

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

STRUKTURA I FUNKCIJA CENTROMERA
STRUCTURE AND FUNCTION OF CENTROMERE
SEMINARSKI RAD

Matko Čančer
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Bachelor Study of Molecular Biology)
Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ

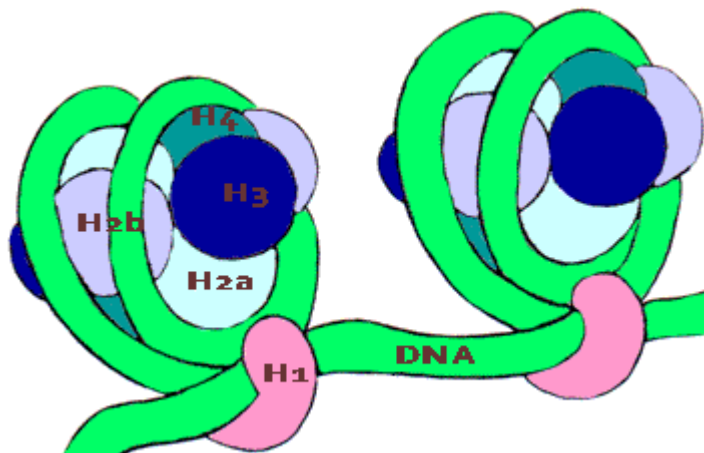
Sadržaj	2
1. Uvod.....	3
1.1. Kromatin	3
1.2. Metafazni kromosom	4
2. Centromer	5
2.1. Struktura centromernog kromatina	6
2.2. Građa centromernog nukleosoma	7
2.3. Sastavljanje nukleosoma CENH3	7
3. Kinetohor	10
3.1. Formiranje kinetohornog aparata	11
3.2. Interakcija kinetohora s diobenim vretenom.....	12
3.3. Kretanje kromosoma uzduž mikrotubula	13
3.4. Regulacija centromera i kinetohora	15
4. Neocentromeri.....	16
5. Bolesti vezane uz poremećaje centromera i kinetohornog aparata	18
6. Zaključak.....	20
7. Literatura.....	22
8. Sažetak	24
9. Summary	24

1. UVOD

Eukariotski genomi daleko su složeniji nego genomi prokariota te je sama DNA kod eukariota organizirana drugačije nego ona kod prokariota. Genom eukariota organiziran je u više kromosoma od kojih svaki sadržava jednu linearnu, dvolančanu molekulu DNA. Eukariotska DNA je vezana na male bazične proteine, histone, čija je funkcija u jezgri održavanje i pravilno pakiranje DNA (Cooper i Hausman 2004).

1.1. Kromatin

Proteini zajedno sa DNA čine kompleks koji se naziva kromatin i obično sadrži dvostruko više proteina nego same DNA. Većinu proteina kromatina čine histoni, a razlikujemo četiri tipa histona: H1, H2a, H2b, H3 i H4. Histoni su visoko konzervirani u eukariotskim organizmima. Histoni, zajedno s DNA čine osnovnu strukturnu jedinicu kromatina, a to je nukleosom, prikazan na slici 1 (Cooper i Hausman 2004).



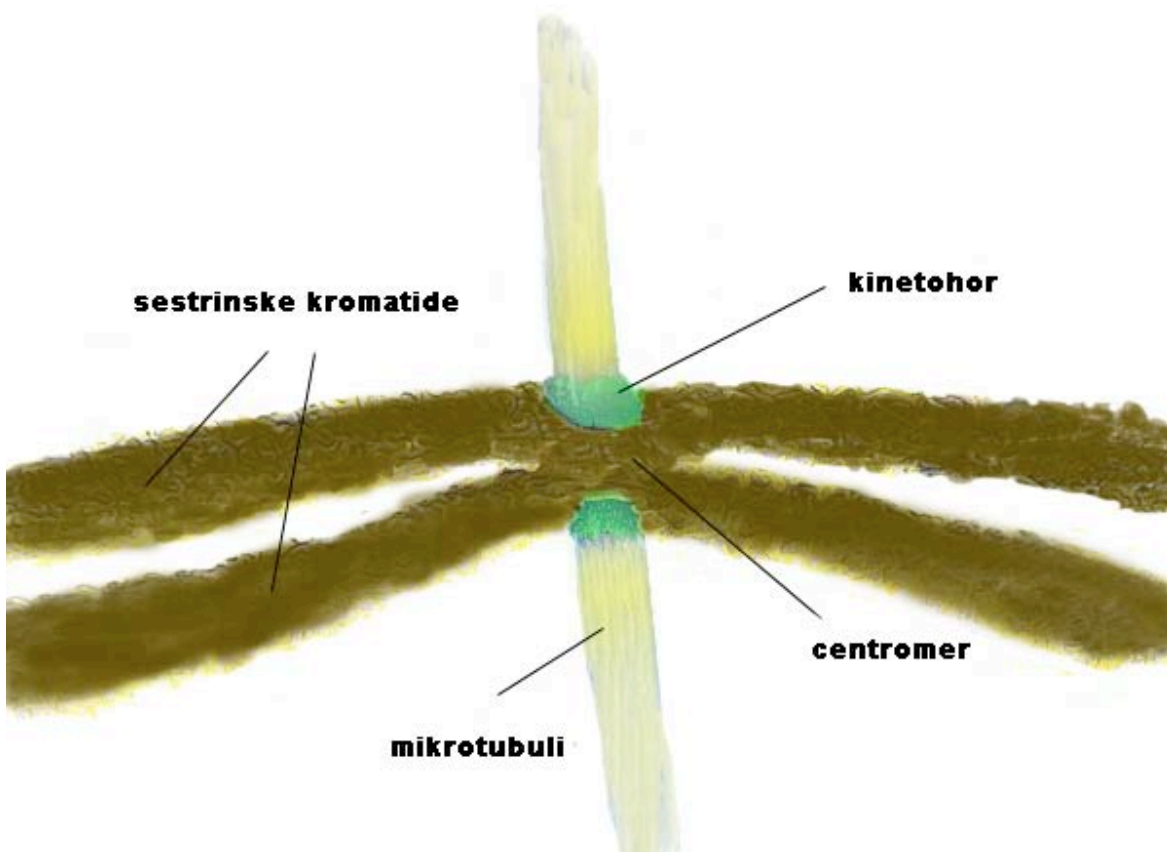
Slika 1. Shematska građa nukleosoma (model ogrlice). Na slici su označeni sržni histoni H2a, H2b, H3 i H4 te histon H1 (djelomično promijenjeno prema http://www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat_solubiologia/histonit.gif)

Kromatin dijelimo na eukromatin i heterokromatin. Eukromatin čini DNA koja je metabolički aktivna i s koje se prepisuju geni. Takva DNA je rahlije pakirana pa se bojanjem

acetokarminom eukromatin boji svjetlije. Za razliku od eukromatina, heterokromatin je gušće pakiran, s njega se ne prepisuju geni te se boji tamnije. Također, heterokromatin sadrži i uzastopno ponavljajuće dijelove DNA. Najveći broj takvih ponavljanja nalazi se upravo u centromernim i telomernim regijama (Cooper i Hausman 2004).

1.2. Metafazni kromosom

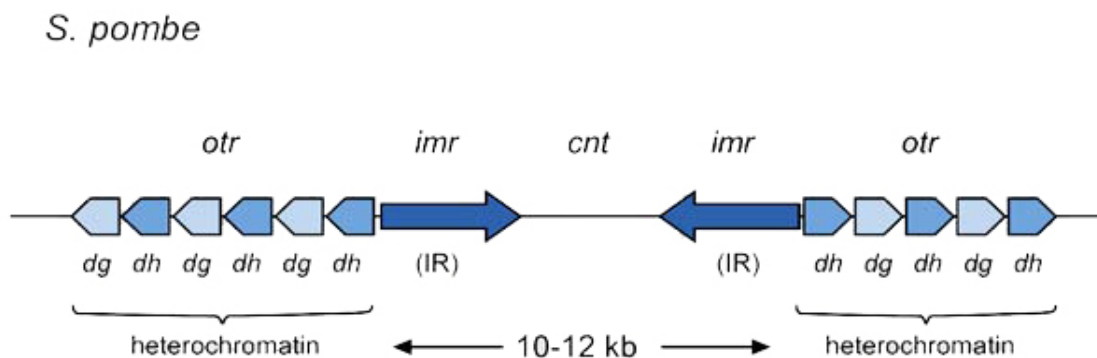
Kako se stanica približava mitozu, kromatin se sve više kondenzira i oblikuje se metafazni kromosom, shematski prikazan na slici 2. Ovdje jasno postaje vidljiv centromer, regija zaslužna za prihvaćanje kromosoma na niti diobenog vretena. Struktura koja omogućava vezanje kromosoma na mikrotubule diobenog vretena naziva se kinetohor (Cooper i Hausman 2004). Detaljnija funkcija centromera i kinetohora opisana je u slijedećim poglavljima.



Slika 2. Metafazni kromosom. (djelomično promijenjeno i preuzeto sa <http://www.lbl.gov/Publications/Currents/Archive/images/Jan-11-2002/kinetochore.jpg>)

2. CENTROMER

U eukariotskim organizmima centromeri su organizirani u tri nezavisna dijela. Unutarnji dio koji predstavlja centromerni kromatin, zadužen je za interakciju s proteinima kinetohora, koji pak omogućavaju interakciju s mikrotubulima diobenog vretena (Dalal i Bui 2010). Struktura centromera kod kvasca *Schizosaccharomyces pombe* također se sastoji od tri dijela, prikazana na slici 3. Centromer ovog organizma sastoji se od jedinstvenog područja (*cnt*) koji se nalazi unutar dva identična invertna ponavljanja (*imr*). Iza tih ponovljenih sekvenci dolazi vanjska ponavljajuća regija (*otr*) (Ishi 2009).



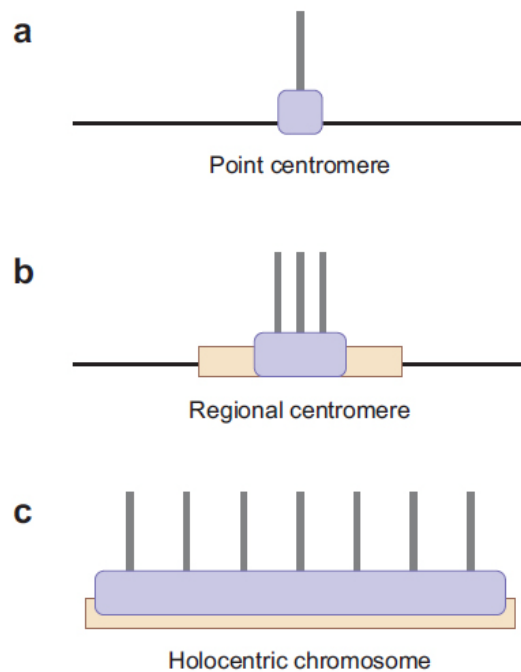
Slika 3. Struktura centromera kvasca *Schizosaccharomyces pombe*. Centromerni kromatin čini regiju *cnt* nakon koje slijede invertna ponavljanja *imr* iza kojih se nalaze vanjske ponavljajuće regije *otr* (Ishi 2009)

Centromerni kromatin bogat je AT ponavljanjima koja su upakirana u specifični centromerni nukleosom – CENH3 nukleosom. Nukleosom CENH3 je zapravo centromerna varijanta histona H3, a varijante centromernog histona pronađene su kod čovjeka, kvasca, biljke *Arabidopsis thaliana*, oblića *Caenorabditis elegans* te vinske mušice (Dalal i Bui 2010). Iako postoje evidentni dokazi da je centromerna regija epigenetički regulirana, ipak glavnu ulogu u mnogim vrstama ima DNA sekvenca. Tako kod ljudi specifičnu sekvencu čini alfa satelitna DNA te kod kvasca središnja jezgra. Centromerna sekvenca u mnogim organizmima nije

očuvana, dapače, postoje velike razlike, no unatoč tim razlikama svi centromeri dijele zajedničku funkciju (Buscaino i sur. 2010).

2.1. Struktura centromernog kromatina

Postoje tri tipa centromera prema strukturi koju posjeduju, a razlike proizlaze iz broja mikrotubula koji se vežu na njih i prema tome sadrže li pericentromerni kromatin. Prema tome, organizme možemo podijeliti na monocentrične i holocentrične (slika 4). Monocentrični organizmi mogu imati točkasti centromer, kao što je slučaj kod kvasca (slika 4a) ili regionalni centromer, kao što je to kod čovjeka (slika 4b). Predstavnik holocentričnih organizama je oblič *C. elegans* koji ima tzv. difuzne centromere raspoređene po čitavom kromosomu te sukladno s time stupa u interakciju s više mikrotubula (slika 4c) (Ekwall 2007).



Slika 4. Tri tipa centromera: **a** točkasti centromer; **b** regionalni centromer; **c** difuzni centromer (Ekwall 2007)

Centromerna DNA kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sadrži vrlo mali broj baza, svega 125 pb. Unutar te sekvence postoji regija CDEIII sa palindromskim ponavljanjima ukupne duljine 25 pb. Sekvenca CDEIII okružena je s jedne strane s ~80 pb dugom sekvencom CDEII, bogatom AT baznim parovima, a s druge strane sekvencom CDEI, duljine ~8 pb. Ovakav tip

centromera naziva se točkasti centromer. S druge strane, centromer kvasca *S. pombe* i višestaničnih organizama ne sadrži specifičnu sekvencu i mnogo su veći. Takav tip centromera naziva se regionalni centromer (Bloom i Joglekar 2010).

2.2. Građa centromernog nukleosoma

Kao što je ranije spomenuto, centromerni nukleosom poprilično se razlikuje u proteinskoj strukturi od normalnog, kanonskog nukleosoma. U centromernom nukleosomu histon H3 zamijenjen je centromernim histonom CENH3 (CENP-A). Protein CENP-A veličine 18 kDa, prvi puta je izoliran i okarakteriziran kod čovjeka. Kada je vezan na DNA, CENP-A formira strukturu nalik disku promjera 0,5 – 1,0 μm . U ljudskoj centromernoj regiji vezano je ~15 000 nukleosoma CENP-A. Nukleosomi CENP-A, vezani na centromerni kromatin, zajedno čine kvaternu strukturu, potpuno drugačiju od običnog histona H3 koji vezan na kromatin stvara niti. U centromernoj regiji također može doći do ugradnje i histona H3, ali je on metiliran na Lys4 te se na taj način razlikuje od kanonskog histona H3. Aminokiselinska sekvenca histona H3 i CENP-A dijeli 51% sličnosti. N-terminalna domena proteina CENP-A u potpunosti se razlikuje od N-terminalne domene histona H3, dok s druge strane N-terminus proteina CENP-A dijeli veliku sličnost s varijantama centromernog histona H3 u drugim vrstama, ukazujući na mogućnost da je upravo ta regija zadužena za interakciju sa komponentama kinetohora (Valdivia i sur. 2009).

Nukleosom CENH3 (CENP-A) veže se na DNA duljine ~120 pb, dok se kanonski nukleosom s histonom H3 veže na DNA duljine ~150 pb. U prisutnosti chaperona NAP-1, nukleosom CENH3 s lakoćom otpušta H2a i H2b dimere, za razliku od nukleosoma H3. Još jedna zanimljiva karakteristika CENH3 nukleosoma jest da se u prisutnosti heparina, CENH3/H4 tetramer, u potpunosti rastavlja (Dalal 2009).

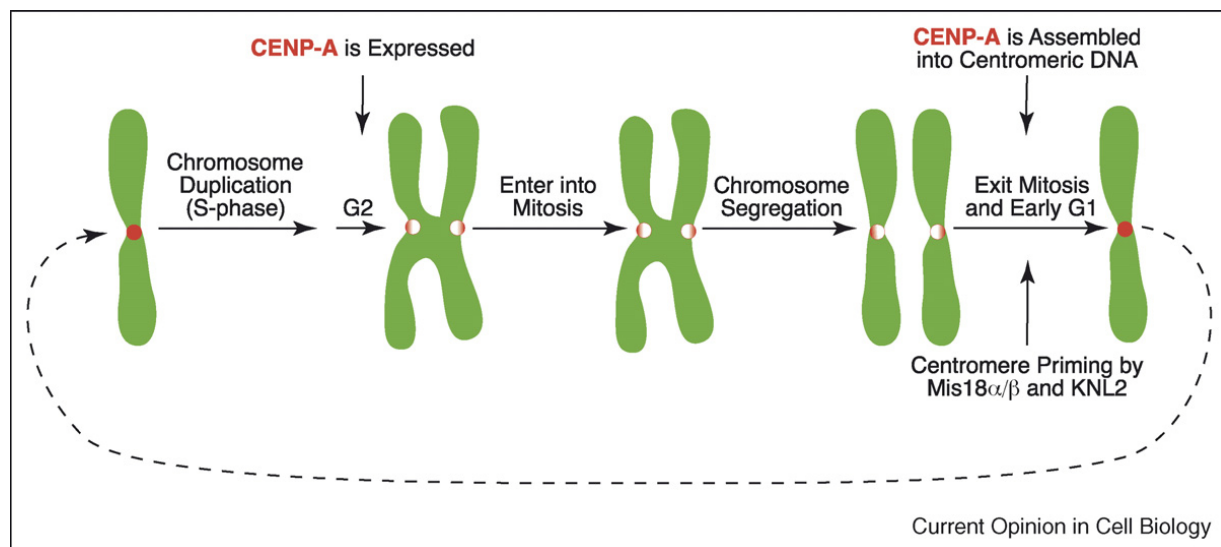
2.3. Sastavljanje nukleosoma CENH3

Istraživanjima je već prije više od 10 godina ustanovljeno da je ugradnja histona CENH3 u centromernu regiju vođena chaperonima. Međutim, model ugradnje CENH3 još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Prema jednom modelu, CENH3 pronalazi specifičnu metu u centromernoj regiji u koju se ugrađuje, dok prema drugom modelu, CENH3 se ugrađuje u kromatin na način

da popunjava praznine. Istraživanja na kvascu pokazuju da ukoliko se delecijom inaktiviraju proteini Mis16 i Mis18, dolazi do gubitka funkcije centromera i pogrešne segregacije kromosoma. Mis18 je zadužen za regrutiranje Cse4 (varijanta CENH3) dok Mis16 mobilizira H3 ostavljajući na taj način praznine u nukleosomima i otvara put ugradnji Cse4. Ovo istraživanje sugerira da bi mogući model ugradnje CENH3 u nukleosom bio popunjavanjem praznine (Dalal i Bui 2010).

Detaljan mehanizam ugradnje histona CENP-A (CENH3) nije u potpunosti razjašnjen. Histon H3 korsiti proteine CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) i HIRA za ugradnju u kromatin. Nedavna istraživanja pokazuju da ova dva proteina također mogu sudjelovati u ugradnji CENP-A, kao dio kompleksa za ugradnju CENP-A. Za prepoznavanje CATD (mjesto za koje se veže CENP-A) koristi se protein HJURP. Iako molekularni mehanizam prepoznavanja CATD od strane proteina HJURP nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da je HJURP specifični chaperon proteina CENP-A (Bernad i sur. 2009).

Ekspresija i ugradnja CENP-A proteina strogo je regulirana i ovisna u fazi staničnog ciklusa. Ekspresija CENP-A započinje u G2 fazi staničnog ciklusa, dok se ugradnja odvija u kasnim fazama mitoze te u početku G1 faze staničnog ciklusa (Black i Bassett 2008). Kao što je spomenuto, ugradnju CENP-A omogućuje topivi chaperon HJURP u kasnoj telofazi te u početku G1 faze (Buscaino i sur. 2010). Ovisnost ekspresije i ugradnje CENP-A o fazi staničnog ciklusa prikazan je na slici 5.



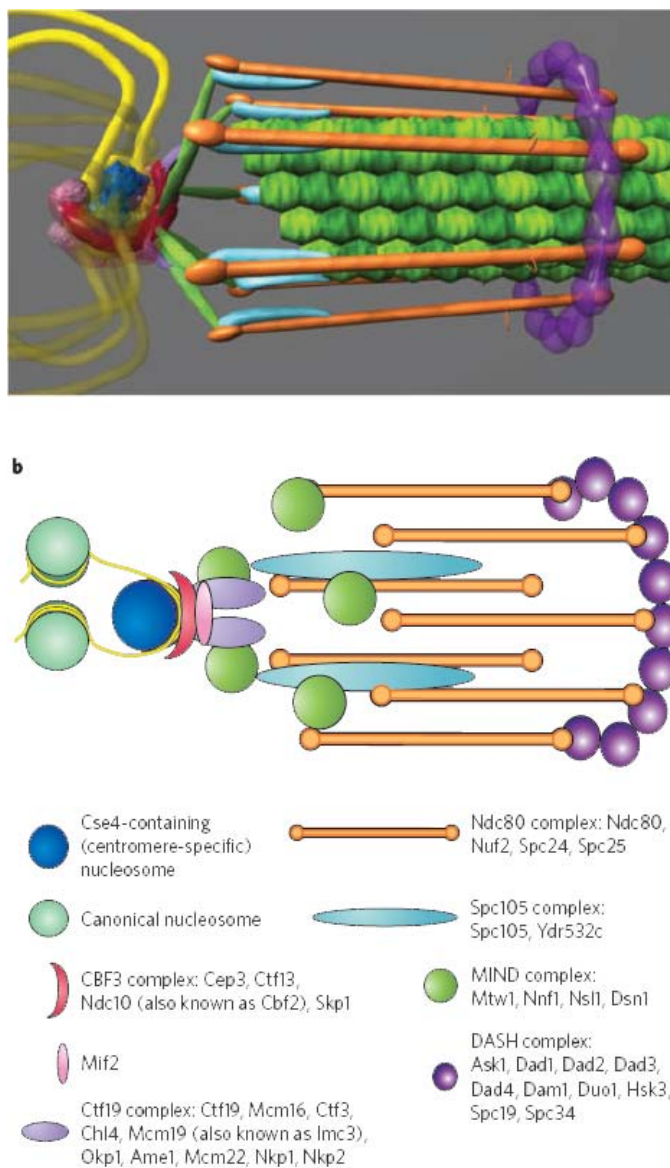
Slika 5. Ekspresija i ugradnja proteina CENP-A regulirana je fazom staničnog ciklusa. Ekspresija se odvija za vrijeme G2 faze, dok se ugradnja odvija za vrijeme izlaska iz mitoze te u ranoj G1 fazi (Black i Bassett 2008).

Za stvaranje funkcionalnog centromera u normalnim uvjetima potrebna je specifična nukleotidna sekvenca. U kvasca *S. cerevisiae* sama nukleotidna sekvenca centromerne regije dovoljna je za poticanje ugradnje CENP-A proteina eksprimiranog sa plazmida *CEN*. Nedavna istraživanja pak pokazuju da uz samu nukleotidnu sekvencu centromerne regije važnu ulogu ima i pericentromerni kromatin, osiguravajući na taj način povoljan okoliš za ugradnju CENP-A i stvaranje CENP-A kromatina (Buscaino i sur. 2010).

Da bi centromer savršeno funkcionirao, dovoljno je da kromosom sadrži 125 pb dugu sekvencu na koju se može vezati CENP-A protein. Prema tome, postavlja se logično pitanje, zašto svi centromeri nisu ovako jednostavni. Naime, epigenetički mehanizmi osiguravaju spašavanje slomljenog ili rearažiranog kromosoma koji bi inače bio izgubljen. Formiranje neocentromera, o čemu će biti više riječi kasnije, predstavlja jedan od načina spašavanja kromosoma, ali također ima značajan utjecaj u evoluciji genoma i specijaciji. Neocentromeri se pojavljuju na mjestima gdje se to ne bi očekivalo, akumuliraju „sebičnu“ DNA koja s lakoćom veže proteine kinetohora te se na taj način stvaraju satelitne DNA kakve pronalazimo u brojnim centromerima. Upravo činjenica da postoje centromeri kojima nedostaju repetitivne regije podržava teoriju neocentromerizacije i objašnjava postanak kompleksnih centromera (Buscaino i sur. 2010).

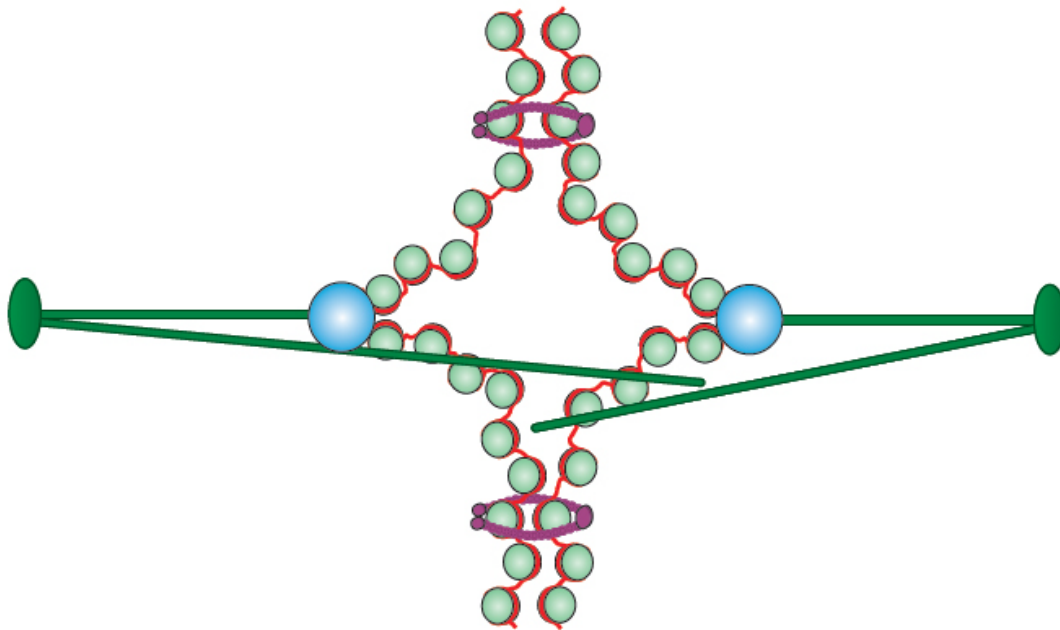
3. KINETOHOR

Da bi centromer pravilno funkcionirao, moraju biti zadovoljena tri fizikalno-kemijska uvjeta: specifično smatanje kromatina, sastavljanje kinetohora te ostvarivanje pokretačkih sila diobenog vretena (Black i Bassett 2008). Kinetohor je struktura koja omogućuje vezanje kromosoma na + kraj mikrotubula, a gradi ga više od 70 proteina (Bloom i Joglekar 2010). Na slici 6. prikazan je kinetohor.



Slika 6. Proteinska arhitektura kinetohora u kvasca *S. cerevisiae* (Bloom i Joglekar 2010)

Radi očuvanja stabilnosti genoma i očuvanja prijenosa genetičke informacije sa stanice majke na stanicu kćer, segregacija kromosoma mora biti iznimno učinkovita. Diobeno vreteno eukariotske stanice ima upravo tu mogućnost, a njegovu osnovu predstavlja dinamička mreža polimera tubulina. Na svaku sestrinsku kromatidu kromosoma veže se kinetohor koji predstavlja vezu između kromosoma i tubulinskih lanaca (mikrotubula) (Bloom i Joglekar 2010). Na slici 7. shematski je prikazana interakcija niti diobenog vretena s kinetohorom.



Slika 7. Shema interakcije diobenog vretena i kinetohora. Zelenom bojom prikazani su elementi diobenog vretena (mikrotubuli i mikrotubularni organizacijski centar), plavim su prikazani kinetohori, crvenim je označena DNA, a svijetlozelenim histoni (Bloom i Joglekar, 2010).

3.1. Formiranje kinetohornog aparata

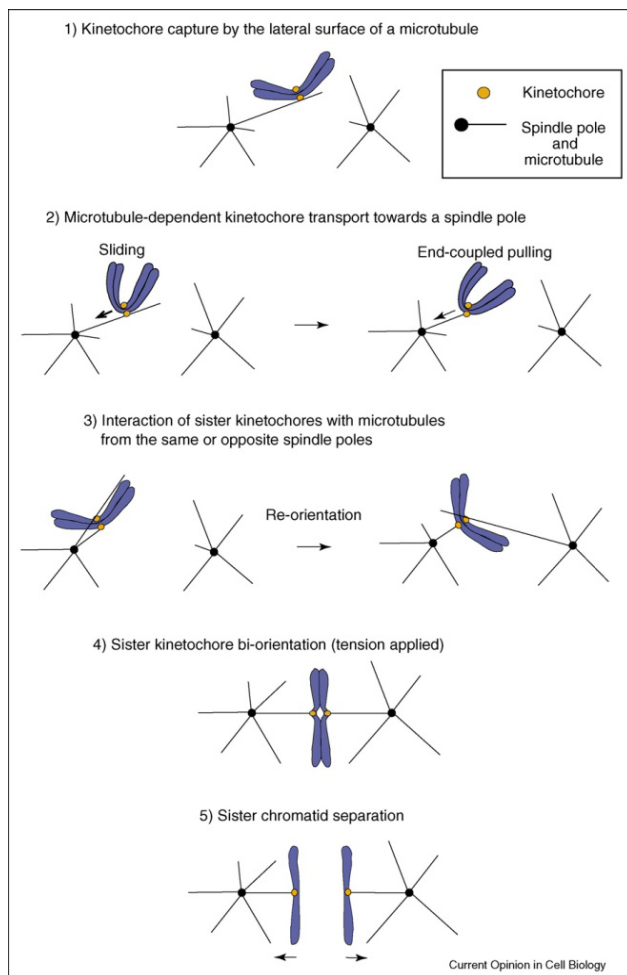
Tijekom staničnog ciklusa određeni centromerni proteini vezani su za centromer permanentno, dok su drugi vezani samo u određenoj fazi staničnog ciklusa. Konstitutivno vezani proteini jesu CENP-A, CENP-B i CENP-C. Nukleosom CENP-A direktno regrutira kompleks NAC sastavljen od CENP-C, CENP-M, CENP-N, CENP-T, CENP-U i CENP-H te uz pomoć proteina CENP-P tvori kinetohornu ploču. Kompleks CENP-A – NAC dalje služi kao temelj za nanošenje distalnih kinetohornih proteina CENP-K, CENP-L, CENP-O, CENP-Q, CENP-R i CENP-S (zajednički nazvan kompleks CAD). Biokemijskim i bioinformatičkim metodama

utvrđeno je da kinetohor sadrži još jedan strukturni protein KMN koji se direktno veže na mikrotubule, a preko kompleksa CENP-H/I na kinetohornu ploču (Valdivia i sur 2009).

Od nekonstitutivno vezanih proteina važno je spomenuti skupinu kinaza Aurora zaduženih za fosforilaciju proteina CENP-A. Fosforilacija proteina CENP-A omogućuje epigenetičku kontrolu sastavljanja kinetohora, a moguće je i da sudjeluje u pravilnoj segregaciji kromosoma (Valdivia i sur 2009).

3.2. Interakcija kinetohora s diobenim vretenom

Za pravilnu segregaciju kromosoma vrlo je bitna pravilna interakcija kinetohora i mikrotubula (Tanaka i Desai 2008). Na slici 8. prikazani su koraci nužni za ostvarivanje funkcionalne veze između kinetohora i mikrotubula.



Slika 8. Shema nastanka veze između mikrotubula i kinetohornog aparata (Tanaka i Desai 2008).

U prvom koraku kinetohor se prihvaća za mikrotubule s jednog pola stanice, a zatim i s drugog pola. Vrlo rijetko može se dogoditi da se oba kinetohora istog kromosoma prihvate za mikrotubule iz istog pola stanice. Tada se nužno mora dogoditi preorijentacija kinetohora, prikazana u koraku 3 na slici 8. U sljedećem koraku prekidaju se veze između sestrinskih kromatida i započinje odvajanje kromatida i kretanje prema polovima stanice (Tanaka i Desai 2008).

Vanjski dio kinetohora čini kompleks NDC80 i predstavlja ključni element kinetohora. Njegova uloga i aminokiselinska sekvenca visoko je očuvana od kvasca do čovjeka. Ukoliko se pojavi poremećaj u kompleksu NDC80, u stanici dolazi do ozbiljnih problema i velikih poteškoća u segregaciji kromosoma (Tanaka i Desai 2008).

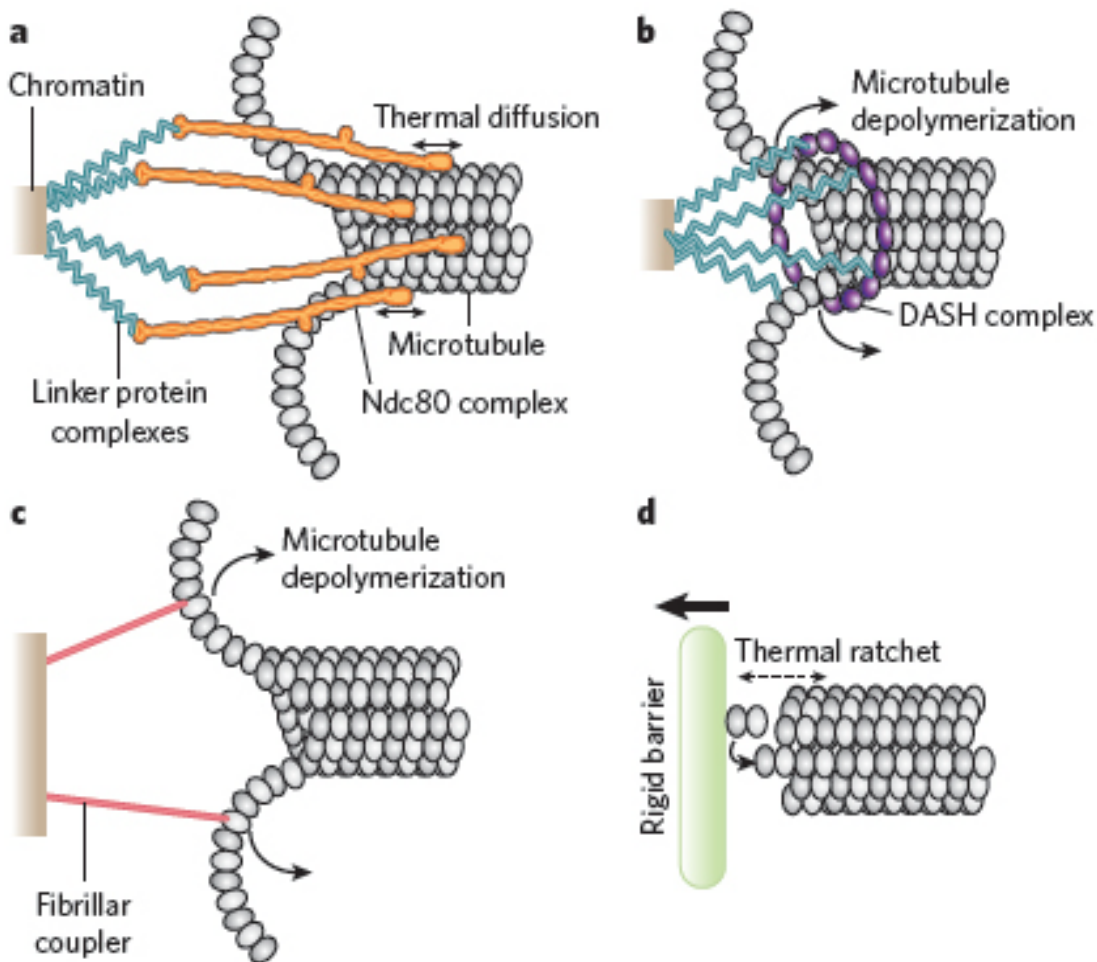
3.3. Kretanje kromosoma uzduž mikrotubula

Otkriće polimerne strukture mikrotubula, koji rastu i smanjuju se putem dodavanja i oduzimanja podjedinica s kraja mikrotubula, predlaže mogućnost stvaranja pokretačke sile upravo ovim mehanizmom. Polimerizacija mikrotubula odvija se dodavanjem GTP-tubulinskih dimera na + kraj mikrotubula (Joglekar i sur. 2010).

Kinetohor se pričvršćuje za lateralnu površinu mikrotubula i zatim se giba u smjeru polova stanice. Kod nekih organizama brzina putovanja kinetohora je relativno velika, iznosi 10 – 50 $\mu\text{m}/\text{min}$, dok u drugima, poput kvasca iznosi svega 1 – 1,5 $\mu\text{m}/\text{min}$. Tako velika razlika u brzini putovanja posljedica je upotrebe različitih motora. Višestanični organizmi uglavnom koriste procesivni motor dinein, dok kod kvasaca pronalazimo neprocesivni motor Kar3 (Tanaka i Desai 2008).

Za pokretanje kinetohora nužna je sila, a nju osiguravaju mikrotubuli diobenog vretena. Kromosomi su preko kinetohora cijelo vrijeme vezani za + kraj mikrotubula. Polimerizacijom ili depolimerizacijom mikrotubula ostvaruje se kretanje kromosoma prema ekvatorijalnoj ravnini ili prema polovima. Ova karakteristika mikrotubula daje dva moguća modela nastanka pokretačke sile, prikazana na slici 9: polarna difuzija i pokretanje silom. U prvom modelu, prikazanom na slici 9a, kinetohor stupa u interakciju s mikrotubulima preko kompleksa NDC80 (Tanaka i Desai 2008, Joglekar i sur. 2010). Depolimerizacija mikrotubula osigurava snagu potrebnu za pokretanje kinetohora prema polu stanice. Otkriće kompleksa DASH omogućilo je stvaranje

novog modela (slika 9b) prema kojem bi depolimerizacija mikrotubula davala energiju kompleksu DASH za kretanje prema kraju mikrotubula. Ultrastrukturna istraživanja pokazala su postojanje nitastih spojnika (eng. *couplers*) prikazanih na slici 9c. Potonje otkriće otvara mogućnost da nitasti spojnici osiguravaju silu potrebnu za pokretanje kinetohora (Tanaka i Desai 2008).



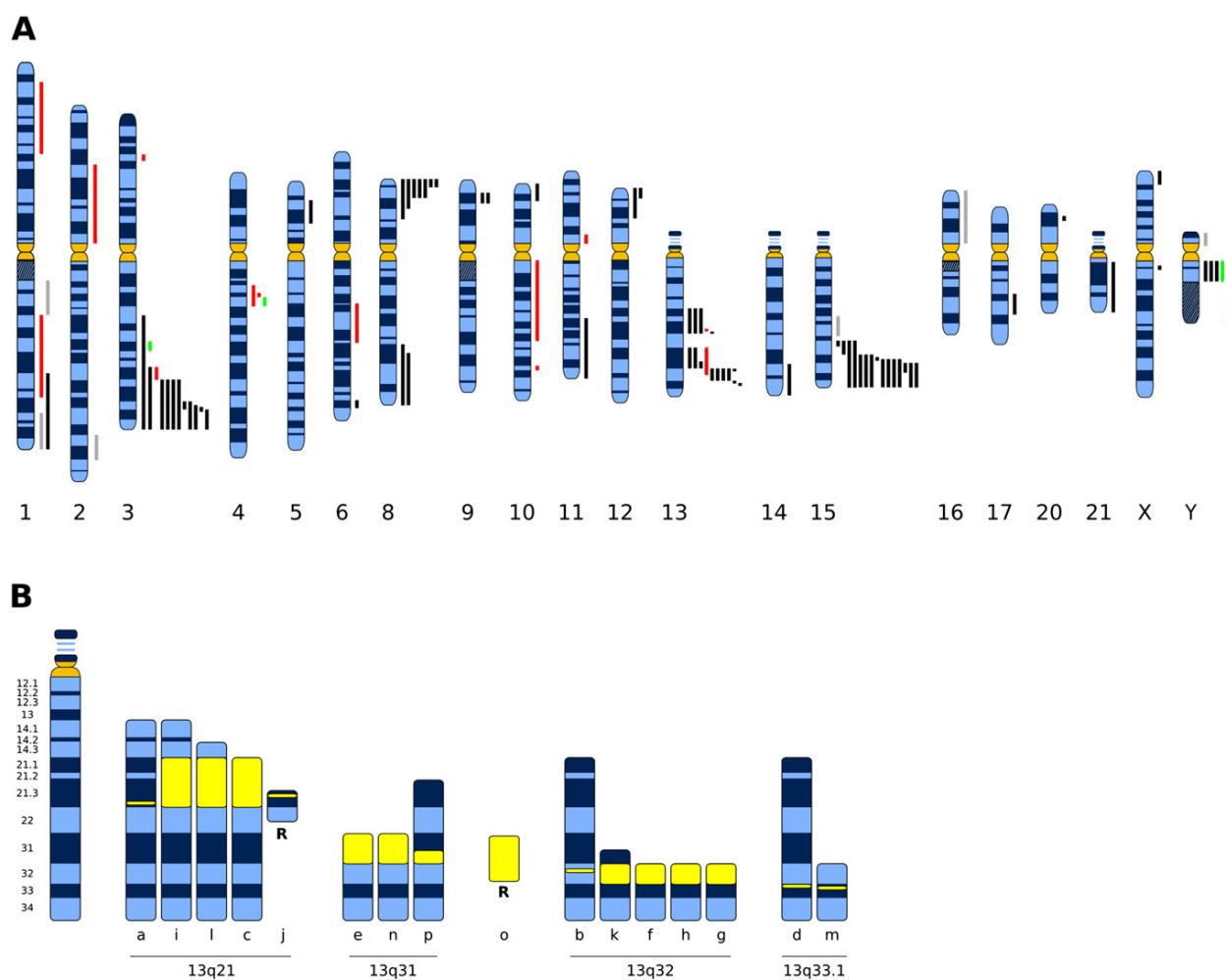
Slika 9. Modeli pokretanja kinetohora uzduž mikrotubula. **a** polarna difuzija (biased diffusion); **b, c** pokretanje silom (forced walk) (Tanaka i Desai 2008).

3.4. Regulacija centromera i kinetohora

Istraživanjima na kukuruzu otkrivena je mala molekula RNA koja stupa u interakciju s kinetohorom, međutim, njezina točna uloga do danas nije razjašnjena. Pretpostavlja se da bi mogla sudjelovati u kontroli ugradnje CENH3 ili u obilježavanju centromera. Također, nije razjašnjeno djeluje li ova RNA *in cis* ili *in trans*, međutim, činjenica da je slična molekula RNA pronađena i kod čovjeka, pretpostavlja se da je interakcija kinetohora sa ovom RNA univerzalni fenomen (Birchler i sur. 2009).

4. NEOCENTROMERI

Danas se jako puno zna o strukturalnim i funkcionalnim karakteristikama neocentromera, međutim, još uvijek vrlo slabo poznajemo mehanizam kojim nastaju. Dokazi o postojanju i formiranju neocentromera pronađeni su u različitim eukariotskim vrstama. Jedna od mogućih teorija nastanka neocentromera je aberantna ugradnja proteina CENP-A tijekom replikacije DNA. Također, istraživanja pokazuju da prekomjerna ekspresija proteina CENP-A u stanicama



Slika 10. Konstitutivni centromeri kod čovjeka. **A** mjesta konstitutivnog nastajanja centromera u ljudskom genomu. Okomite crte predstavljaju mjesta nastanka neocentromera – različita boja predstavlja različite klase neocentromera; **B** Vruća mjesta neocentromerizacije na 13q. Žutom bojom prikazana su mjesta neocentromerizacije (Marshall i sur. 2008)

vinske mušice i čovjeka dovodi do pogrešne ugradnje CENP-A duž krakova kromosoma (Marshall i sur. 2008, Black i Bassett 2008). Neocentromeri kod čovjeka nastaju u regijama gdje postoji alfa satelitna DNA ili neka druga uzastopno ponavljajuća sekvenca. Istraživanja pokazuju da ovakvi sljedovi imaju sposobnost regrutirati sve kinetohorne proteine, osim proteina CENP-B (Buscaion i sur. 2010).

Prema tome, ugradnja proteina CENP-A u krakove kromosoma mogla bi biti ozbiljan problem, s obzirom da može doći do nastanka multicentričnih kromosoma. Aberantna ugradnja proteina CENP-A, na sreću, ne dovodi uvijek do stvaranja novog centromera. Naime, kromosomi koji već posjeduju funkcionalni centromer s velikom efikasnošću uklanjaju pogrešno ugrađeni protein CENP-A, najvjerojatnije pomoću faktora koji djeluju *in cis*. S druge strane, acentrični kromosomi, nastali kromosomskim lomovima i rearanžmanima, imaju velik potencijal za stvaranje neocentromera (Marshall i sur. 2008, Buscaino i sur. 2010).

Neocentromeri ne nastaju na nasumičnim mjestima u kromosomu, već za to postoje vruća mjesta na kojima je povoljno nastajanje neocentromera. U ljudskom genomu to su primjerice 3q, 8p, 13q i 15q (slika 10a). Očito je da je na nekim mjestima u kromosomu nastanak neocentromera povoljniji nego na drugima. Na q kraku kromosoma 13 pronađene su dvije jasne regije pogodne za neocentromerizaciju ili vruća mjesta neocentromerizacije i to unutar citogenetičkih pruga 13q21 i 13q32 (slika 10b). Ukoliko se pokaže da je postojanje vrućih mjesta univerzalno pravilo, to bi značilo da je neocentromerizacija usko povezana sa sekvencom DNA u kojoj nastaje neocentromer (Marshall i sur. 2008).

5. BOLESTI VEZANE UZ POREMEĆAJE CENTROMERA I KINETOHORNOG APARATA

Molekularni mehanizmi očuvanja pravilne segregacije kromosoma kritični su za očuvanje euploidije u eukariotskim organizmima. Nažalost, brojni mehanizmi mogu destabilizirati kromosome, primjerice umnažanje centrosoma, pogreške u interakciji mikrotubula i kinetohora te poremećaji u kretanju kromosoma prema polovima stanica. Aneuploidija, jedna od posljedica poremećaja u radu segregacijske mašinerije, može nastati na 5 različitih načina: 1) povećanje broja centrosoma što dovodi do multipolarne mitoze, 2) gubitak kromosoma zbog defekata u radu kinetohora, 3) pogrešna segregacija kromosoma uslijed poremećaja u odvajanju sestrinskih kromatida, 4) mitotsko proklizavanje zbog inhibicije mitoze što dovodi do tetraploidije i 5) izostanak citokineze zbog pogreške u formiranju mikrofilamenata. Aneuploidija, kako pokazuju istraživanja, ima ključnu ulogu u karcinogenezi i nastanku tumora (Iarmarcovai i sur. 2006).

Pogreške u sastavljanju kinetohornog aparata, kao što je navedeno u prethodnom odlomku, mogu dovesti do ozbiljnih problema, vrlo često do aneuploidija. Često takva oštećenja nisu letalna za samu stanicu, ali zbog poremećenog broja kromosoma, takva je stanica sposobna inducirati karcinom. Nedavna istraživanja pokazuju da bi uzrok ovakvim poremećajima mogla biti prekomjerna ekspresija proteina CENP-A. Ranije je navedeno kako prekomjerna ekspresija CENP-A dovodi do stvaranja multicentričnog kromosoma te brojnih drugih poremećaja. S druge strane, stanicama kojima je utišan gen za CENP-A pokazuju također defekte i to već u ranim fazama razvoja. U takvim stanicama pojavljuju se brojni mikronukleusi, fragmentacija kromatina te hiperkondenzacija kromatina. Imunofluorescentnim bojanjem pokazano je u stanicama bez CENP-A da se ostale komponente kinetohora, prvenstveno CENP-B i CENP-C nalaze razbacane po kromosomu, ukazujući tako na važnost proteina CENP-A u funkcioniranju centromera (Valdivia i sur. 2009).

Na žalost, danas ne postoje lijekovi kojima bi se liječili pacijenti oboljeli od ovakvih poremećaja. Utišavanje gena za CENP-A zasigurno nije metoda kojom bi se mogli liječiti ovakvi poremećaji jer dovodi do smrti i zdravih i bolesnih stanica. Najnovije spoznaje govore da je za aktivnost proteina CENP-A potrebna fosforilacija. Također, ukoliko se fosforilirani CENP-A

inaktivira protutijelima, stanica završava svoj ciklus u prometafazi, prestaje se dijeliti i odlazi u apoptozu. S druge strane, autoimune bolesti tipa skleroderme sadrže visoku koncentraciju autoprotutijela za proteine CENP-A i CENP-B. Takvi pacijenti pokazuju također visok stupanj aneuploidija. Prema tome, koristeći ove činjenice, smatra se da mogućnost liječenja leži u varijabilnim N-terminalnim i konzerviranim C-terminalnim domenama proteina CENP-A. U budućnosti bi se ovakvi lijekovi koristili za pravilnu segregaciju kromosoma, liječenje aneuploidija i samim time osiguravali bi pravilnu diobu stanica (Valdivia i sur. 2009).

6. ZAKLJUČAK

Kromosomi su iznimno bitan dio stanice i imaju iznimno važnu ulogu u životu stanice. Oni osiguravaju nasljednu uputu kojim stanica točno zna što joj sve treba za normalan život i razmnožavanje. Kromosomi su u svojoj osnovi građeni vrlo jednostavno, sastoje se od dvolančane molekule DNA koja na prvi pogled izgleda veoma monotono – sastoji se od svega 4 različite podjedinice (adenin, gvanin, citozin i timin). Molekula DNA je vezana na proteine – histone, koji omogućuju pakiranje DNA i zajedno u kompleksu proteini i DNA čine kromatin. Kromatin dijelimo na heterokromatin – nekodirajući dio koji je kompaktnije pakiran i eukromatin – kodirajući dio koji je rahlije pakiran.

Od iznimne je važnosti jedan dio kromosoma, a to je centromer. Centromer osigurava vezanje kromosoma na niti diobenog vretena putem kinetohora. Diobeno vreteno izuzetno je efikasan mehanizam pravilne segregacije kromosoma i prijenosa sa stanice majke na stanicu kćer, pod uvjetom da sve komponente, centromer, kinetohor i diobeno vreteno, pravilno funkcioniraju.

Centromer je definiran svojom nukleotidnom sekvencom i postoje tri tipa centromera: najjednostavniji točkasti centromer, prisutan kod kvasca *S. cerevisiae*, zatim regionalni centromer, prisutan kod čovjeka te na kraju difuzni centromer, prisutan kod oblića *C. elegans*. Za razliku od ostatka kromatina, centromerni kromatin sadrži centromernu varijantu histona H3 – CENH3, koji je nađen kod velikog broja eukariota. U različitim organizmima se različito naziva, pa je tako kod čovjeka to protein CENP-A. Ugradnja CENH3 pažljivo je regulirana i ovisna o staničnom ciklusu. U G2 fazi započinje ekspresija CENH3 dok u kasnoj telofazi i u početku G1 faze traje ugradnja CENH3 u centromerni kromatin.

Za pravilnu funkciju centromera važan je i kinetohorni aparat. Kinetohor je sastavljen od više od 70 proteina i omogućuje vezu između kromosoma i mikrotubula diobenog vretena. Depolimerizacija mikrotubula daje energiju potrebnu za kretanje kromosoma uz pomoć

procesivnih motora dineina kod višestaničnih organizama te neprocesivnih motora Kar3, kao što je to kod kvasca.

U kromosomu također može doći do procesa neocentromerizacije, što je često povezano uz različite poremećaje, ali također može predstavljati korisno svojstvo u acentričnim kromosomima. Neocentromerizacija je proces stvaranja novih centromera (neocentromera) u regijama gdje to nije za očekivati. Međutim, za nastanak neocentromera također je važna DNA sekvenca, tako da u kromosomu postoje vruća mjesta nastanka neocentromera. Vruća mjesta obično su vezana uz alfa satelitnu DNA ili AT ponavljanja. Mehanizam nastanka neocentromera strogo je reguliran, tako da do neocentromerizacije neće doći ukoliko na kromosomu već postoji funkcionalni centromer. Za neocentromerizaciju također je, kao i kod normalnog centromera, važna ugradnja centromernog histona CENP-A (CENH3).

Iako neocentromerizacija može predstavljati prednost, ukoliko se pojavi acentrični kromosom, ponekad se može dogoditi da upravo taj proces dovede do poremećaja u stanici i do nastanka tumora. Vrlo čest uzrok nastanka tumora jesu aneuploidije vezane uz poremećaje rada segregacijske mašinerije. Danas se veliki napori ulažu u pronalazak lijeka za rješavanje ovakvih poteškoća, ali još uvijek bez značajnih rezultata.

7. LITERATURA

- Allshire R C, Karpen G H, 2008, Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Review Genetics* **9**(12), 923 – 937
- Bernad R, Sánchez P, Losada A, 2009, Epigenetic specification of centromeres by CENP-A. *Experimental Cell Research* **315**, 3233 – 3241
- Birchler J A, Han F, 2009, Maize Centromeres: Structure, Function, Epigenetics. *Annual Review of Genetics* **43**, 287 – 303
- Black B E, Bassett E A, 2008, The histone variant CENP-A and centromere specification. *Current opinion in Cell Biology* **20**, 91 – 100
- Bloom K, Joglekar A, 2010, Towards building a chromosome segregation machine. *Nature* **464**, 446 – 456
- Buscaino A, Allshire R, Pidoux A, 2010, Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Current Opinion in Genetics & Development* **20**, 1 – 9
- Cooper G M, Hausman R E, 2004, Stanica – molekularni pristup, 3. izdanje, 150 – 157
- Dalal Y, 2009, Epigenetic specification of centromeres. *Biochemistry Cell Biology* **87**, 272 – 282
- Dalal Y, Bui M, 2010, Down the rabbit hole of centromere assembly and dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 1 – 10
- Ekwall K, 2007, Epigenetic Control of Centromere Behavior. *Annual Review of Genetics* **41**, 63 – 81
- Iarmarcovai G, Botta A, Orsière T, 2006, Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of anuploidy. *Toxicology Letters* **166**, 1 – 10
- Ishi K, 2009, Conservation and divergence of centromere specification in yeast. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 616 – 622
- Joglekar A P, Bloom K S, Salmon ED, 2010, Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 57 – 67
- Marshall O J, Chueh A C, Wong L H, Choo A K H, 2008, Neocentromeres: New Insights into Centromere Structure, Disease Development, and Karyotype Evolution. *The American Journal of Human Genetics* **82**, 261 – 282

Tanaka T U, Desai A, 2008, Kinetochore-microtubule interactions: the means to the end. *Current Opinion in Cell Biology* **20**, 53 – 63

Valdivia M M, Hamdouch K, Ortiz M, Astola A, 2009, CENPA a Genomic Marker for Centromere Activity and Human Diseases. *Current Genomics* **10**, 326 – 335

www.lbl.gov/Publications/Currents/Archive/images/Jan-11-2002/kinetochore.jpg

www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat_solubiologia/histonit.gif

8. SAŽETAK

Kromosomi predstavljaju iznimno važan dio eukariotske stanice. Oni nose nasljednu uputu (DNA) i osiguravaju prijenos genetičke informacije s roditelja na potomstvo. Veoma važan dio kromosoma jesu centromeri koji zajedno s kinetohornim aparatom čine vezu između kromosoma i mikrotubula diobenog vretena.

U ovom seminaru objašnjena je specifična građa centromera na razini nukleosoma. Također je opisana građa kinetohora te na koji se način osigurava kretanje kinetohora, a samim time i kromosoma uzduž mikrotubula diobenog vretena. Na kraju, dan je osvrt na proces neocentromerizacije (stvaranje novih centromera) te je objašnjena uloga centromera, kinetohora i neocentromera u mehanizmu nastanka poremećaja vezanih uz segregaciju kromosoma.

9. SUMMARY

Chromosomes are very important part of eukaryotic cells. They carry genetic information (DNA) and provide transfer from parents to the offspring. Centromere and kinetochore are very important part of eukaryotic chromosome because they make link between chromosome and mitotic spindle and thus provide chromosome segregation.

In this seminar specific architecture of centromere is explained. It also describes kinetochore architecture that provides kinetochore movement and thus chromosomes along mitotic spindle microtubules. At the end are an overview of neocentromerisation process and the role of centromere, kinetochore and neocentromeres in the chromosomes segregation disorders.