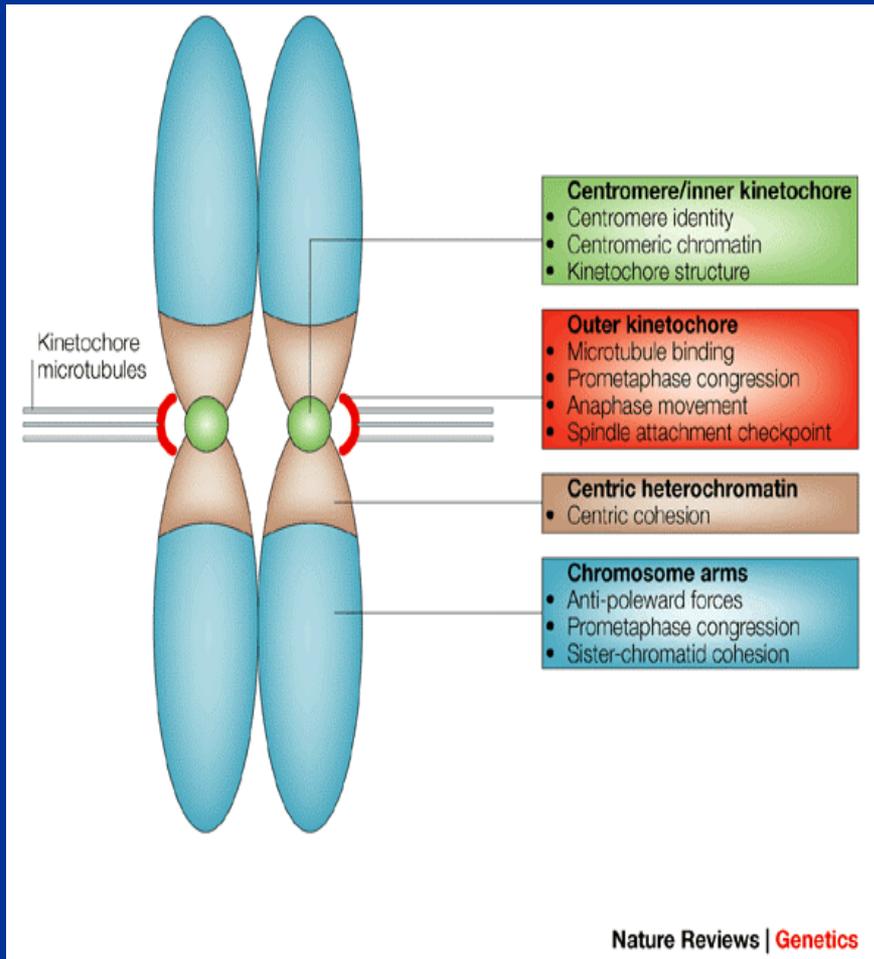


Il centromero



Nel **1880 Walther Flemming** definì i **centromeri** come **costrizioni primarie** citologicamente visibili sui cromosomi.

Agli inizi del 1900 i centromeri vennero definiti geneticamente come siti cromosomici essenziali per la normale ereditarietà e come regioni dove la ricombinazione meiotica era ridotta o assente.

Il centromero è il locus necessario per la segregazione cromosomica. E' una regione specializzata del cromosoma eucariotico necessaria per la **formazione del cinetocore**, l'attacco del fuso mitotico e il movimento dei cromosomi durante la meiosi e la mitosi.

Il centromero, quindi, assicura la stabilità genetica ed è quindi di vitale importanza.

CENTROMERO

Sebbene il ruolo svolto dal centromero sia altamente conservato tra gli eucarioti, è ormai da molti anni evidente il fatto che la morfologia varia in maniera sorprendente.

Cromosomi monocentrici

Interagiscono con i microtubuli in una particolare regione e si muovono verso i poli in anafase seguendo il centromero.

Cromosomi olocentrici

Si legano ai microtubuli lungo tutto il cromosoma. Sono diffusi nel regno vegetale ed animale. Possono essere il prodotto di un'evoluzione convergente oppure possono rappresentare il modello centromerico ancestrale.

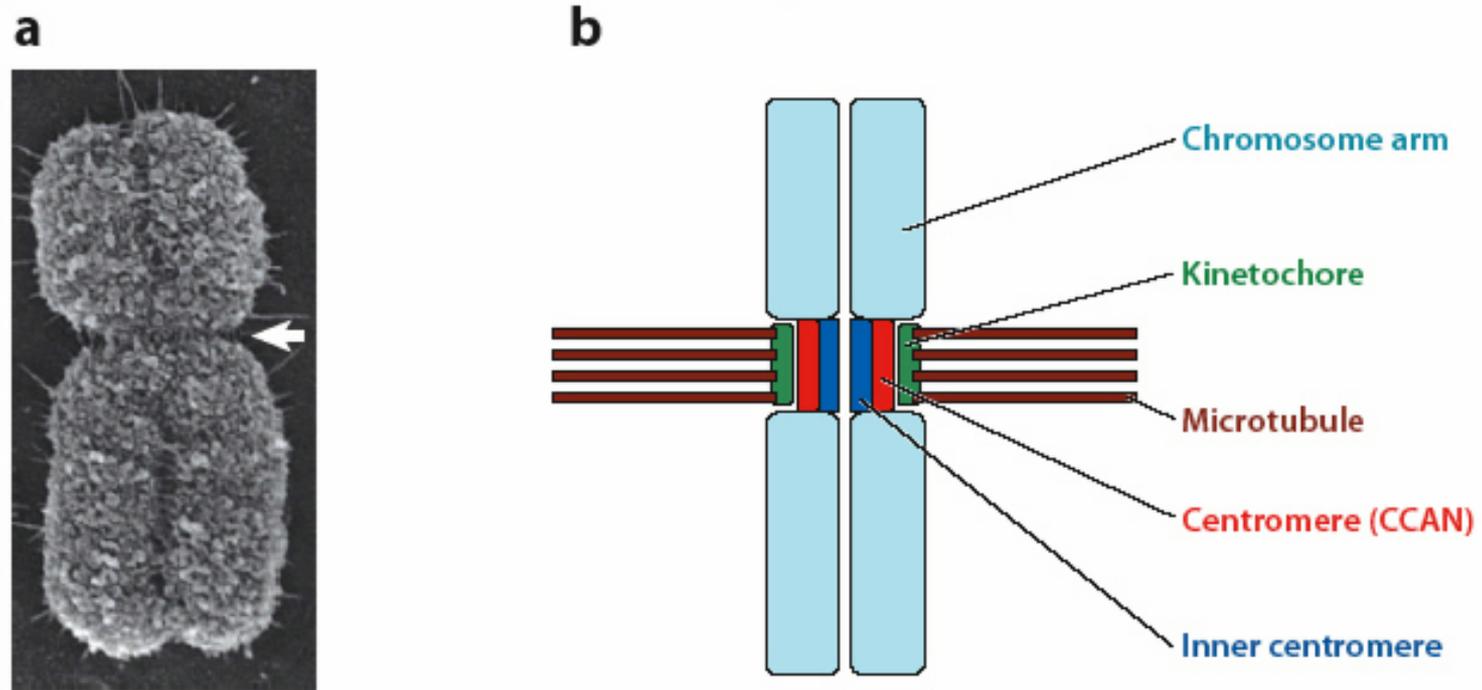


Figure 1

Kinetochores as seen through the microscope. (a) Scanning electron micrograph of a metaphase chromosome; sister chromatids are easily distinguishable and still attached at the centromere (*arrow*). (b) Schematic of a bi-oriented chromosome; labeled are structures discussed in this review and they comprise inner centromere, centromere (including CENP-A containing chromatin and CCAN) and kinetochore.

C

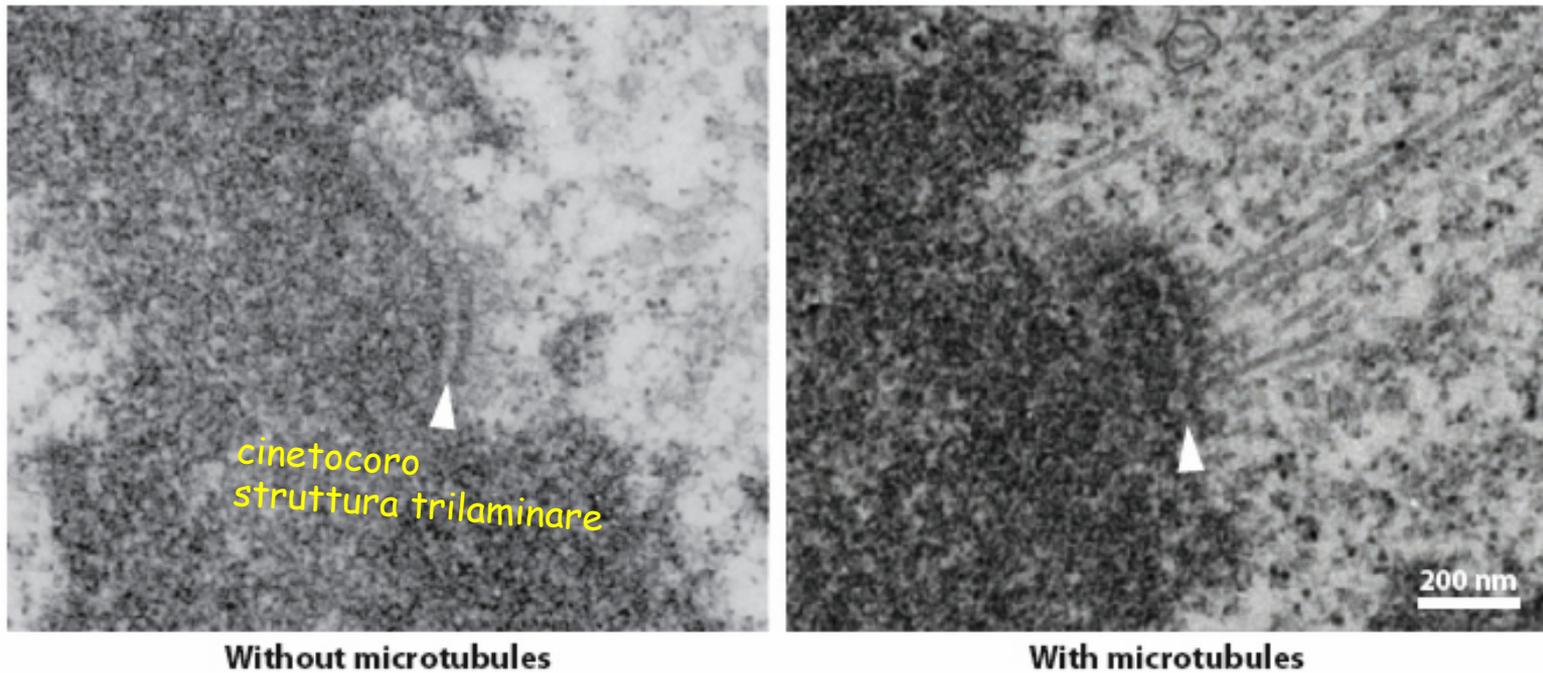


Figure 1

(c) Electron micrographs of kinetochores from PtK1 (rat kangaroo kidney epithelial) cells. Kinetochores without microtubules exhibit a trilaminar structure (*arrow head*) consisting of two dense plates and an external fibrous corona. The binding of microtubules does not alter the trilaminar configuration, although the corona is no longer conspicuous. (a) Courtesy of Terry D. Allen from “Molecular Biology of the Cell” by Alberts et al. 2008 (b) Courtesy of Helder Maiato from Maiato et al. 2006, *Chromosoma* 115:469–480 (100).

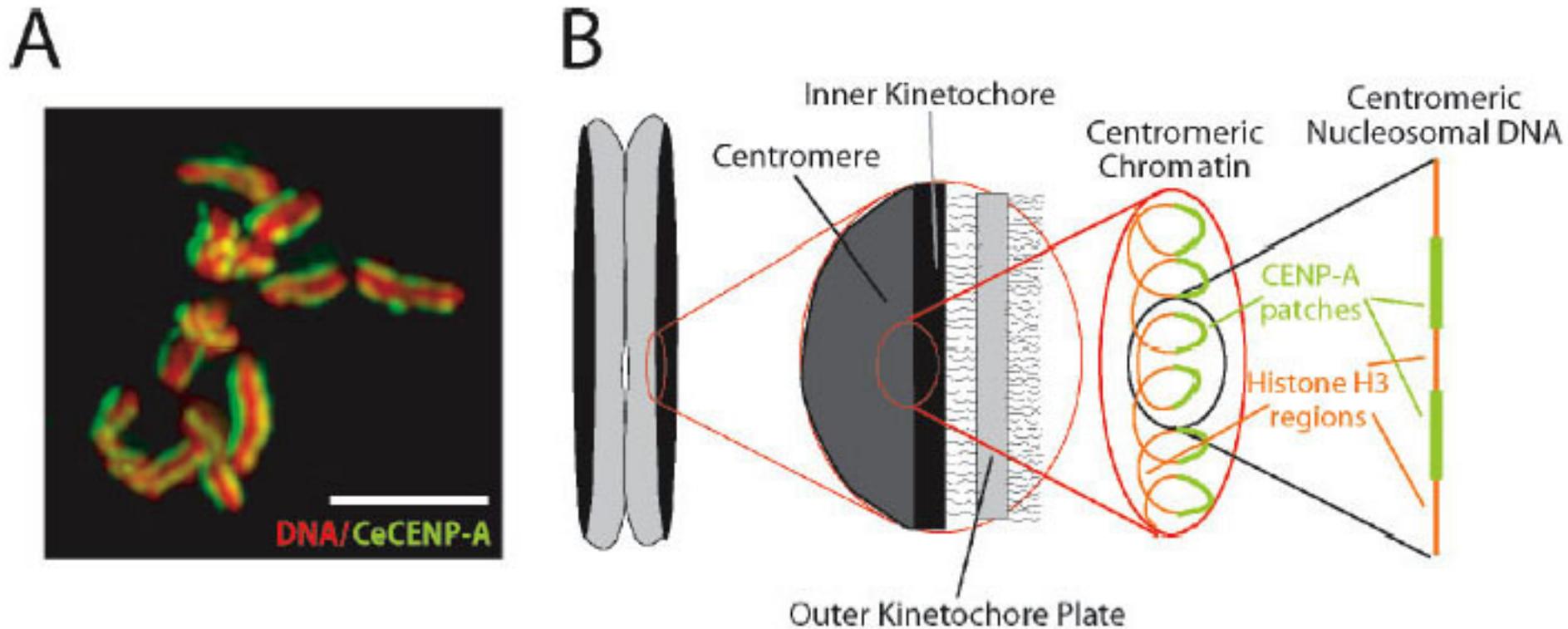


Figure 1. CENP-A is an essential determinant of kinetochore specification. (A) CENP-A^{HCP-3} localizes to the diffuse *C. elegans* kinetochores. Immunofluorescence showing CENP-A staining in yellow and DNA in red. Scale bar is 5 μ m. (B) Model for formation of physically juxtaposed CENP-A-containing chromatin domains on a condensed chromatid. Interspersed regions of histone H3-containing nucleosomes and CENP-A-containing nucleosomes are organized such that CENP-A-containing domains face outward and direct formation of the outer domains of the kinetochore, while histone H3 domains are internal and constitute the bulk of chromosomal chromatin.

Holocentric chromosome segregation

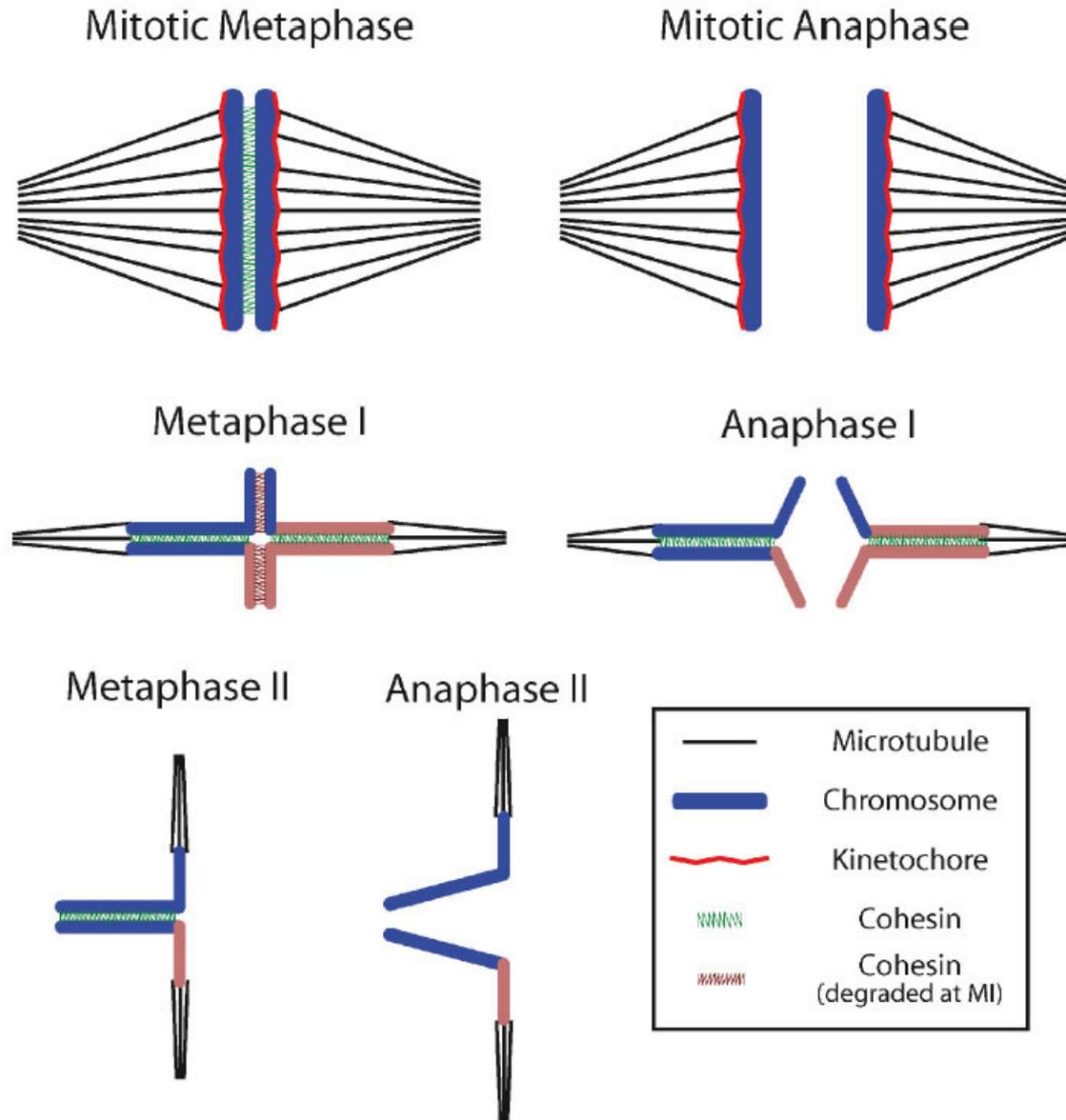
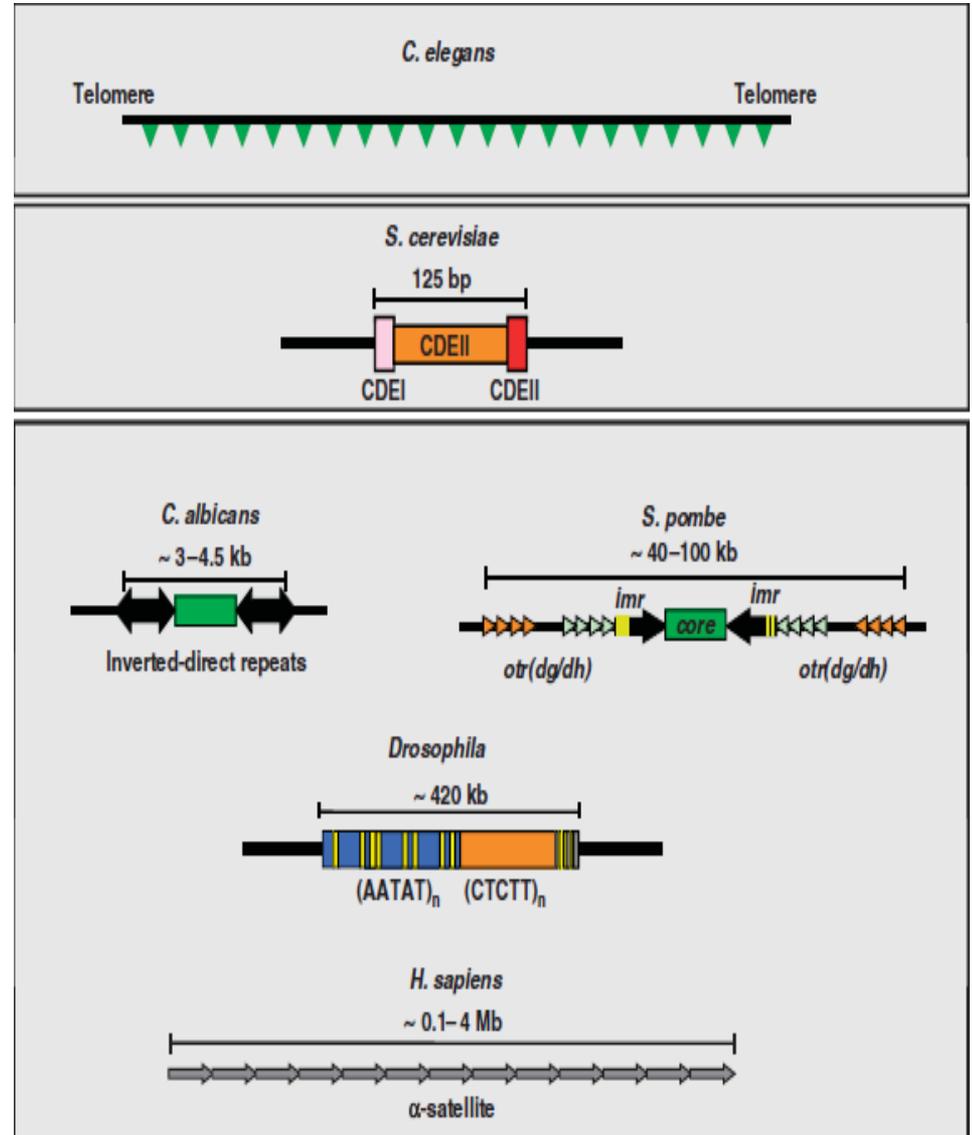
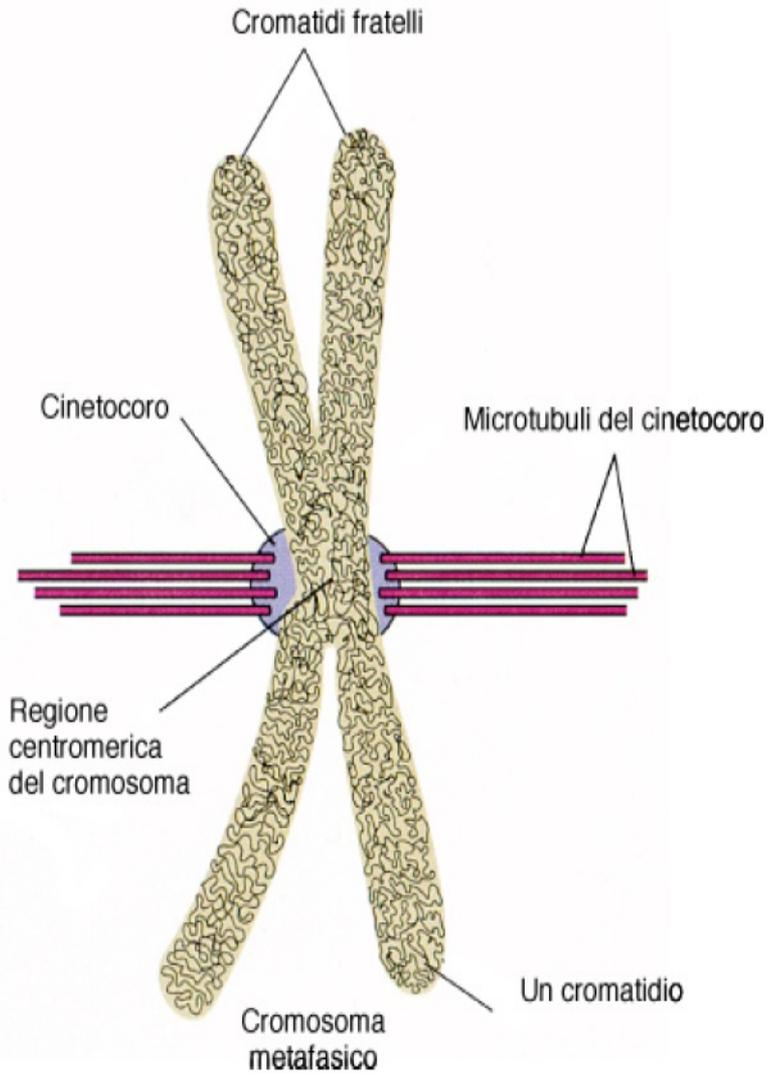


Figure 5. Mitotic vs. meiotic segregation in holocentric species. Diagram showing chromosome segregation during mitosis and meiosis. During mitosis, chromosomes are holocentric with a diffuse kinetochore along the length. During meiosis, microtubules are directly embedded in the chromosome ends, but the specific chromosome end is chosen randomly. DNA originally from one homologue is shown in either blue or pink. Chromosomes composed of two colours represent the resolved products of the single meiotic recombination event (see Hillers & Villeneuve 2003). At meiosis I, cohesion between homologues is degraded allowing the separation of homologous chromosomes to opposite poles. During meiosis II, the opposite end of the chromosome is used to attach to microtubules. At the transition to anaphase, cohesion between paired sister chromatids is eliminated allowing their segregation to opposite poles.

- Il centromero è costituito da DNA e proteine

IL CENTROMERO

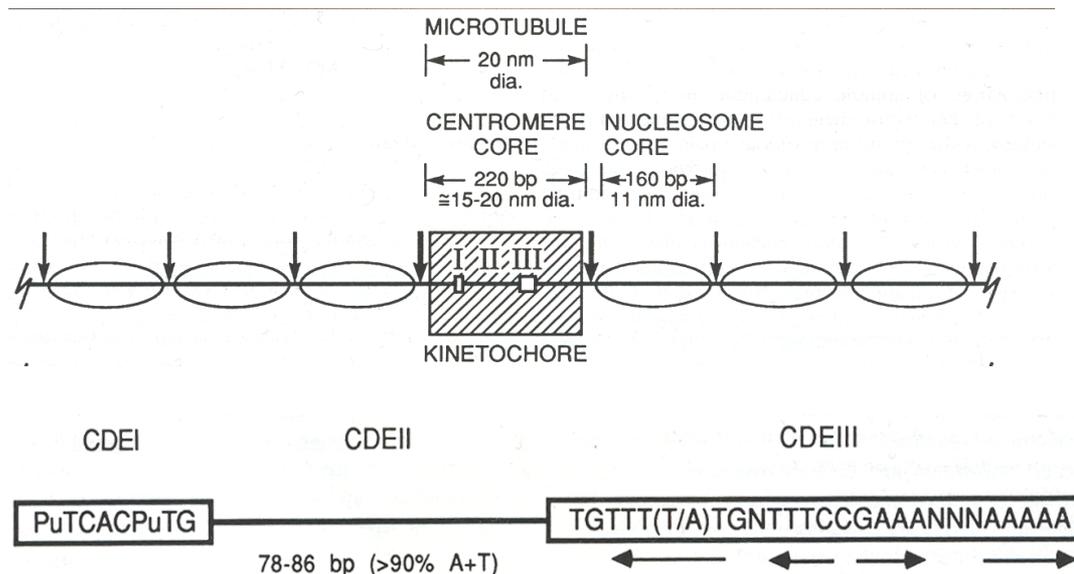


S. cerevisiae

Presenta semplici centromeri "puntiformi" costituiti da una **sequenza conservata di 125 bp** composta da **3 elementi funzionali** in grado di nucleare le proteine centromeriche e organizzarle in un cinetocore citologicamente invisibile.

CDE II è una regione di 78-86 bp ricca in AT (>90%) fiancheggiata dalla sequenza conservata **CDE I** (PuTCACPuTG) e dalla sequenza consensus **CDE III**.

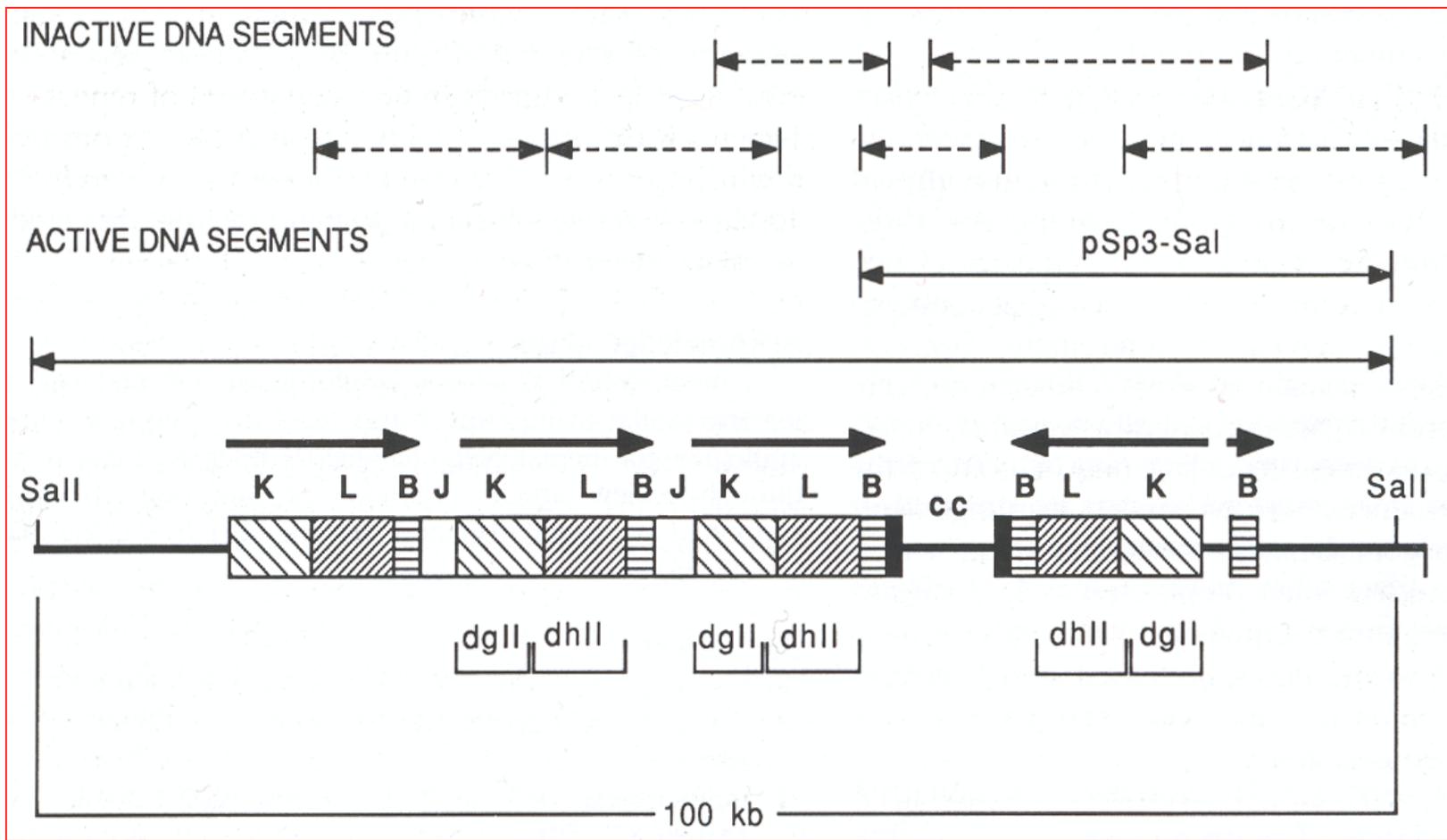
Nel DNA nativo CEN DNA è contenuto in un segmento di 220-250 bp protetto dal taglio delle nucleasi.



Schizosaccaromyces pombe

Il DNA centromerico (40-100 Kb) è molto più complesso rispetto a quello di *S. Cerevisiae* e condivide molte caratteristiche delle altre regioni centromeriche eucariotiche.

La sequenza del core centrale (4-5 kb) è costituita da DNA non ripetuto fiancheggiato da diverse classi di larghi repeats organizzati in orientamento invertito.



La sequenza del core centrale (4-5 kb) è costituita da DNA non ripetuto fiancheggiato da diverse classi di larghi repeats (incluso il repeat K di ~ 6 Kb) organizzati in orientamento invertito.

Neurospora crassa

Il DNA centromerico del cromosoma VII è lungo circa 400 Kb. E' costituito da ripetizioni, alcune simili a retrotrasposoni.

Caenorhabditis elegans

Presenta cromosomi olocentrici, cioè in grado di assemblare il cinetocore lungo l'intera lunghezza quindi senza una sequenza determinante specifica.

Drosophila melanogaster

Un centromero funzionalmente e molecolarmente ben definito è quello del minicromosoma Dp1187 lungo 1,3 Mb e derivato dal cromosoma X di *D.m.*.

Delezioni progressive hanno definito una regione di 420 Kb in grado di assicurare la corretta segregazione cromosomica.

E' costituito da un core di un DNA satellite di 5 bp e trasposoni fiancheggiato da altre sequenze ripetute.

Ogni regione centromerica ha sequenze diverse di DNA ripetuto.

Mus musculus

I centromeri sono costituiti da sequenze di DNA ripetuto in tandem di 120 bp chiamato “*satellite minor*” che occupa ~ 300 Kb in ogni cromosoma ad eccezione del cromosoma Y in cui è assente.

Primati

DNA alfoide o α -satellite

Costituito da una sequenza di 171 bp ripetuta in tandem ~10.000 volte in tutti i centromeri dei primati incluso l' uomo. Il numero più basso di ripetizioni è presente nel cromosoma Y umano (~200Kb).

Nelle sequenze alfoidi un tratto di DNA è altamente conservato (54 bp) mentre la parte rimanente, più variabile, è diversa nei vari cromosomi.

Ogni cromosoma differisce nella parte variabile ed è così possibile riconoscere, mediante le sequenze alfoidi, i singoli cromosomi umani.

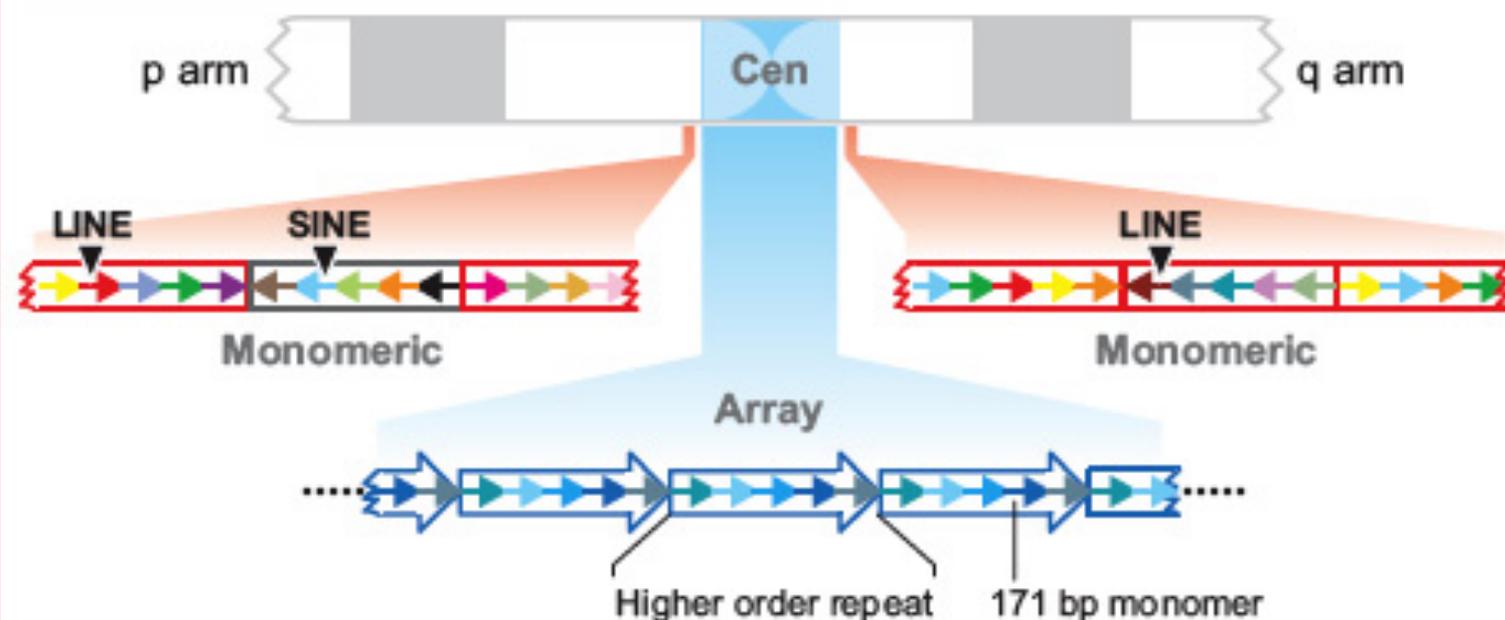


Figure 1

Centromeric (CEN) DNA organization. A typical human chromosome is schematically depicted, emphasizing the pericentromeric and CEN (*blue*) satellites in the ideogram. Each small arrow represents a single satellite monomer. In the pericentromeric regions, blocks of tandem satellite monomers from a single family (indicated by *red* versus *gray* boxes) occasionally contain embedded interspersed repetitive elements [e.g., long interspersed elements (LINEs) and short interspersed elements (SINEs)]. Adjacent satellite blocks can exist in the same or opposite orientations. In the CEN region, higher-order repeat units of α -satellite (this unit comprised of five monomers) are indicated with large blue arrows.

Figura basata
su dati derivati
da studi
riguardanti
l'evoluzione
del cr. X

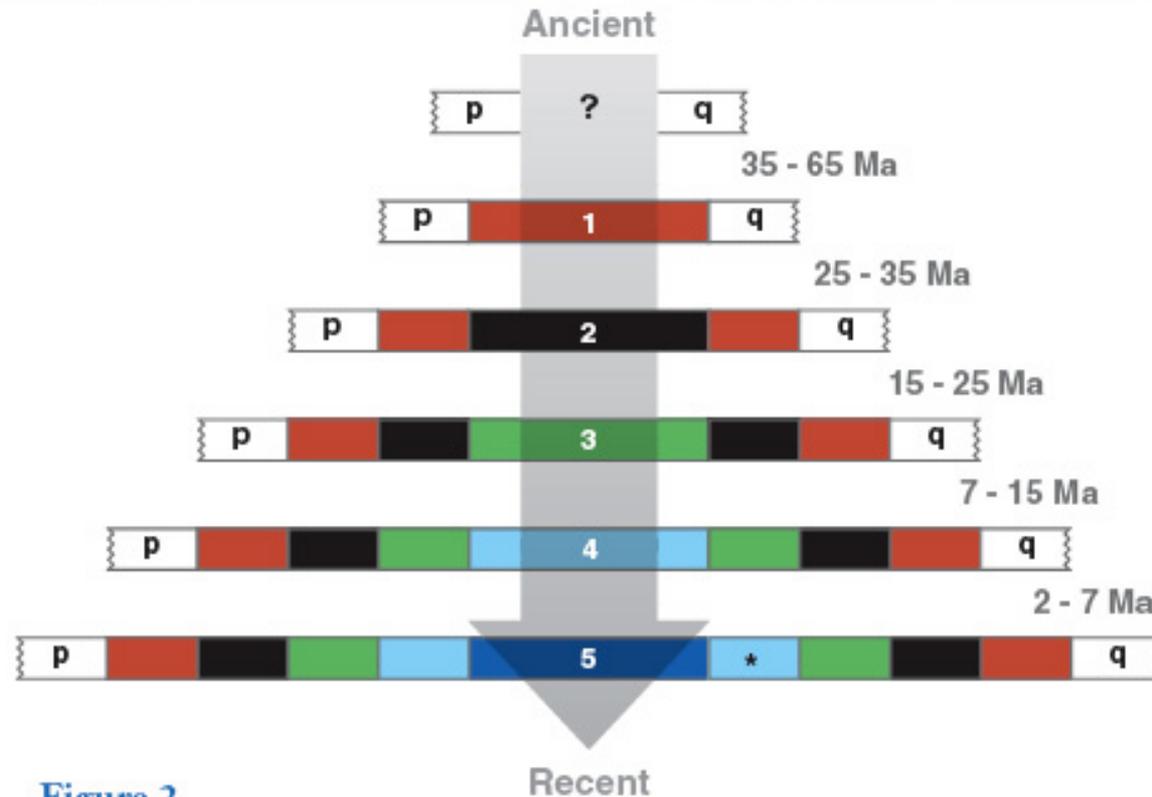


Figure 2

α -satellite DNA evolution: progressive proximal expansion. Successive additions (*colored rectangles*) to the centromere throughout primate evolution begin at the top of the image with an ancestral chromosome prior to α -satellite emergence and proceeding down through the image to the current human centromere. Each addition of new material moves previous centromeric DNA outward. An asterisk (*) indicates the region of monomeric α -satellite with centromere protein (CENP)-B boxes. The image is based on data from the human X chromosome (55). Approximate dates [millions of years ago (mya)] are derived from the primate tree (21) and from the phylogeny of L1 elements observed within the α -satellite sequences (55, 59).

Proteine centromeriche

La maggior parte delle informazioni sulle proteine centromeriche derivano dalla scoperta casuale nel 1980 di anticorpi anti-centromerici in pazienti affetti da un malattia autoimmune definita “**CREST**” [Calcinosi, Raynard’ s (spasmi vascolari), Esofago (perdita controllo muscolare di), Sclerodattilia (deformità delle dita), Telangiectasia (spot rossi sulla pelle)].

Sono state inizialmente identificate varie proteine (ad es. CENP-A, CENP-B, CENP-C CENP-G e CENP-H) specifiche per il centromero.

Tre hanno la capacità di legarsi al DNA e gli studi condotti hanno messo in evidenza il ruolo centrale svolto da CENP-A (proteina simile all'istone H3, chiamata talvolta CENH3) nella determinazione dell'identità centromerica.

Come il Centromero diventa Cinetocore

Le proteine centromeriche marcano il sito/siti sui cromosomi dove vengono reclutate le proteine del cinetocore.

- Centromero e cinetocore sono strutture dinamiche la cui composizione cambia in modo da riflettere le funzioni proprie dei specifici stadi del ciclo cellulare.
- Il centromero acquisisce la capacità di reclutare i componenti chiave del cinetocore che, a loro volta, attraggono proteine responsabili per il legame con i microtubuli e con gli aspetti sequenziali della regolazione mitotica.

Neocentromeri

Siti cromosomici che non contengono il DNA ripetitivo centromerico ma:

- ↳ acquisiscono le caratteristiche della cromatina centromerica,
- ↳ possono assemblare un cinetocore funzionale,
- ↳ reclutare le altre proteine centromeriche,
- ↳ essere trasmessi stabilmente in meiosi e mitosi.



The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 1946

H. J. Muller 1938, 1940

"for the discovery of the production of mutations by means of X-ray
irradiation"



Hermann Joseph Muller

Muller mediante esperimenti di irradiazione con raggi X in *Drosophila* dimostrò l'**impossibilità** di recuperare cromosomi con **delezioni terminali**.

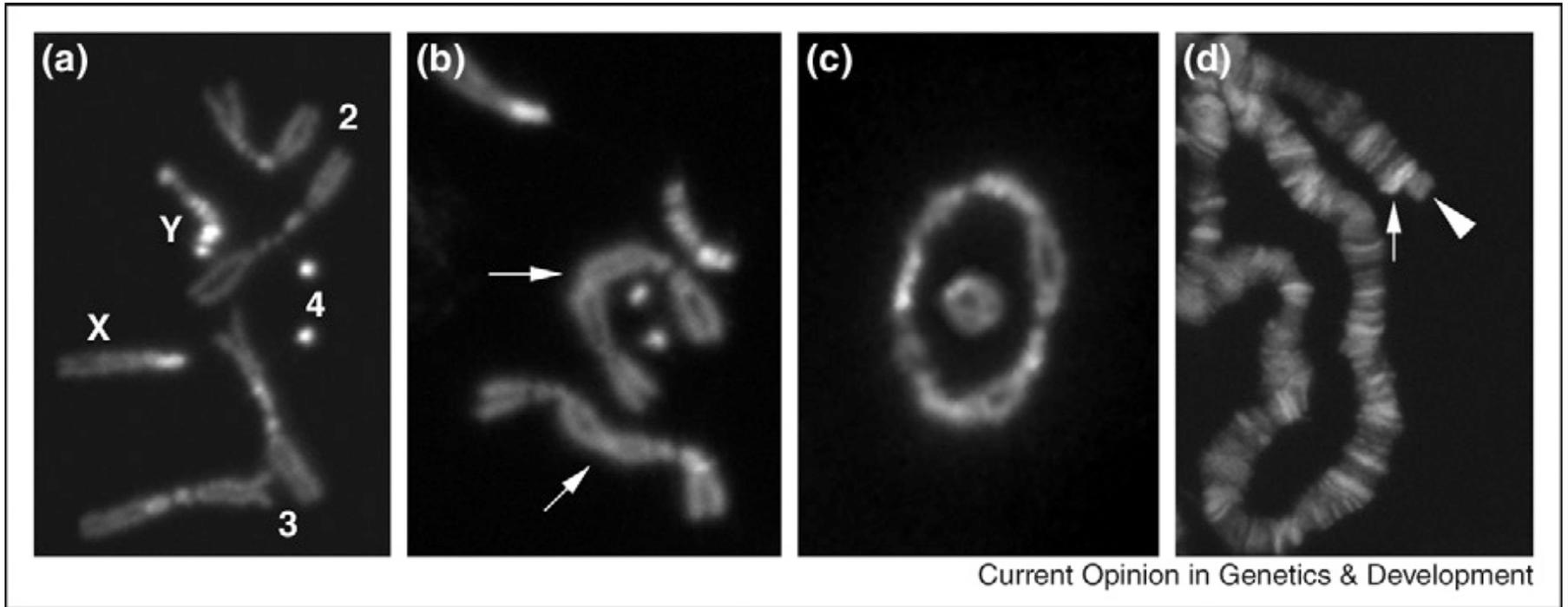
I cromosomi rotti recuperati erano sempre protetti da altri frammenti cromosomici.

Le **rottture cromosomiche indotte** da radiazioni **portavano i cromosomi a fondersi** mentre **le terminazioni naturali erano protette dalle fusioni e dai riarrangiamenti**.

Questa scoperta portò Muller alla elaborazione del concetto di **telomero** dalle parole greche:

TELOS (FINE) + MEROS (PARTE)

Fusioni telomeriche



TELOMERI

Studi citologici e genetici



definizione funzionale:

- » i cromosomi lineari con rotture terminali sono instabili



le estremità possono fondersi:

- » cromosomi dicentrici
- » cromosomi ad anello
- » etc

TELOMERI

Sono strutture complesse presenti alle estremità di tutti i cromosomi eucariotici lineari.

- * proteggono le estremità cromosomiche dalla degradazione e da eventi di fusione
- * permettono la replicazione completa dei cromosomi, compreso il ripristino di ripetizioni terminali semplici di caratteristica lunghezza

DNA TELOMERICO

I repeats telomerici di molte specie sono simili:

➤ diversi gruppi hanno la stessa unità ripetuta dei vertebrati (TTAGGG)

↳ possibile spiegazione

»»»▶ necessità delle sequenze telomeriche di funzionare come siti di legame di proteine per formare interazioni di basi non canoniche (G-quartet)

Tipo di organismo	Nome scientifico	Ripetizione telomerica (direzione 5' -> 3')
Vertebrati	<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Xenopus laevis</i>	TTAGGG
Funghi	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Physarum</i> , <i>Didymium</i>	TTAGGG
Protisti	<i>Dictyostelium discoideum</i>	AG(1-8)
Kinetoplastea (protozoi)	<i>Trypanosoma</i> , <i>Crithidia</i>	TTAGGG
Protozoi ciliati	<i>Tetrahymena</i> , <i>Glaucoma</i>	TTGGGG
	<i>Paramecium</i>	TTGGG(T/G)
	<i>Oxytricha</i> , <i>Stylonychia</i> , <i>Euplotes</i>	TTTTGGGG
Apicomplexa	<i>Plasmodium</i>	TTAGGG(T/C)
Piante superiori	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TTTAGGG
Alghe verdi	<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
Insetti	<i>Bombyx mori</i>	TTAGG
Anellidi	<i>Ascaris lumbricoides</i>	TTAGGC
Lieviti a scissione binaria	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTAC(A)(C)G(1-8)
Lieviti gemmanti	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TGTGGGTGTGGTG (da stampo RNA) o G(2-3)(TG)(1-6)T (sequenza consenso)
	<i>Candida glabrata</i>	GGGGTCTGGGTGCTG
	<i>Candida albicans</i>	GGTGTACGGATGTCTAACTTCTT
	<i>Candida tropicalis</i>	GGTGTAC[C/A]GGATGTCACGATCATT
	<i>Candida maltosa</i>	GGTGTACGGATGCAGACTCGCTT
	<i>Candida guilliermondii</i>	GGTGTAC
	<i>Candida pseudotropicalis</i>	GGTGTACGGATTTGATTAGTTATGT
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GGTGTACGGATTTGATTAGGTATGT	

Sequenze dei repeats telomerici in eucarioti

GRUPPO	ORGANISMO	SEQUENZA TELOMERICA
Vertebrati	<i>Homo sapiens, Mus musculus, Xenopus</i>	TTAGGG
Insetti	<i>Bombyx mori</i> <i>Drosophila</i>	TTAGG HeT-A TART retrotrasposoni TAHRE
Nematodi	<i>Ascaris lumbricoides,</i> <i>C.elegans</i> <i>Parascaris univalens</i>	TTAGGC TTGCA
Piante	<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
Alghe	<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
Ciliati	<i>Paramecium</i> <i>Oxytricha</i>	TTGGG(T/G) TTTTGGGG
Funghi filamentosi	<i>Neurospora</i>	TTAGGG
Lieviti	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	TTACC(A)(C)(G)₍₁₋₈₎ G₍₂₋₃₎ (TG)₍₁₋₆₎ T

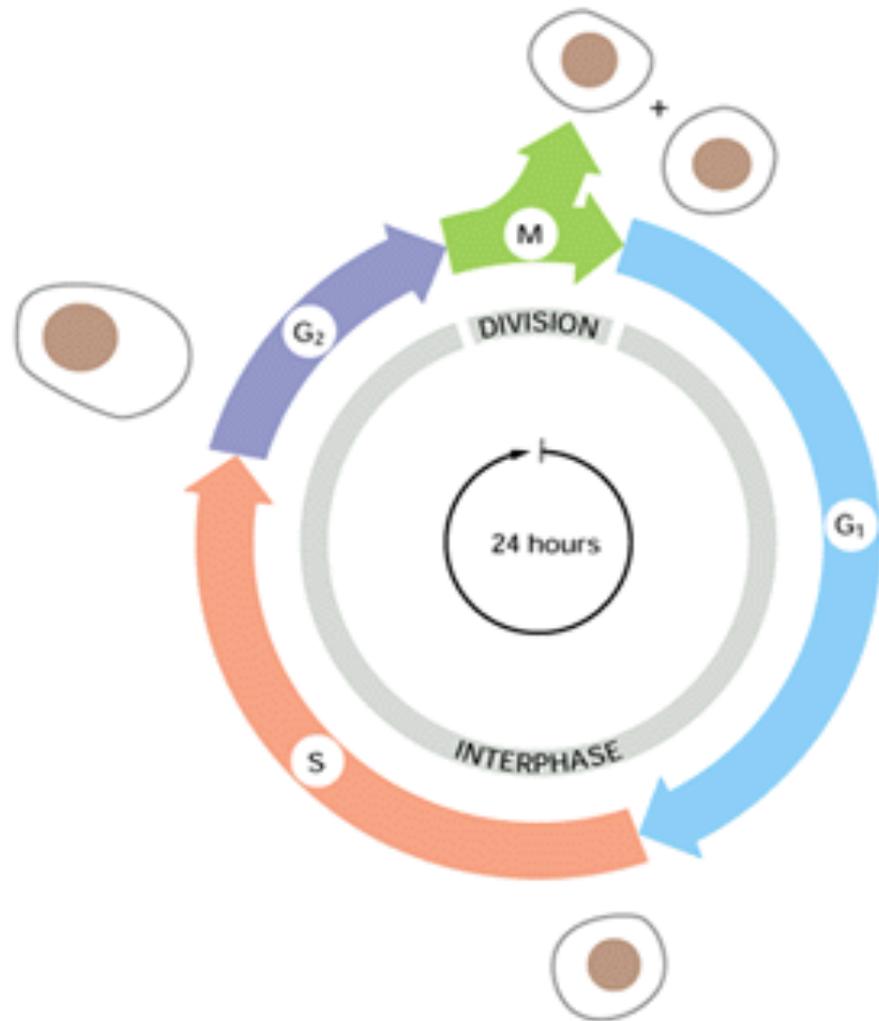
Ciclo cellulare

Serie ordinata di eventi che ha
come conseguenza la divisione
della cellula

Divisione cellulare: processo che dà origine a nuove cellule.

Avviene durante lo sviluppo embrionale, nella formazione dell'organismo adulto e nella vita adulta, dove circa 25 milioni di cellule al secondo sono soggette a divisione.

La divisione cellulare si inserisce nel ciclo cellulare, che corrisponde al periodo di vita della cellula.



Il ciclo cellulare: interfase e mitosi

Interfase: G1 (G=gap)

S (duplicazione del DNA)

G2

Nell'interfase la cellula cresce in volume ed è attiva nelle sue funzioni metaboliche, come l'ossidazione del glucosio, la trascrizione, la traduzione e la replicazione.

Nell'interfase avvengono gli eventi preparatori alla mitosi.

La sintesi proteica è sempre attiva, ma per esempio in S vengono sintetizzati soprattutto gli istoni.

La durata del ciclo varia molto, soprattutto nella lunghezza della fase G1. In una cellula adulta può durare da 12 a 36 ore, la differenza dipende dalla fase G1.

La fase G1 può durare ore, giorni, settimane o più a lungo a seconda del tipo cellulare.

Quando la fase G1 si protrae a lungo, si parla di Go, cioè una fase stazionaria di attesa.

L'ingresso da Go a G1 ed il passaggio da G1 a S richiede l'intervento di messaggi ambientali, chiamati mitogeni o fattori di crescita.

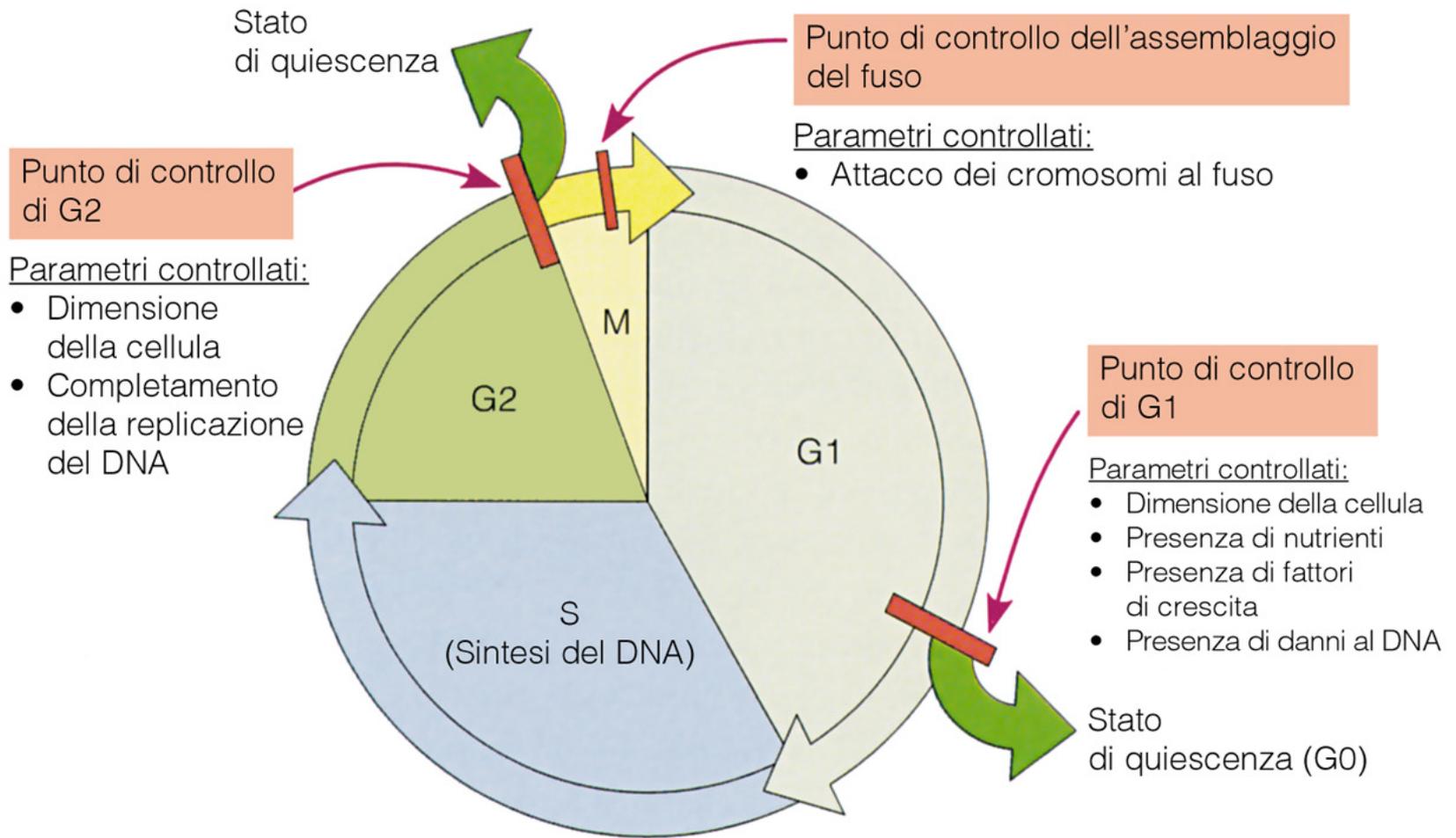
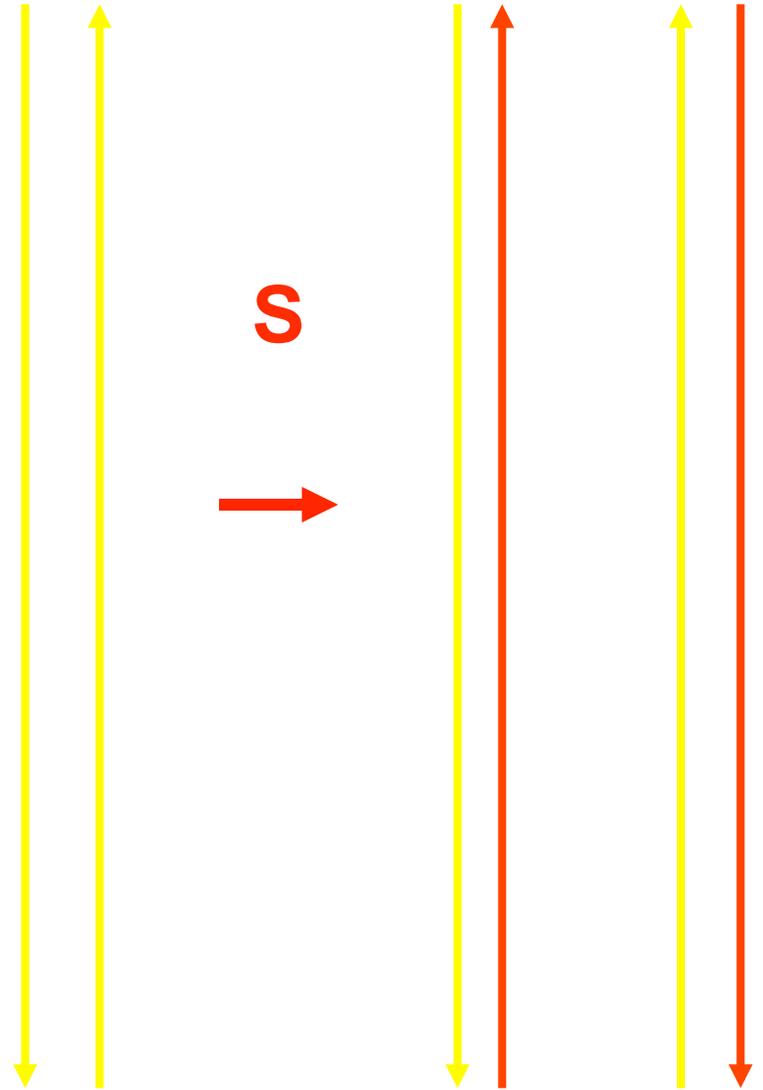
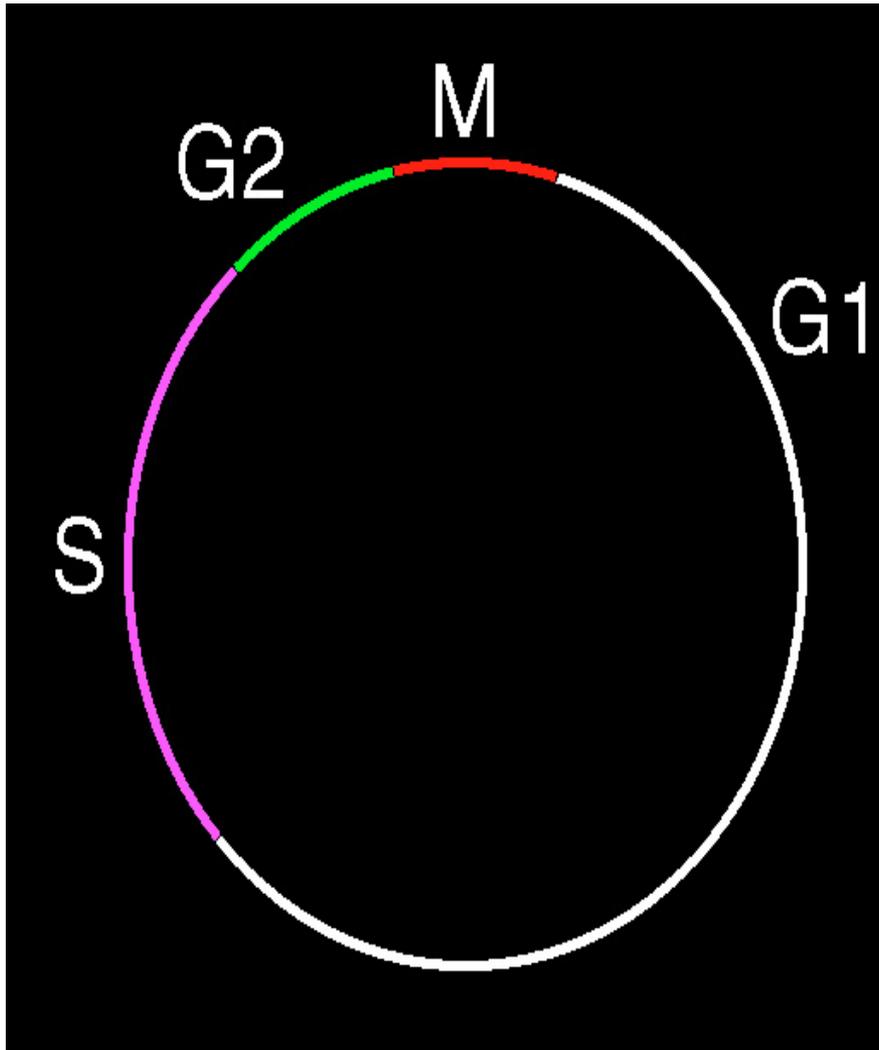


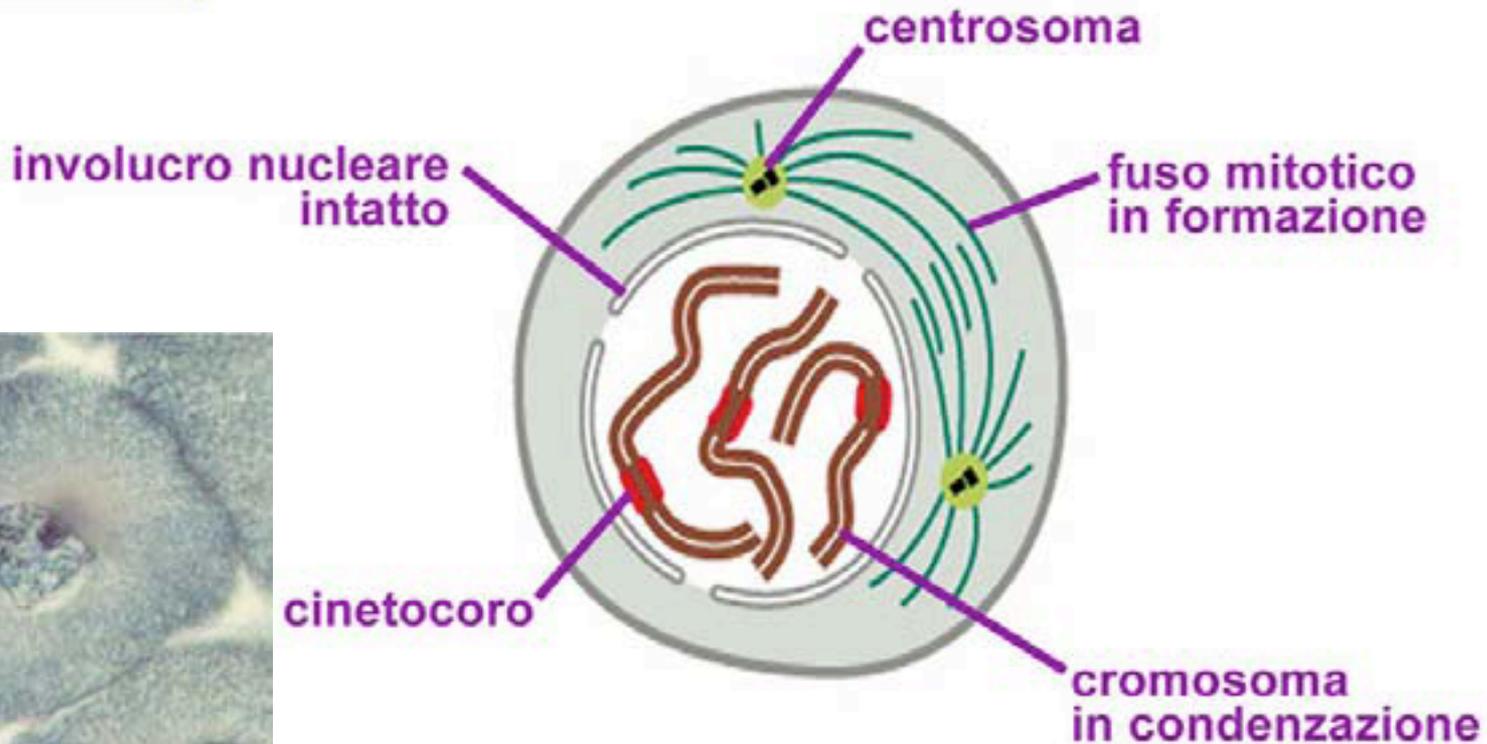
Figura 17-30

Duplicazione del DNA



I 6 STADI DELLA FASE M (MITOSI E CITOCHINESI)

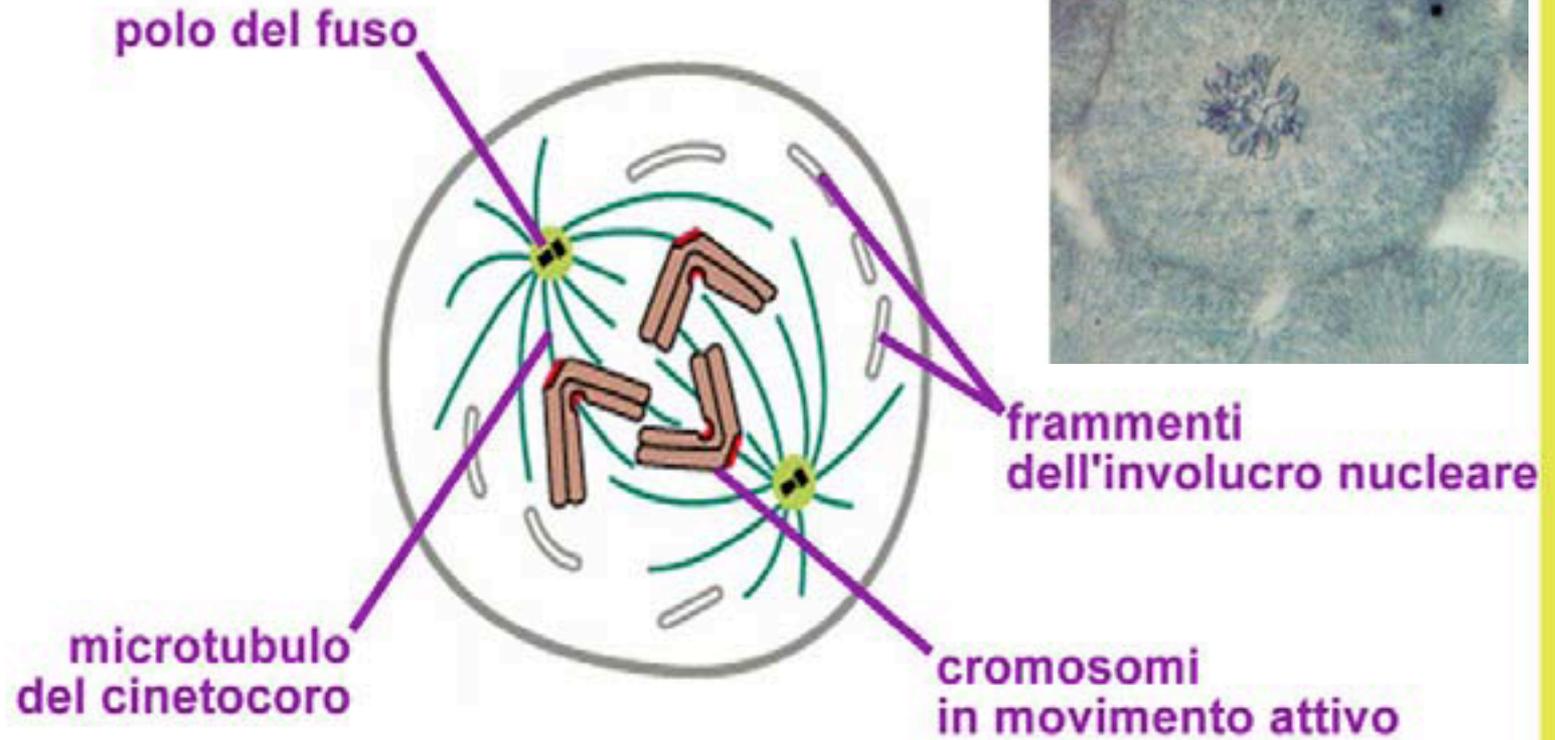
1 PROFASE



- si condensano i cromosomi replicati
- il fuso mitotico si autoassocia tra i due centrosomi

I 6 STADI DELLA FASE M (MITOSI E CITOCHINESI)

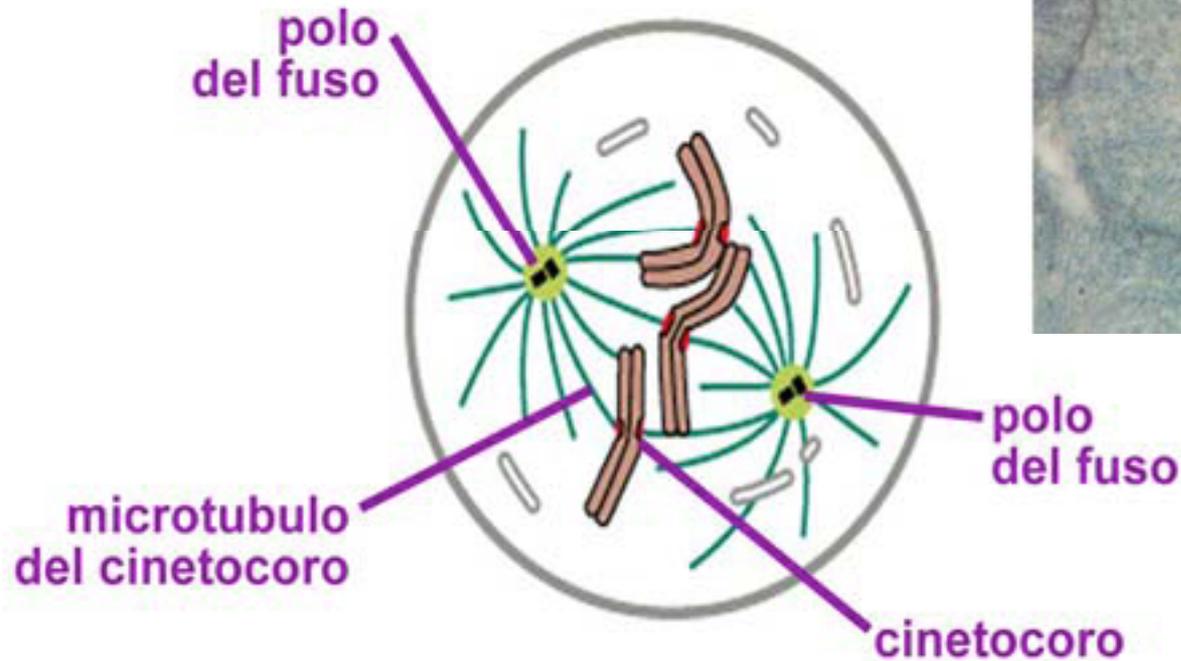
2 PROMETAFASE



- frammentazione dell'involucro nucleare
- i cromosomi si attaccano ai microtubuli del fuso tramite i loro cinetocori

I 6 STADI DELLA FASE M (MITOSI E CITOCHINESI)

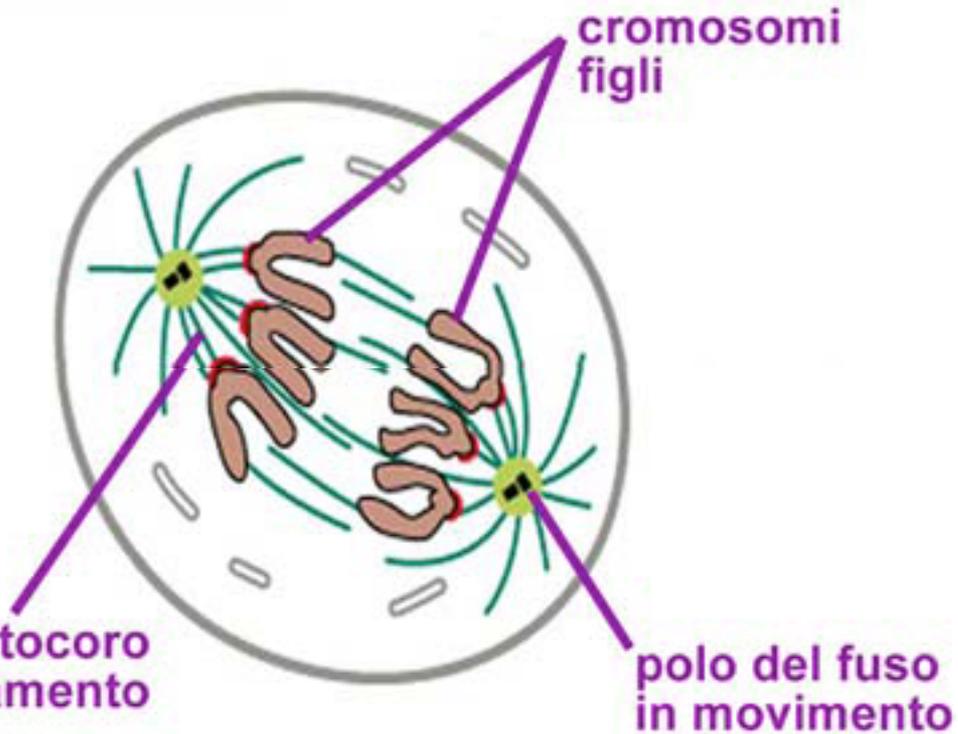
3 METAFASE



- i cromosomi si dispongono a metà strada tra i poli (equatore)

I 6 STADI DELLA FASE M (MITOSI E CITOCHINESI)

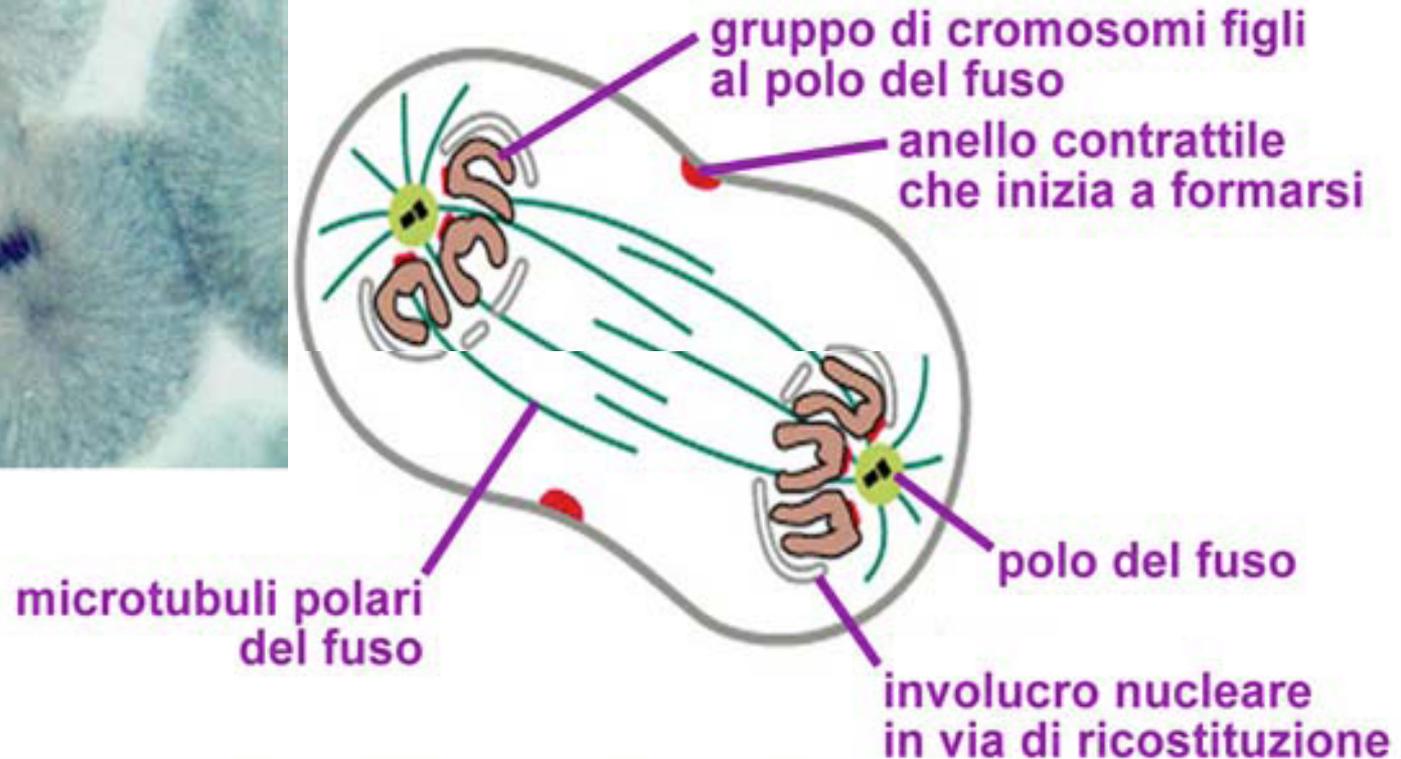
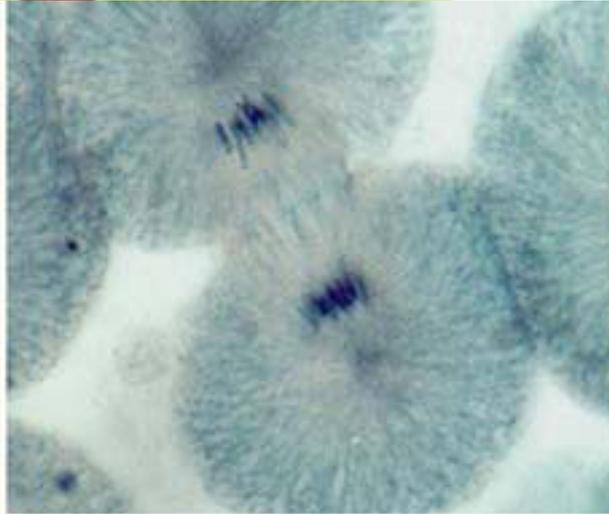
4 ANAFASE



- i cromatidi appaiati si separano dando luogo ai due cromosomi figli
- i cromosomi figli sono tirati verso i due poli del fuso
- i microtubuli del cinetocoro si accorciano e i poli si allontanano

I 6 STADI DELLA FASE M (MITOSI E CITOCHINESI)

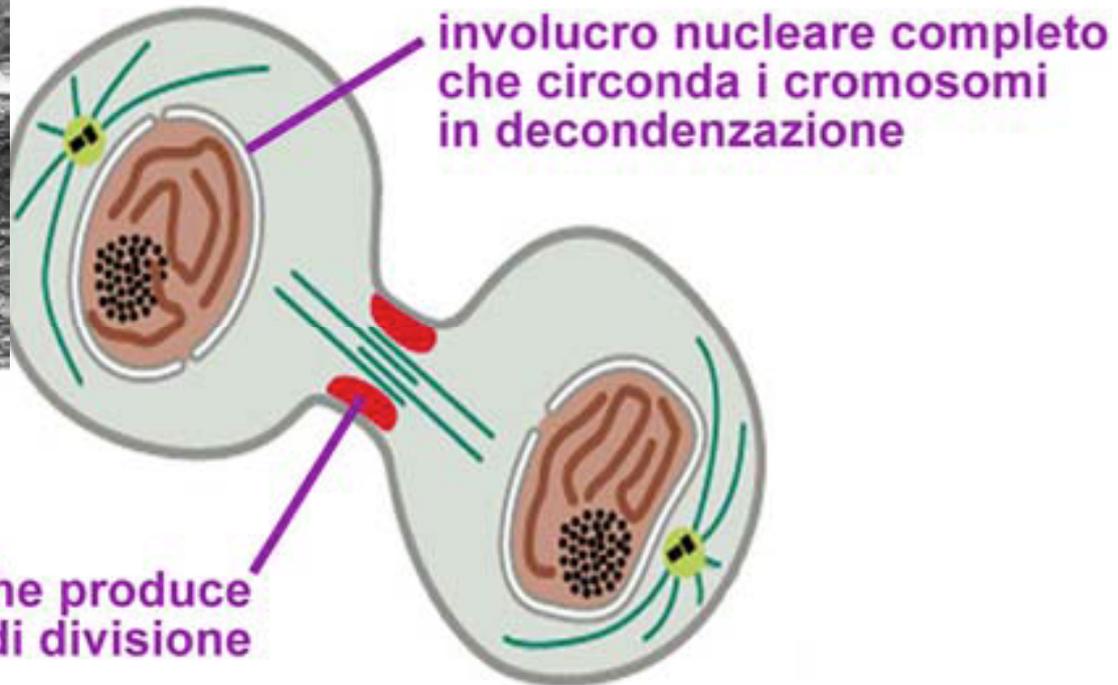
5 TELOFASE



- i due gruppi di cromosomi figli raggiungono i poli del fuso
- si costituiscono gli involucri nucleari dei due nuclei
- inizia la divisione del citoplasma con l'assemblaggio dell'anello contrattile

I 6 STADI DELLA FASE M (MITOSI E CITOCHINESI)

6 CITOCHINESI



involucro nucleare completo
che circonda i cromosomi
in decondenzazione

anello contrattile che produce
il solco di divisione

- la cellula animale si divide per mezzo dell'anello contrattile che crea una strozzatura