individui con l'inversione rispetto alla posizione degli stessi *loci* nel nucleo degli individui con cariotipo normale.

Quindi, l'inversione non determina alterazione nell'organizzazione intranucleare del cromosoma 16. Ciò è presumibilmente dovuto alle caratteristiche composizionali non solo dell'intero cromosoma 16, che è molto ricco in GC e localizzato prevalentemente nelle parti più interne del nucleo (v. sopra), ma soprattutto delle due bande in cui sono localizzati i breakpoints che hanno determinato l'inversione. Infatti, le due bande appartengono a due regioni cromosomiche molto ricche in GC che quindi occupano la medesima posizione intranucleare.

Effetto posizione e fenotipo patologico

L'assenza di una modificazione nella posizione intranucleare del cromosoma 16 con l'inversione fa quindi escludere un'eventuale effetto posizione quale causa dell'insorgenza del ritardo mentale nell'individuo analizzato. Tale ipotesi era stata ritenuta possibile in quanto genitore e figlio presentano, per quanto riguarda il ritardo mentale, un differente fenotipo. Si è quindi esclusa una possibile mutazione a carico di geni presenti nelle regioni dei breakpoints, in quanto se così fosse stato entrambi avrebbero dovuto mostrare lo stesso tipo di ritardo mentale anche se, eventualmente, con differente livello di gravità. Quindi, non essendo state evidenziate anomalie da effetto posizione nel nucleo, si può affermare che la patologia di cui il bambino è affetto non sembra dipendere dalla variazione della posizione intranucleare del cromosoma 16, essendo questa simile non solo rispetto alla posizione del cromosoma 16 nel padre ma anche rispetto al cromosoma 16 di individui normali esterni alla famiglia.

Il cromosoma HSA16 negli altri Primati

Il cromosoma HSA16 delle specie più vicine all'uomo è estremamente conservato, mentre nelle specie più lontane il cromosoma HSA16 risulta sempre frammentato in almeno due parti corrispondenti al braccio corto e al braccio lungo (Fig. 51). Le specie che sono state prese in considerazione per ottenere informazioni sul livello di conservazione della localizzazione intranucleare dei cromosomi omologhi ad HSA16, sono state CJA, CMO, LCA e PCR.

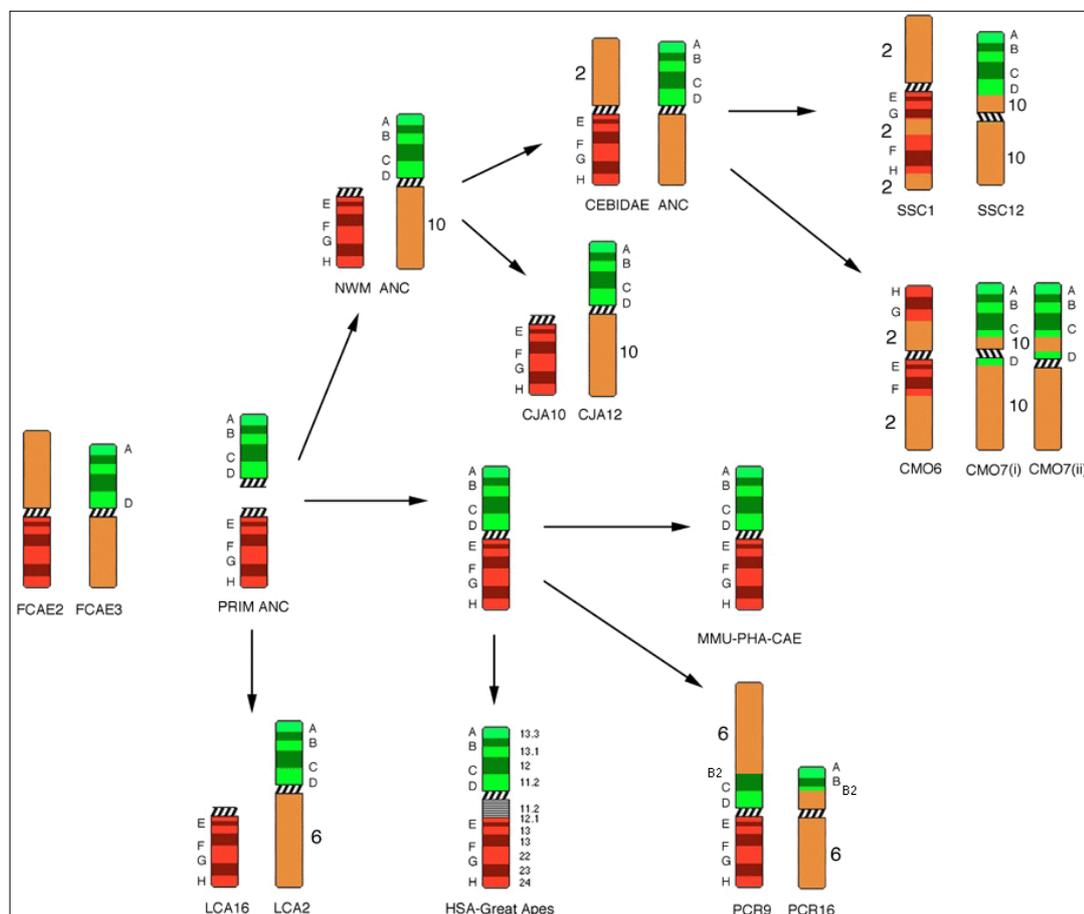


Fig. 51: La storia evolutiva del cromosoma HSA16.

Le ibridazioni effettuate sono risultate leggibili nelle specie considerate. La localizzazione radiale intranucleare, per tutte le sonde utilizzate, è stata decisamente interna, avendo riscontrato solo valori al di sotto di 0,65 (v. Tab. 8).

Come è possibile osservare dalla tabella 8 non è stato possibile calcolare la localizzazione nucleare radiale per i *loci* presi in considerazione in LCA in quanto la sua distanza evolutiva dall'uomo ha reso difficile l'individuazione dei tratti di omologia mediante FISH.

Tab. 8: Localizzazione nucleare radiale delle sonde BAC di HSA16 in individui normali, con inversione nelle altre specie di Primati.

BAC	band	band, GC%	RNL (46,XX o)	RNL (inv16)		CMO	CJA	PCR
				S73	S74			
1 RP11-846C9	16p13.3	49,5200	0,474	ND	ND		0,471	
2 RP11-2M20	16p12.3	43,9419	0,501	ND	0,501	0,498		
3 RP11-915B15	16p11.2a	49,3972	0,495	0,534	ND			
4 RP11-104C4	16p11.2b	41,4370	0,630	ND	0,625	0,641		
5 RP11-1088B6	16p11.2b	41,4370	0,560	0,564	0,573	0,601	0,595	
6 RP11-37K19	16q23.2	42,8125	0,631	ND	ND			
7 RP11-81M17	16q24.2	52,2436	0,518	0,532	0,497	0,532		
8 RP11-830F9	16q24.3	54,1900	0,487	0,514	ND		0,492	0,593

3.3 - I CROMOSOMI HSA21 E HSA22

Una famiglia, venuta all'attenzione del laboratorio di Genetica, presenta diversi individui con un cariotipo composto da 45 cromosomi e fenotipo non patologico. Lo studio, mediante citogenetica classica, di tali cariotipi, effettuata presso il laboratorio di Citogenetica della dott.ssa Caruso (Ospedale V. Emanuele – Ferrarotto di Catania), ha dimostrato la presenza di un piccolo cromosoma metacentrico risultante dalla fusione tra un cromosoma 21 e un cromosoma 22. Un'analisi familiare del cariotipo ha mostrato che il cromosoma aberrante è stato trasmesso dalla madre, la quale presenta anch'essa tale cromosoma, ed è anche presente in due sorelle del caso analizzato.

Definizione del punto di fusione

Le sonde utilizzate sono state di due tipi: plasmidi contenenti sequenze alfoidi dei cromosomi 21 e 22 e BAC contenenti segmenti di DNA degli stessi cromosomi. Le sonde BAC utilizzate contengono DNA delle regioni telomeriche e delle regioni pericentromeriche del braccio lungo di entrambi i cromosomi (Fig. 52 e Tab. 9).

Tab. 9: Caratteristiche delle sonde BAC utilizzate.

BAC	band	start	end	size	band, GC%
1 RP11-345K23	21q11.2	16.368.352	16.556.943	188.592	38,0407
2 RP11-135B17	21q22.3	47.931.911	48.108.188	176.278	50,2671
3 RP11-112D4	22q11.21	18.202.100	18.385.443	183.343	49,6378
4 RP11-931F19	22q13.33	50.425.014	50.627.374	202.361	52,1002

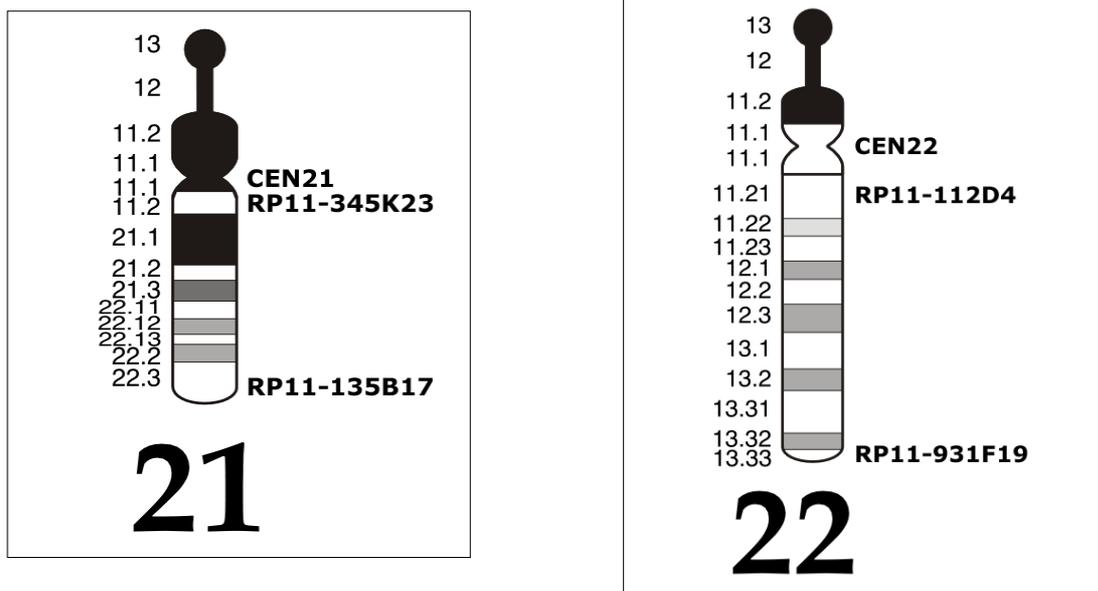


Fig. 52: Ideogramma dei cromosomi 21 e 22 in cui sono indicate le sonde utilizzate per caratterizzare il cromosoma derivativo der(21;22).

Le regioni centromeriche

Le sonde specifiche delle regioni centromeriche dei cromosomi 21 e 22 sono state fornite dal Prof. M. Rocchi (Università di Bari) e sono state:

- -pZ21A, che contiene sequenze di DNA alfa satellite specifiche delle regioni centromeriche dei cromosomi 21 e 13 (Fig. 53);
- -p190.22 che contiene una sequenza alfoide specifica del cromosoma 22 (Fig. 53). In condizione di bassa stringenza, tale sonda ibrida anche con il centromero del cromosoma 14.

Non è stato possibile utilizzare sonde specifiche dei centromeri dei soli cromosomi 21 e 22 in quanto i cromosomi 13 e 21, da una parte, e i cromosomi 14 e 22, dall'altra, presentano un'organizzazione del DNA centromerico estremamente simile, per cui non sono disponibili sonde più specifiche. In ogni caso, l'ibridazione nei cromosomi 13 e 14 non abbassa il livello di efficienza dell'analisi in quanto tali cromosomi sono più grandi del 21 e del 22 e facilmente distinguibili. Inoltre, il segnale d'ibridazione sul cromosoma traslocato è anch'esso facilmente identificabile in quanto tale cromosoma è submetacentrico (Fig. 54).

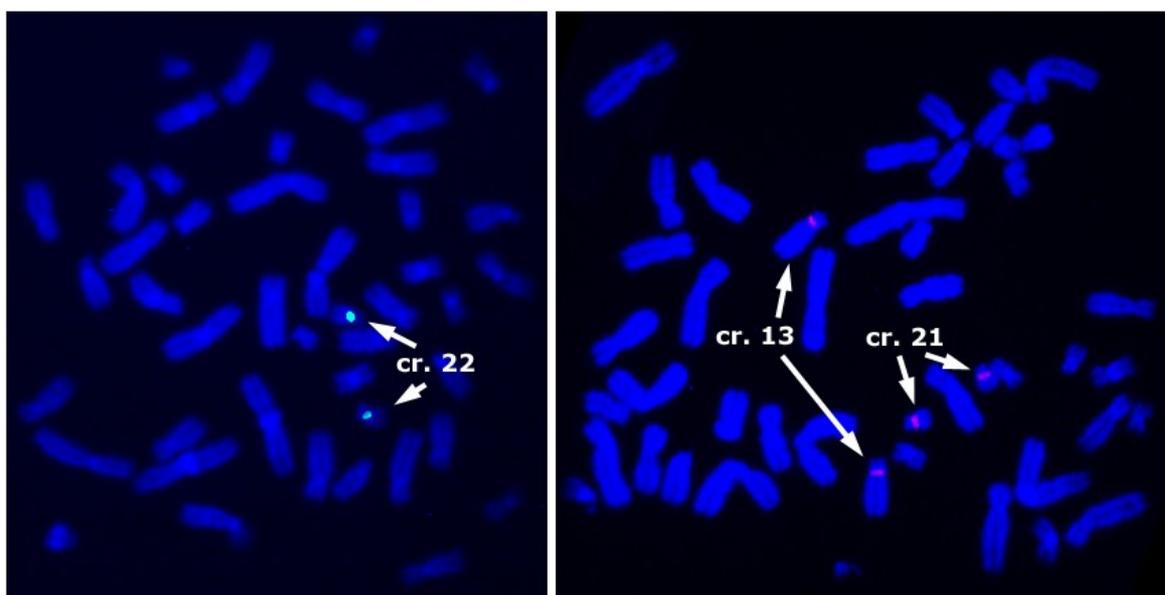


Fig. 53: Ibridazione in situ con le sonde pZ21A (mitosi a sinistra) e p190.22 (mitosi a destra) su cromosomi di individui con cariotipo normale.

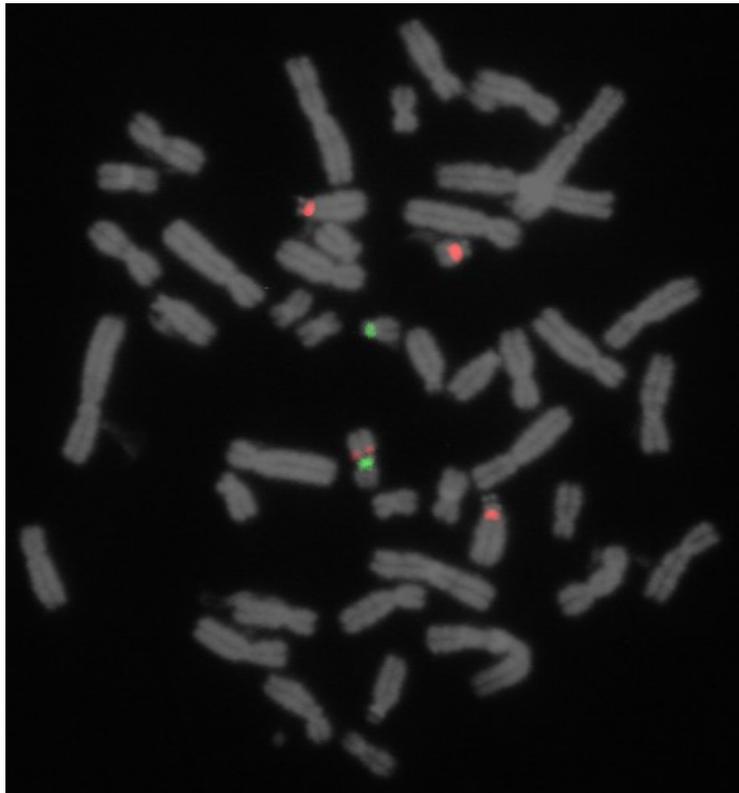


Fig. 54: Ibridazione *in situ* con le sonde specifiche dei centromeri dei cromosomi 21 (segnale di colore rosso) e 22 (segnale di colore verde) (v. Fig. 55) su metafasi 45,XX,der(21;22).

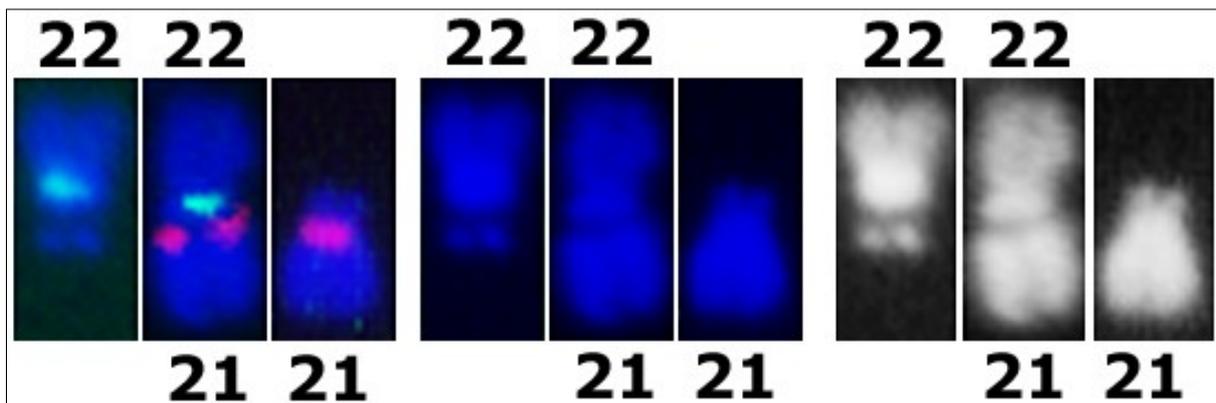


Fig. 55: Ibridazione *in situ* con le sonde specifiche dei centromeri dei cromosomi 21 (segnale di colore rosso) e 22 (segnale di colore verde) (v. Fig. 54) su metafasi 45XX,der(21;22). A sinistra è visibile la configurazione dei segnali d'ibridazione sia sui cromosomi normali che sul cromosoma traslocato. Si nota il segnale singolo sulla costrizione primaria che corrisponde al centromero del cromosoma 22. Al centro gli stessi cromosomi sono mostrati, senza i segnali d'ibridazione, con la sola colorazione DAPI. A destra i cromosomi sono mostrati in scala di grigio.

Le sonde pZ21A e p190.22 (Fig. 53) sono state ibridate nei cromosomi con la traslocazione tra il 21 e il 22 (Fig. 54). L'ibridazione ottenuta nei cromosomi 21 e 22 è anche riportata nella figura 55. Il risultato ottenuto indica che nel cromosoma ottenuto dalla fusione tra il 21 e 22 sono presenti le sequenze centromeriche di entrambi i cromosomi di origine e che la costrizione primaria di tale cromosoma mostra l'ibridazione della sonda p190.22 (il segnale di colore verde che risulta unico) indicando che il centromero attivo è quello del cromosoma 22, mentre quello del cromosoma 21 è inattivo, come dimostrato dalla presenza di due segnali d'ibridazione, uno per ciascun cromatide, e dall'assenza della relativa costrizione centromerica.

L'immagine dei cromosomi colorati con il DAPI (Fig. 55) mostra anche la presenza di una piccola regione poco colorata subito sopra il segnale della sonda pZ21A indicando, presumibilmente, che la fusione tra i due cromosomi sia avvenuta a livello degli stalk, cioè all'interno del cluster dei geni per l'rDNA (Fig. 56). Si può cioè ipotizzare che la regione poco colorata tra i due centromeri corrisponda al residuo delle due regioni NOR.

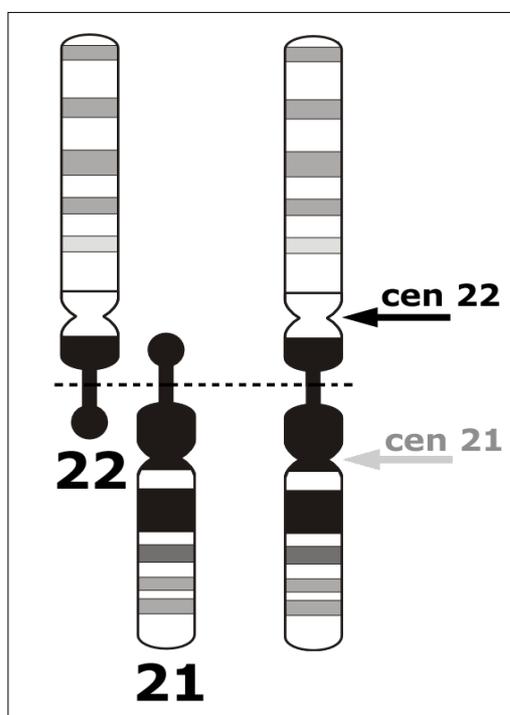


Fig. 56: Schema illustrante il possibile punto di fusione tra i cromosomi 21 e 22.

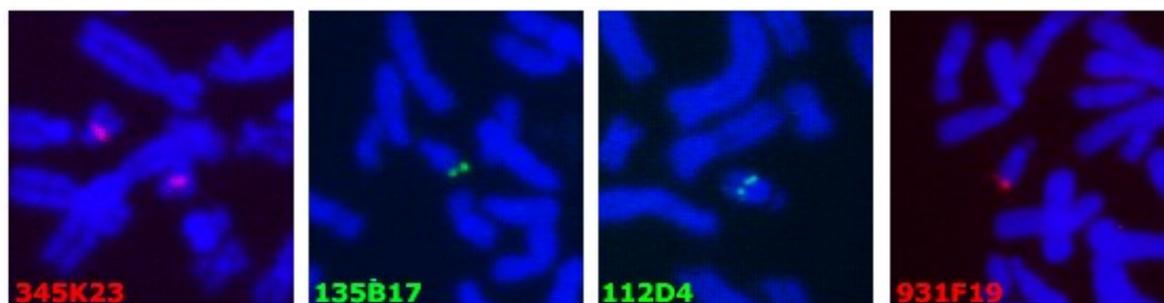


Fig. 57: Ibridazione *in situ* con le sonde BAC descritte nella Tab. 1. Le sonde RP11-345K23 e RP11-931F19 sono state rilevate con rodamina (segnali di colore rosso) mentre le sonde RP11-135B17 e RP11-112D4 con fluoresceina (segnali di colore verde).

Le regioni eucromatiche

Dopo avere definito che le sequenze alfoidi delle regioni centromeriche di entrambi i cromosomi di origine sono presenti, si sono analizzate le regioni eucromatiche del braccio lungo dei cromosomi 21 e 22, dove sono presenti quasi tutti i geni localizzati in tali cromosomi. Per tale analisi sono state utilizzate quattro sonde di tipo BAC (Tab. 9) contenenti DNA dei cromosomi 21 e 22. In particolare, per ciascun cromosoma sono state prese in considerazione due sonde: una molto vicina al centromero e l'altra molto vicina al telomero (Fig. 57). In tal modo è stata delimitata tutta o quasi tutta la regione eucromatica dei suddetti cromosomi.

La sonda RP11-345K23 è localizzata nella banda 21q11.2, la più prossimale rispetto al centromero e identifica una regione cromosomica con pochi geni.

La sonda RP11-135B17 è localizzata nella banda telomerica 21q22.3 e occupa una posizione estremamente distale, infatti contiene il gene PRNT2, il gene più telomerico del cromosoma 21.

La sonda RP11-112D4 è localizzata nella banda 22q11.21, la più prossimale rispetto al centromero. La regione cromosomica identificata da tale sonda è molto ricca in geni.

La sonda RP11-931F19 è localizzata nella banda 22q13.33, la più telomerica del cromosoma 22, e occupa la porzione distale di tale banda.

Analisi del cromosoma derivato

Tutte le sonde sono state utilizzate sia singolarmente sia mediante ibridazione dual-color. Una prima ibridazione è stata effettuata, come prassi, su cromosomi di individui normali per verificarne la localizzazione cromosomica nei *loci* attesi. La posizione osservata conferma quella attesa per tutte le sonde.

Le ibridazioni effettuate sulle metafasi con 45 cromosomi hanno confermato che il cromosoma derivato è stato ottenuto dalla fusione tra le regioni centromeriche dei cromosomi 21 e 22 e che entrambi i bracci lunghi dei due cromosomi sembrano essere presenti in tutta la loro interezza.

Infatti, le sonde localizzate nelle due regioni telomeriche si trovano, nel cromosoma derivato, in corrispondenza delle due estremità (Fig. 58). Anche le regioni pericentromeriche mostrano una localizzazione nel cromosoma derivato conforme alla fusione centromerica (Fig. 59).

Localizzazione radiale intranucleare

Le sonde descritte nella tabella 9 sono state localizzate nel nucleo interfase dei linfociti umani e i risultati hanno mostrato un elevato livello di conservazione della localizzazione intranucleare per tutti i *loci* analizzati, come dimostrato dai valori delle mediane ottenute per tutte le sonde (tab. 10). La sonda relativa al centromero del cromosoma 21 (che cross-ibrida con il centromero del cromosoma 13) non è stata analizzata.

E' comunque da rilevare che anche le sequenze centromeriche sono localizzate nelle parti più interne, in quanto in tali cromosomi i centromeri, a differenza di quelli dei cromosomi senza organizzatori nucleolari, occupano una posizione perinucleolare.

Tab. 10: Localizzazione intranucleare dei loci dei cromosomi 21 e 22

BAC	band	start	end	size	band, GC%	RNL (46,XX)	RNL (45,XX)	
1	RP11-345K23	21q11.2	16.368.352	16.556.943	188.592	38,0407	0,598	0,487
2	RP11-135B17	21q22.3	47.931.911	48.108.188	176.278	50,2671	0,622	0,520
3	RP11-112D4	22q11.21	18.202.100	18.385.443	183.343	49,6378	0,554	0,526
4	RP11-931F19	22q13.33	50.425.014	50.627.374	202.361	52,1002	0,562	0,584

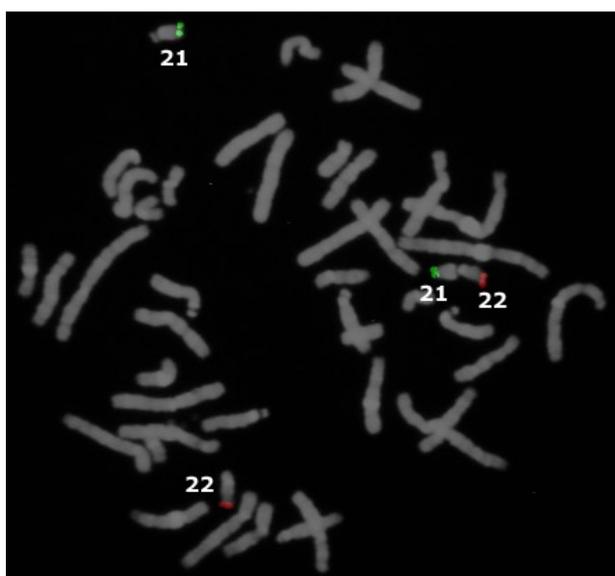


Fig. 58: Ibridazione *in situ* dual-color con le sonde telomeriche RP11-135B17 (segnale verde) e RP11-931F19 (segnale rosso). Al centro è visibile il cromosoma ottenuto dalla traslocazione tra i 21 e il 22 dove i due segnali d'ibridazione confermano la fusione centromero - centromero.

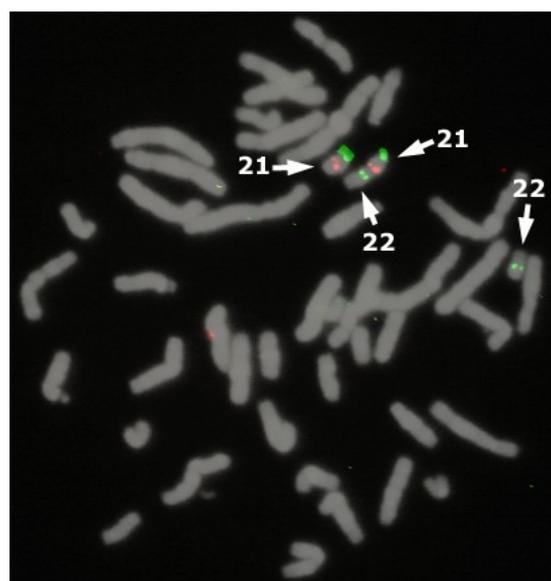


Fig. 59: Ibridazione *in situ* dual-color con le sonde del cromosoma 21 RP11-345K23 (segnale rosso) e RP11-135B17 (segnale verde) e del cromosoma 22 RP11-112D4 e (segnale verde). E' visibile il cromosoma ottenuto dalla fusione tra i cromosomi 21 e 22 in cui sono presenti i tre segnali d'ibridazione nell'ordine corretto in base alla fusione centromero - centromero tra i due cromosomi.

La traslocazione robertsoniana

L'analisi del cromosoma aberrante osservato nel cariotipo con 45 cromosomi ha dimostrato che esso è stato ottenuto da una fusione tra i cromosomi 21 e 22 riconducibile ad una cosiddetta traslocazione robertsoniana. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il cromosoma traslocato presenta entrambi i centromeri, ma solo uno dei due sembra essere quello attivo, cioè quello del cromosoma 22 originario. Inoltre, l'analisi della morfologia del cromosoma e dei segnali d'ibridazione ottenuti ha indicato che i punti di rottura dei due cromosomi sembrano essersi verificati a livello delle sequenze NOR presenti nei bracci corti dei cromosomi 21 e 22. Questo è un evento che si può ricondurre ad un fenomeno di crossing-over ineguale, cioè di una ricombinazione tra sequenze simili presenti in cromosomi non omologhi.

L'analisi delle regioni eucromatiche di tale cromosoma ha anche indicato che l'intero braccio lungo dei due cromosomi 21 e 22 è conservato, cioè sembra essere presente tutto il DNA cromosomico eucromatico senza, apparentemente, alcuna delezione. Ciò è in accordo con l'assenza di un fenotipo anormale dei portatori di tale cariotipo, indice di un cariotipo genotipicamente bilanciato ancorché portatore di una traslocazione cromosomica.

La localizzazione intranucleare delle sonde utilizzate ha chiaramente mostrato che il cromosoma derivativo conserva la posizione tipicamente molto interna dei due singoli cromosomi, indicando l'assenza di un qualunque fenomeno di riposizionamento intranucleare in linea con il fenotipo normale di tutti gli individui della famiglia portatori della traslocazione. In pratica, il suddetto cromosoma non determina alterazioni fisiologiche di alcun genere essendo anche trasmesso alla progenie con elevata frequenza.

3.4 - TRASLOCAZIONI X;AUTOSOMA

Nel laboratorio della dott.ssa Toniolo (DIBIT, Milano) sono state preparate linee cellulari linfoblastoidi da donne affette da POF. Tali linee cellulari sono state utilizzate, in passato, per identificare un possibile effetto posizione nell'insorgenza della POF (Cantarella, 2006) effetto che non è stato messo in evidenza. In particolare, sono stati analizzati i *loci* prossimali e distali rispetto ai breakpoints delle traslocazioni bilanciate identificate in tali linee cellulari (v. oltre). I dati di localizzazione intranucleare erano stati ottenuti con un sistema ancora in fase di messa a punto e i risultati ottenuti ne avevano, probabilmente, risentito. La localizzazione dei punti di rottura sul cromosoma X e sugli autosomi coinvolti nelle traslocazioni è stata nel presente lavoro revisionata utilizzando il sistema di localizzazione semiautomatica messo a punto successivamente in modo da potere valutare con maggiore accuratezza l'eventuale riposizionamento intranucleare dei *loci* coinvolti per effetto delle traslocazioni cromosomiche.

Le linee cellulari prese in considerazione sono state:

- linea cellulare LA1: presenta una traslocazione tra il cromosoma X e il cromosoma 1.
I punti di rottura sono localizzati nella banda Xq21 e 1p35.3. Il cariotipo in questione è così: 46,X,t(X;1)(q21;p35.3)
- linea cellulare LB106: presenta una traslocazione tra il cromosoma X e il cromosoma 2. Più precisamente i punti di rottura sono localizzati nella banda Xq21 e 2q14.2. Il cariotipo in questione è: 46,X,t(X;2)(q21;q14.2)
- linea cellulare CC: presenta una traslocazione tra il cromosoma X e il cromosoma 4, con i punti di rottura localizzati nella banda Xq21 e 4q32. Il cariotipo è quindi: 46,X,t(X;4)(q21;q32)

Come cellule di controllo sono stati utilizzati linfociti di individui normali.

Le sonde, utilizzate nei vari esperimenti di ibridazione *in situ* fluorescente corrispondono alle regioni distali e prossimali ai punti di breakpoints dei cromosomi coinvolti nelle traslocazioni, come descritto nella figura 60. Tutte le sonde prossimali ai breakpoints sono state marcate con biotina e rilevate mediante rodamina, mentre le sonde distali ai breakpoints sono state marcate con digoxigenina e rilevate mediante fluoresceina (v. Fig. 60 e 61).

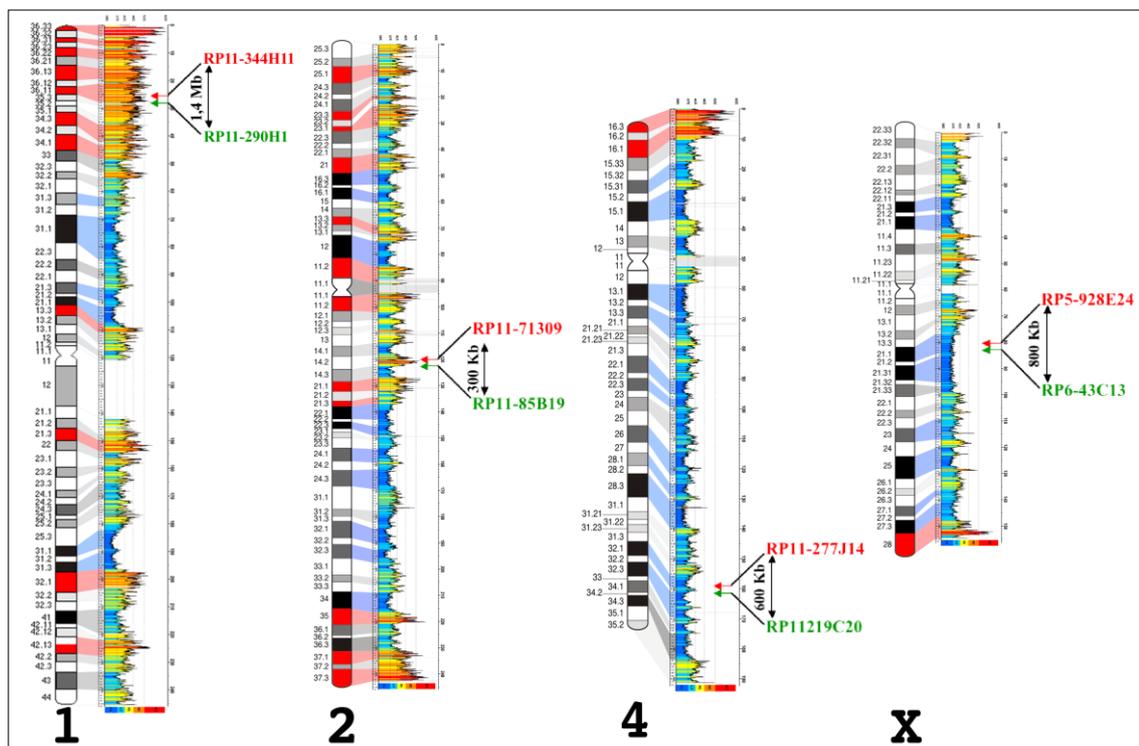


Fig. 60: Descrizione delle sonde utilizzate. A destra di ogni cromosoma sono indicate le sonde localizzate sui breakpoints dei cromosomi 1, 2, 4 e X.

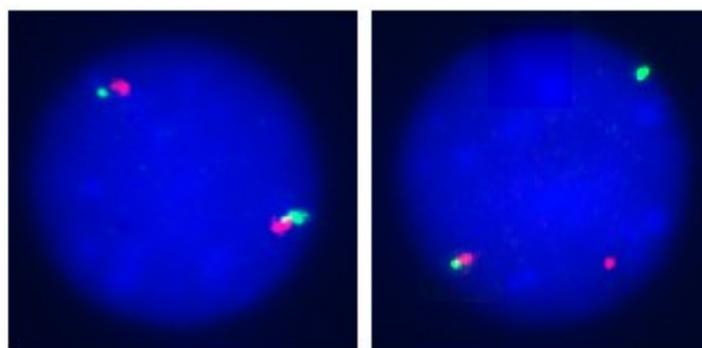


Fig. 61: Esempio di ibridazione *in situ* su nuclei interfaseici con una delle coppie di sonde descritte nella figura 60. L'ibridazione consente di identificare il cromosoma normale da quello con la traslocazione.

Localizzazione intranucleare dei loci traslocati

Le sonde sono state ibridate sia su nuclei interfasici di linfociti umani con cariotipo normale, sia su cellule con cariotipo che presenta le traslocazioni X;autosoma. I dati ottenuti sulle cellule normali hanno consentito di ottenere la localizzazione nucleare normale delle regioni interessate (Fig. 62).

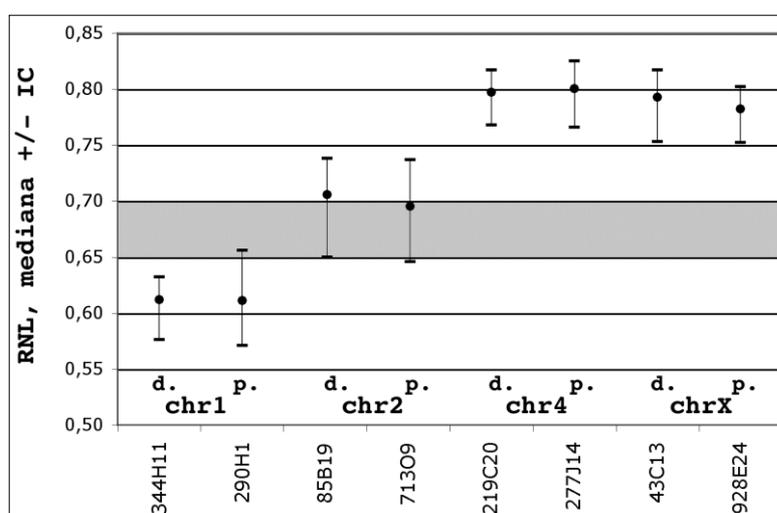


Fig. 62: Localizzazione nel nucleo dei loci coinvolti nelle traslocazioni X;autosoma. d: indica la sonda distale e p la sonda prossimale .

I risultati analizzabili sono stati quelli relativi alle cellule LB e CC ed hanno mostrato che:

- le sonde appartenenti alla banda Xq21 hanno valori di mediana di distribuzione dei segnali d'ibridazione sempre molto superiori a 0,70 sia negli individui di controllo che nei cromosomi X normali delle linee con la traslocazione. Quindi tale banda ha una localizzazione periferica.
- le sonde appartenenti alla banda 2q14.2 hanno valori della mediana di distribuzione dei segnali d'ibridazione prossimi a 0,70, un valore di confine tra la posizione periferica e la posizione intermedia.
- le sonde appartenenti alla banda 4q32 hanno valori di mediana di distribuzione dei segnali d'ibridazione molto superiori a 0,70, quindi tale banda ha una localizzazione periferica.

- le sonde appartenenti alla banda 1p35.3, negli individui di controllo, hanno valori medi di distribuzione dei segnali d'ibridazione intorno a 0,60 e quindi tale banda ha una localizzazione interna. Nelle cellule LA1 tale sonda non ha dato risultati leggibili.

I risultati hanno quindi mostrato che, in linfociti di donne normali, le bande Xq21 e 4q32 (due bande molto povere in GC) sono localizzate nella parte più periferica del nucleo, mentre la banda 2q14 (banda composizionalmente di tipo intermedio) in una posizione leggermente più interna. La differenza nella localizzazione nucleare di tali *loci* è statisticamente significativa. Nelle cellule linfoblastoidi CC la traslocazione t(4;X) non determina alterazione della localizzazione nucleare delle bande analizzate mentre, nelle cellule LB la traslocazione t(2;X) determina modificazione della posizione intranucleare della banda 2q14 sia quella presente sul frammento centrico sia quella traslocata sul cromosoma X che si posiziona più in periferia del normale (la differenza è statisticamente significativa) (Fig. 63).

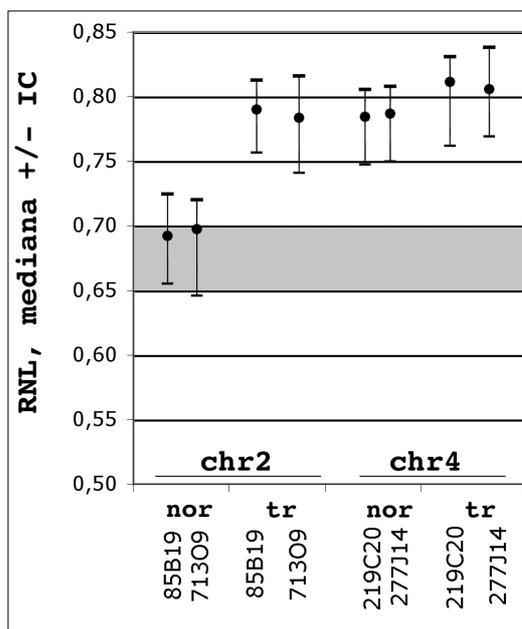


Fig. 63: Localizzazione nel nucleo dei loci dei cromosomi 2 e 4 coinvolti nella traslocazione X;autosoma. Sono messi a confronto i valori di mediana ottenuti da individui normali e con traslocazione.

Con i risultati ottenuti, si può concludere che le traslocazioni bilanciate che coinvolgono regioni con caratteristiche simili tra loro, come le bande 4q32 e Xq21, non determinano modificazioni del posizionamento nel nucleo, mentre le traslocazioni che coinvolgono bande con caratteristiche diverse, come nel caso delle bande 2q14 e Xq21 determinano, come in questo caso, un riposizionamento intranucleare; infatti, la banda 2q14 risulta più periferica sia nella parte prossimale centrica che nella parte distale traslocata sul cromosoma X.

3.5 – LE REGIONI PERICENTROMERICHE

I centromeri sono delle strutture che col passare del tempo, nei diversi cromosomi, possono cambiare di posizione mediante emergenza di un nuovo centromero e inattivazione del centromero ancestrale (fenomeno definito neo-centromerizzazione evolutiva). E' stato già osservato (Federico, 2009) che i neocentromeri possono formarsi in vari punti di un cromosoma, ma quelli che hanno la capacità di conservarsi durante l'evoluzione e quindi di fissarsi nella popolazione, sembrano essere quelli che si formano in regioni con basso contenuto in GC e bassa densità genica e che nel nucleo in interfase sono localizzati nella parte più periferica. Quindi, le regioni più propense a diventare centromeri con la capacità di conservarsi nel tempo sono quelle che dopo neocentromerizzazione non modificano l'organizzazione intranucleare.

Per studiare questo particolare aspetto della modificazione dell'organizzazione interna di un cromosoma, cioè la formazione di un centromero in una regione diversa rispetto al centromero pre-esistente, sono state prese in considerazione le regioni pericentromeriche dei cromosomi di *Macaca mulatta* clonate in BAC. Tali sonde sono state utilizzate per identificare i *loci* omologhi nei cromosomi di altri Primati e la relativa localizzazione intranucleare, in modo da potere mettere in evidenza l'esistenza o meno di una organizzazione comune.

L'analisi delle regioni pericentromeriche è stata condotta su sei specie di Primati. Oltre a *Macaca mulatta* (MMU) sono stati presi in considerazione i cromosomi e i nuclei di *Homo sapiens* (HSA), *Gorilla gorilla* (GGO), *Pan troglodytes* (PTR), *Pongo pygmeus* (PPY) e *Callithrix jacchus* (CJA). I nuclei e i cromosomi di MMU, GGO, PTR, PPY e CJA sono stati preparati a partire da linee cellulari linfoblastoidi mentre quelli umani a partire da sangue periferico. Le sonde BAC e le linee cellulari linfoblastoidi utilizzate sono state fornite dal Prof. M. Rocchi.

Descrizione delle sonde

Le sonde utilizzate sono BAC della libreria CH-250, costruite al Children's Hospital Oakland Research Institute dal Dr. Baoli Zhu a partire da DNA estratto da sangue periferico di un individuo maschio di *Macaca mulatta* (www.bacpac.chori.org). Per lo studio

condotto in questo lavoro sono stati analizzati cloni BAC che contengono DNA della regione pericentromerica dei cromosomi 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 17 e Y di *Macaca*, omologhi rispettivamente ai cromosomi 3, 7, 6, 15, 8, 12, 2q, 11, 9, 13 e Y umani (Fig. 64). Sono stati presi in considerazione questi cromosomi perché durante il corso dell'evoluzione i rispettivi cromosomi ancestrali hanno subito diversi riarrangiamenti tra cui la formazione di neocentromeri.

Le sonde BAC utilizzate sono state selezionate nel laboratorio del Dott. M. Ventura (Bari) tra quelle che possedevano una estremità di natura alfoide e l'altra estremità a sequenza unica, individuando quindi il limite tra l'eterocromatina centromerica e le sequenze a singola copia dei cromosomi di *Macaca*.



Fig. 64: Comparazione tra il cariotipo di *Macaca mulatta* e il cariotipo umano. A sinistra sono mostrati i cromosomi di MMU con bandeggio Q e a destra il carigramma umano del corrispondente cromosoma omologo (dati in accordo con Rogers et al. 2006).

Attraverso il database del Bioinformatics Reserch Laboratory of the Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA è stata ottenuta la localizzazione e la lunghezza delle sonde BAC nei cromosomi di macaca. La localizzazione è stata verificata direttamente nei cromosomi di macaca mediante ibridazione *in situ* e confrontata con i dati di ibridazione sui cromosomi umani. Nel database dell'UCSC è stato inoltre calcolato il numero di geni presenti nelle 2 Mb di DNA intorno alla sonda. I dati ottenuti sono sintetizzati nella tabella 11.

La posizione cromosomica in HSA e MMU delle sonde utilizzate

I dati della tabella mostrano che alcune sonde non hanno una singola localizzazione. Come accade per le sonde CH250-383A13 e CH250-516F15, che mostrano rispettivamente omologia per dieci e tre *loci* su cromosomi diversi, o per le sonde CH250-192J17 e CH250-

Tab. 11: Caratteristiche genomiche delle sonde CH250 *Macaca mulatta*

BAC	Genboree in MMU (rheMac2)	Start - End	n° geni in 2Mb
CH250-261B7	chr2	117.956.279-117.957.094	4
CH250-389P6	chr2	124.237.988-124.342.383	0
CH250-283K5	chr3	68.235.542-68.397.258	0
CH250-88I6	chr4	118.052.467-118.228.891	0
CH250-383A13	chr11	35.311.269-35.312.326	0
	chr13	116.085.026-116.085.263	2
	chr14	92.827.278-92.827.520	3
	chr14	48.416.576-48.416.817	0
	chr14	50.437.460-50.437.702	0
	chr17	17.353.435-17.353.677	1
	chr20	50,798,084-50,798,612	0
	chr5	92.186.703-92.186.945	6
	chr6	46,395,870-46,396,524	0
	chrX	61.330.605-61.331.682	0
CH250-221O5	chr7	62.008.262-62.192.568	0
CH250-147 E11	chr8	49.062.917-49.236.546	0
CH250-90O12	chr11	34.988.509-35.151.527	0
CH250-18F12	chr13	113.860.910-114.024.053	1
CH250-135A13	chr12	1.087.896-1.286.553	0
CH250-158H16	chr14	67.185.167-67.355.546	8
CH250-289F17	chr14	59.242.541-59.243.194	0
CH250-516F15	chr11	35.610.669-35.612.160	0
	chr3	59.711.453-59.712.197	0
	chr6	47.670.978-47.671.964	0
CH250-113M14	chr17	45.278.456-45.279.634	0
CH250-239H9	chr17	45.321.730-45.532.523	0
CH250-18A4	chr17	45.376.130-45.531.215	0
CH250-386E22	chr17	45.367.636-45.536.442	0
CH250-192J17	chr17	45.279.753-45.281.187	0
	chr17	45.282.126-45.282.889	0
	chr17	45.284.035-45.285.099	0
CH250-7 E7	chr11	35.566.954-35.567.684	0
	chr11	35.570.576-35.571.309	0

7E7, che mostrano localizzazione su un unico cromosoma ma con più di un tratto di omologia lungo la sequenza. In particolare la sonda CH250-192J17 trova omologia sul cromosoma 17 di macaca in tre diverse regioni lungo il cromosoma individuate dalla grandezza della sonda in bp, mentre la sonda CH250-7E7 trova omologia sul cromosoma 11 di macaca in due diverse regioni lungo il cromosoma individuate dalla grandezza della sonda in bp.

Successivamente è stata analizzata la banca dati Bioinformatics Reserch Laboratory of the Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA per definire la localizzazione dei singoli BAC nei cromosomi umani; quindi, utilizzando la banca dati UCSC è stata calcolata la percentuale in GC e il contenuto in geni della regione della sonda e della banda in cui è localizzata la stessa. Lo studio fatto è riassunto nella tabella 12.

Tab. 12: Contenuto in GC e in geni delle sonde BAC CH250 analizzate e delle relative bande in cui esse si localizzano nei cromosomi umani.

BAC	Genboree in HSA (hg16)	%GC della banda	%GC di 2Mb	n° geni in 2Mb	Start - End	%GC della regione della sonda	n° geni regione sonda
CH250-261B7							
CH250-389P6							
CH250-283K5							
CH250-88I6	6q24.3	37,76%	37,15%	5	145.671.137-145.671.870	40,59%	0
CH250-383A13	10p14	40,12%	36,46%	0	9.569.080-9.569.319	35,82%	0
	15q25.2	42,37%	42,52%	22	82.252.378-82.252.617	33,31%	1
	19q12	43,55%	40,31%	1	32.666.608-32.667.137	35,07%	0
	2q31.2	38,08%	38,46%	16	179.119.877-179.120.119	34,14%	1
	3p11.1	35,51%	35,73%	1	90.261.914-90.262.425	35,57%	0
	5q13.3	40,11%	39,29%	13	75.078.708-75.078.950	35,06%	1
CH250-221O5							
CH250-147 E11	10q11.1	37,10%	40,72%	5	41.789.212-41.792.347	36,48%	0
CH250-90O12	12q12	37,16%	36,86%	6	37.749.683-37.750.533	34,07%	0
CH250-18F12	2q22.1	36,00%	37,07%	5	139.026.199-139.152.815	37,29%	0
CH250-135A13	2q22.1	36,00%	37,34%	4	138.813.467-138.814.299	30,56%	0
CH250-158H16	11p15.4	42,00%	39,79%	79	5.784.507-5.784.999	31,58%	0
CH250-289F17							
CH250-516F15	11p11.12	37,09%	37,55%	8	50.638.259-50.639.587	36,41%	0
CH250-113M14	11p11.12	37,09%	37,66%	8	50.679.229-50.680.125	35,04%	0
CH250-239H9							
CH250-18A4	14q31.1	37,58%	38,11%	8	79.038.938-79.270.875	35,70%	1
CH250-386E22	13q21.32	34,48%	34,32%	1	63.968.063-63.969.336	30,35%	0
CH250-192J17	13q21.32	34,48%	34,22%	1	63.741.258-63.742.051	40,63%	0
CH250-7 E7	Yq11.221	38,25%	38,57%	15	19.101.379-19.102.013	35,05%	0

Dalla tabella è possibile osservare che nel database utilizzato per identificare la localizzazione delle sonde prese in considerazione sui cromosomi umani non sono presenti i dati riguardanti tutte le sonde o le stesse non mostrano localizzazione univoca. Infatti, per le sonde CH250-261B7, CH250-389P6, CH250-283K5, CH250-221O5, CH250-289F17 e CH250-239H9 non è stata individuata omologia per alcun cromosoma umano, mentre la sonda CH250-383A13 mostra omologia per sei diversi cromosomi.

Mediante FISH su cromosomi umani e di macaca, le sonde selezionate sono state localizzate sui cromosomi di *Macaca mulatta* e sui cromosomi umani; i risultati ottenuti sono sintetizzati nella tabella 13.

Tab. 13: Localizzazione delle sonde BAC CH250 mediante FISH nei cromosomi di HSA (*Homo sapiens*) e MMU (*Macaca*)

BAC	Localizzazione cromosomica	
	in MMU	in HSA
CH250-261B7	2qcen	3q26
CH250-389P6	2qcen	no signal
CH250-283K5	3qcen	no signal
CH250-88I6	4qcen	6q24
CH250-383A13	4qcen	6q24
CH250-221O5	7pcen+7qcen	no signal
CH250-147E11	8qcen	8q12
CH250-90O12	11p+11qw	12q
CH250-18F12	12pcen+12qcen	2q22
CH250-135A13	12pcen+12qcen	2q22
CH250-158H16	14pcen	11p15.4
CH250-289F17	14pcen	11p15.4
CH250-516F15	15pcen	no signal
CH250-113M14	17qcen	13q21
CH250-236H9	17qcen	13q21
CH250-18A4	17qcen	13q21
CH250-386E22	17pcen+17qcen	13q21
CH250-192J17	17qcen	13q21
CH250-7E7	Ycen	Yq

Dal momento che le sonde contengono DNA di *Macaca mulatta*, per le FISH eterologhe sono state usate condizioni di stringenza più basse al fine di consentire l'ibridazione anche con tratti del genoma non perfettamente omologhi.

I dati qui presentati sono in accordo con quanto descritto in letteratura (Rogers et al. 2006) sull'omologia tra i cromosomi umani e quelli di macaca (Fig. 64).

Mettendo a confronto la tabella 11, che mostra la localizzazione delle sonde nel genoma di *Macaca mulatta*, la tabella 12, che mostra la localizzazione delle sonde nel genoma umano, e la tabella 13, che mostra i dati ottenuti dal mio lavoro mediante esperimenti FISH sui cromosomi di *Macaca mulatta* e di uomo, ci si rende conto che i dati ottenuti dal database Bioinformatics Reserch Laboratory of the Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA non sempre sono in accordo con quanto osservato sperimentalmente. Infatti, la sonda CH250-261B7, che secondo il database non ha omologia nel genoma umano, sperimentalmente è stato visto che è omologa alla regione 3q26; la sonda CH250-383A13, che secondo il database non mostra localizzazione univoca sia nell'uomo che in macaca, sperimentalmente si localizza in macaca nella regione 4qcen e nell'uomo nella regione 6q24; la sonda CH250-147E11 mostra, sperimentalmente, localizzazione nella regione 8qcen nel cromosoma di macaca e nella regione 8q12 nel cromosoma umano mentre secondo il database trova omologia nell'uomo nel cromosoma 10q11.1; la sonda CH250-18F12 si localizza sperimentalmente nel cromosoma 12 di macaca splittandosi da entrambi i lati del centromero mentre secondo il database essa si localizza sul cromosoma 13; la sonda CH250-516F15 che secondo quanto visto sperimentalmente si localizza nel cromosoma 15 di macaca a livello del centromero e nell'uomo non trova omologia, nel database non riscontra localizzazione univoca nè sui cromosomi di macaca, nè su quelli umani; la sonda CH250-289F17 che secondo il database non trova omologia nel genoma umano, ibrida con la regione 11p15.4; la sonda CH250-113M14 secondo il database trova omologia nel genoma umano nel cromosoma 11p11.12, mentre è stato visto sperimentalmente che è omologa alla regione 13q21; la sonda CH250-239H9 che nel database non trova omologia con nessun *locus* nel genoma umano, mediante ibridazione è stato visto che trova localizzazione nella banda q21 del cromosoma 13; la sonda CH250-18A4 che sperimentalmente si localizza sul cromosoma umano 13 nella banda q21 secondo il database utilizzato per la localizzazione si trova sul cromosoma 14 a livello della banda q31.1; la sonda CH250-7E7, che sperimentalmente si localizza a livello del centromero del

cromosoma Y, nel database trova localizzazione in due *loci* diversi del cromosoma 11 di macaca.

Localizzazione delle sonde BAC di macaca nei cromosomi di altri

Primati

Dopo aver identificato sia il cromosoma di macaca in cui le sonde sono localizzate, sia la posizione della sonda lungo il cromosoma umano omologo mediante gli esperimenti di ibridazione *in situ* sopra citati, le sonde BAC di macaca sono state utilizzate in esperimenti FISH su cromosomi e nuclei in interfase di linee cellulari linfoblastoidi di *Gorilla gorilla* (GGO), *Pan troglodytes* (PTR), *Pongo pygmeus* (PPY) e *Callithrix jacchus* (CJA). Sono stati analizzati i cromosomi per poter osservare la specificità di ibridazione della sonda e quindi individuarne i *loci* omologhi, mentre i nuclei in interfase sono stati analizzati per poter stabilire se durante l'evoluzione i *loci*, che in macaca rappresentano regioni pericentromeriche e nelle altre specie si trovano nelle regioni eucromatiche dei cromosomi, mantengono la medesima localizzazione all'interno del nucleo.

L'ibridazione con le sonde CH250-18F12 e CH250-135A13 ci ha permesso di localizzare la regione pericentromerica del cromosoma 12 di macaca, rappresentata dalla sonda che si splitta ai due lati del centromero, nei cromosomi omologhi di HSA, GGO e PTR. Le sonde ibridano nel cromosoma umano 2 nella banda 2q22, una banda molto povera in GC in quanto formata da isocore L1 (Fig. 65).

In PTR e in GGO le sonde si localizzano quasi sotto il centromero nel braccio lungo dei cromosomi omologhi al cromosoma umano 2q che sono rispettivamente PTR13 e GGO11.

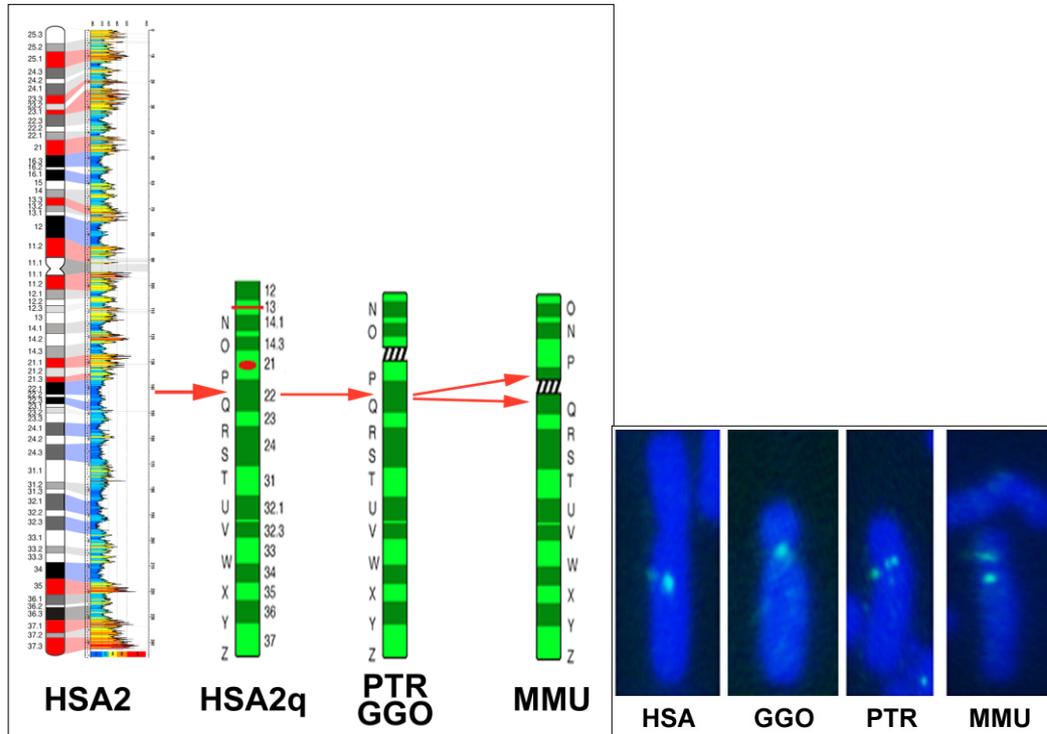


Fig. 65. A sinistra: ideogramma del cromosoma HSA2 e degli omologi in PTR, GGO e MMU. A destra: Ibridazione *in situ* con le sonde pericentromeriche di macaca nei cromosomi delle quattro specie indicate. Accanto all'ideogramma del cromosoma umano è indicato il profilo del livello di GC del cromosoma dove si può rilevare che la regione di omologia con la regione pericentromerica di macaca corrisponde alla banda 2q22 che è molto povera in GC, essendo formata da isocore della famiglia L1.

Ibridando le sonde CH250-389P6 e CH250-261B7 abbiamo individuato la regione pericentromerica del cromosoma 3 di macaca nei cromosomi di HSA, PPY e CJA. In particolare la sonda CH250-389P6 non ha mostrato omologia nelle altre specie considerate, quindi per localizzare la regione pericentromerica nei cromosomi delle tre specie è stata utilizzata la sonda CH250-261B7. Essa ibrida nel cromosoma umano 3 nella banda 3q26, una banda molto povera in GC in quanto formata da isocore L1 (Fig. 66). Dalla letteratura è noto che questa banda è coinvolta nella formazione di neocentromeri nell'uomo. La formazione del neocentromero è la conseguenza di un riarrangiamento che ha portato alla formazione di un cromosoma acentrico che per potersi trasmettere alla progenie ha organizzato un centromero; questa condizione fa supporre che questa regione abbia mantenuto durante l'evoluzione caratteristiche di centromero latente (Ventura et al., 2004).

Nel cromosoma di PPY la sonda si localizza nella regione terminale del braccio q del cromosoma submetacentrico 2 omologo al cromosoma umano 3, mentre in CJA il cromosoma 3 si divide in due cromosomi acrocentrici, i cromosomi 15 e 17, e la sonda si localizza a circa metà del braccio lungo del cromosoma 17.

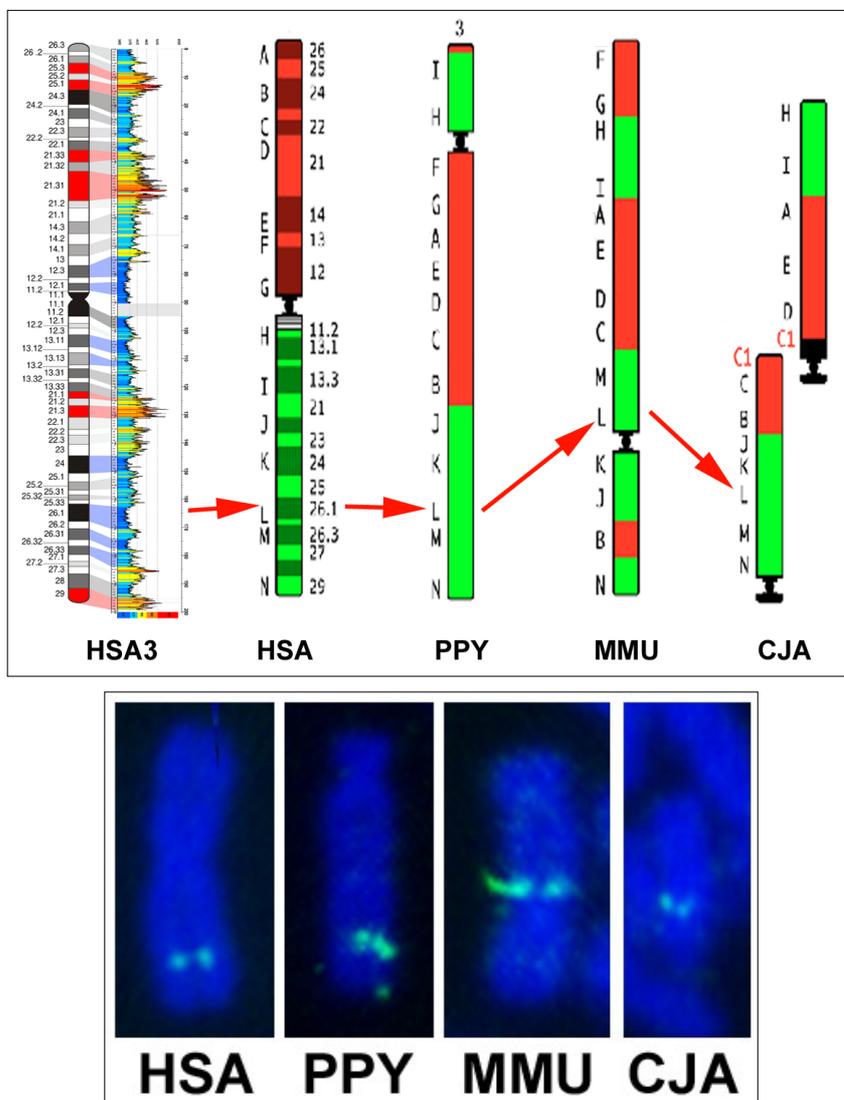


Fig. 66. In alto: ideogramma del cromosoma HSA3 e degli omologhi in PPY, MMU e CJA. In basso: ibridazione *in situ* con le sonde pericentromeriche di macaca nei cromosomi delle specie indicate. Accanto all'ideogramma del cromosoma umano è indicato il profilo del livello di GC del cromosoma dove si può rilevare che la regione di omologia con la regione pericentromerica di macaca corrisponde alla banda 3q26 che è molto povera in GC, essendo formata da isocore della famiglia L1.

L'ibridazione con le sonde CH250-88I6 e CH250-383A13 consente di localizzare la regione pericentromerica del cromosoma 4 di macaca nel cromosoma 6 umano a livello della banda 6q24, questa è una banda molto povera in GC formata da isocore L1 (Fig. 67). Questa regione era stata precedentemente studiata con la sonda RP11-474A9 (contente DNA umano). Essa individua esattamente il centromero di MMU4, infatti la sonda appare splittata ai due lati del centromero (Ventura et al., 2007).

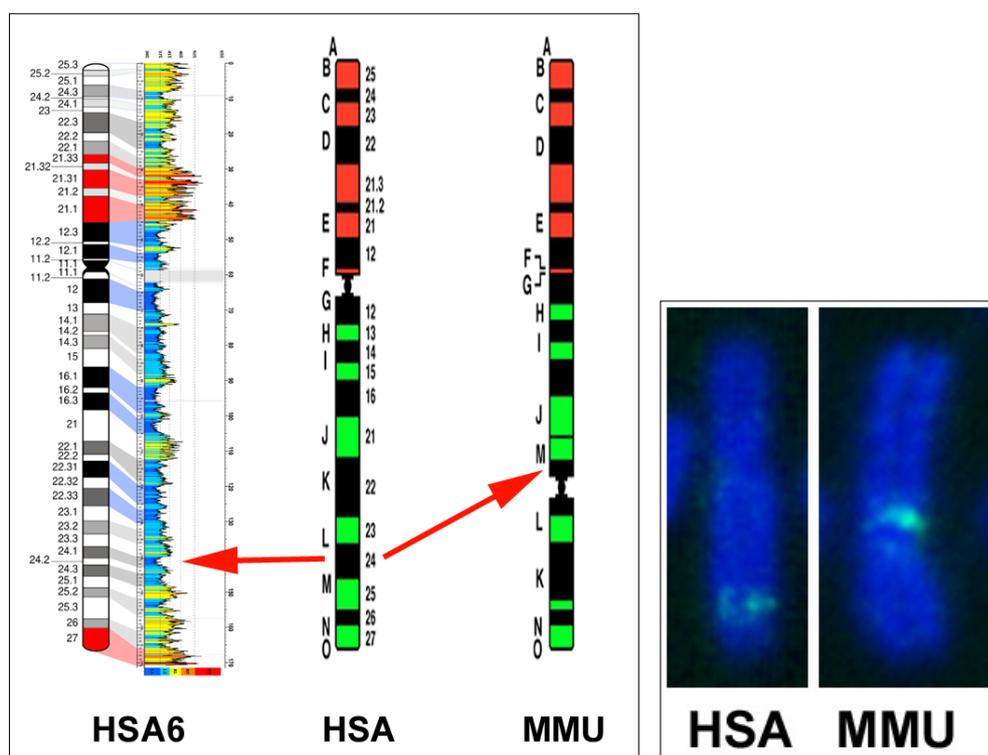


Fig. 67: A sinistra: ideogramma del cromosoma HSA6 e del cromosoma omologo in MMU. A destra: Ibridazione *in situ* con le sonde pericentromeriche di macaca nei cromosomi umani. Accanto all'ideogramma del cromosoma umano è indicato il profilo del livello di GC del cromosoma dove si può rilevare che la regione di omologia con la regione pericentromerica di macaca corrisponde alla banda 6q24 che è molto povera in GC, essendo formata da isocore della famiglia L1.

L'ibridazione con la sonda CH250-147E11 consente di localizzare la regione pericentromerica del cromosoma 8 di macaca nel cromosoma umano 8 a livello della banda 8q12; questa banda è molto povera in GC essendo formata da isocore L1 e L2 (Fig. 68). I due cromosomi omologhi mostrano organizzazione simile, con medesima posizione del centromero, a testimonianza del fatto che durante l'evoluzione i due cromosomi non hanno subito significativi riarrangiamenti.

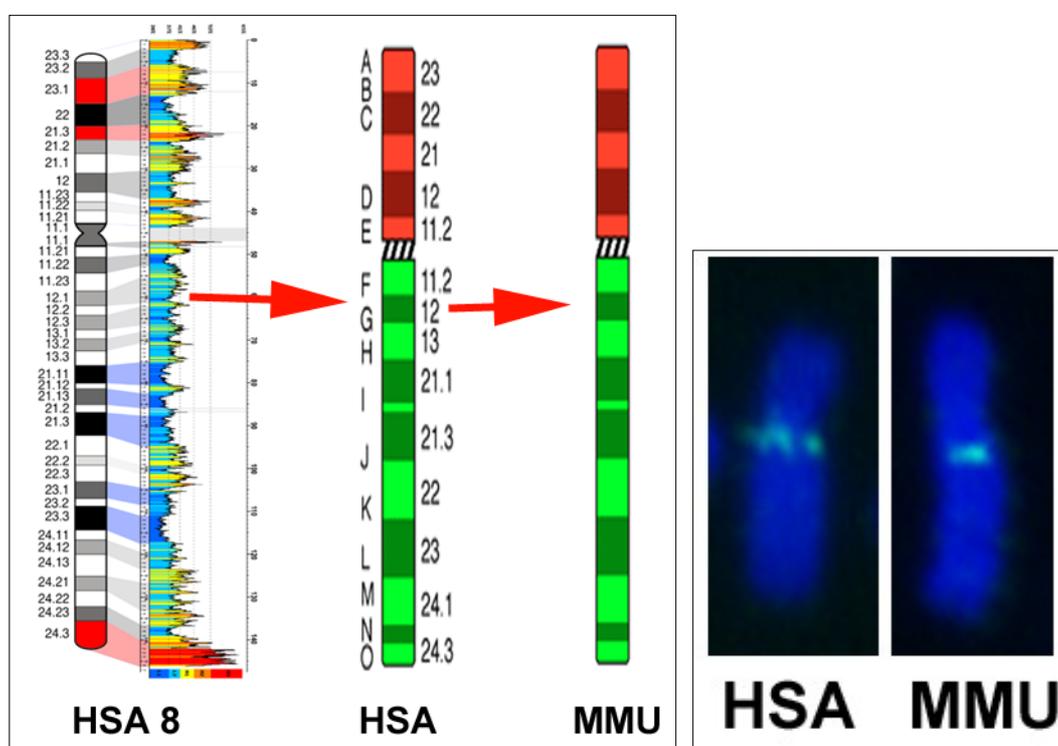


Fig. 68: A sinistra: ideogramma del cromosoma HSA8 e del cromosoma omologo in MMU. A destra: Ibridazione *in situ* con le sonde pericentromeriche di macaca nei cromosomi umani. Accanto all'ideogramma del cromosoma umano è indicato il profilo del livello di GC del cromosoma dove si può rilevare che la regione di omologia con la regione pericentromerica di macaca corrisponde alla banda 8q12 che è povera in GC, essendo formata da isocore della famiglia L1 ed L2.

L'ibridazione con le sonde CH250-158H16 e CH250-289F17 consente di localizzare la regione pericentromerica del cromosoma 14 di macaca nei cromosomi di HSA, PPY e CJA. In particolare le due sonde ibridano a livello della banda 11p15.4 del cromosoma umano 11, una banda povera in GC costituita da isocore L2. Questa banda si localizza subito sotto ad una banda H3⁺, molto ricca in GC.

Nel cromosoma 8 di PPY la sonda si localizza sotto il centromero nel braccio q, mentre nel cromosoma 11 di CJA si localizza circa a metà del braccio q (Fig. 69).

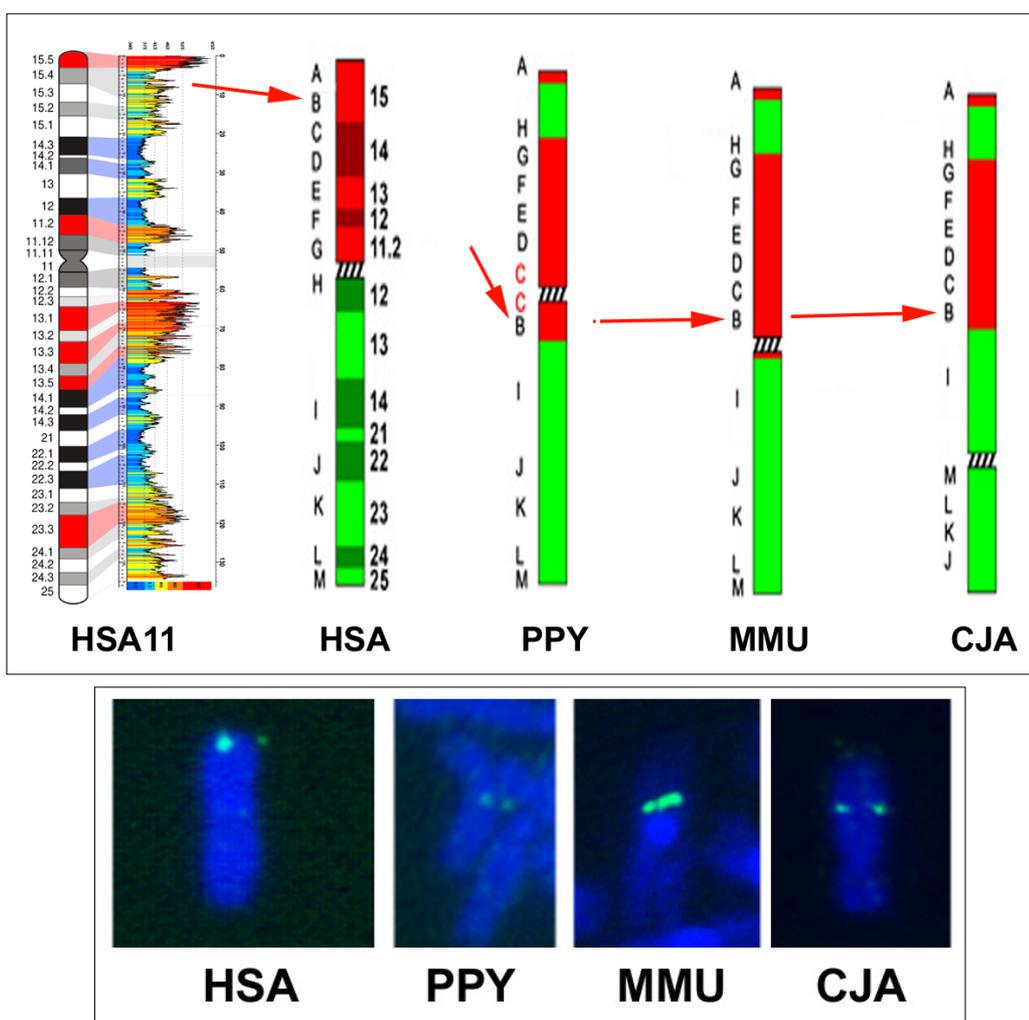


Fig. 69: In alto: ideogramma del cromosoma HSA11 e degli omologi in PPY, MMU e CJA. In basso: ibridazione *in situ* con le sonde pericentromeriche di macaca nei cromosomi delle specie indicate. Accanto all'ideogramma del cromosoma umano è indicato il profilo del livello di GC del cromosoma dove si può rilevare che la regione di omologia con la regione pericentromerica di macaca corrisponde alla banda 11p15.4 che è povera in GC, essendo prevalentemente formata da isocore della famiglia L2.

L'ibridazione con le sonde CH250-113M14, CH250-239H9, CH250-18A4, CH250-386E22 e CH250-192J17 consente di localizzare la regione pericentromerica del cromosoma 17 di macaca nei cromosomi di HSA e PPY.

La CH250-389P22 mostra, nei cromosomi di macaca, localizzazione ai due lati del centromero individuandone esattamente la posizione, mentre le altre ibridano nella regione 17qcen.

Nell'uomo le sonde ibridano nella banda 13q21 del cromosoma 13, una banda molto povera in GC in quanto formata da isocore L1. Le sonde nel cromosoma 14 di PPY mostrano localizzazione omologa a quella riscontrata nell'uomo (Fig. 70).

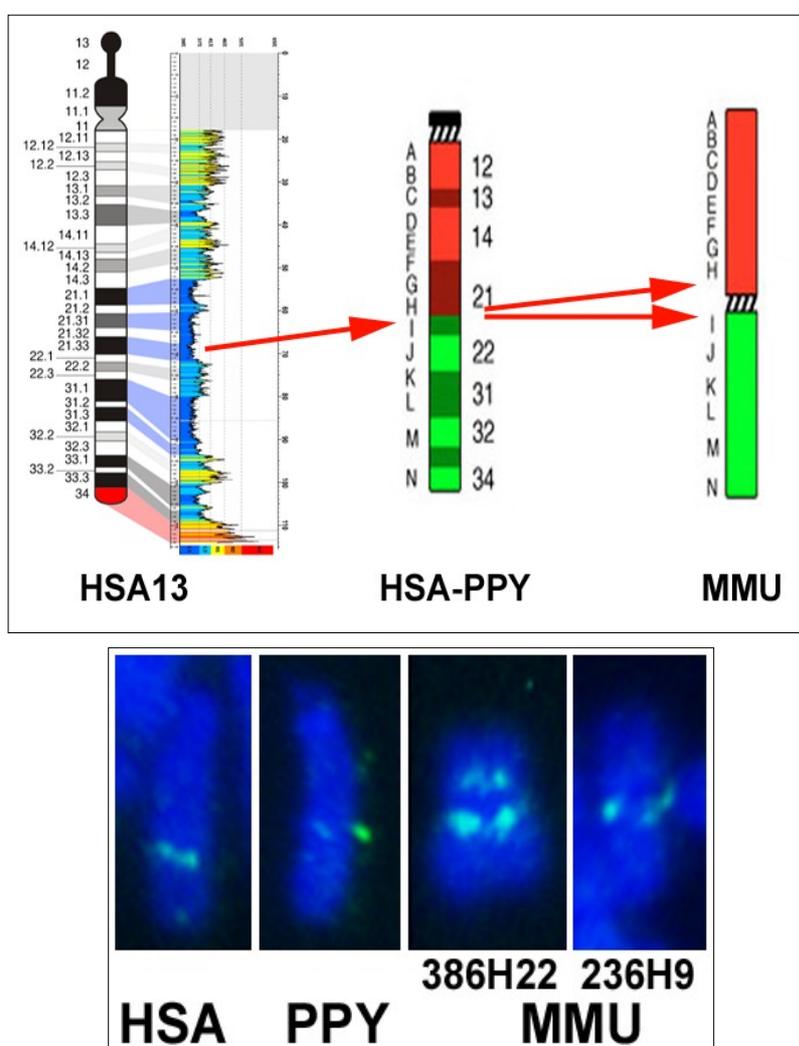


Fig. 70. In alto: ideogramma del cromosoma HSA13 e degli omologi in PPY, MMU. In basso: ibridazione *in situ* con le sonde pericentromeriche di macaca nei cromosomi delle specie indicate. Accanto all'ideogramma del cromosoma umano è indicato il profilo del livello di GC del cromosoma dove si può rilevare che la regione di omologia con la regione pericentromerica di macaca corrisponde alla banda 13q21 che è molto povera in GC, essendo formata da isocore della famiglia L1.

Localizzazione intranuclare delle regioni pericentromeriche di MMU nei Primati

Dovendo localizzare i *loci* con un'ibridazione *in situ* bidimensionale è necessario analizzare un elevato numero di nuclei in interfase ibridati, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi"; i risultati ottenuti in merito alla localizzazione radiale nucleare delle sonde BAC CH250 analizzate nelle sei specie di Primati sono riportati nella tabella 14.

Tab. 14: Localizzazione nucleare radiale delle sonde BAC CH250 nei nuclei interfascici di: MMU, HSA, PTR, PPY, GGO e CJA.

BAC	banda in MMU	Localizzazione Nucleare Radiale (mediana)					
		HSA	MMU	PPY	PTR	GGO	CJA
CH250-261B7	2pcen	0,779	0,720	0,772			0,672
CH250-389P6	2qcen		0,683				
CH250-283K5	3qcen		0,589				
CH250-88I6	4pcen+4qcen	0,786	0,734				
CH250-383A13	4pcen+4qcen	0,791	0,622				
CH250-221O5	7p+7q		0,637				
CH250-147E11	8qcen	0,732	0,724				
CH250-90O12	11p+11qw	0,734					
CH250-18F12	12p+12q	0,762	0,732		0,732		
CH250-135A13	12p+12q	0,777	0,674			0,711	
CH250-158H16	14qcen	0,730	0,765				
CH250-289F17	14pcen	0,658	0,620	0,625			0,700
CH250-516F15	15pcen		0,538				
CH250-113M14	17p+17q	0,731	0,752	0,779			
CH250-236H9	17p+17q	0,796	0,789	0,725			
CH250-18A4	17p+17q	0,767	0,793	0,754			
CH250-386E22	17pw+17q	0,774	0,753	0,699			
CH250-192J17	17pcen+17qcen	0,754	0,757				
CH250-7E7	Ycen	0,773	0,650				

Dall'analisi dei nuclei ibridati è emerso che le sonde BAC nelle sei specie di Primati analizzate, pur localizzandosi lungo il cromosoma in posizioni diverse, nel nucleo mostrano localizzazioni molto simili, e in particolare nella parte più periferia del nucleo, indicando che il *locus* individuato dalla sonda mantiene durante l'evoluzione le medesime caratteristiche posizionali intranucleari. Questa localizzazione è in accordo con quanto

presente in letteratura sulla localizzazione intranucleare delle regioni eterocromatiche. Infatti, tali regioni, povere in GC e in geni, si localizzano preferenzialmente nelle regioni periferiche del nucleo interfaseico.

4. Conclusioni

È noto che i cromosomi, nel nucleo interfascico, si organizzano in domini distinti in grado di interagire tra loro per regolare l'attività trascrizionale. Tale interazione può a volte determinare riarrangiamenti, come le traslocazioni, tra regioni cromosomiche frequentemente contigue nel nucleo interfascico.

È inoltre accertato che singoli cromosomi nel nucleo si organizzano secondo una polarità composizionale: le regioni povere in GC e in geni verso la periferia del nucleo, mentre le regioni ricche in GC e in geni verso la parte più interna, come è stato ad esempio dimostrato per il cromosoma 7 umano. Questa organizzazione dei cromosomi indica che la periferia del nucleo è caratterizzata da cromatina compatta e poco trascritta, mentre la regione più interna è caratterizzata da cromatina aperta e attivamente trascritta. Riarrangiamenti cromosomici di geni nel nucleo possono essere causa di un'alterata espressione genica e determinare l'insorgenza di patologie di vario tipo. Uno studio condotto sulla *t(7;12)* riscontrata in un terzo dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta ha messo in evidenza che l'alterata espressione del gene *HLXB9* è dovuta ad una sua alterata posizione intranucleare.

Nello studio eseguito nella presente tesi sono stati presi in considerazione un certo numero di riarrangiamenti cromosomici, alcuni dei quali conseguenza di eventi improvvisi osservati in individui della specie umana e altri invece conseguenti a processi più estesi nel tempo osservabili come trasformazioni evolutive di alcuni cromosomi dei Primati. Tra questi riarrangiamenti sono stati anche inclusi casi di neocentromerizzazione evolutiva, cioè eventi che hanno portato, in alcune linee evolutive, alla formazione di nuovi centromeri. Il lavoro descritto ha avuto come obiettivo principale la valutazione dell'effetto che i riarrangiamenti cromosomici hanno nell'alterazione o nella conservazione della cromatina all'interno del nucleo, in modo da potere definire un possibile "effetto posizione" sulla base delle caratteristiche genomiche dei *loci* interessati dal riarrangiamento.

I riarrangiamenti analizzati hanno indicato che quando le traslocazioni comportano riarrangiamenti tra regioni composizionalmente differenti (vedi il caso della traslocazione

tra il cromosoma X e il cromosoma 2) si assiste ad un riposizionamento intranucleare dei *loci* coinvolti, come avvenuto nel caso citato sopra relativo alla traslocazione tra i cromosomi 7 e 12. Invece, quando i riarrangiamenti avvengono tra regioni composizionalmente simili tra di loro (vedi le inversioni nei cromosomi HSA9 e HSA16 e le traslocazioni tra il cromosoma X e il cromosoma 4) non si osserva riposizionamento, delle regioni coinvolte, nel nucleo. Anche la traslocazione robertsoniana tra i cromosomi HSA21 e HSA22 rientra in tale casistica: i due cromosomi occupano la medesima posizione intranucleare sia come cromosomi autonomi sia come cromosomi fisicamente uniti. In questi casi, non essendo presumibilmente alterata la funzionalità dei geni coinvolti, le mutazioni cromosomiche con le caratteristiche suddette possono essere trasmesse alla progenie senza alcuna apparente conseguenza nella fitness della popolazione e quindi, con il trascorrere del tempo, può aumentare il numero di individui portatori del riarrangiamento e, possibilmente, esso può fissarsi nella popolazione. Il caso della traslocazione robertsoniana presente in diversi componenti della medesima famiglia è indicativo di tale fenomeno.

La comparazione della posizione intranucleare dei *loci* dei cromosomi HSA9 e HSA16 in diverse specie di Primati ha messo in evidenza che nel corso dell'evoluzione le diverse regioni cromosomiche analizzate hanno mantenuto le loro caratteristiche posizionali intranucleari. Infatti, i diversi *loci*, pur trovandosi in localizzazioni cromosomiche diverse rispetto all'omologo umano, mantengono nel nucleo la medesima localizzazione.

Anche l'analisi delle regioni pericentromeriche di *Macaca mulatta* ha messo in evidenza che le regioni cromosomiche capaci di formare neocentromeri con elevato successo evolutivo, cioè con elevata probabilità di mantenersi stabili e poi di fissarsi nella popolazione, sono regioni con caratteristiche composizionali e posizionali (intranucleari) simili ai centromeri canonici. Quindi, una regione che organizza un neocentromero evolutivo è una regione con basso livello di GC, con una posizione intranucleare estremamente periferica e con un numero di geni molto basso o assente. Cioè, il nuovo centromero non comporta scompensi rilevanti nella funzionalità della regione cromosomica interessata.

Durante l'evoluzione, quindi, un dato *locus* cromosomico può andare incontro a diversi tipi di eventi mutazionali. Molti di tali eventi sono in genere dannosi per l'individuo in cui avvengono e vengono quindi subito eliminati dalla selezione naturale. In tale

categoria possono essere inseriti i riarrangiamenti cromosomici tra regioni composizionalmente differenti e che determinano riposizionamento intranucleare dei *loci* coinvolti. Gli eventi che invece possono avere un successo evolutivo sono quelli che alterano poco o non alterano affatto la funzionalità del genoma e tra questi possono essere inseriti i riarrangiamenti tra regioni cromosomiche composizionalmente simili tra loro e che non alterano la posizione intranucleare dei *loci* coinvolti. Questo è verificabile dall'elevato livello di conservazione della posizione intranucleare dei *loci* presi in considerazione nella presente tesi.

5. Bibliografia

- Ahmed S., Brickner D.G., Light W.H., Cajigas I., McDonough M., Froysheter A.B., Volpe T., Brickner J.H. 2010: DNA zip codes control an ancient mechanism for gene targeting to the nuclear periphery. *Nat. Cell. Biol.* 12: 111–118.
- Aota S., Ikemura T. 1986: Diversity in G+C content at the third position of codons in vertebrate genes and its cause. *Nucleic Acids Res* 14: 6345–6355.
- Ballabio E., Cantarella C.D., Federico C., Di Mare P., Hall G., Harbott J., Saccone S., Tosi S. 2009: Ectopic expression of the HLXB9 gene is associated with an altered nuclear position in t(7;12) leukaemias. *Leukemia* 23: 1179-1182.
- Bernardi G. 1989: The isochore organization of the human genome. *Ann Rev Genet* 23: 637–661
- Bernardi G. 2000: Isochores and evolutionary genomics of vertebrates. *Gene* 241: 3-17
- Bernardi G. 2004, reprinted in 2005: Structural and evolutionary genomics. Natural selection in genome evolution. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- Bernardi G., Olofsson B., Filipski J., Zerial M., Salinas J., Cuny G., Meunier-Rotival M., Rodier F. 1985: The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science* 228: 953–957
- Bioinformatics Reserch Laboratory of the Baylor College of Medicine, Houston, TX
<http://brl.bcm.tmc.edu/pgi/rhesus/dataAccess.rhtml>
- Blobel G. 1985: Gene gating: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8527–8529.
- Boveri T. 1909: Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3: 181-268.
- Boyle S., Gilchrist S., Bridger J.M., Mahy N.L., Ellis J.A., Bickmore W.A. 2001: The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerimutant cells. *Hum Mol Gen* 10 (3): 211-219.
- Branco M.R., Pombo A. 2006: Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol* 4(5): 780-788.
- Cantarella CD. 2007: L'organizzazione dei geni nel nucleo e l'evoluzione dei genomi. Tesi di dottorato. Università di Catania.

- Cardone M.F., Alonso A., Pazienza M., Ventura M., Montemurro G., Carbone L., de Jong P.J., Stanyon R., D'Addabbo P., Archidiacono N., She X., Eichler E.E., Warburton P.E., Rocchi M. 2006: Independent centromere formation in a capricious, gene-free domain of chromosome 13q21 in Old World monkeys and pigs. *Genome Biology* 7: R91
- Cardone M.F., Lomiento M., Teti M.G., Misceo D., Roberto R., Capozzi O., D'Addabbo P., Ventura M., Rocchi M., Archidiacono N. 2007: Evolutionary history of chromosome 11 featuring four distinct centromere repositioning events in Catarrhini. *Genomics* 90: 35–43
- Caspersson T., Farber S., Foley G.E., Kudynowski J., Modest E.J., Simonsson E., Wagh U., Zech L. 1968: Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49(1): 219–222
- Caspersson T., Zech L., Johansson C. 1970: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60:315–319
- Comings D.E. 1978: Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *A Rev Genet* 12: 25–46
- Corneo G., Ginelli E., Soave C., Bernardi G. 1968: Isolation and characterization of mouse and guinea pig satellite DNA's. *Biochemistry* 7: 4373–4379
- Costantini M., Clay O., Federico C., Saccone S., Auletta F., Bernardi G. 2007: Human chromosomal bands: nested structure, high-definition map and molecular basis. *Chromosoma* 116: 29-40
- Craig J.M. and Bickmore W.A. 1993: Chromosome bands: flavours to savour. *BioEssays* 15: 349-354.
- Cremer T., Cremer C., Baumann H., Luedtke E.K., Sperling K., Teuber V., Zorn C. 1982: Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet* 60: 46-56.
- Cremer T., Cremer M. 2010: Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003889
- Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Müller S., Solovei I., Fakan S. 2006: Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 307-316
- Cuny G., Soriano P., Macaya G., Bernardi G. 1981: The major components of the mouse and human genomes: preparation, basic properties and compositional heterogeneity. *Eur J Biochem* 111: 227–233
- Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. 2002: Capturing Chromosome Conformation. *Scienze* 295: 1306-1311.
- Dev V.G., Warburton D., Miller O.J. 1972: Giemsa banding of chromosomes. *Lancet* 1: 1285

- Dutrillaux B. 1973: Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. *Chromosoma* 41: 395-402
- Dutrillaux B., Couturier J., Richer C.L., Viegas-Pequignot E. 1976: Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. *Chromosoma* 58: 51-61.
- Federico C. 2009: Le bande cromosomiche nell'evoluzione del genoma dei Primati. Tesi di dottorato. Università di Catania.
- Federico C., Andreozzi L., Saccone S., Bernardi G. 2000: Gene density in the Giemsa bands of human chromosomes. *Chromosome Res* 8: 737-746
- Federico C., Cantarella C.D., Di Mare P., Tosi S., Saccone S. 2008: The radial arrangement of the human chromosome 7 in the lymphocyte cell nucleus is associated with chromosomal band gene density. *Chromosoma* 117: 399-410.
- Federico C., Scavo C., Cantarella C.D., Motta S., Saccone S., Bernardi G. 2006. Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates. *Chromosoma* 115: 123-128.
- Filipski J., Thierry J.P., Bernardi G. 1973: An analysis of the bovine genome by $\text{Cs}_2\text{SO}_4\text{-Ag}^+$ density gradient centrifugation. *J Mol Biol* 80: 177-197
- Furst A., Brown E.H., Braunstein J.D., Schildkraut C.L. 1981: Alpha-globulin sequences are located in a region of early-replicating DNA in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1023-1027
- Gilbert N., Boyle S., Fiegler H., Woodfine K., Carter N.P., Bickmore W.A. 2004: Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118: 555-566.
- Goldman M.A., Holmquist G.P., Gray M.C., Caston L.A., Nag A. 1984: Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science* 224: 686-692
- Grasser F., Neusser M., Fiegler H., Thormeyer T., Cremer M., Carter N.P., Cremer T., Müller S. 2008: Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and primate interphase nuclei. *J Cell Sci* 121 (Pt 11): 1876-1886
- Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I. 1988: The role of topological constraints in the kinetics of collapse of macromolecules. *J Phys* 49: 2095-2100.
- Grosberg A.Y., Rabin Y., Havlin S., Neer A. 1993: Crumpled globule model of the three-dimensional structure of DNA. *Europhys Lett* 23: 373
- Holmquist G., Gray M., Porter T., Jordan J. 1982: Characterization of Giemsa dark- and light-band DNA. *Cell* 31(1): 121-129
- <http://bacpac.chori.org/library.php?id=42>
- Ikemura T., Aota S. 1988: Alternative chromatic structure at CpG islands and quinacrine-brightness of human chromosomes. Global variation in G+C content along

- vertebrate genome DNA. Possible correlation with chromosome band structures. *J Mol Biol* 60: 909–920
- Ishii K., Arib G., Lin C., Van Houwe G., Laemmli U.K. 2002: Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell*. 109: 551–562.
- Jauch A., Wienberg J., Stanyon R., Arnold N., Tofanelli S., Ishida T., Cremer T. 1992: Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8611–8615.
- Korenberg J.R., Engels W.R. 1978: Base ratio, DNA content, and quinacrine brightness of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3382–3386
- Krull S., Dorries J., Boysen B., Reidenbach S., Magnius L., Norder H., Thyberg J., Cordes V.C. 2010: Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *EMBO J*. 29: 1659–1673.
- Kylberg K., Bjorkroth B., Ivarsson B., Fomproix N., Daneholt B. 2008: Close coupling between transcription and exit of mRNP from the cell nucleus. *Exp. Cell Res*. 314: 1708–1720.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. 2009: Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Scienze* 326: 289–293.
- Lima-de-Faria A., Isaksson M., Olsson E. 1980: Action of restriction endonucleases on the DNA and chromosomes of *Muntiacus muntjak*. *Hereditas* 92: 267–273
- Macaya G., Thiery J.P., Bernardi G. 1976: An approach to the organization of eukaryotic genomes at a macromolecular level. *J Mol Biol* 108: 237–254
- Misceo D., Ventura M., Eder V., Rocchi M., Archidiacono N. 2003: Human chromosome 16 conservation in primates. *Chromosome Res* 11: 323.
- Montefalcone G., Tempesta S., Rocchi M., Archidiacono N. 1999: Centromere Repositioning. *Genome Research* 9: 1184–1188
- Mora L., Sánchez I., Garcia M., Ponsà M. 2006: Chromosome territory positioning of conserved homologous chromosomes in different primate species. *Chromosoma* 115: 367–375.
- Müller S., Stanyon R., O'Brien P.C., Ferguson-Smith M.A., Plesker R., Wienberg J. 1999: Defining the ancestral karyotype of all Primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans. *Chromosoma* 108: 393–400
- Murphy W.J., Stanyon R., O'Brien S.J. 2001: Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. *Genome Biol* 2: REVIEWS0005.

- Németh A., Conesa A., Santoyo-Lopez J., Medina I., Montaner D., Péterfia B., Solovei I., Cremer T., Dopazo J., Längst G. 2010: Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet.* 6: e1000889.
- Neusser M., Schubel V., Koch A., Cremer T., Müller S. 2007: Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma* 116: 307-320.
- O'Brien S.J., Stanyon R. 1999: Phylogenomics. Ancestral primate viewed. *Nature* 402: 365.
- Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S.W.M., Solovei I., Brugman W., Gräf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L., van Steensel B. 2010: Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular Cell* 38: 603–613.
- Rajapakse I., Groudine M. 2011: On emerging nuclear order. *J. Cell Biol.* 192 (5): 711–721
- Roger J., Garcia R., Shelledy W., Kaplan J., Arya A., Johnson Z., Bergstrom M., Novakowski L., Nair P., Vinson A., Newman D., Heckman G., Cameron J. 2006: An initial genetic linkage map of the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) genome using human microsatellite *loci*. *Genomics* 87: 30-38
- Russell P.J.: Genetica III edizione. *EdiSES*
- Saccone S., Cacciò S., Kusuda J., Andreozzi L., Bernardi G. 1996: Identification of the gene-richest bands in human chromosomes. *Gene* 174: 85–94
- Saccone S., De Sario A., Della Valle G., Bernardi G. 1992: The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4913–4917
- Saccone S., De Sario A., Wiegant J., Raap A.K., Della Valle G., Bernardi G. 1993: Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11929–11933
- Saccone S., Federico C., Bernardi G. 2002. Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammalian and bird. *Gene* 300: 169-178.
- Saccone S., Federico C., Solovei I., Croquette M.F., Della Valle G., Bernardi G. 1999: Identification of the gene-richest bands in human prometaphase chromosomes. *Chromosome Res* 7: 379–386
- Scheuermann M.O., Tajbakhsh J., Kurz A., Saracoglu K., Eils R., Lichter P. 2004: Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 301(2): 266-279
- Schmid M., Arib G., Laemmli C., Nishikawa J., Durussel T., Laemmli U.K. 2006: Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol. Cell.* 21: 379–391.
- Schwaiger M. and Schubeler D. 2006: A question of timing: emerging links between transcription and replication. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 177-183.

- Schweizer D. 1977: R-banding produced by DNase I digestion of chromomycin-stained chromosomes. *Chromosoma* 64: 117–124
- Stack S.M., Brown D.B., Dewey W.C. 1977: Visualization of interphase chromosomes. *J Cell Sci* 26: 281-299.
- Stanyon R., Rocchi M., Capozzi O., Roberto R., Misceo D., Ventura M., Cardone M.F., Bigoni F., Archidiacono N. 2008: Primate chromosome evolution: Ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. *Chromosome Research* 16: 17–39
- Strambio-De-Castillia C., Niepel M., Rout M.P. 2010: The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 490-501.
- Taddei, A., Van Houwe G., Hediger F., Kalck V., Cubizolles F., Schober H., Gasser S.M. 2006. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature*. 441: 774–778.
- Thiery J.P., Macaya G., Bernardi G. 1976: An analysis of eukaryotic genomes by density gradient centrifugation. *J Mol Biol* 108: 219–235
- van Berkum N.L., Lieberman-Aiden E., Williams L., Gnirke A., Mirny L.A., Dekker J., Lander E.S. 2010: Hi-C: a method to study the three-dimensional architecture of genomes. *J Vis Exp* 39: 1869.
- Ventruto V., Sacco G., Lonardo F. 2001: *Testo-Atlante di Citogenetica Umana*. Springer - Verlag Italia
- Ventura M., Weigl S., Carbone L., Cardone M.F., Misceo D., Teti M.G., D'Addabbo P., Wandall A., Björck E., de Jong P.J., She X., Eichler E.E., Archidiacono N., Rocchi M. 2004: Recurrent Sites for New Centromere Seeding. *Genome Research* 14: 1696–1703
- Wimmer R., Kirsch S., Rappold G.A., Schempp W. 2005: Evolutionary breakpoint analysis on Y chromosomes of higher primates provides insight into human Y evolution. *Cytogenet Genome Res* 108: 204.
- Zink D. 2006: The temporal program of DNA replication: new insights into old questions. *Chromosoma* 115: 273-287.

