

## Evoluzione del cromosoma 4 umano mediante mappaggio di sonde sub cromosomiche in Platyrrhinae, Primates

Francesca DUMAS\*, Luca SINEO\*

\*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche,  
Università degli Studi Palermo, via Archirafi 18. Palermo, Italy  
[francesca.dumas@unipa.it](mailto:francesca.dumas@unipa.it)

---

### Riassunto

Mediante il painting cromosomico che permette di identificare le omologie cromosomiche e i riarrangiamenti intercromosomici è stato dimostrato che l'associazione sintenica che caratterizza il cromosoma 4 dell'uomo è evolutivamente conservata nell'ordine Primates, con l'eccezione di alcune specie di primati non umani dove si trova frammentata ed eventualmente associata ad altre sintenie. Ulteriori dati sull'evoluzione della sintenia umana 4 derivano dall'analisi di pattern di bandeggio associato al mappaggio di sonde subcromosomiche, tecnica che permette di verificare la coerenza e la conservazione della composizione sintenica usando dei marcatori BAC. La conservazione o la non conservazione dell'ordine dei marcatori lungo gli ortologhi dei cromosomi umani in Primates consente di individuare con maggior sicurezza e a livello molecolare i riarrangiamenti intracromosomici o l'insorgenza di nuovi centromeri. L'analisi del pattern di bandeggio dell'ortologo del 4 in Platyrrhinae e Catarrhinae aveva permesso di avanzare un'ipotesi secondo cui la differente morfologia degli ortologhi fosse il risultato o di una inversione pericentrica o di uno "shift del centromero". Al fine di testare questa ipotesi si sono ibridate la sonda omologa al braccio piccolo del cromosoma 4 umano e la sonda 4q12 (che mappa sotto il centromero in *Homo*) su *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* e *Aotus lemurinus greisembra* (Platyrrhinae). I segnali di entrambe le sonde mappano sul braccio q nelle specie in esame indicando che l'ordine dei marcatori è conservato e che la differente morfologia degli omologhi in Platyrrhinae e Catarrhinae è dovuta ad una differente posizione del centromero, conseguenza probabilmente, dell'attivazione di un nuovo centromero evolutivo in una delle due linee filogenetiche.

### Abstract

Chromosome painting, a molecular technique that detects chromosomal homologies and interchromosomal rearrangements, demonstrated the conservation of human synteny 4 in Primates, with same exception. More data on the evolution of human chromosome 4 can be obtained through the analysis of the banding pattern associated with the mapping of BAC's subchromosomal probes. The mapping of subchromosomal probes permits to study the order of the markers along the orthologues and to detect intrachromosomal rearrangements and new evolutionary centromeres not easily detectable through painting. The analysis of the banding pattern permitted to show a different morphology of synteny 4 in the Platyrrhinae and Catarrhinae due to the occurrence of a pericentric inversion or a centromeric shift. In order to test this hypothesis we hybridized the 4 HSA p arm and the 4HSA q12 on the orthologues to human chromosome 4 in *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* and *Aotus lemurinus greisembra* (Platyrrhinae). The signals of both probes fall on the q arm in all the species analyzed. Those data indicate that markers order is conserved along the syntenies but we observed that the orthologues in Platyrrhinae and Catarrhinae differ for the position of the centromeres due probably to the activation of a new evolutionary centromeres in one of the two phylogenetic branch.

**Parole chiave:** sintenia, nuovi centromeri, Platyrrhinae

**Key words:** synteny, new centromeres, Platyrrhinae

---

## Introduzione

L'applicazione del metodo cladista e della massima parsimonia, nell'analisi dei dati ottenuti attraverso il painting, omologie cromosomiche e i riarrangiamenti intercromosomici (traslocazioni, fusioni e fissioni), permette di discriminare le sintenie ancestrali dalle associazioni cromosomiche derivate (Wienberg *et al.*, 1997) e la ricostruzione degli ipotetici cariotipi ancestrali dei nodi principali dell'albero filogenetico dei mammiferi (Ferguson-Smith and Trifonov 2007; Robinson and Ruiz-Herrera 2008). La definizione del cariotipo ancestrale di Mammiferi placentati mediante *painting* ha permesso a sua volta di determinare i passi principali che negli ultimi 100 milioni di anni hanno portato alla formazione delle sintenie cromosomiche che caratterizzano del tutto o in parte i cromosomi umani (Stanyon *et al.*, 2008). Il *painting* cromosomico fornisce normalmente solo limitate informazioni sull'ordine dei geni e non sono altamente informativi riguardo riarrangiamenti intracromosomici come le inversioni. La raccolta di tali informazioni ad alta risoluzione richiede l'analisi dei dati di pattern di bandeggio cromosomico o l'applicazione di metodi di mappaggio di sonde sub-cromosomiche "BAC" (Sineo *et al.* 2007, Dumas and Sineo 2010). Tali sonde (che assumono la funzione di marcatori lungo il cromosoma) permettono di tracciare le variazioni dell'ordine dei marcatori nei cromosomi di specie diverse a confronto. In particolare due o più BAC possono essere coibridati e definiti nella loro posizione reciproca in specie diverse. Il confronto della organizzazione della sintenia in specie diverse ha permesso oltre la rivelazione di inversioni la scoperta del fenomeno del "riposizionamento del centromero" nel corso dell'evoluzione (Montefalcone *et al.*, 1999, Stanyon *et al.*, 2008). Nuovi centromeri evolutivi (ENC) sono stati trovati in una nuova regione cromosomica senza alcun cambiamento nell'ordine dei marker (Rocchi *et al.* 2009). Il nuovo centromero generalmente si fissa nelle specie, coesistendo con il vecchio centromero per un tempo considerevole (come polimorfismo). Gli studi degli ultimi dieci anni hanno ampiamente dimostrato che gli spostamenti del centromero nel corso dell'evoluzione non sono rari e che devono essere considerati al pari di altri riarrangiamenti. Attualmente i centromeri sono considerati caratteristici "hot spots" sia nei cambiamenti cromosomici nel corso

dell'evoluzione sia in ambito medico (Villasante *et al.* 2007).

Uno dei cromosomi la cui storia evolutiva è ampiamente dibattuta è il 4 (Picone *et al.*, 2010); mediante la genomica comparata è stato dimostrato che esso è conservato nel cariotipo ancestrale dei Mammiferi euteri (AEK- Ancestral Eutherian Karyotype), in associazione con il braccio piccolo del cromosoma umano 8p (Ferguson-Smith and Trifonov, 2007). Questa associazione ancestrale 4/8p la ritroviamo in tutti i mammiferi eccetto in alcuni Afrotheria e nei Primati. Nei Primati la sintenia 4 grande cromosoma submentacentrico conservato (Haig *et al.*, 1999) anche se molte eccezioni sono state dimostrate soprattutto in specie caratterizzate da un alto livello di riarrangiamenti come le Scimmie (Nie *et al.* 2006), Scimmie del Nuovo mondo (De Oliveira *et al.* 2002, 2012) Cercopithecini (Dumas and Sineo 2010; Moulin *et al.* 2008) e Gibboni (Muller *et al.* 2003).

L'ordine dei marcatori lungo la sintenia 4 definito mediante il mappaggio di sonde BAC su alcune specie rappresentative dei Primati e il confronto con un outgroup ha permesso di ipotizzare una conservazione dell'ordine dei marker nell'ipotetico antenato del cromosoma 4 nei Primati (Stanyon *et al.*, 2008). Alcune eccezioni erano state dimostrate soprattutto in alcune Catarrhinae, per esempio in *Macaca* e nelle antropomorfe (Ventura *et al.*, 2007, Marzella *et al.*, 200). Un'altra eccezione rispetto questa organizzazione era stata proposta molti anni prima mediante l'analisi del pattern di bandeggio confrontando l'ortologo del 4 in *Cebus apella* (Platyrrhinae). Il differente pattern di bandeggio in *Cebus* e in *Homo* era stato interpretato o come il risultato di una inversione pericentrica o di uno "shift del centromero" ossia spostamento del centromero senza l'intervento di un'inversione (Dutrillaux *et al.*, 1979). Al fine di testare questa ipotesi sono state ibridate la sonda del braccio piccolo 4p (HSA4parm) e la sonda 4q12 (che mappa sotto il centromero in HSA) su *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* e *Aotus lemurinus greisembra* (Platyrrhinae) con l'obiettivo di studiare l'ordine dei marcatori nell'ortologo del 4 nelle Platyrrhinae.

## Materiali e metodi

Preparati cromosomici su vetrino di *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* sono stati allestiti seguendo protocolli standard

(Small *et al.* 1985, Stanyon *et al.*, 2005) da Stanyon e colleghi al NCI (MD, USA). *Aotus lemurinus greisembra* è stato gentilmente fornito da T. Ishida dell'Università di Tokyo, Giappone.

I vetrini sono stati sottoposti ad un pretrattamento con una soluzione 2X SSC/0,5% NP40, a pH 7.0 ad una temperatura di 37°C per 30 minuti. In seguito sono stati deidratati con una serie di soluzioni in etanolo a concentrazioni crescente rispettivamente al 70%, 80%, 95% a temperatura ambiente, per 2 minuti, infine asciugati all'aria. I vetrini sono stati sottoposti a denaturazione per 2 minuti a 72°C in una soluzione 70% formammide/2xSSC a pH 7.0. Successivamente sono stati deidratati con una serie di soluzioni di etanolo ghiacciato, rispettivamente al 70%, 80% e 95%, per 2 minuti a temperature ambiente e asciugati all'aria. La sonda è stata denaturata a 75°C per 5-10 minuti. 10µl di mix della sonda sono stati applicati sui vetrini precedentemente denaturati e i campioni incubati "over night" a 37°C. I vetrini sono stati lavati in "Wash buffer (0.5X SSC/0.1%SDS) per 5 minuti a 65°C, e trattati con 15µl di DAPI/antifade (0.02 µg/ml) o PI (0.3µg/ml) e applicato il coprioggetto. Le immagini sono state acquisite mediante un microscopio Leica DMRXA2, fornito di macchina fotografica.

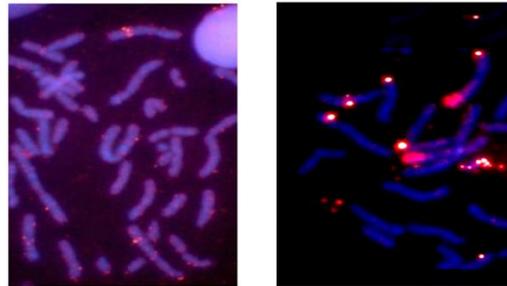
Le sonde, il braccio piccolo del cromosoma 4 dell'uomo (HSA4parm) e la sonda 4HSAq12 ottenute per microdissezione, sono stata marcate direttamente con un fluorocromo che eccita nello spettro del rosso (Texas Red # Microscopia, filtri - 585 nm eccitazione; 615) (molecular cytogenetics-Q-BIOgene).

**Risultati e Discussione**

Le sonde utilizzate mappano sugli orologi del cromosoma 4 dell'uomo in accordo con i dati di painting cromosomico (Neusser *et al.*, 2001, Stanyon *et al.*, 2000, Stanyon *et al.*, 2011). Le sonde HSA4p e F(HSAq12) mappano sui cromosomi submetacentrici di *Callithrix jacchus* (ch. 3), *Saguinus oedipus* (ch.7), *Saimiri sciureus* (ch. 1) (Fig. 1) and *Aotus l. greisembra* (ch. 9), sul braccio q.

L'associazione umana 4/8p presente nel cariotipo ipotetico ancestrale dei mammiferi (Ferguson-Smith and Trifonov, 2007; Stanyon *et al.*, 2008) si è persa per fissione nei Primati; infatti il painting cromosomico comparativo ha permesso di dimostrare che le sonde umane 4 e 8 mappano su cromosomi differenti nei primati

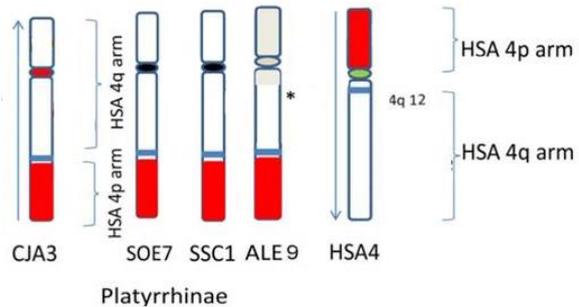
(Haig 1999). L'omologo del cromosoma 4 umano, nei Primati consiste generalmente in un cromosoma sub metacentrico. Fanno eccezione alcuni taxa caratterizzati da un alto tasso di riarrangiamenti, come per esempio le Proscimmie, le Platyrrhinae ei Gibboni dove la sintenia 4 ha subito, fissioni, traslocazioni e ha formato nuove associazioni con altre sintenie umane. Tra i Cercopithecoidea in Macaca e nelle antropomorfe attraverso il mappaggio di sonde BACs sono state dimostrate delle inversioni pericentriche ognuna con breakpoints diversi (Ventura *et al.*, 2007, Marzella *et al.*, 2000).



**Fig.1:** Esempio di ibridazione delle sonda 4q12 (a sinistra) e 4parm (a destra) su *Saimiri sciureus* (SSC).

In base alle osservazioni del pattern di bandeggio della sintenia 4 (Dutrillaux, 1979), il nodo evolutivo della divergenza tra Platyrrhinae e Catarrhinae datato circa 40 milioni di anni potrebbe essere segnato o da un'inversione pericentrica o da uno "shift" del centromero.

Al fine di testare questa ipotesi sono state ibridate la sonda omologa al braccio piccolo del 4 (4p) e la sonda 4q12 (che mappa sotto il centromero in *Homo*) su *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* e *Aotus lemurinus greisembra* (Platyrrhinae) (Fig. 2).



**Fig. 2:** Ideogrammi dei cromosomi ortologi al 4 umano (HSA4) di *Callithrix jacchus* (CJA), *Soeguinus oedipus* (SOE), *Saimiri sciureus* (SSC) e *Aotus lemurinus greisembra* (ALE) su cui sono riportati i segnali delle sonde 4q12 (in blue) e 4parm (in rosso).\*indica la sintenia 15 (in grigio) associata al 4 in ALE. Le frecce indicano la direzione presunta dell'ordine dei marcatori.

La sonda (4p) mappa sulla regione q terminale negli ortologi del 4 nelle scimmie del Nuovo Mondo. In *Aotus lemurinus greisembra* la sintenia umana 4 ha subito una fissione dando luogo a due frammenti; sia la sonda 4p che la sonda 4q12 sembra abbiano mantenuto la loro posizione originale e cadono su uno dei due frammenti omologhi al 4, sul cromosoma sub metacentrico 9 formato dall'associazione con la sintenia 15 dell'uomo 4/15 (Stanyon *et al.*, 2011). La sonda 4q12 mappa sugli ortologi del 4 umano in *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* sul braccio q in una posizione adiacente alla sonda 4p arm ma lontano dalla posizione centromerica nelle Platyrrhinae. Questi risultati indicano che la posizione della sonda 4p arm in Platyrrhinae e Catarrhinae è solo apparentemente opposta in quanto la sonda 4q12 sulle specie analizzate mappa sulla regione adiacente al segmento omologo al HSA 4p arm; i cromosomi per convenzione in citogenetica vengono rappresentati con il braccio piccolo in alto, essi risultano quindi soltanto invertiti nelle Platyrrhinae e presentano solo una diversa posizione del centromero. La constatazione della conservazione dell'ordine dei marcatori e di una posizione del centromero diversa permette di avanzare l'ipotesi secondo cui un nuovo centromero evolutivo si sia originato in una delle due linee filogenetiche. Questi dati ampliano e supportano i risultati ottenuti in precedenza mediante FISH con sonde di DNA clonate in BACs (**Bacterial Artificial Chromosomes**) mappate su *Callithrix jacchus* (Platyrrhinae), (Stanyon *et al.*, 2008), che avevano dimostrato una conservazione dell'ordine dei marcatori nell'ortologo del 4 umano.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia Roscoe Stanyon per la disponibilità sempre dimostrata.

#### Bibliografia

DE OLIVEIRA, E.H., NEUSSER, M., AND MÜLLER, S., 2012. Chromosome evolution in new world monkeys (Platyrrhini). *Cytogenet Genome Res.*;137(2-4):259-72.

DE OLIVEIRA, EHC., NEUSSER, M., FIGUEIREIDO, WB., NAGAMACHI, C., PIECZARCA, JC., SBALQUIERO, IJ., WIENBERG, J., AND MULLER S., 2002. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research* 10: 669-683

DE OLIVEIRA, EHC, NEUSSER, M, FIGUEIREIDO, WB, NAGAMACHI, C, PIECZARCA, JC, SBALQUIERO, IJ, WIENBERG, J, AND MULLER, S., 2002. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*,10 (8): 669-683

DUMAS, F, AND SINEO, L., 2010. Chromosomal dynamics in Cercopitheciini studied by Williams Beuren probe mapping. *Caryologia* (vol 3, 4:435-442).

DUTRILLAUX, B., 1979. Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum Genet* 48:251-314.

Ferguson-Smith, MA., and Trifonov, V., 2007. Mammalian karyotype evolution. *Nature Reviews Genetics*, 8: 950-962.

MARZELLA, R., VIGGIANO, L., MIOLLA, V., STORLAZZI, CT., RICCO, A., GENTILE, E., ROBERTO, R., SURACE, C., FRATELLO, A., AND MANCINI, M., ET AL. 2000. Molecular cytogenetic resources for chromosome 4 and comparative analysis of Phylogenetic Chromosome IV in Great Apes. *Genomics*, 63: 307-313.

Moulin, S., Gerbault-Seureau, M., Dutrillaux, B., and Richard, FA., 2008. Phylogenomics of African guenons. *Chromosome Research*, 16 (5): 783-99.

MÜLLER, S., HOLLAZ, M., AND WIENBERG J., 2003. Chromosomal phylogeny and evolution of gibbons (*Hylobatidae*). *Human Genetics*, 113: 493-501

NEUSSER, M., STANYON, R., BIGONI, F., WIENBERG, J., AND MULLER, S., 2001. Molecular cytogenetics of New World monkeys (Platyrrhini) a comparative analysis of five species by multi-color chromosome painting gives evidence for a classification of *Callimico goeldii* within the family of Callitrichidae. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 94: 206-215.

NIE, W., O'BRIEN, PCM., FU, B., WANG, J., SU, W., FERGUSON-SMITH, MA., ROBINSON, TJ., AND YANG, F., 2006. Chromosome painting between human and lorisiform prosimians: evidence for the HSA 7/16 synteny in the primate ancestral karyotype. *American Journal of Physical Anthropology*, 129 (2): 250-259.

PICONE, B., AND SINEO, L., 2010. Reconstructing the Phylogeny of the Human Chromosome 4 Synteny using Comparative Karyology and Genomic Data Analysis. *Caryologia* Vol. 63, no. 3: 314-334.

*Research*,10 (8): 669-683.

ROCCHI, M., STANYON, R. E ARCHIDIACONO, N., 2009. Evolutionary new Centromere in Primates. *Prog Mol Subcell Biol.*;48:103-52.

SINEO, L., DUMAS, F., VITTURI, R., PICONE, B., PRIVITERA, O., AND STANYON, R., 2007. Williams-Beuren mapping in *Callithrix argentata* and *Callicebus cupreus*, and *Alouatta caraya* indicate different patterns of chromosomal rearrangements in Neotropical Primates. *Journal of Zoological*

Systematics and Evolutionary. Research, 45(4). 366-371.

SMALL MF., STANYON R., SMITH DG., SINEO L., 1985. High-resolution chromosomes of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American J Primat* 9:63–67.

STANYON, R., GAROFALO, F., STEINBERG, E.R., CAPOZZI, O., DI MARCO, S., NIEVES, M., ARCHIDIACONO, N., MUDRY, M.D., 2011. Chromosome Painting in Two Genera of South American Monkeys: Species Identification, Conservation, and Management.

STANYON, R., CONSIGLIÈRE, S., MÜLLER, S., MORESCALCHI, A., NEUSSER, M., WIENBERG, J., 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between the dusky titi and squirrel monkey. *Am J Primatol* 50:95–107.

STANYON, R., BRUENING, R., STONE, G., SHEARIN, A., AND BIGONI, F., 2005. Reciprocal painting between humans, De Brazza's and patas monkeys reveals a major bifurcation in the Cercopithecini phylogenetic tree. *Cytogenetic and Genome Research*, 108: 175-182.

STANYON, R., ROCCHI, M., CAPOZZI, O., ROBERTO, R., MISCEO, D., VENTURA M., CARDONE, MF., BIGONI, F., AND ARCHIDIACONO, N., 2008. Primate chromosome evolution: Ancestral karyotypes,

marker order and neocentromeres. *Chromosome Research*, 16:17-39

STANYON R., GAROFALO F., STEINBERG, ER., CAPOZZI, O., DI MARCO, S., NIEVES, M., ARCHIDIACONO, N., AND MUDRY MD., 2011. Chromosome Painting in Two Genera of South American Monkeys: Species Identification, Conservation, and Management. *Cytogenetics and genome research*.

VENTURA, M., ANTONACCI, F., CARDONE, MF., STANYON, R., D'ADDABBO, P., CELLAMARE, A., SPRAGUE, LJ., EICHLER, E., ARCHIDIACONO, N., E ROCCHI, M., 2007. Evolutionary formation of new centromeres in macaque. *Science* 316: 243–246.

VILLASANTE, A., J.P. ABAD, E MENDEZ-LAGO, M., 2007. Centromeres were derived from telomeres during the evolution of the eukaryotic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(25): p.10542-7.

WIENBERG, J., 2005. Fluorescence *in situ* hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution. *Cytogenet Genome Res* 108:139–160.

WIENBERG, J., AND STANYON R., 1997. Comparative painting of mammalian chromosomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7:784-791.