

NEOCENTROMERY. II. MOLEKULARNE CZYNNIKI NIEZBĘDNE DLA POWSTANIA CENTROMERU I NEOCENTROMERU

NEOCENTROMERES. II. MOLECULAR FACTORS REQUIRED
FOR FORMATION OF CENTROMERE AND NEOCENTROMERE

Maria Joanna OLSZEWSKA

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Neocentromery nie zawierają DNA charakterystycznego dla endogennych centromerów, tj. tandemowych układów sekwencji powtarzalnych; zatem rodzaj DNA nie decyduje o tożsamości neocentromerów. Tworzenie neocentromerów odbywa się przez mechanizmy epigenetyczne. Jest prawdopodobne, że ośrodkiem tworzenia neocentromerów w odcinkach euchromatynowych chromosomów mogłyby być ruchome elementy, które licznie występują w genomach eukariotycznych i są również obecne we właściwym centromerze oraz w przylegającej do niego heterochromatynie przycentromerowej. Wyniki badań metodą immunoprecypitacji wykazały, że kluczowe białko CENP-A/CENH3, decydujące o powstaniu centromeru, wiąże się z retorelementami. Nadekspresja tego białka u *Drosophila* powoduje jego pojawienie się w miejscach niecentromerowych chromosomów, powstanie funkcjonalnych neocentromerów i chromosomów policentrycznych, co skutkuje licznymi zakłóceniami w przebiegu mitozy. Mechanizm zapobiegający nadmiarowi CID (homolog CENP-A u *Drosophila*) polega na proteolizie tego białka niezwiązanego z centromerami. Zastosowanie białek fuzyjnych CENP-A i jego homologów – GFP/YFP/EYFP pozwoliło na stwierdzenie, że u większości wyższych Eukaryota synteza i montowanie tego białka do nukleosomów chromatyny centromerowej odbywa się w fazie G2, u *Drosophila* – w fazie S, zaś u drożdży – podczas S i G2. O specyficznym dla centromerów montowaniu CENP-A/CENH3 decyduje obecność w ich C-terminalnym krańcu domeny docelowej, CATD. Montowanie CENP-A i homologów następuje również przy braku gatunkowo-specyficznego N-terminalnego krańca. Integralną częścią regionu centromerowego jest heterochromatyna, obecna we właściwym centromerze i w regionie przycentromerowym. W endogennych centromerach heterochromatyna wykazuje wszystkie epigenetyczne cechy właściwe dla heterochromatyny i nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny skondensowanej: metylację DNA, metylacje lizyn 9, i 27, w histonie H3 oraz lizyny 20, w histonie H4, brak acetylacji H3 i H4, obecność białka HP1. Te modyfikacje pojawiają się w regionie neocentromerowym powstałym w obrębie euchromatyny, ale w mniejszym stopniu niż w endogennych centromerach. Kohezyna, powodująca przyleganie siostrzanych chromatyd, pojawia się wraz z odtwarzaniem chromatyny, po replikacji DNA i preferencyjnie wiąże się z regionami heterochromatynowymi, z których jako ostanía zanika przy heterochromatynie przycentromerowej. Ostatnio wykazano wiązanie kohezyny do odcinków euchro-

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

matynowych. Podczas ewolucji chromosomów następują zmiany w lokalizacji centromerów w wyniku ich dezaktywacji i powstawania neocentromerów. Uzyskane dotąd dane doświadczalne dotyczące tworzenia neocentromerów są nieliczne: nadal nie wiadomo, dlaczego neocentromery tworzą się zarówno w regionach eu-, jak i heterochromatyny oraz co – poza dezaktywacją endogennego centromeru – powoduje ich pojawienie.

Słowa kluczowe: neocentromery, ruchome elementy, CENP-A i homologi, heterochromatyna, kohezja, ewolucja.

Summary: Contrary to endogenous centromeres containing the species-specific tandem repeated DNA arrays, the neocentromeres are formed on DNA sequences without tandem arrays, therefore DNA does not decide about a neocentromere identity, and epigenetic mechanisms have an essential role in neocentromere assembly. The transposable elements are the most abundant class of DNA in higher Eukaryota. LTR retrotransposons are present both in centromeric and pericentromeric heterochromatin in the endogenous centromeric region. Chromatin immunoprecipitation data indicate that the key proteins for the centromere assembly, CENP-A/CENH3 interact with retroelements. It is possible that, even single copy, retroelements could be the first mark for the site of a future neocentromere. Overexpression of CID (CENP-A homologue in *Drosophila*) results its mislocalization, i. e. the presence in normally noncentromeric chromosome region. Several disturbances of mitosis (e. g. chromosome missegregation and aneuploidy) indicate that these ectopic neocentromeres induce active multicentromere chromosomes. Mechanism that prevents deposition of CID out of endogenous centromeres consists in proteolysis of soluble CENP-A, not incorporated into centromeric chromatin nucleosomes. Nucleosomal location of the centromere-specific variant of histone H3, CENP-A and its homologues is necessary for the assembly of other centromeric and kinetochore proteins. Studies performed recently with fusion protein CENP-A or its homologues – GFP/YFP/EYFP gave precise information concerning the time of synthesis organisms (mammalians and angiosperm plant species), synthesis and loading of CENP-A/CENH3 occur mainly in G2 faze, but even in the same type of cells, HeLa, maximum expression and CENP-A loading were shown to take place, depending on the authors, either in G2 or during telophase and G1 phase. In yeast these processes occur in S and G2 phase, while in *Drosophila* – during S phase. Therefore, the synthesis and loading of CENP-A and its homologues should take place during interphase before the onset of mitosis with chromosome bearing a neocentromere. In human, *Drosophila*, yeast and *Arabidopsis thaliana* cells it has been shown that histone-fold domain is required for centromere-specific deposition of CENP-A and its homologues. The C-terminal parts of these proteins are responsible for the recognition of centromeres. This region, CENP-A targeting domain (CATD) includes the L1 linker and $\alpha 2$ helix of CENP-A and is sufficient to direct this protein to centromeres, even when its N-terminal (species-specific) tail is absent. Heterochromatin is an integral part of the centromere region. It is present at the centromere itself and in the pericentromeric region flanking it. In endogenous centromeres both kinds of heterochromatin display the epigenetic DNA and histone modifications characteristic of condensed and transcriptionally inactive chromatin, i.e. cytosine methylation in DNA, methylation of lysine 9 and 27 in the histone H3, methylation of lysine 20 in the histone H4, absence of acetylation of the latter two. Moreover, heterochromatin of the centromeric region contains HP1 protein. In endogenous centromeres in human cells mutation of DNA methyltransferase gene results in decreased methylation of centromeric DNA and in several disturbances in sister chromatid separation during mitosis. The amount of heterochromatin at neocentromeres formed on euchromatin bands in chromosomes is reduced as compared to endogenous centromeres, although some epigenetic marks characteristic of heterochromatin and the presence of HP1 have been observed. These modifications do not occur in those domains in neocentromere region that contain coding DNA sequences. The role of cohesion is to establish sister chromatid cohesion. It is generally admitted that in higher Eukaryota cohesin is preferentially bound by heterochromatic parts of chromatin just after DNA replication and chromatin restitution. During mitosis the last disappearing part of cohesin is that bound to pricentromeric heterochromatin. Reduction of sister chromatids cohesion as a result of diminished amount of pricentromeric heterochromatin in some human neocentromeres has been observed. It has to be noted that recent results suggest possibility of cohesion binding to euchromatic parts of chromatin. Some data obtained from the studies on chromosome evolution can facilitate understanding of neocentromere formation. Chromosome rearrangements are known as mechanisms that contribute to the changes of chromosome shape and of centromere position, e. g. in rare *de novo* formation of centromeres on acentric

chromosome fragments. A particular role in centromere evolution has been attributed to transposable elements, as they have an important role in initiating heterochromatin formation from a single-copy domain at an euchromatic region. The location of a centromere and its inactivation or activation can change during evolution. Centromere repositioning occurred, among others, in mammalian X chromosome. The centromeres of X chromosome in two lemur species and in human are located in different positions and contain different DNA repeats. Therefore, centromere repositioning may be due to the endogenous centromere inactivation/neocentromere formation. The presence of active genes in centromere 8 region in rice and in some human neocentromeres may indicate their relatively recent formation. Up to now, there are only few data concerning the question of why a neocentromere originates in a particular – both heterochromatic as euchromatic – location and what, besides endogenous centromere inactivation, triggers their formation.

Key words: neocentromere, transposable elements, CENP-A and homologues, heterochromatin, cohesion, evolution.

1. WSTĘP

Podstawowym zjawiskiem warunkującym powstanie neocentromeru jest pojawienie się w nukleosomach przyszłej chromatyny centromerowej białka CENP-A (lub jego homologów), którego obecność warunkuje przyłączenie innych białek centromerowych i kinetochorowych. Dla osiągnięcia przez neocentromer stanu funkcjonalnego, taka chromatyna musi znajdować się na zewnętrznych powierzchniach siostrzanych chromatyd, tj. skierowanych ku przeciwnym biegunom (ref. [33, 39]).

Rodzaj DNA, na którym tworzy się neocentromer, wydaje się mieć podrzędne znaczenie. Niekiedy obserwowano, że preferowane są odcinki DNA tworzące heterochromatynę. Np. znaczne ilości heterochromatyny w długim ramieniu chromosomu Y u człowieka może sprzyjać tworzeniu neocentromeru [39], zaś u jęczmienia centromer chromosomu 7. przemieszcza się do heterochromatyny (ref. [7]). Z drugiej strony wiadomo, że neocentromery często tworzą się w miejscach euchromatynowych chromosomu (ref. [34]). Dobrym kandydatem na inicjowanie i wyznaczenie miejsca tworzenia neocentromeru mogłyby być ruchome elementy (por. niżej, 2.1). Wspólnymi – jak się obecnie wydaje – właściwościami DNA, na terenie którego powstają neocentromery, są jego replikacja w późnej fazie S i bogactwo w AT ([1, 2], ref. [39]).

Dla prawidłowego rozdzielenia siostrzanych chromatyd niezbędny jest system kohezji. Pod koniec metafazy kohezyna przylega do heterochromatyny przycentromerowej: jej ilość przy neocentromerach jest zredukowana (ref. [34]). Te zagadnienia w odniesieniu do powstania neocentromerów są omówione niżej (por. 2.4). Dane zaczerpnięte z badań ewolucji centromerów mogą być użyteczne w rozważaniach dotyczących powstawania neocentromerów (por. 3).

2. CZYNNIKI NIEZBĘDNE DLA POWSTAWANIA NEOCENTROMERÓW

2.1. Ruchome elementy

Obecnie nie budzi wątpliwości fakt, że nie rodzaj DNA wchodzący w skład centromeru, lecz możliwość powstania chromatyny z nukleosomami zawierającymi CENP-A lub jego homologi jest warunkiem utworzenia centromeru *de novo*.

Ruchome elementy powszechnie występują w genomach wyższych Eukaryota. U człowieka stanowią 46% genomu, u *Drosophila* – ok. 30% (ref. [40]). Ich obecność stwierdzono również u roślin. U gatunków dwuliściennych są one obecne zarówno we właściwym centromerze, jak i w heterochromatynie przycentromerowej ([42], ref. [30]). U traw retroelementy są dominującym składnikiem DNA centromerowego (ref. [30]). Należą one do klasy retrotranspozonów z LTR-ami (ang. *Long Terminal Repeats*), zwykle są centromerowo-specyficzne i dlatego nazywane CR (ang. *Centromeric Retrotransposons*). Aktualne dane dotyczące obecności CR w genomach wskazują, że występują one także w innych niecentromerowych regionach. U traw pojedyncze kopie monomerów wchodzących w skład długich powtórzeń retroelementów znajdujących się w centromerze, zostały znalezione również w innych częściach genomu (ref. [19]).

Przypuszcza się, że charakterystyczne dla współczesnych endogennych centromerów układy tandemowe (satelitarne) są układami pierwotnymi i że centromerowe retroelementy są bądź sprawnie działającym pasożytem centromerów, bądź ułatwiają utworzenie centromeru [7].

Wielokrotnie dowiedziono metodą ChIP (ang. *Chromatin ImmunoPrecipitation*), że retroelementy w centromerach wiążą białka CENP-A/CENH3 ([11, 15, 38], ref. [20, 40]).

Biorąc pod uwagę przytoczone fakty, można przypuścić, że ruchome elementy mogłyby być ośrodkami tworzenia neocentromerów [7, 20]. Wyniki badań ewolucji DNA centromerowego przynoszą wiele informacji również przemawiających za możliwością inicjującej roli ruchomych elementów w tworzeniu neocentromerów (por. 3).

2.2. Udział białka CENP-A i jego homologów w tworzeniu neocentromerów

Istnieją dowody, świadczące o znaczeniu błędnej lokalizacji białek CENP-A/CENH3/CID wynikającej z ich nadekspresji (CID jest homologiem CENP-A u *Drosophila*). Punktem wyjścia dla tej koncepcji było stwierdzenie, że u *Drosophila* i jęczmienia neocentromery powstają blisko funkcjonalnego endogennego centromeru, co sugerowało rozprzestrzenianie się w obrębie chromosomu tych białek kluczowych dla tożsamości chromatyny centromerowej. Jednak u człowieka w komórkach *in vitro* nadmiar CENP-A, mimo włączenia tego białka do nukleosomów, nie powodował powstania funkcjonalnych neocentromerów (ref. [10]); nadekspresja CENP-A towarzyszy procesom nowotworowym (ref. [6, 10]).

Stosując metodę fuzyjnych białek CID-GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) i H3-GFP, uzyskano ich stabilną ekspresję w serii kontrolnej komórek *Drosophila*, białko

CID-GFP było obecne wyłącznie w endogennych centromerach, zaś H3-GFP było rozmieszczone równomiernie na terenie jąder interfazowych. Wyniki analizy metody Western wykazały, że indukcja nadekspresji genów kodujących CID powodowała 70-krotne zwiększenie jego zawartości. Po zastosowaniu metody immunocytochemicznej stwierdzono, że nadekspresja CID prowadzi do jego błędnej lokalizacji na chromosomach mitotycznych i politenicznych, przy czym było ono preferencyjnie włączone do euchromatyny, podczas gdy histon H3 – do heterochromatyny [10]. W większości komórek kontrolnych z białkami fuzyjnymi CID-GFP i H3-GFP segregacja chromosomów podczas anafazy odbywała się normalnie. Defekty mitotyczne wykryto w ok. 18% komórek. Natomiast w komórkach z nadekspresją CID były liczne uszkodzenia chromosomów i zakłócenia w segregacji chromosomów. W zależności od poziomu indukcji CID, komórki takie stanowiły 55%, 78% i 100%. Dane te wskazują, że te defekty są bezpośrednim wynikiem błędnej lokalizacji CID, tj. jego obecności w niecentromerowych regionach chromosomów. Część defektów mitotycznych mogła być spowodowana przez uszkodzenie mechanizmu kohezji [10].

Białko centromerowe CENP-C oraz białka kinetochorowe oraz związane z likwidacją kohezji i segregacją siostrzanych chromatyd – MEI-S332 i BUBR1 – w komórkach kontrolnych i tych, w których zaindukowano nadekspresję histonu H3, były prawidłowo zlokalizowane, tj. znajdowały się w regionie centromer/kinetochor. Natomiast w komórkach z nadekspresją CID, w których to białko było błędnie zlokalizowane, liczba sygnałów po immunobarwieniu była znacznie wyższa, przy czym ta różnica nie była spowodowana przez większą liczbę chromosomów (wywołaną przez zakłócenia w przebiegu mitozy). Wyniki te wskazują, że nadmiar CID, powodujący jego błędną lokalizację, może powodować powstanie funkcjonalnych neocentromerów. Wynikiem ich obecności było utworzenie chromosomów policentrycznych, a w konsekwencji – błędną segregację chromosomów [10].

Błędnej lokalizacji CENP-A zapobiega proteoliza tego białka, znajdującego się poza chromatyną centromerową. Dowody na słuszność tego twierdzenia zostały uzyskane u drożdży i *Drosophila*. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykazano, że zawartość białka Cse4 (homolog białka CENP-A) jest regulowana przez proteolizę w systemie ubiquityna-proteasom. Rozpuszczalne białko jest szybko degradowane, natomiast to wmontowane w nukleosomy chromatyny centromerowej jest ochroniane przed degradacją [6]. Analogiczne wyniki uzyskano u *Drosophila* posługując się białkiem fuzyjnym CID-YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*). Proteolityczna degradacja nadmiaru CID nie następuje w obecności inhibitora proteasomów MG132 [26].

2.3. Montowanie CENP-A/CENH3 do nukleosomów

Semikonserwatywna replikacja DNA powoduje zmniejszenie o połowę zawartości nukleosomów z CENP-A/CENH3 w chromatynie centromerowej [12]. Z licznych badań wiadomo (ref. [31]), że synteza i montowanie CENP-A u ssaków następuje w fazie G2. Ostatnio, po raz pierwszy na materiale roślinnym (*Arabidopsis thaliana* i jęczmień *Hordeum vulgare*) wykazano, posługując się białkiem fuzyjnym CENH3-EYFP (ang. *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), że również u roślin okrytozalążkowych synteza

i montowanie tego białka odbywa się podczas fazy G2 [17, 18], czego można było się spodziewać na podstawie wyglądu sygnału immunocytochemicznego, który u jęczmienia tylko podczas fazy G2 jest obecny w postaci dwóch kropek [18, 27]. U krasnorostu *Cyanidioschyzon merolae* (niewielki, prymitywny glon), u którego chromosomy nie ulegają mitotycznej kondensacji, zawartość CENH3 szybko zwiększa się podczas fazy S, po czym następuje rozdzielenie sygnałów immunocytochemicznych na dwie struktury [22]. U *Drosophila* montowanie CID następuje już podczas fazy S [26]. U drożdży rozszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*) montowanie homologu tego białka, Cnp1, odbywa się podczas dwóch faz: S i G2 [37], zaś u rośliny wyższej z chromosomami holokinetycznymi (policentrycznymi) – dopiero w okresie prometafazy/metafaza [18].

Zupełnie odmienne wyniki niż u ssaków, w tym u człowieka, otrzymano w badaniach przeprowadzonych na ludzkich komórkach HeLa, poddanych synchronizacji cykli komórkowych metodą tymidynową. W tych warunkach CENP-A pojawiało się już w telofazie, a montowanie ich do nukleosomów następowało wyłącznie w fazie G1 [12].

U drożdży rozszczepkowych zidentyfikowano dwa czynniki, Ams2 i Mis6, z których każdy jest niezbędny dla nukleosomowej lokalizacji białka Cnp1 (nazywanego także SpCENP-A). Ams2 może być odpowiedzialny za zespolone z replikacją DNA ładowanie SpCENP-A przez ułatwienie tworzenia nukleosomów podczas fazy S. Podczas środkowej fazy G2 sygnały białka fuzyjnego SpCENP-A-GFP gromadzą się stopniowo w centromerach; największe nasilenie fluorescencji ma miejsce w późnej fazie G2 i podczas mitozy. Wydaje się, że Ams2 ma kluczową rolę w aktywacji transkrypcji genów histonów rdzeniowych specyficznej dla fazy S i prawdopodobnie uczestniczy w selektywnym włączaniu nukleosomów zawierających SpCENP-A do chromatyny centromerowej. U mutantu pozbawionego Ams2, do nukleosomów jest włączany histon H3 zamiast SpCENP-A, co świadczy o decydującej roli tego czynnika w montowaniu centromerowo-specyficznej chromatyny u drożdży [37].

Analiza czynników niezbędnych do załadowania białka CENP-A/CENH3 i jego homologów do nukleosomów chromatyny centromerowej w komórkach drożdży i wyższych Eukaryota wykazały, że niezbędna i wystarczająca dla specyficznej dyspozycji tego białka jest C-terminalna zwinięta domena ze zmiennym regionem tzw. pętli. Proces ten odbywa się nawet pod nieobecność części N-terminalnej (wysoce zmiennej, specyficznej gatunkowo – ref. [5, 33]) oraz [17]. Niezbędny jest dla tego procesu region nazywany CATD (ang. *CENP-A Targeting Domain*) zawierający łącznik L1 i α -helisę. Jest możliwe, że inna sekwencja, poza CATD, również uczestniczy we właściwym ukierunkowaniu CENP-A (ref. [5]). CATD dla CENP-A sam przez się pośredniczy w konformacyjnej sztywności w nukleosomach zawierających to białko, zatem wyznacza lokalizację nowych miejsc dla ładowania CENP-A. Mimo tego, istnienie nukleosomów z CENP-A nie jest niezbędne dla jego montowania, ponieważ możliwe jest montowanie centromeru *de novo* [4].

U nicienia *Caenorhabditis elegans* (chromosomy holokinetyczne) zostało odkryte białko KNL-2; nazwa ta pochodzi od mutantu pozbawionego tego białka i pozba-

wionego kinetochoru (ang. *Kinetochore NuL*). U tego nicienia fenotyp KNL charakteryzuje się takimi samymi zakłóceniami mitozy i mejozy, jak u mutantów pozbawionych homologu CENP-A, CeCENP-A. Białko KNL-2 zawiera w krańcach C taką domenę, jaka została wcześniej odkryta w protoinkogenie Myb i jest obecna w wielu białkach powodujących zmianę struktury (remodelowanie) chromatyny. Białko KNL-2 znajduje się w centromerach, podobnie jak CeCENP-A. U osobników pozbawionych KNL-2 nie następowało montowanie CeCENP-A, ale brak KNL-2 nie wpływał na stabilność już wmontowanego CeCENP-A. Brak KNL-2 nie naruszał lokalizacji w nukleosomach ani podstawowego histonu H3, ani histonów H2b, co udowodniono stosując białko fuzyjne H2b-GFP. Fakty te wskazują, że KNL-2 jest specyficznie niezbędne dla ładowania CeCENP-A do nukleosomów. Obecność białka KNL-2 stwierdzono również u człowieka [21].

2.4. Heterochromatyna przycentromerowa i kohezja siostrzanych chromatyd

Niezbędnym warunkiem prawidłowego przemieszczania się chromatyd siostrzanych do jąder potomnych jest ich poprawne rozdzielenie podczas przejścia metafazy w anafazę, bowiem podczas metafazy są one ze sobą połączone w regionie chromatyny przycentromerowej za pośrednictwem kompleksu białkowego zwanego kohezyną. W skład kohezyny wchodzi co najmniej cztery białka o charakterze konserwatywnym (ref. [24]). Asocjacja kohezyny z chromatyną u wyższych Eukaryota rozpoczyna się w fazie S i postępuje w miarę replikacji DNA i odtwarzania chromatyny (ref. [31]), zaś u drożdży pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*) przyłączanie kohezyny rozpoczyna się już w fazie G1 [29]. U wyższych Eukaryota szczególne nagromadzenie kohezyny ma miejsce w regionach heterochromatynowych, a głównie – przy heterochromatynie przycentromerowej, od strony przeciwnej niż kinetochory (ref. [32]). U drożdży rozszczepkowych białko Swi6 (homolog białka heterochromatynowego HP1) jest fizycznie zasocjowane z białkiem kohezyny Rad21 (ref. [28]). U *Drosophila* białko MEI S332, istotne dla kohezji, podczas mitozy oraz częściowo podczas mejozy, znajduje się przy centromerze, od którego odłącza się w okresie przejściowym metafaza/anafaza. U mutantu *mei s332* brak jest kohezji siostrzanych chromatyd podczas anafazy I podziału mejozy, co powoduje błędną segregację podczas II podziału [15].

Ostatnio stwierdzono, że wśród białek kohezyny znajduje się konserwatywne białko nazwane Nipped-B, o wielorakiej funkcji. Wyniki badań immunocytochemicznych wykazały, że u *Drosophila* występuje ono razem z kohezyną między siostrzanymi chromatydami podczas mitozy i mejozy. Jest ono obecne w ekstraktach jądrowych, w rozpuszczalnych kompleksach, wraz z podjednostkami kohezyny. U mutantów Nipped-B następuje przedwczesna separacja siostrzanych chromatyd [8]. Również u *Drosophila* metodą ChIP wykazano, że białko Nipped-B i kohezyna wiążą się preferencyjnie, ale nie wyłącznie, w tych samych miejscach z regionami chromatyny, w których w danej fazie rozwoju następuje transkrypcja, o czym świadczy obecność polimerazy RNA II. Autorzy [25] postulują, że transkrypcja ułatwia wiązanie kohezyny

do zdekondensowanej chromatyny. Należy zauważyć, że u drożdży pączkujących Nipped-B wiąże się w innych miejscach niż kohezyna, która jest obecna w obszarach międzygenowych (ref. [25]). Przytoczone dane mogą wskazać, że wiązanie kohezyny między chromatydami zawierającymi neocentromery mogłoby odbywać się w regionach euchromatynowych, które wtórnie mogłyby poprzez mechanizmy epigenetyczne przekształcić się w chromatynę skondensowaną (por. niżej).

Heterochromatyna przycentromerowa endogennych centromerów zbudowana jest z sekwencji tandemowych, wśród nich – z retroelementów i nosi wszelkie cechy epigenetyczne właściwej (konstytutywnej) heterochromatyny: wysoki poziom metylacji DNA, metylacja w histonie H3 lizyny w pozycji 9. i w histonie H4 lizyny w pozycji 20., obecność białka HP1 oraz hypoacetylacja histonów H3 i H4 (ref. [33, 42]). Istnieje pogląd, w myśl którego heterochromatyna przycentromerowa ułatwia przyleganie chromatyd siostrzanych, ale nie jest niezbędna dla kohezji. U mutantów *Arabidopsis thaliana*, u których uszkodzona jest metylacja lizyny 9. w histonie H3, separacja chromatyd przebiega normalnie. W neocentromerze chromosomu 13. i w chromosomie PD-NC4 u człowieka (ref. [34]) znajduje się chromatyna nosząca cechy heterochromatyny, ale w nieznacznej ilości. U człowieka mutacja w genie kodującym metylotransferazę 3B powoduje obniżoną metylację DNA w heterochromatynie przycentromerowej w 1qh, 16qh i 9qh (w chorobie immunologicznej zwanej IFC). Wynikiem tej mutacji są liczne zakłócenia podczas mitozy, jak mosty anafazowe, fragmentacja chromosomów i tworzenie mikrojąder [9]. U *Schizosaccharomyces pombe* wszelkie anomalie we właściwościach epigenetycznych cechujących heterochromatynę powodują błędy w segregacji chromatyd z powodu utraty kohezji (ref. [38]).

Przytoczone dane wskazują, że w większości zbadanych obiektów obecność heterochromatyny przycentromerowej, przynajmniej w minimalnej ilości, jest niezbędna dla poprawnej separacji chromatyd siostrzanych.

3. EWOLUCJA CENTROMERÓW PODCZAS EWOLUCJI CHROMOSOMÓW

Chromosomy ewoluują w wyniku pierwotnych i wtórnych rearanżacji, a u roślin również w wyniku zmian w ploidalności, będących następstwem międzygatunkowych krzyżówek i/lub błędów podczas mitozy lub mejozy. Pierwotne i większość wtórnych rearanżacji są spowodowane przez błędną ligację nici DNA podczas naprawy. Transpozycja, błędy podczas replikacji DNA, inwersje i/lub delecje podczas naprawy podwójnych pęknięć mogłyby także uczestniczyć w ewolucji przez promowanie skracania lub wydłużania poszczególnych chromosomów [36]. Znaczny udział w tych modyfikacjach przypisuje się retroelementom (ref. [35]). W wyniku takich zmian pozycja centromeru może ulec zmianie nie tylko wskutek inwersji lub translokacji, ale także przez stabilną inaktywację centromeru w chromosomach dicentrycznych oraz przez

utworzenie *de novo* centromeru na fragmencie acentrycznym [36]. Takie procesy prowadzące do powstania neocentromeru zostały opisane wcześniej (ref. [34]).

Ruchome elementy szczególnie obficie występują w centromerze i w regionie przycentromerowym. Ruchomym elementem, TE (ang. *Transposable Elements*) i transpozazom przypisuje się znaczącą rolę w ewolucji centromerowego DNA i składników białkowych centromeru [40]. Zakłada się, że wzbogacenie i dywersyfikacja TE w regionie przyszłego centromeru następuje drogą ich amplifikacji i nierównego *crossing-over*, w rezultacie czego powstają układy TE centromerowe i przycentromerowe oraz odmienne subdomeny chromatyny, tj. takie, które są zdolne do zastępowania w nukleosomach histonu H3 przez CENP-A/CENH3 i wiązanie białek centromerowych [40]. Ostatecznie autorzy [40] postulują możliwość inicjowania neocentromerów w euchromatynie w miejscu występowania tylko pojedynczej kopii TE, a szczególnie retroelementu z LTR-ami.

Jednym z kierunków badań, które mogą rzucić światło na kwestię miejsca powstania neocentromeru jest rozpoznanie ewolucyjnego przemieszczania się centromerów. Np. pozycja neocentromeru w 15q u człowieka znajduje się w regionie 8 Mpz proksymalnie i 1,5 Mpz dystalnie w odniesieniu do centromeru w ekwiwalentnym chromosomie u małp Starego Świata. Region ten zawiera znaczne zagęszczenie chromosomo-specyficznych replikonów, co do których postulowano, że uczestniczą w dużej częstotliwości wyłaniania się centromerów w tym regionie [39].

W rozważaniach dotyczących ewolucji centromerów głównie rozpatrywano ewolucję DNA centromerowego. U człowieka wyróżniono dwa typy alfoidalnego DNA w centromerze: typ I obecny w chromosomie X (a więc rzadki) i typ II – powszechny. Sugeruje się, że typ I jest ewolucyjnie młodszy i ma zdolność do inicjowania centromerów *de novo* oraz indukowania przesunięcia pozycji centromeru. W typie I znajduje się motyw wiążący białko CENP-B (ref. [34]), które wykazuje znaczną homologię do niektórych transpozaz. Wobec tego jest prawdopodobne, że interakcja CENP-B/motywy CENP-B w alfoidalnym DNA mogłyby działać jako siła napędowa w procesie przemieszczania centromeru z pierwotnej pozycji [23].

Chromosomy X u dwóch gatunków lemura i u człowieka wykazują genetyczną syntenię, ale centromery w tych trzech chromosomach X nie tylko znajdują się w rozmaitych pozycjach, ale także zawierają odmienne powtórzenia satelitarne. Analogiczne obserwacje były poczynione u wielu innych gatunków ssaków. Te fakty wskazują, że jednym z możliwych mechanizmów zmiany usytuowania centromerów jest powstanie neocentromerów sprzężone z utratą lub dezaktywacją pierwotnego centromeru (ref. [41]).

Centromery w chromosomie 8. u ryżu przypominają neocentromery u człowieka, ponieważ znajdują się w regionie zawierającym geny (ref. [34]) i dlatego zostały uznane za ewolucyjnie młode. Przypuszcza się, że nabycie przez neocentromery typowych dla centromerów sekwencji powtarzalnych mogło nastąpić bądź przez przemieszczenie z pierwotnych centromerów, bądź przez spontaniczne powstanie takich sekwencji w neocentromerze [41]. Obie możliwości są prawdopodobne zważywszy, że w centromerowym DNA znaczny udział mają ruchome elementy

(por. wyżej, 2.1). Chromatyna zawierająca geny charakteryzujące się, podobnie jak w innych regionach genomu, obecnością w nukleosomach dimetylacji lizyny 4. w histonie H3 i acetylacji histonu H4, co jest typowe dla potencjalnie aktywnej transkrypcyjnie chromatyny, podczas gdy w innych obszarach regionu centromerowego w histonie H3 była metylowana lizyna w pozycji 9., co jest stałą cechą chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie (ref. [14]).

Przykład chromosomu PD-NC4 u człowieka (ref. [34]), powstałego bez dostrzegalnych rearanżacji, wskazuje, że przemieszczenie się centromeru poprzez jednoczesną dezaktywację endogennego centromeru i tworzenie neocentromeru mogłoby podobnie przebiegać podczas procesu zmiany pozycji centromeru w ewolucji i specjacji. Jest prawdopodobne, że neocentromer taki, jaki w chromosomie PD-NC4, pozbawiony α -satelitarnego DNA, podczas ewolucji uzyskiwałby α -satelitarny DNA z innych chromosomów, dzięki czemu nabyłby właściwości typowego centromeru, a dowód na jego neocentromerowe pochodzenie uległby zatarciu. Chromosom PD-NC4 mógłby być najwcześniejszym stadium przejścia z neocentromeru do typowego centromeru [1].

4. PROCESY WARUNKUJĄCE POWSTAWANIE NEOCENTROMERÓW – FAKTY I HIPOTEZY

W świetle dotąd uzyskanych danych, tworzenie neocentromerów odbywa się za pośrednictwem mechanizmów epigenetycznych. Powyżej (2.2–2.4) zostały opisane te właściwości centromerów, które muszą (obecność białka CENP-A lub jego homologów) lub powinny (heterochromatyna przycentromerowa) mieć funkcjonalne neocentromery.

Faktem jest, że rodzaj DNA nie odgrywa decydującej roli w wyznaczaniu miejsca powstawania neocentromerów; jedyną cechą centromerowego DNA jest znaczna zawartość AT. To stwierdzenie dotyczy neocentromerów powstających spontanicznie, ponieważ w przypadku indukcji neocentromerów w minichromosomach człowieka, powstanie neocentromerów jest uwarunkowane przez wprowadzenie naturalnego, α -satelitarnego DNA odpowiedniej długości ([13], ref. [34]). W przypadku ludzkich sztucznych chromosomów (HAC, ang. *Human Artificial Chromosome*) niezbędny jest taki α -satelitarny DNA, który zawiera motyw wiążący białko CENP-B ([3], ref. [34]). W odniesieniu do spontanicznie powstających neocentromerów można przypuścić, że zaktywizowane ruchome elementy mogłyby przemieszczać się z regionu endogennego centromeru i stanowić zapoczątkowanie neocentromeru. Ruchome elementy wiążą się z CENP-A/CENH3 (por. 2.1), a powstanie chromatyny z nukleosomami zawierającymi to białko stanowi mechanizm spustowy inicjujący powstanie neocentromeru w regionach euchromatynowych (por. 3). Do czynników sprzyjających utworzeniu neocentromeru można zaliczyć ektopową lokalizację tego białka przy jego nadprodukcji (por. 2.4). Wydaje się, że wykrycie nowej rodziny białek KNL-2 (por. 2.3) może stanowić punkt wyjścia dla zrozumienia tego krytycznego etapu w tworzeniu neocentromeru [21].

Znaczna część procesów warunkujących stan funkcjonalny centromeru odbywa się podczas interfazy. Należy do nich montowanie CENP-A lub jego homologów po replikacji DNA centromerowego, synteza i montowanie w centromerze centromerowych białek konstytutywnych, powstanie i przyłączanie kohezyny. Białka te mogłyby być dostępne w wyniku dezaktywacji centromeru endogennego (w chromosomie dicentrycznym), ale w przypadku powstania neocentromeru we fragmentach acentrycznych chromosomów lub przy indukcji neocentromerów w minichromosomach i sztucznych chromosomach (ref. [34]), pochodzenie tych białek jest nieznane.

Heterochromatyna stanowi charakterystyczny dla regionu centromerowego typ chromatyny, obecnej zarówno we właściwym centromerze, jak i w obszarze przycentromerowym. W endogennych centromerach nosi ona wszystkie modyfikacje epigenetyczne heterochromatyny zwanej konstytutywną [33]. Nabycie tych cech przez euchromatynę, w obrębie której mogą tworzyć się neocentromery, polega na metylacji lizyny 9. i 27. w histonie H3 oraz lizyny 20. w histonie H4 (podobnie jak w heterochromatynie), ale przy zachowaniu modyfikacji epigenetycznych właściwych dla euchromatyny [33]. Zatem powstanie chromatyny skondensowanej z obszaru euchromatynowego, tj. zjawiska często zachodzącego w jądrach interfazowych, wydaje się być procesem, dla którego realizacji złożona maszyna stale istnieje podczas interfazy. Faktem wskazującym, że tak właśnie ten proces się odbywa, jest wykazanie, że w HAC-ach na lewym ramieniu powstaje chromatyna skondensowana w wyniku modyfikacji epigenetycznych, które polegają na trimetylacji lizyny 9. w histonie H3 oraz na wmontowaniu białka HP1a. Tak zmodyfikowana chromatyna skondensowana nosi więc epigenetyczne cechy heterochromatyny przycentromerowej, a wyposażone w nią HAC-i wykazują prawidłową kohezję. Prawe ramię HAC-ów zbudowane jest nadal z aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny z nukleosomami zawierającymi standardowy histon H3. Zatem w *de novo* powstałym regionie centromerowym zostaje wytworzony system warunkujący kohezję siostrzanych chromatyd, a także system sterujący ich rozdzieleniem, w tym kinaza Aurora B [28]. Należy jednak zaznaczyć, że nie zawsze niedobór heterochromatyny przycentromerowej powoduje zakłócenia w kohezji siostrzanych chromatyd (por. wyżej, 2.4).

Stwierdzenie, że synteza i montowanie CENP-A w komórkach HeLa odbywa się podczas telofazy i fazy G1 [12] wskazuje na możliwość postmitotycznej (a nie premitotycznej, jak u większości Eukaryota) inicjacji neocentromerów, co stworzyłoby możliwość montowania kohezyny, zachodzącego podczas fazy S (por. 2.4).

Niedobór informacji na temat mechanizmów warunkujących powstawanie neocentromerów jest spowodowany brakiem odpowiedniego modelu do badań. Pomocne dla wyjaśnienia tego zagadnienia mogą być dalsze badania ewolucji centromerów (por. 3.). Sporo informacji dostarczyły wyniki dotyczące chromosomu PD-NC4 u człowieka (ref. [34], por. 3, [1]), ponieważ neocentromer w tym chromosomie wykazuje kilka cech wskazujących, że jest on we wczesnym stadium formowania, czemu dali wyraz jego odkrywcy, określając tę sytuację jako „*in progress*” [1]. Można oczekiwać, że również dalsze badania dotyczące powstawania sztucznych chromosomów i minichromosomów przyczynią się do powstania procesów warunkujących powstanie neocentromeru.

Nie jest wyjaśnione, co stanowi impuls do spontanicznego utworzenia neocentromeru. Należy przypomnieć, że neocentromery mogą powstawać spontanicznie w acentrycznych fragmentach chromosomów (ref. [34]) lub mogą być indukowane w minichromosomach i sztucznych chromosomach (ref. [34]). Wydaje się zatem prawdopodobne, że uszkodzenie i w konsekwencji dezaktywacja centromeru endogennego może stanowić pierwotny sygnał dla powstania neocentromeru, przy czym proces ten powinien odbywać się w interfazie, aby neocentromer stał się funkcjonalny, a chromosom dicentryczny był stabilny mitotycznie.

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] BASU J, STROMBER G, COMPITELLO G, WILLARD HF, Van BOKKELEN G. Rapid creation of BAC-based human artificial chromosome vectors by transposition with synthetic alpha-satellite arrays. *Nucleic Acid Res* 2005; **33**: 587–596.
- [4] BLACK BE, BROCK MA, BEDARD S, WOODS VL Jr, CLEVELAND DW. An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 5008–5013.
- [5] CARROL CW, STRAIGHT AF. Centromere formation from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 70–78.
- [6] COLLINS KA, FURUYAMA S, BIGGINS S. Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of yeast Cse/CENP-a histone H3 variant. *Curr Biol* 2004; **14**: 1968–1972.
- [7] DAWE RK. Centromere renewal and replacement in the plant kingdom. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11573–11574.
- [8] GAUSE M, WEBBER HA, MISULOVIN Z, HALLER G, ROLLINS RA, EISSENBERG JC, BICKEL SE, DORSETT D. Functional links between *Drosophila* Nipped-B and cohesion in somatic and meiotic cells. *Chromosoma* 2008; **117**: 51–66.
- [9] GISSELSSON D, SHAO C, TUCK-MULLER CM, SOGOROVIC S, PALSSON E, SMEETS D, EHRLICH M. Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in IFC syndrome cells. *Chromosoma* 2005; **114**: 118–126.
- [10] HEUN P, ERHARDT S, BLOWER MD, WEISS S, SKORAAD, KARPEN GH. Mislocalisation of *in situ* *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Develop Cell* 2006; **10**: 303–315.
- [11] HOUBENA, SCHROEDER-REITER E, NAGAKI K, NASUDAS, WANNER G, MURATA M, ENDO TR. CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon *cereba* and GC-rich satellites and locates to centromeric substructure in barley. *Chromosoma* 2007; **116**: 275–283.
- [12] JANSEN LE, BLACK BE, FOLTZ DR, CLEVELAND DW. Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol* 2007; **176**: 795–805.
- [13] 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.
- [14] LAMB JC, YU W, HAN F, BIRCHLER JA. Plant chromosomes from end to end: telomeres, heterochromatin and centromeres. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 116–122.
- [15] LEE JY, LOPEZ JM, ORR-WEAVER TL. Control of centromere localization in the MEI-S332 cohesion protection protein. *Curr Biol* 2004; **14**: 1277–1283.
- [16] LEE HR, ZHANG W, LANGDON T, JIN W, YAN H, CHENG Z, JIANG J. Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11793–11798.
- [17] 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.

- [18] LERMONTOVA I, FUCHS J, SCHUBERT V, SCHUBERT I. Loading time of the centromeric histone H3 variant differs between plants and animals. *Chromosoma* 2007; **116**: 116–507–510.
- [19] MA J, BENNETZEN JL. Recombination, rearrangement, reshuffling and divergence in a centromeric region of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 383–388.
- [20] MA J, WING RA, BENNETZEN JL, JACKSON SA. Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. *Trends Genet* 2007; **23**: 134–139.
- [21] MADDOX PS, HYNDMAN F, MONEN J, OEDEGENA K, DESAI A. Functional genomics identifies a Myb domain-containing protein family required for assembly of CENP-A chromatin. *J Cell Biol* 2007; **176**: 757–763.
- [22] MARUYAMA S, KUROIWA H, MIYAGISHIMA SY, TANAKA K, KUROIWA T. Centromere dynamics in the primitive red alga *Cyanoschyzon merolae*. *Plant J* 2007; **49**: 1122–1129.
- [23] MASUMOTO H, NAKANO 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.
- [24] MASZEWSKI J, RYBACZEK D. Mechanizmy kondensacji chromosomów. *Post Biol Kom* 2004; **31** Supl. 22: 145–156.
- [25] MISULOVIN Z, SCHWARTZ YP, LI XY, KAHN T, GAUSE M, MacARTHUR S, FAY JC, EISEN MB, PIROTTA V, BIGGIN MD, DORSETT D. Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma* 2008; **117**: 89–102.
- [26] MORENO-MORENO O, TORRAS-LITORT M, AZORIN F. Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 6247–6255.
- [27] NAGAKI K, CHENG Z, OUYING S, TALBERT PB, KIM M, HENIKOFF S, BUELL CR, JIANG J. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet* 2004; **36**: 138–145.
- [28] NAKASHIMA H, NAKANO M, OHNISHI R, HIRAOKA Y, KANEDA Y, SUGINO A, MASUMOTO H. Assembly of additional heterochromatin distinct from centromere-kinetochore chromatin is required for *de novo* formation of human artificial chromosome. *J Cell Sci* 2005; **118**: 5885–5898.
- [29] OCAMPO-HAFALLA MT, KATOU Y, SHIRAHIGE K, UHLMAN F. Displacement and re-accumulation of centromeric cohesin during transient pre-anaphase centromere splitting. *Chromosoma* 2007; **116**: 531–544.
- [30] OLSZEWSKA MJ. DNA i białka centromerowe. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 167–185.
- [31] OLSZEWSKA MJ. Struktura i ewolucja kompleksu centromer/kinetochor. *Post Biol Kom* 2004; **31** Supl. 22: 5–19.
- [32] 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.
- [33] OLSZEWSKA MJ. Heterochromatyna i „heterochromatynizacja”. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 391–407.
- [34] OLSZEWSKA MJ. Neocentromery. I. Występowanie i struktura. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 259–271.
- [35] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Ewolucja rozmiarów genomów jądrowych u roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 737–751.
- [36] SCHUBERT I. Chromosome evolution. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 109–115.
- [37] TAKAHASU K, TAKAYAMA Y, MASUDA F, KOBAYASU Y, SAITOH S. Two distinct pathways responsible for the loading of CENP-A to centromeres in the fission yeast cell cycle. *Phil Trans R Soc B* 2005; **360**: 595–607.
- [38] TOPP CN, DAWE RK. Reinterpreting pericentromeric heterochromatin. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 647–653.
- [39] WARBURTON PE. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chrom Res* 2004; **12**: 617–626.
- [40] WONG LH, CHOO KHA. Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. *Trends Genet* 2004; **20**: 611–616.
- [41] YAN H, JIANG J. Rice as a model for centromere and heterochromatin research. *Chrom Res* 2007; **15**: 77–84.
- [42] YANG TY, LEE S, CHANG S B, YU Y, de JONG H, WING RA. In-depth analysis of the tomato chromosome 12 centromeric region: identification of a large CAA block and characterization of pericentromeric retrotransposons. *Chromosoma* 2005; **114**: 103–117.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 13.03. 2008 r.

Przyjęto: 24.04. 2008 r.

Banacha 12/16, 90-237 Łódź