

NEOCENTROMERY. I. WYSTĘPOWANIE I STRUKTURA

NEOCENTROMERES. I. OCCURRENCE AND STRUCTURE

Maria Joanna OLSZEWSKA

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Neocentromery są strukturami w pełni aktywnymi w procesie separacji chromatyd i ich kierowania ku biegunom wrzeciona podziałowego podczas mitozy i mejozy. Nukleosomy chromatyny centromerowej zawierają białko CENP-A i jego homologi, będące wariantami histonu H3 i decydujące o tożsamości centromeru/neocentromeru. Neocentromery powstają w odległych, niecentromerowych strefach chromosomów i dlatego zawierają DNA inny niż centromerowy. Utworzenie centromeru może być odpowiedzią na dezaktywację endogennego centromeru. Neocentromery tworzą się zwykle w wyniku rearanżacji chromosomów, na ich fragmentach acentrycznych, dzięki czemu taki fragment może przemieszczać się prawidłowo do biegunów wrzeciona. Do 2004 r. u człowieka opisano 70 przykładów występowania neocentromerów powstałych w wyniku rearanżacji chromosomów. Szczególnie podatne na ich tworzenie są ramiona chromosomów 3q, 13q i 15q. Powstanie funkcjonalnych neocentromerów może być indukowane *in vitro* na minichromosomach ssaków oraz na ludzkich sztucznych chromosomach. Neocentromery tworzą się po wprowadzeniu do komórek w kulturach *in vitro* drogą transfekcji lub mikroiniekcji centromerowego DNA. U roślin prawdziwe neocentromery, tj. zawierające białko CENH3 (homolog CENP-A) oraz inne białka centromerowe i kinetochorowe, tworzą się w wyniku rearanżacji chromosomów. Nazwę „neocentromery” nadaje się niesłusznie dużym blokom heterochromatynowym, zwanym knobami, zawierającymi powtórzenia DNA o długości 350 pz i 180 pz. Knobys łączą się z mikrotubulami i szybko przesuwały się ku biegunom podczas anafazy II podziału mejozy. Knobys nie zawierają ani CENH3, ani jakichkolwiek białek centromerowych. W jądrach endopoliploidalnych, pozbawionych zdolności do podziałów mitotycznych, zwielokrotnieniu DNA centromerowego nie towarzyszy proporcjonalne zwiększenie poziomu CENH3. Neocentromery człowieka powstające w prążkach euchromatynowych zawierają, podobnie jak endogenne centromery chromosomu 8. u ryżu, sekwencje unikatowe. W przeciwieństwie do typowych centromerów zarówno w neocentromerach, jak i w regionach centromerowych u ryżu może zachodzić proces transkrypcji.

Słowa kluczowe: neocentromery, knobys, chromosomy dicentryczne, minichromosomy, sztuczne chromosomy.

Summary: The centromere is a highly specialized domain on a chromosome that controls the process of faithful sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. The common feature of the centromeric DNA is the presence of long tandem arrays in which the monomers are species-specific. Centromere identity is epigenetically determined by the presence of centromere protein CENP-A and its homologues,

*Praca finansowana z badań statutowych Uniwersytetu Łódzkiego nr 506/04996.

conserved histone H3 variants. Neocentromeres are the structures devoid of complete activity characteristic of centromeres. Neocentromeres originate from ectopic, noncentromeric region of a chromosome. It is possible that neocentromere formation depends on the inactivation of an endogenous centromere. Inactivation of endogenous centromere consists in loss of centromeric constitutive proteins, with exception of CENP-B (if present). In dicentric chromosomes formed by fusion of two chromosome arms belonging to the same chromosome, each bearing one centromere, therefore containing the same kind of centromeric DNA, the switching of the centromere activity seems to be due to epigenetic changes, e.g. as a result of histone hyperacetylation. Neocentromeres are formed mainly on acentric chromosome fragments, therefore such a chromosome behaves during mitosis and meiosis as a normal one. Despite the absence of centromeric DNA, neocentromeres are able to assemble all the centromere and kinetochore proteins. Human neocentromeres are formed mainly as a result of chromosome rearrangements, on chromosomal acentric arm fragments, but neocentromeres can also originate on unarranged chromosomes. Till 2004, 70 neocentromeres have been identified on human chromosomes. Non-random distribution of neocentromeres in the human genome has been observed. Disproportional number of neocentromeres is formed on 3q, 13q and 15q. Formation of centromere on 4q21 is not preceded by chromosome rearrangement. Formation of neocentromeres can be induced *in vitro* on mammalian minichromosomes and human artificial chromosomes (HACs). Upon introduction by transfection or microinjection of centromere DNA repeats into several kinds of cells, functional neocentromeres are formed. Neocentromeres on human minichromosomes and on HACs are formed after transfection of human centromeric alphoid DNA repeats containing CENP-B boxes elements into cells in tissue culture. In plants, true neocentromeres, i. e. devoid of CENH3 protein (homologue of CENP-A) and other centromere and kinetochore proteins, are similar to those described in human chromosomes. They are formed in response to chromosome rearrangements. The term of „neocentromere” is used also to denote the structures being large heterochromatic domains – knobs – that contain two kinds of DNA tandem repeats, 350 bp and 180 bp. Knobs associate with microtubules and move rapidly poleward during 2nd anaphase in meiosis and function together with an endogenous, true centromere. These structures contain neither CENH3, nor other centromeric proteins and are described in detail only in abnormal chromosome 10 in maize. In endopolyploid nuclei, unable to enter mitosis, in spite of proportional centromere DNA multiplication, the amount of CENH3 does not increase proportionally to the level of centromeric DNA. Human neocentromeres that originate on euchromatic bands of a chromosome, contain some unique sequences of DNA, similar to endogenous centromere of rice chromosome 8. Contrary to canonical endogenous centromeres, transcriptional competence has been demonstrated of both types of centromere, i. e. human neocentromeres and centromere of rice chromosome 8.

Key words: neocentromeres, knobs, dicentric chromosomes, minichromosomes, artificial chromosomes.

1. WSTĘP

Kompleks centromer/kinetochor decyduje o poprawnej segregacji siostrzanych chromatyd podczas anafazy mitozy i II podziału mejozy oraz chromosomów homologicznych podczas anafazy I podziału mejozy. Kompleks ten, obecny w chromosomach wszystkich Eukaryota, ze względu na jego rolę w wiernym przekazywaniu materiału genetycznego, został stosunkowo dobrze poznany (ref. [21, 22, 23]). Funkcja centromerów polega na montowaniu składników białkowych kinetochoru, połączeniu mikrotubul wrzeciona podziałowego, utrzymaniu i likwidacji kohezji siostrzanych chromatyd i ich przemieszczaniu do biegunów wrzeciona (ref. [17]).

Utrata centromeru w wyniku uszkodzenia chromosomu powoduje poważne zakłócenia w rozdzielaniu oraz przemieszczaniu siostrzanych chromatyd do jąder potomnych, co w konsekwencji prowadzi do zakłóceń w strukturze i funkcji genomu.

Powstanie neocentromeru jest więc swoistą odpowiedzią na sygnał SOS, ponieważ fragmenty chromosomów wyposażone w neocentromer są sprawnie przekazywane do jąder potomnych.

Neocentromer jest funkcjonalną strukturą powstałą spontanicznie jako odpowiedź na brak lub uszkodzenie endogennego (pierwotnego) centromeru lub indukowaną doświadczalnie w nowym regionie chromosomu, uprzednio pozbawionym centromeru. Najczęściej utworzenie neocentromeru jest konsekwencją aberracji chromosomowych, w wyniku których powstają fragmenty acentryczne, a wyjątkowo tylko – bez dostrzegalnych zakłóceń strukturalnych w chromosomie, co powoduje pojawienie się chromosomu dicentrycznego. Z reguły w chromosomach dicentrycznych centromer endogeny ulega dezaktywacji, co zapobiega uszkodzeniu takiego chromosomu podczas anafazy, zaś on sam jest meiotycznie i mitotycznie stabilny. Nieaktywny centromer w chromosomie dicentrycznym traci wszystkie białka centromerowe i kinetochorowe, z wyjątkiem CENP-B (o ile u danego gatunku to białko jest obecne).

W przeciwieństwie do białek kompleksu centromer/kinetochor, DNA centromerowy nie ma charakteru konserwatywnego. Ma on układ sekwencji typowy dla heterochromatyny, tj. zbudowany z sekwencji ułożonych tandemowo, przy czym długość monomerów wynosi np. u człowieka 171 pz, u rośliny *Arabidopsis thaliana* – 178 pz. Sekwencje te są bogate w AT. Jednak rodzaj DNA nie decyduje o tożsamości centromerów, ponieważ neocentromery tworzą się na rozmaitych sekwencjach DNA, często na odcinkach euchromatynowych chromosomów, o czym świadczą wyniki analizy DNA w neocentromerach u człowieka (ref. [11]) i u *Drosophila* (ref. [2]).

O tożsamości centromerów decyduje obecne w nukleosomach chromatyny centromerowej konserwatywne białko CENP-A i jego homologi, będące wariantem specyficznym gatunkowo histonu H3 (ref. [24]). Zatem kluczowym i podstawowym procesem warunkującym powstanie neocentromeru jest nabycie tego białka. CENP-A i jego homologi stanowią więc epigenetyczne piętno centromeru. Tetramery CENP-A-H4 mają strukturę bardziej zwartą i sztywną niż tetramery H3-H4 (ref. [11]). Obecność CENP-A warunkuje przyłączenie innych białek z grupy konstytutywnych (tj. obecnych podczas całego cyklu komórkowego) – CENP-C i CENP-I oraz montowanie kinetochoru, polegające na przyłączaniu białek fakultatywnych (syntetyzowanych w późnej fazie G2 lub we wczesnej profazie). Liczba poznanych fakultatywnych białek kinetochorowych stale się zwiększa; jest ich co najmniej kilkadziesiąt i są one również konserwatywne. Ich funkcja polega na pośredniczeniu między chromosomem poprzez centromer a mikrotubulami wrzeciona podziałowego, regulacji punktu kontrolnego anafazy dzięki usunięciu kohezji między siostrzanymi chromatydami (ref. [22, 23]). Neocentromery są wyposażone we wszystkie te białka, co zostało dowiedzione metodami immunocytochemicznymi.

Heterochromatyna przycentromerowa (pericentromerowa) jest stałym składnikiem regionu centromerowego u wyższych Eukaryota. Obecność heterochromatyny sprzyja wzbogaceniu w kohezynę w tym miejscu i utrzymania jej aż do separacji siostrzanych chromatyd, tj. inicjacji anafazy (ref. [2, 22]).

Współczesny stan wiedzy o tworzeniu neocentromerów nie daje odpowiedzi na pytanie, co jest czynnikiem determinującym miejsce, w którym jest montowany kompleks neocentromer/kinetochor, ani w jaki sposób chromatyna z CENP-A jest ograniczana tylko do locus neocentromerowego oraz czy i w jaki sposób DNA stanowiący podłoże neocentromeru uczestniczy w tych procesach. Jak dotąd, mechanizm kierujący CENP-A do nowego genomowego miejsca podczas montowania neocentromeru nie jest znany [17].

Powstanie neocentromerów w wyniku aberracji chromosomowych ma miejsce w genomie człowieka i powoduje szczególnie poznane stany patologiczne [27]. Informacji o neocentromerach brak jest w polskich podręcznikach dotyczących cytogenetyki zarówno człowieka [3], jak i zwierząt domowych [26]. Neocentromery są uwzględnione jedynie w podręczniku cytogenetyki roślin [18]. Okoliczność ta stanowiła zachętę do szerszego omówienia stanu wiedzy o tych strukturach.

2. WYSTĘPOWANIE I STRUKTURA NEOCENTROMERÓW

U roślin neocentromery są bardzo rzadkim zjawiskiem, stąd literatura ich dotycząca jest bardzo skąpa. Głównym źródłem informacji o neocentromerach są badania przeprowadzone na chromosomach człowieka.

2.1. Neocentromery u roślin

U roślin wyższych wyróżnia się dwie kategorie neocentromerów: te, które są podobne do typowych neocentromerów zbadanych głównie u człowieka oraz występujące wyłącznie u roślin struktury, które nie powinny być zaliczane do neocentromerów, ponieważ brak jest w nich białka CENH3 (homolog CENP-A u roślin). Typowe neocentromery powstają w wyniku indukowanych aberracji chromosomowych [20]. Druga kategoria, aczkolwiek zaliczana przez wszystkich autorów do neocentromerów, nie powinna być tak klasyfikowana, ponieważ struktury te są pozbawione wszelkich białek kompleksu centromer/kinetochor; ich aktywność „neocentromerowa” ujawnia się tylko podczas mejozy w dużych skupieniach heterochromatynowych, zwanych knobami (ang. *knob*).

W wyniku aberracji w chromosomie 7H u jęczmienia (indukowanej przez tzw. system gametobójczy, tj. krzyżówek międzyrodzajowych między jęczmieniem – *Hordeum vulgare* a pszenicą) otrzymano izochromosom krótkiego ramienia, w którym nie było sekwencji DNA typowych dla centromerów jęczmienia (retroelementy *cereba* z grupy *gypsy* i sekwencja satelitarna AGGGAG). Mimo braku tych sekwencji, chromosomy takie były stabilnie przekazywane kolejnym pokoleniom, ponieważ w strefie zawierającej przycentromerową heterochromatynę chromosomu 7H znajdowały się białka centromerowe – CENH3 i CENP-C. Natomiast translokacja centromerowych powtórzeń jęczmienia (AGGGAG)_n do chromosomu pszenicy nie generowała dicentrycznego chromosomu ([20] ref. [8]).

W wyniku aberracji mogą powstawać chromosomy dicentryczne (por. 2.3). U kukurydzy są one stabilne, ponieważ tylko jeden centromer jest funkcjonalny. W przypadku dicentryków powstałych w drodze fuzji centrycznych fragmentów chromosomów A i B, nieaktywny staje się centromer z chromosomu B, czego dowiedziono poprzez wykazanie obecności białka CENH3 tylko w centromerze z chromosomu A. Oba centromery zawierają sekwencje DNA (CentC i CRM) specyficzne dla centromerów kukurydzy [10]. W obrębie chromosomów B, poza normalnie funkcjonującym centromerem, znajdują się regiony, zawierające te specyficzne dla centromerów kukurydzy powtórzenia sekwencji DNA (należące do grupy retroelementów Ty3/gypsy) [15].

W liniach kukurydzy bez knobów zwanych KTF (ang. *Knobless Tama Flint*) wykryto wersję chromosomu 8. z dwoma regionami centromerowymi, z których jeden znajdował się w pierwotnej pozycji, a drugi na powstałym w wyniku translokacji długim ramieniu. Aktywny okazał się tylko ten drugi centromer [15].

Knoby są stosunkowo dużymi, silnie barwiącymi się skupieniami heterochromatyny, położonymi zwykle terminalnie lub rzadziej centrycznie w obrębie chromosomu. Funkcjonowanie aktywnych knobów ma miejsce tylko podczas mejozy; wówczas tworzą wypustki chromatyny skierowane ku biegunom wrzeciona i łączą się z jego mikrotubulami. Są obecne razem z normalnym centromerem. W konsekwencji, chromosomy wyposażone w aktywne knoby zachowują się jak dicentryki podczas mejozy, zaś w mitozie funkcjonują tylko normalne centromery. Aktywne knoby uczestniczą w zjawisku zwanym „*meiotic drive*”; tym terminem określa się odchylenie od mendlowskiej segregacji w heterozygotach. „*Meiotic drive*” jest procesem faworyzującym szybsze przemieszczanie się chromatydy wyposażonej w aktywny knob podczas anafazy II podziału mejozy. U roślin dotyczy to tej przyszej megaspory, z której rozwinię się woreczek zalążkowy. U kukurydzy aktywny knob przemieszcza się znacznie szybciej niż normalne centromery, wskutek czego chromatyda z knobem wysuwa się na czoło grupy chromosomów podczas anafazy (ref. [9]). Poza kukurydzą funkcjonujące podczas mejozy knoby zostały opisane u żyta (ref. [22]); ponadto ich obecność zastała stwierdzona u kilkunastu gatunków roślin okrytozalążkowych i krzyżówek międzyrodzajowych (ref. [12]).

Najlepiej poznano strukturę i funkcjonowanie knobów u kukurydzy. Są one obecne w liniach zawierających nienormalny chromosom 10. (Ab10). W liniach z normalnym chromosomem 10. (N10) knoby są nieaktywne. Powstanie Ab10 jest spowodowane przez liczne rearanżacje N10, w wyniku których Ab10 jest od niego dłuższy. Polimorfizm Ab10 wyklucza crossing-over, tworząc haplotyp. Chromosom Ab10 jest stworzony z czterech odmiennych domen, zlokalizowanych terminalnie: segmentu z trzema małymi knobami, centralnej euchromatyny, knobu K1OL i distalnego szczytu. DNA trzech małych knobów jest zbudowany głównie z powtórzeń TR-1 (monomery długości 350 pz), zaś duży knob K1OL zawiera dodatkowo powtórzenia sekwencji DNA o długości 180 pz (ref. [9]). Aktywne knoby w Ab10 pozbawione są białek centromerowych i kinetochorowych (ref. [9,12]). Liczba powtórzeń monomerów w poszczególnych knobach jest różna, przy czym znajdują się one w dwóch oddzielnych domenach. Dzięki zastosowaniu metody FISH można było prześledzić

kształt, jaki przybierają knoby w Ab10 podczas anafazy II mejozy. Powtórzenia TR-1 układają się, począwszy od metafazy II, równoległe do osi wrzeciona podziałowego, tworząc wypustki skierowane ku biegunom. Porównanie liczby takich układów z udziałem sekwencji 180 pz i TR-1 wskazuje, że powtórzenia TR-1 są częstsze, co jest interpretowane jako większe powinowactwo do mikrotubul, z którymi się łączą (ref. [9]). „Neocentromerowa” aktywność powtórzeń 180 pz i TR-1 jest kontrolowana niezależnie przez odrębne loci w Ab10. W wyniku analizy mutantów z delecjami Ab10-Df(I) (część przylegająca do powtórzeń TR-1) i Ab10-Df(K) (część przylegająca do powtórzeń 180 pz), tj. delecji sekwencji w strefie rozdzielającej układy TR-1 i 180 pz wykazano, że aktywność „neocentromerowa” układów z powtórzeniami 180 pz była znacznie zredukowana w liniach delecyjnych. Natomiast taxol (uszkadzający mikrotubule) nie powoduje mierzalnej redukcji aktywności tych „neocentromerów” [12].

Podczas endoreplikacji DNA w bielmie kukurydzy następuje proporcjonalne zwielokrotnienie DNA zarówno normalnych centromerów, jak i knobów, mimo że endopoliploidalne komórki nie są zdolne do podziałów mitotycznych [5]. Mimo zwielokrotnienia DNA centromerowego, ilość specyficznego centromerowego białka CENH3 w jądrach endopoliploidalnych osiąga zaledwie ok. 28% poziomu oczekiwanego na podstawie poziomu ploidalności [16].

2.2. Neocentromery u człowieka

Neocentromery są rzadką aberracją w chromosomach człowieka. Polega ona na tworzeniu nowego centromeru w miejscu nie-centromerowym. Powstanie neocentromerów we fragmentach acentrycznych sprzyja ich mitotycznej stabilności. Neocentromery mogą pojawiać się w chromosomach, które nie uległy rearanzacji. U człowieka obecność spontanicznie powstałych neocentromerów w chromosomach, które nie uległy rearanzacji, stwierdzono w 4q21 [1] oraz w 10q25 i 20q12 [7, 27]. W takich dicentrykach jeden centromer ulega dezaktywacji.

Do 2001 r. zidentyfikowano u człowieka ok. 70 przykładów występowania neocentromerów, pochodzących z 19 rozmaitych chromosomów, które powstały w wyniku aberracji. Neocentromery tworzą się w wyniku aberracji chromosomowych typu delecji pericentrycznych i paracentrycznych, inwersji, duplikacji i terminalnych delecji. Pericentryczne delecje polegają na wycięciu fragmentu centrycznego, zawierającego endogenne centromer i fuzji dwóch acentrycznych fragmentów, które dzięki powstaniu neocentromeru są sprawne w anafazie. Delecje paracentryczne polegają na wycięciu acentrycznego fragmentu chromosomu, wytworzeniu na nim neocentromeru i fuzji z acentrycznym fragmentem. W przypadku duplikacji odwrotnej zachodzi inwersja i duplikacja części chromosomu, w wyniku czego powstaje fragment centryczny z centromerem endogenным, zaś na jednym z ramion zduplikowanego fragmentu tworzy się neocentromer [27]. W pewnych przypadkach w wyniku rearanzacji mogą być wytworzone w niearanżowanych chromosomach neocentromery w pozycji znacznie oddalonej (ektopowej) od endogenne centromeru, w wyniku czego powstaje neodicentryczny chromosom, w którym endogenne centromer ulega dezaktywacji [27].

Częstotliwość powstawania aberracji i tworzenia neocentromerów nie wydaje się być przypadkowa. W niektórych chromosomach i pewnych domenach występuje szczególnie nasilenie tworzenia neocentromerów. Są to 3q, 13q i 15q, ale także 4q21 oraz 8p23; ten ostatni w wyniku zduplikowanych inwersji. W chromosomie 4. neocentromer może powstawać bez rearanżacji; w tym przypadku następuje dezaktywacja endogennego centromeru (por. niżej i ref. [27]).

Bliższa analiza chromosomu 15. z odmiennymi punktami pęknięć – 15q24.1 i 15q25.3, których wynikiem była zduplikowana inwersja (*invdup*), neocentromery powstają w linii granicznej między pojedynczą kopią i zduplikowanym DNA, co sugeruje, że powodem preferencyjnego powstania w tym miejscu neocentromeru może być naprawa DNA. Jednak w większości przypadków tworzenie neocentromerów zachodzi daleko od miejsca rearanżacji chromosomów, jak również oddalonych od endogennych centromerów (ref. [27]).

Sz szczególnie wysoka liczba neocentromerów w 13q zachęciła badaczy do bliższej analizy siedmiu przypadków neocentromerów powstających w 13q32. Jest to w normalnym chromosomie prążek euchromatynowy, zachowany w chromosomie utworzonym w wyniku inwersji i duplikacji (*invdup*). Stosunkowo wysoka częstotliwość pojawiania się neocentromerów w tym prążku sugeruje, że stanowi on „hotspot” dla tworzenia neocentromerów (powstaje tylko jeden, mimo że oba ramiona są identyczne). Przeprowadzono badania z zastosowaniem metody ChIP (ang. *Chromatin Immunoprecipitation*) z użyciem przeciwciał przeciwko CENP-A i DNA z prążka 13q32. Okazało się, że domena chromatyny z nukleosomami zawierającymi CENP-A w każdym z badanych neocentromerów w 13q32 zajmuje obszar 215 kpz, 130 kpz i 275 kpz, znajdujących się w domenie długości ok. 6,5 Mpz. Te trzy domeny wiążące CENP-A były rozdzielone przez regiony długości odpowiednio ok. 5 Mpz i 1 Mpz. Wyciągnięto z tych wyników wniosek, że 13q32 nie zawiera sekwencji, która by wyjaśniała „hotspot” dla neocentromeru [27]. Takimi samymi metodami uzyskano analogiczne wyniki w odniesieniu do 10q25 i 20p12. Nie wykryto jakichkolwiek konserwatywnych motywów ani homologii do centromerowych sekwencji DNA typu α -satelitarnych DNA, ani tandemowych układów DNA. Jedyłą wspólną cechą charakterystyczną dla DNA, na którym budowane są neocentromery, jest bogactwo AT oraz względnie niska zawartość sekwencji powtarzalnych typu SINE (ang. *Short Interspersed Elements* albo *Short Interspersed Nuclear Elements*), tj. tych cech charakteryzujących endogenne centromery człowieka (ref. [27]).

Bliższej analizie został poddany również pseudodicentryczny neocentryczny wariant chromosomu 4. u człowieka – PD-NC4 (ang. *PseudoDicentric-Neocentric Chromosome 4*) [1]. Mimo powstania neocentromeru w ramieniu q, chromosom ten jest mitotycznie i mejotycznie stabilny. Powstanie pseudodic(4)(q21.3;p10) nie było poprzedzone przez zmiany strukturalne (rearanżacje) w obrębie tego chromosomu. Badaniom metodami cytogenetyki molekularnej zostały poddane chromosomy PD-NC4 z linii komórkowej limfoblastów uzyskanych od osobników dotkniętych tą aberracją chromosomu 4. Wyniki FISH wykazały – podobnie jak w przytoczonych wyżej przypadkach – brak jakiegokolwiek sygnału świadczącego o obecności w neocentromerach α -satelitarnego DNA oraz silny sygnał z tą samą sondą w

endogennym centromerze w 4p10. Białka CENP-A, CENP-C, CENP-E, CENP-I i BUB1 były obecne wyłącznie w neocentromerze, natomiast CENP-B – tylko w nieaktywnym endogennym centromerze. Jest to spowodowane omówioną niżej (por. 3) obecnością specyficznego dla CENP-B motywu w α -satelitarnym DNA, niezależnie od stanu funkcjonalnego centromeru. Białko heterochromatynowe HP1 jest obecne zarówno w aktywnym neocentromerze, jak i w nieaktywnym endogennym centromerze. Region, w którym powstał neocentromer, zawiera 11 znanych i 4 domniemane geny i jest wzbogacony w AT (61,2%). Zahamowanie deacetylacji nie przywraca nieaktywnemu centromerowi zdolności do funkcjonowania. Chromosom PD-NC4 jest przekazywany mejotycznie bez jakichkolwiek zakłóceń kariologicznych lub fenotypowych, co świadczy o tym, że powstanie neocentromeru przy jednoczesnej dezaktywacji endogennego centromeru mogło mieć miejsce podczas ewolucji i specjacji [1].

Integralnym składnikiem regionu centromerowego jest heterochromatyna przycentromerowa. Jej charakterystyczną cechą, poza rodzajem DNA, jest znaczny stopień kondensacji, uwarunkowany obecnością białka HP1 i metylacją lizyny 9. w histonie H3 [24]. HP1 znajduje się w neocentromerze chromosomu 13., aczkolwiek w nieznacznych ilościach [27] i 4. [1], natomiast metylacja lizyny 9. w histonie H3 nie została dotąd dowiedziona w sposób niebudzący wątpliwości. Ilość przycentromerowej heterochromatyny wydaje się być znacznie mniejsza w neocentromerach w porównaniu z endogennymi centromerami. O nieznacznej ilości heterochromatyny w regionie centromerowym świadczy również fakt, że aktywność transkrypcyjna genów znajdujących się w neocentromerze 10q25 jest taka sama jak w normalnym chromosomie 10. (ref. [27]). Trzeba jednak przypomnieć, że w centromerze chromosomu 8. u ryżu znajdują się przynajmniej 4 geny, które ulegają ekspresji [19]. Wyniki badania preferencji miejsca wytwarzania neocentromerów wskazują, że powinowactwo chromatyny z CENP-A było obniżone w tych regionach, które zawierały wysoko acetylowane histony H3 i H4, co jest charakterystyczne dla chromatyny aktywnej transkrypcyjnie (ref. [24, 27]).

Porównanie centromerów i neocentromerów na przykładzie człowieka wskazuje na kilka zasadniczych różnic. Podstawową jest brak w neocentromerach nie tylko powtarzalnych układów sekwencji α -satelitarnego DNA, ale brak jakichkolwiek sekwencji powtarzalnych. Okres replikacji centromerowego DNA przypada na środkową i późną fazę S; tak samo jest w przypadku neocentromeru na obszarze ok. 450 kpz, zaś po jego utworzeniu obszar ten zwiększa się do 1500 kpz. Heterochromatyna przycentromerowa zarówno w centromerach endogennych, jak i w neocentromerach zawiera białko HP1a, ale w neocentromerach chromatyna skondensowana przycentromerowa jest znacznie mniejszych rozmiarów, a obecność w niej zmetylowanej lizyny 9. w histonie H3 jest wątpliwa (ref. [1, 7, 27]).

2.3. Mechanizmy dezaktywacji centromerów

Mechanizmy dezaktywacji centromerów badano w różnych typach chromosomów dicentrycznych, powstających w systemie Pushmi-Pullyn somatycznych

hybrydach komórkowych mysz-człowiek. Uzyskano 3 klony dicentrycznych ludzkich chromosomów: 1 – takie, w których jeden z dwóch genetycznie identycznych centromerów jest trwale nieaktywny; 2 – funkcjonalnie dicentryczne chromosomy, w których oba centromery są trwale aktywne; 3 – dicentryczne chromosomy heterogenne pod względem aktywności centromerów [13]. Dicentryczne chromosomy pierwszego typu powstały z krótkiego ramienia ludzkiego chromosomu X, idic(Xp), a zatem ramiona stanowią lustrzane odbicie i zawierają genetycznie identyczne centromery. Ich α -satelitarny DNA nie wykazywał zmian w porównaniu z DNA centromerowym wyjściowych chromosomów X. Wykazano, poprzez obecność CENP-A i CENP-E, że aktywność centromerów w tych trzech typach chromosomów jest zwykle dziedziczona klonalnie. Wygaszanie aktywności centromerów następuje w wyniku modyfikacji epigenetycznych.

Okres replikacji DNA w aktywnych i nieaktywnych centromerach jest taki sam, co wskazuje, że ten czynnik nie uczestniczy w dezaktywacji centromeru. Podobnie brak jest różnic w acetylacji lizyny 12. w histonie H4 w aktywnych i nieaktywnych centromerach, natomiast zahamowanie deacetylacji (przez inkubację ze specyficznym inhibitorem deacetylacji TSA) może zakłócić aktywność centromerów, ponieważ histony H3 i H4 są hypoacetylowane, z niektórymi wyjątkami dotyczącymi H3K9 i H4K16 [ref. 24]. Jednak oba centromery w badanych chromosomach dicentrycznych wykazują tę właściwość. Wprawdzie nieaktywny centromer nie wydaje się być hyperacetylowany, ale dezaktywacja centromeru może być indukowana przez TSA. Autorzy są zdania, że procesy niezbędne dla dezaktywacji mogą zachodzić w specyficznych punktach cyklu komórkowego [13].

Nieaktywny endogenne centromer w dicentrycznym chromosomie 4. u człowieka (DC-NC4, por. 2.2) poza brakiem białek centromerowych i kinetochorowych (CENP-A, CENP-I, CENP-E i BUB1) charakteryzuje się obecnością CENP-B, co się tłumaczy istnieniem w α -satelitarnym DNA (którego brak jest w neocentromerach) motywu sekwencyjnego wiążącego to białko. Poziom acetylacji histonu H4 w komórkach traktowanych TSA był większy o 62–1119%, w zależności od trwania inkubacji z tym inhibitorem. Nawet po pięciu dniach działania TSA, w nieaktywnym endogennym centromerze nie było wiązane CENP-A, z czego wyciągnięto wniosek, że zahamowanie acetylacji nie przywraca nieaktywnemu centromerowi zdolności do funkcjonowania [1].

Dla wyjaśnienia mechanizmów, warunkujących dezaktywację endogenne neocentromeru w PD-NC4, zaproponowano dwa modele. W jednym z nich zakłada się zmiany w DNA, w drugim – udział czynników epigenetycznych. W pierwszym przyjęto, że dezaktywacja endogenne centromeru wynika z częściowej delecji α -satelitarnego DNA; z tą koncepcją sprzeczne są dane wskazujące, że funkcje centromeru zależą wyłącznie od krótkich subdomen α -satelitarnego DNA oraz że nie wszystkie α -satelitarne sekwencje są równoważne. Np. tylko sekwencje ze specyficznymi motywami wiążą CENP-B. Czynnikiem uczestniczącym w dezaktywacji centromeru mogłoby być – zdaniem autorów – upakowanie chromatyny, które zapobiega wiązaniu CENP-A w tym miejscu. Drugi model zakłada, że następuje

utrata lub nabycie hipotetycznych epigenetycznie kontrolowanych czynników promujących lub hamujących aktywność centromeru [1].

3. NEOCENTROMERY W MINICHROMOSOMACH I SZTUCZNYCH CHROMOSOMACH CZŁOWIEKA

Uzyskiwanie minichromosomów i sztucznych chromosomów człowieka polega na wprowadzeniu do aktywnych mitotycznie komórek *in vitro* sekwencji DNA naturalnych lub uzyskanych drogą syntezy. Funkcjonalne minichromosomy i sztuczne chromosomy, aby mogły się reprodukować, muszą mieć m.in. funkcyjalny centromer, w tych przypadkach – neocentromer.

W komórkach embrjonalnych myszy uzyskano minichromosomy z DNA długości 2,6 Mbp, składające się z sekwencji pochodzących z 12. i 15. chromosomu myszy (ale bez powtórzeń obu centromerowych sekwencji DNA) oraz ludzkiego chromosomu Y; należy zaznaczyć, że sekwencje centromerowe myszy są całkowicie odmienne od α -satelitarnych powtórzeń u człowieka. Wykazano, że taki minichromosom wytworzył funkcyjalny neocentromer z sekwencjami DNA z ludzkiego chromosomu Y. W neocentromerach obecne było białko centromerowe CENP-C [25]. Zdaniem autorów był to wówczas pierwszy przykład sztucznego minichromosomu, który tworzy neocentromer.

Od 1971 r. prowadzone są prace dotyczące tworzenia minichromosomów w komórkach ludzkich linii fibroblastomy HT1080 z użyciem alfoidalnych DNA z chromosomów 5., 13., 14., 17., 21., 22., X i Y. Stwierdzono, że alfoidalny DNA z chromosomów Y i 21. nie zawierał 17-nukleotydowego motywu wiążącego białko CENP-B (obecnego w centromerach nie wszystkich wyższych Eukaryota – ref. [22]). Powstałe *de novo* centromery wiązały wszystkie zbadane centromerowe białka, w tym CENP-A, CENP-B, CENP-C i CENP-E (ref. [14]). Wykazano, że wydajność tworzenia funkcyjalnych minichromosomów zależy od długości wprowadzanego do komórek linii HT1080 α -satelitarnego DNA. Szczególnie wysoka wydajność (50%) tworzenia neocentromerów następuje po transfekcji układów DNA o długości 110–160 kbp z chromosomów 17., 13/21. i 14/22.; mniejsza wydajność (29%) miała miejsce przy krótszych układach – 50 kbp. Największą wydajność uzyskano przy zastosowaniu α -satelitarnego DNA o długości 200 kbp z chromosomu 18. [14].

Od lat 90. ub. wieku z powodzeniem uzyskuje się sztuczne chromosomy drożdży – YAC (ang. *Yeast Artificial Chromosome*) pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabra*), a także drożdży rozszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*). Są one mitotycznie i mejotycznie stabilne. U wymienionych organizmów centromery powstają *de novo* po wprowadzeniu nagiego DNA (pozbawionego białek) zawierającego sekwencje centromerowe. Jednak u drożdży rozszczepkowych stwierdzono, że w przypadku braku w tym DNA odwróconych powtórzeń centromerowych lub gdy ich zawartość była obniżona,

wytworzenie neocentromerów było opóźnione o kilka generacji (ref. [6]). W przeciwieństwie do wspomnianych YAC i ludzkich sztucznych chromosomów (por. niżej), u drożdży *Candida albicans* egzogenicznie wprowadzony centromerowy nagi DNA nie wiąże białka CaCse4p (homolog CENP-A), co wskazuje, że w tym przypadku sam centromerowy DNA nie wystarcza dla powstania neocentromeru [6]. Należy zauważyć, że u tego gatunku w regionie centromerowym brak jest motywów konserwatywnych i długich układów powtarzalnego DNA. Region ten długości 4–18 kbp nie zawiera genów i jest oflankowany przez euchromatynę. Delecja regionu centromerowego destabilizuje ten chromosom, z którego został usunięty. Obecność białek CaCse4p oraz CaMif2p (homolog CENP-C) wskazuje, że region ten jest miejscem montowania kinetochorów [6].

Wiele uwagi poświęcono uzyskiwaniu ludzkich sztucznych chromosomów – HAC (ang. *Human Artificial Chromosome*) ze względu na możliwość zastosowania ich jako przenośnika genów w terapii genowej u ludzi. Wykazano, że geny włączone *de novo* do HAC-ów ulegają ekspresji (ref. [14]). W przypadku tych sztucznych chromosomów powstają neocentromery i dlatego są one tutaj omawiane.

Stwierdzono, że w przypadku HAC-ów dla tworzenia centromerów *de novo* niezbędny jest taki α -satelitarny DNA człowieka, w którym są motywy wiążące białko CENP-B. Dowiedziono tego, konstruując zmodyfikowaną sekwencję DNA długości 2,7 kbp z chromosomu 17. w taki sposób, aby każdy z monomerów długości ok. 170 bp zawierał motyw dla CENP-B 5' – TTT CGT TGG AAA CGG GA 3'. Jako kontrolę użyto α -satelitarnego DNA z chromosomu Y, który nie zawiera motywu dla CENP-B. W takim doświadczeniu kontrolnym tylko jeden wśród 40 klonów zawierał neocentromer, podczas gdy wśród 45 klonów z pełnym motywem dla CENP-B, dziesięć wytworzyło neocentromery. Wynik ten wskazuje, że dla wysokiej wydajności motywy dla CENP-B są czynnikiem wspomagającym tworzenie centromerów *de novo* w systemie HAC. Ponadto wykazano, że tempo tworzenia neocentromerów zależy od wysycenia DNA motywem dla CENP-B. We wszystkich zbadanych przypadkach, te neocentromery wiązały CENP-C i były mitotycznie stabilne [4].

Przytoczone wyniki świadczą o niezbędności motywów dla CENP-B do wysokiej wydajności tworzenia HAC-ów są zastanawiające. Od dawna wiadomo, że CENP-B, chociaż należy do białek konstytutywnych centromeru, nie jest obecne w wszystkich wyższych Eukaryota pod tym względem zbadanych oraz że brak genu kodującego to białko nie zakłóca ani powstawania kinetochorów, ani przebiegu mitozy (ref. [22]).

Omawiane rezultaty badań, a także wyniki z dawniejszej literatury wskazują, że obecność CENP-B i motywu w DNA wiążącego to białko jest krytycznym, ale nie jedynym elementem uczestniczącym w tworzeniu *de novo* centromerów w HAC [4]. Należy jednak podkreślić, że nie udało się utworzenie HAC-ów w doświadczeniach, w których użyto syntetycznych powtórzeń DNA, bogatych w AT i zawierających motywy dla CENP-B [17].

4. PODSUMOWANIE

Z przytoczonych danych wynika, że zastosowanie metod cytogenetyki molekularnej pozwoliło na rozpoznanie struktury neocentromerów, która jest bardzo podobna do struktury endogennych centromerów z wyjątkiem DNA neocentromerowego, którym staje się DNA obecny w miejscu inicjacji neocentromeru. Wyposażenie neocentromerów w kluczowe białko CENP-A lub jego homologi, stanowiące o tożsamości centromeru, wyklucza zaliczenie knobów do neocentromerów, bowiem knobby nie zawierają białek centromerowych i mogą funkcjonować jednocześnie z endogennym centromerem podczas prawidłowo przebiegającej anafazy II podziału mejozy.

LITERATURA

- [1] AMOR DJ, BENTLEY K, RYAN J, PERRY J, WONG L, CHOO A. Human centromere repositioning „in progress”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6542–6547.
- [2] AMOR DJ, KALITSIS P, SUMER H, CHOO KHA. Building the centromere: from foundation protein to 3D organization. *Trends Cell Biol* 2004; **14**: 359–368.
- [3] BADANIA MOLEKULARNE I CYTOGENETYCZNE W MEDYCYNIE [red.] Bal J., Springer PWN, Warszawa 1998.
- [4] BASU J, STROMBER G, COMPITELLO G, WILLARD HF, Van BOKKELEN G. Rapid creation of BAC-based human artificial chromosome vectors by transposition with synthetic alfa-satelitare arrays. *Nucleic Acid Res* 2005; **33**: 587–596.
- [5] BAUER MJ, BIRCHLER JA. Organization of endoreduplicated chromosomes in the endosperm of *Zea mays* L. *Chromosoma* 2006; **115**: 383–394.
- [6] BAUM M, SANYAL K, MISHRA PK, THALER N, CARBON J. Formation of functional centromeric chromatin is specified epigenetically in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 14877–14882.
- [7] CHOO KH. Domain organization at the centromere and neocentromere. *Develop Cell* 2001; **1**: 165–177.
- [8] DAWE RK. Centromere renewal and replacement in the plant kingdom. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11573–11574.
- [9] DAWE RK, HIATT EN. Plant neocentromeres: fast, focused, and driven. *Chrom Res* 2004; **12**: 655–669.
- [10] HAN F, LAMB JC, BRICHLER JA. High frequency of centromere activation resulting in stable dicentric chromosomes in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 3238–3243.
- [11] HENIKOFF S, DALAL Y. Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 177–184.
- [12] HIATT EN, KENTNER EK, DAWA RK. Independently regulated neocentromere activity at two classes of tandem repeated arrays. *Plant Cell* 2002; **14**: 407–412.
- [13] HIGGINS AW, GUSTASHAW KM, WILLARD HF. Engineered human dicentric chromosomes show centromere plasticity. *Chrom Res* 2005; **13**: 745–762.
- [14] KANAME T, MCGUIGAN A, GEORGHIO A, YUROV Y, OSOEGAWA K, DE JONG PJ, IOANOU P, HUXLEY C. Alphoid DNA from different chromosomes forms *de novo* minichromosomes with high efficiency. *Chrom Res* 2005; **13**: 411–422.
- [15] LAMB JC, KATO A, BIRCHLER JA. Sequences associated with A chromosome centromeres are present throughout the maize B chromosome. *Chromosoma* 2005; **112**: 337–349.
- [16] LERMONTOVA I, SCHUBERT V, FUCHS J, KLATTE S, MACAS J, SCHUBERT I. Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 2006; **18**: 2443–2551.

- [17] MASUMOTO H, NAKANOM M, OHZEKI J. The role of CENP-B and α -satellite DNA: *de novo* assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chrom Res* 2004; **12**: 543–556.
- [18] MAŁUSZYŃSKA J, ROGALSKA S, OLSZEWSKA MJ. Struktura chromosomów mitotycznych. W: Olszewska MJ [red.] Podstawy cytogenetyki roślin. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2005: 56–93.
- [19] NAGAKI K, CHENG Z, OUYNG S, TALBERT PB, KIM M, HEINKOFF S, BUELL CR, JIANG J. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet* 2004; **36**: 138–145.
- [20] NASUDA S, HUDAKOVA S, SCHUBERT I, ENDO TR. Stable barley chromosomes without centromeric repeats. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2005, **102**: 9842–9847.
- [21] OLSZEWSKA MJ. DNA i białka centromerowe. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 167–185.
- [22] OLSZEWSKA MJ. Struktura i ewolucja kompleksu centromer/kinetochor. *Post Biol Kom* 2004; **31**: Supl. 22: 5–19.
- [23] OLSZEWSKA MJ. Struktury i mechanizmy uczestniczące w prawidłowej segregacji siostrzanych chromatyd. W: Krajewski P, Zwierzykowski Z, Kachlicki P [red.] Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. Rozprawy i Monografie nr. 11, Instytut Genetyki Roślin PAN, 2004: 25–37.
- [24] OLSZEWSKA MJ. Heterochromatyna i „heterochromatynizacja”. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 391–407.
- [25] SHEN MH, ROSS A, YANG J, de las HERAS J, COOKE H. Neo-centromere formation on a 2.6 Mb minichromosome in DT4O cells. *Chromosoma* 2001; **110**: 421–429.
- [26] Świtoński M, SŁOTA E, JASZCZAK K. Diagnostyka cytogenetyczna zwierząt domowych. Wyd. Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego Poznań 2006.
- [27] WARBURTON PE. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chrom Res* 2004; **12**: 617–626.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 13.03. 2008 r.

Przyjęto: 24.04. 2008 r.

Banacha 12/16, 90-237 Łódź