

ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო  
უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ბელა სეფიაშვილი

სატელიტებისაგან თავისუფალი ცენტრომერების ნუკლეოტიდური  
თანმიმდევრობების შედარება ორთოლოგიურ არაცენტრომერულ  
უბნებთან ცხენისებრთა ოჯახის წარმომადგენლებში

სამაგისტრო პროგრამა: ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის  
მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელი: ბ.მ.დ. პროფ. ნანა კოტრიკაძე

ბ.მ.დ. პროფ. სოლომონ ნერგაძე

თბილისი

პავია (იტალია) 2018

## შინაარსი

ანოტაცია.....	3
შესავალი.....	4
თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა .....	6
1.1. რა არის ცენტრომერა? .....	6
1.2. ცენტრომერის სტრუქტურა .....	8
1.2.1. ცენტრომერული ცილები .....	8
1.2.3. CENP-A .....	10
1.3. სატელიტური დნმ-ი .....	12
1.4. ნეოცენტრომერები .....	14
1.4.1 კლინიკური ნეოცენტრომერები .....	14
1.4.2. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები ( <i>ENCs</i> ) .....	15
1.5. ცხენისებრთა სახეობები, როგორც ცენტრომერათა ბიოლოგიის სამოდულო სისტემა.17	
თავი II. მეთოდები .....	21
2.1 უჯრედული კულტურა.....	21
2.2 ქრომატინის იმუნოპრეციპიტაცია ( <i>CHIP</i> ) .....	21
2.3 CENP-A-სთან დაკავშირებული დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების დადგენა მომავალი თაობის სექვენსირების მეთოდით ( <i>next generation sequencing</i> ) და ბიოინფორმატიკული ანალიზი .....	24
თავი III ექსპერიმენტული ნაწილი .....	25
3.1.1 მთავარ ცენტრომერულ ცილასთან <i>CENP-A</i> -სთან დაკავშირებული არაცენტრომერული დნმ-ის სექვენსები (მეორეული პიკები .....	25
3.1.2 მთავარ ცენტრომერულ ცილასთან <i>CENP-A</i> -სთან დაკავშირებული ცენტრომერული დნმ-ის სექვენსები ( ცენტრომერული პიკები ).....	29
3.2 <i>EHO22</i> და <i>EHO27</i> ქრომოსომათა ნეოცენტრომერების ანალიზი .....	34
თავი IV დასკვნები .....	40
თავი V გამოყენებული ლიტერატურა .....	41

## ანოტაცია

დღესდღეობით ცენტრომერების ფუნქციის კვლევა აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს, ვინაიდან ზუსტად არ არის განსაზღვრული ცენტრომერის სტრუქტურა და ფუნქცია. ცენტრომერების სრულყოფილ გენომურ ანალიზს ამნელებს ქრომოსომის აღნიშნულ უბნებში სატელიტური დნმ-ის შემცველობა. ბოლო დროინდელ კვლევებში აღმოჩენილ იქნა უსატელიტო ცენტრომერები ე.წ. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები (*ENCs*), რომლებიც არ შეიცავენ სატელიტურ დნმ-ს. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები იძლევა უნიკალურ შესაძლებლობას მათი კვლევის საკითხებში.

აღნიშნული სამაგისტრო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა: ონაგროს (*Equus hemionus onager*) ქრომოსომებში *CENP-A* ცილით გამდიდრებული დნმ თანმიმდევრობები; ასევე, ცენტრომერული სექვენსების დაწვრილებით ანალიზი ონაგროს ორი ცენტრომერის (*EHO22- ისა და EHO27- ის*) მაგალითზე. საკვლევ მასალად გამოიყენებოდა ონაგროს ფიბრობლასტების უჯრედული ხაზები. ჩატარებული კვლევის საფუძველზე დადგენილ იქნა ცენტრომერული და ე.წ. მეორეული პიკები ონაგროს გენომში, გაანალიზებულ იქნა მოცემული პიკები ცხენის სარეფერენტო გენომის მიხედვით და ასევე, სექვენირებული იქნა ონაგროს 22-ე და 27-ე ქრომოსომების ცენტრომერული უბნების დნმ-ის მონაკვეთები.

## Annotation

Nowadays the research of centromeres function is an actual issue since the structure and function of centromeres is not fully defined yet. The presence of satellite DNA in the given regions of chromosomes makes it difficult for the complete genome analysis of centromeres. The recent studies have detected satellite-free centromeres, so-called evolutionary new centromeres, (ENCs), which do not contain satellite DNA. Evolutionary new centromeres provide a unique opportunity in centromeres research.

The aim of the abovementioned Master's thesis was to study: the CENP-A protein enriched DNA sequences in onager (*Equus hemionus onager*) chromosomes; Also, the detailed analysis of centromere sequences on the examples of two centromeres of onager (EHO22 and EHO 27). The cellular lines of onager fibroblasts were used as the study material. Based on the conducted research, the centromere and so-called secondary peaks were determined in the onager genome. These peaks were analyzed according to the horse reference genome. Also the sequence analysis of DNA segments of the centromere regions of the 22<sup>nd</sup> and 27<sup>th</sup> chromosomes has been carried out.

## შესავალი

დღესდღეობით ცენტრომერების ფუნქციის კვლევა მნიშვნელოვან საკითხს წარმოადგენს, ვინაიდან ცნობილია რომ ცენტრომერას წამყვანი როლი აქვს სეგრეგაციასა და ქრომოსომების ორ შვილეულ უჯრედში თანაბარ გადანაწილებაში. თანამედროვე სამყარო ჯერ კიდევ ვერ სცემს ცენტრომერის შესახებ ყველა კითხვაზე პასუხს, ამიტომ მათი კვლევა აქტუალურია. ცენტრომერის ორგანიზაცია და ფუნქცია დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების დონეზე ბოლო დრომდე წარმოადგენდა ე.წ შავ ხვრელს. ცნობილია, რომ ცენტრომერას იდენტურობა განისაზღვრება სპეციფიური ნუკლეოსომური კონფიგურაციით, რომელიც შეიცავს *H3* ჰისტონის ნაცვლად *CENP-A* ცილას (სამეცნიერო ლიტერატურაში ასევე მოიხსენიებენ, როგორც *H3* ვარიანტს). ცენტრომერების სრულყოფილ გენომურ ანალიზს აძნელებს ქრომოსომის აღნიშნულ უბნებში სატელიტური დნმ-ის შემცველობა. ბოლო დროინდელ კვლევებში აღმოჩენილ იქნა უსატელიტო ცენტრომერები ე.წ. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები (*ENCs*), რომლებიც არ შეიცავენ სატელიტურ დნმ-ს. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები იძლევა უნიკალურ შესაძლებლობას მათი კვლევის საკითხებში.

ამგვარად, პრობლემის აქტუალობას განაპირობებს ის, რომ *CEN*-უბნები დღემდე რჩებიან „თეთრ ლაქებად“ ქრომოსომულ რუკაზე, შესაბამისად გენომის დიდი და მნიშვნელოვანი ნაწილი დღემდე რჩება შეუსწავლელი. გენომის ორგანიზაცია ვერ იქნება ბოლომდე გაგებული თუ კი არ მოხდა ამ უბნების სტრუქტურისა და ფუნქციის ზუსტი განსაზღვრა, ვინაიდან ცნობილია, რომ ისინი განაპირობებენ ქრომატინის *3D* ორგანიზაციას, ევოლუციურ ცვლილებებს გენომში და მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ უჯრედის პროლიფერაციაზე.

აღნიშნული სამაგისტრო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა:

- *ონაგროს (Equus hemionus onager) ქრომოსომებში CENP-A ცილით გამდიდრებული დნმ თანმიმდევრობები;*
- *ასევე, ცენტრომერული სექვენსების დაწვრილებით ანალიზი ონაგროს ორი ცენტრომერის (EHO22- ისა და EHO27- ის) მაგალითზე.*

მასალა და მეთოდები:

*საკვლევ მასალად გამოიყენებოდა ონაგროს ფიბრობლასტების უჯრედული ხაზები.*

ცენტრომერული ქრომატინის გამოყოფა განხორციელდა *CENP-A*-ს საწინააღმდეგო ანტისხეულების გამოყენებით *CHIP-seq* მეთოდოლოგიით. დნმ-ის გამოყოფა და მისი სექვენირება ილუმინას მეთოდით (*Illumina paired-end methodology, IGA, Udine, Italy*). ილუმინასაგან მიღებული სასექვენსო ფაილებიდან ცენტრომერული დნმ-ის სექვენსის *de novo* დადგენა განხორციელდა შესაბამისი კომპიუტერული პროგრამების გამოყენებით.

სექვენსთა შედარება და მათი მაპირება განხორციელდა პროგრამების *Multalin, BLAT* და *BLAST* გამოყენებით. კვლევის გეგმით გათვალისწინებული დნმ-ის სექვენსების ავტომატურ აწყობას უზრუნველყო პროგრამა *SPAdes*-მა. დუბლიკაციების შემცველი მონაკვეთების სექვენსთა ასემბლირება (აწყობა), რაც ერთ-ერთ მთავარ სიმწიფეს წარმოადგენდა, საჭიროების მიხედვით განხორციელდა საუზერნ-ბლოტინგის (*Southern-Blotting*), რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციისა (*qRT-PCR*) და მეტაფაზურ ქრომოსომებთან ფლუორესცენტული ზონდების *in situ* ჰიბრიდიზაციის (*FISH*) მეთოდის გამოყენებით.

ჩვენს მიერ ჩატარებული გამოკვლევების საფუძველზე:

1. დადგენილ იქნა ცენტრომერული და ე.წ. მეორეული პიკები რაოდენობა და მდებარეობა ონაგროს გენომში.
2. გაანალიზებულ იქნა ცენტრომერული და ე.წ. მეორეული პიკები.
3. სექვენირებული იქნა ონაგროს 22-ე და 27-ე ქრომოსომების ცენტრომერული უბნების დნმ-ის მონაკვეთები.

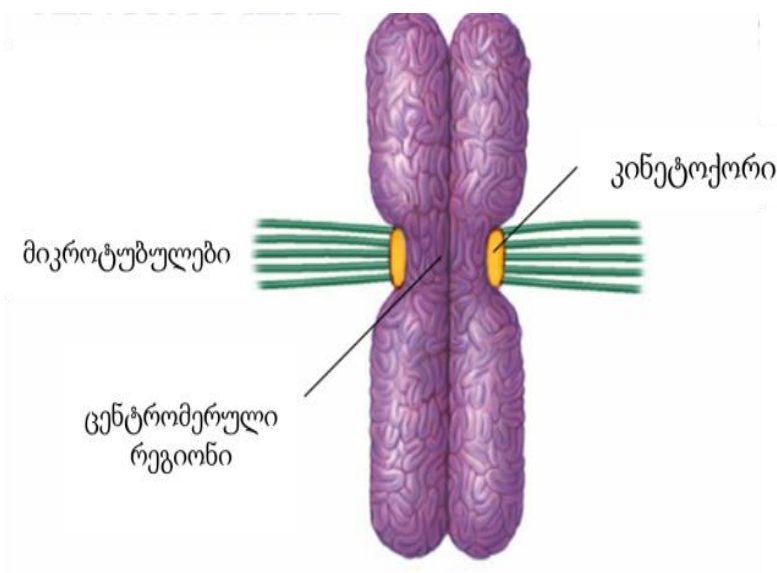
# თავი I

## ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1 რა არის ცენტრომერა?

ცნობილია, რომ ყველა ეუკარიოტულ ორგანიზმში ცენტრომერა ქრომოსომის ფუნდამენტალურ ლოკუსს წარმოადგენს, რომელიც ანიჭებს ქრომოსომას ტრანსმისიის ფუნქციას უჯრედული გაყოფის, მიტოზის ან მეიოზის განმავლობაში.

ცენტრომერი წარმოადგენს კინეტოქორის დაკავშირების საიტს, რომელიც ურთიერთქმედებს თითისტარას მიკროტუბულებთან, რის შედეგადაც ყალიბდება მეტაფაზური ფირფიტა (სურ.1). ასევე, ცნობილია, რომ ცენტრომერას წამყვანი როლი აქვს სეგრეგაციასა და ქრომოსომების ორ შვილეულ უჯრედში თანაბარ გადანაწილებაში. ცენტრომერის ცენტრალური ნაწილი, გარშემორტყმულია პერიცენტრომერული რეგიონით. პერიცენტრომერულ რეგიონში ხდება შვილეული ქრომატიდების დაკავშირება [Allshire and Karpen, 2008; Cheeseman and Desai, 2008; Cleveland et al., 2003; Pluta et al., 1995].



სურ.1 მეტაფაზური ქრომოსომის სქემატური გამოსახულება. ყვითლად ნაჩვენებია კინეტოქორი, რომელსაც უკავშირდება მიკროტუბულები. შვეიწროებულ ნაწილს ცენტრომერა წარმოადგენს.

ეუკარიოტებში ცენტრომერის სამი განსხვავებული ტიპია იდენტიფიცირებული: წერტილოვანი ცენტრომერა, ჰოლოცენტრული ცენტრომერა და რეგიონალური ცენტრომერა [Choo, 2000; Clarke, 1998; Nagaki et al., 2005]. წერტილოვანი ცენტრომერა (ტიპიურია *S. Cerevisiae*-სთვის) მოიცავს ას ნუკეოტიდს და მასთან ასოცირებულია კინეტოქორი, რომელთანაც თავის მხრივ დაკავშირებულია ერთი მიკროტუბულინი. [Clarke, 1998; Cleveland et al., 2003]. უჯრედის გაყოფის დროს მთელი წერტილოვანი ცენტრომერა არის მდგრადი და შეიცავს სპეციფიურ დნმ-ის თანმიმდევრობას ( არ არის დამახასიათებელი უმაღლესი ეუკარიოტებისთვის) [Clarke, 1998; Cleveland et al., 2003]. ჰოლოცენტრული ცენტრომერა დამახასიათებელია მცენარეებისთვის, ნემატოდებისა და მწერებისთვის. აღნიშნულ შემთხვევაში მთელი ქრომოსომა იმენს ცენტრომერის ფუნქციას. [Choo, 2000; Nagaki et al., 2005]. რეგიონალური ცენტრომერა უმაღლეს ეუკარიოტებისთვისაა დამახასიათებელი მოიცავს დიდ რეგიონს (ათიდან რამდენიმე ათას კბ-მდე ) და ჩანს, როგორც მკეთრი სტრუქტურა მეტაფაზურ ქრომოსომაში. ზოგადად აღნიშნული ცენტრომერა შედგება განმეორებადი დნმ-ისა (სატელიტური დნმ-ი) და/ან რეტროდრანსპოზიციური ელემენტებისგან [Kalitsis and Choo, 2012; Plohl et al., 2014].

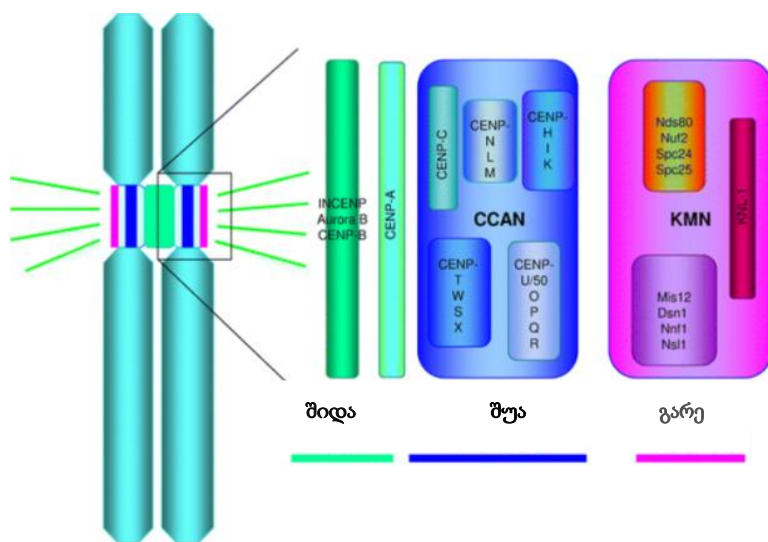
ცენტრომერის უნივერსალურობა მდგომარეობს შემდგომში, ჩვეულებრივი ჰისტონ *-H3* ნაცვლად ცენტრომერა შეიცავს *CENP-A* ცილას (*CENtromeric Protein A*); [Malik and Henikoff, 2009] . ყველა ცენტრომერული ცილა განსაკუთრებით კი *CENP-A* საჭიროა კინეტოქორის ფუნქციონირებისათვის [Black and Cleveland, 2011]. ცნობილია, რომ *CENP-A* ცილა არის მდგრადი ევოლუციის განმავლობაში და მონაწილეობს ქრომატინის ერთობლიობის შენარჩუნებაში [Kato et al., 2013; Maddox et al., 2012]. მიუხედავად ცენტრომერის ფუნქციის მაღალ კონსერვატულობისა (ევოლუციური პერიოდის განმავლობაში) ცენტრომერული დნმ-ის თანმიმდევრობა არის ექსტრემალურად გადახრილი ფილოგენეტიკურადად დაკავშირებულ სახეობებშიც კი [Bensasson, 2011; Plohl et al., 2014].

ამგვარად, ევოლუციურად დაშორებულ წინაპრებში ცენტრომერაში შემავალი ცილები არის მაღალ კონსერვატული. ცენტრომერული დნმ-ის თანმიმდევრობა არის ექსტრემალურად ცვლადი მჭიდროდ დაკავშირებულ სახეობებს შორის. ცენტრომერის ადგილი არის ეპიგენეტიკურად განსაზღვრული და არ არის დამოკიდებული დნმ-ის თანმიმდევრობაზე [Earnshaw and Migeon, 1985].

## 1.2. ცენტრომერის სტრუქტურა

### 1.2.1 . ცენტრომერული ცილები

ელექტრონული მიკროსკოპით კინეტოქორზე დაკვირვებისას იდენტიფიცირდა სამ შრიანი სტრუქტურა: გარე, შუა და შიდა (სურ.2).



*სურ.2. კინეტოქორის სამფენოვანი სტრუქტურის სქემა. ორ ქრომატიდს შორის შიდა ცენტრომერა (მწვანე). იგი შეიცავს Aurora B, CENP-B. შიდა კინეტოქორი (ლურჯი) მოიცავს CCAN-ს ცილებს და გარეთა კინეტოქორი (ვარდისფერი) შეიცავს KMN-ის ცილებს. [From Perpelescu and Fukagawa, 2011]*

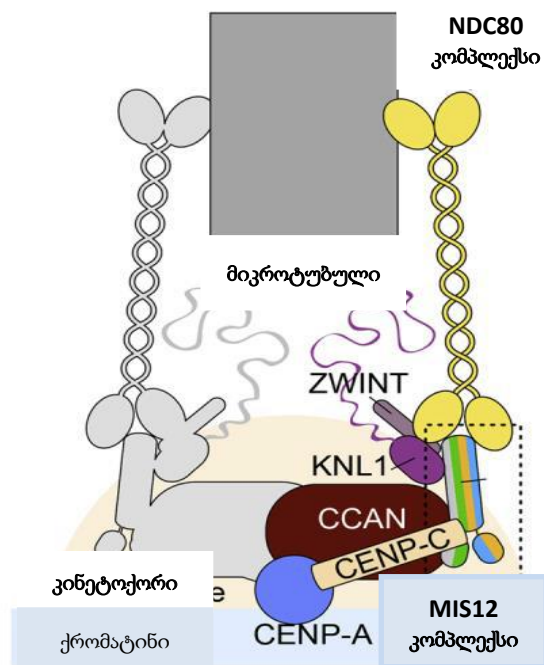
**შიდა შრე** მოიცავს ყველაზე მნიშვნელოვან CENP-A-ს და CENP-B-ს (CENtromeric Protein B) ცილებს. (მნიშვნელოვანი და შეუცვლელია CENP-A) [Cooke et al., 1990]. ნაჩვენები იქნა, რომ CENP-B სპეციფიურად უკავშირდებოდა ადამიანის ალფა სატელიტური დნმ-ის 17 ფწ [Muro et al., 1992]. ალფოიდის (განმეორებადი დნმ-ი ადამიანში) მონომერი CENP-B-სთან ერთად აღმოჩენილია ყველა ცნობილ ალფოიდის ქვეკლასებში, გარდა Y ქრომოსომისა [Masumoto et al., 1989]. მომდევნო საამუშაოებმა აჩვენა რომ 17 ფწ-დან მხოლოდ 9 არის საჭირო CENP-B-ს იდენტიფიკაციისთვის [Masumoto et al., 1993]. CENP-B 9 ნუკლეოტიდთან ერთად აღმოჩენილია სხვადასხვა სახეობის ცენტრომერის სატელიტურ თანმიმდევრობაში [Yoda et al., 1996]. CENP-B და ალფოიდური დნმ-ის თანმიმდევრობა საჭიროა de novo ძუძუმწოვრების ხელოვნური ქრომოსომის (MAC)



ფორმირებისა და ცენტრომერული სტრუქტურის ასაწყობად [Ohzeki et al., 2002; Okada et al., 2007] (სურ.2).

შუა შრე მოიცავს CCAN ტიპის ცილებს, რომლებიც ექსპრესირებულნი არიან მთელი უჯრედული ციკლის განმავლობაში [Cheeseman and Desai, 2008]. CCAN-ის ყველაზე მნიშვნელოვანი ცილაა ცენტრომერული ცილა CENP-C (CENtromeric Protein C), რომელიც უშუალო კონტაქტშია NDC80 კომპლექსთან და CENP-A-სთან. CENP-C-ის არ არსებობა იწვევს მიტოზის შეყოვნებას, ქრომოსომის არასწორ სეგრეგაციას და აპოპტოზს [Fukagawa and Brown, 1997] (სურ.2).

გარე შრე შედგება ათი KMN ანსამბლისაგან. (მოიცავს KNL1, MIS12 და NDC80 კომპლექსებს), გარე შრე უკავშირდება თითისტარას მიკროტუბულებს ფიბრილარულ კომპონენტ NDC80 კომპლექსის საშუალებით [Petrovic et al., 2016] (სურ.2; სურ.3). ცნობილია, რომ გარეთა კინეტოქორი უკავშირდება მიკროტუბულებს NDC80 კომპლექსის საშუალებით. კინეტოქორის სხვა კომპონენტები არის უფრო ახლოს ქრომატინთან. CENP-A ურთიერთქმედებს შიდა და გარე კინეტოქორის შრეებთან [Adapted from Petrovic et al. 2016].



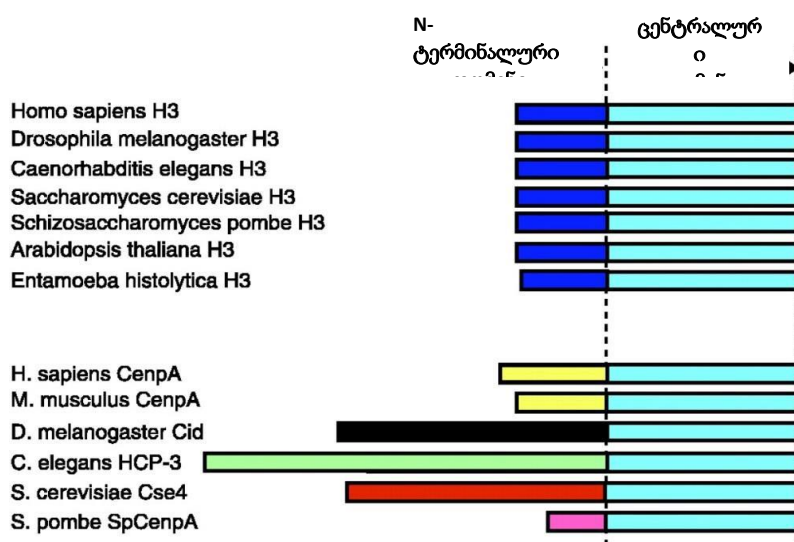
სურ. 3 კინეტოქორის სქემატური გამოსახულება [Adapted from Petrovic et al. 2016]

ადამიანის ნეოცენტრომერები (ე. წ. კლინიკური ნეოცენტრომერები აღმოჩენილ იქნა მხოლოდ კლინიკური შემთხვევების დროს. ისინი არ არიან ფიქსირებული სახეობაში) და არაერთი სახეობის Y ქრომოსომა არ შეიცავენ *CENP-B*-ცილას [Amor and Choo, 2002; Choo, 2000]. თუმცა, ნაჩვენებია ადამიანის ცენტრომერაში *CENP-B*, სტაბილური *CENP-A* და *CENP-C* არსებობა ზრდის ქრომოსომის სეგრეგაციას.

### 1.2.3. CENP-A

ცენტრომერისთვის დამახასიათებელია უნიკალური ტიპის ცილის *CENP-A* არსებობა, რომელიც სტრუქტურულად განსხვავდება *H3* ჰისტონისგან. *CENP-A* განსაზღვრავს კინეტოქორის აწყობას. ცნობილია, რომ კინეტოქორი პასუხისმგებელია გაყოფის თითისტარას ე.წ მიკროტუბულების დაკავშირებაზე, რომელიც ჩანს პროფაზაში და დაშლილი სახით ტელოფაზაში. *CENP-A*-ს არსებობა ცენტრომერის

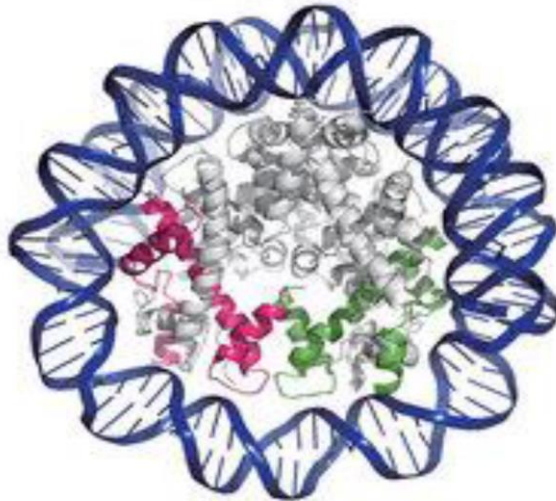
ფუნქციონირებისთვის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს. სხვადასხვა სახეობაში *CENP-A* ცილა კარგადაა შენახული განსაკუთრებით ცენტრალურ დომენში (სურ. 4).



სურ. 4. *CENP-A*-სა და *H3*-ის შედარება სახეობებს შორის [Henikoff et al., 2001]. ნაჩვენებია *CENP-A*-ს და *H3*-ის მაღალ კონსერვირებული ცენტრალური დომენი (მოწოდებულია მწვანე ფერში); სახეობებს შორის *CENP-A*-ს განსხვავებული N-ტერმინალური დომენი (ყვითელი, შავი, სალათისფერი, წითელი, ვარდისფერი).

მეორეს მხრივ N -ტერმინალურ ბოლოზე ნაჩვენებია სახეობის შორის განსხვავება, ალბათ იმის გამო, რომ ურთიერთქმედებს განსხვავებულ ცენტრომერულ დნმ-ის თანმიმდევრობასთან [Malik and Henikoff, 2009].

*In vivo* თითოეული ცენტრომერული დნმ-ი შეიცავს ჰისტონურ ოქტამერს, რომელიც შეიცავს *CENP-A* ცილას *H3* ჰისტონის ნაცვლად ( სურ 5). თავის მხრივ ჰისტონური ოქტამერი შედგება 2 *CENP-A/H4* დიმერისაგან, რომელიც დაკავშირებულია *H2A/H2B* ტეტრამერთან და შეფუთულია 120-150 ნუკლეოტიდით (Allshire and Karpen, 2008).



სურ. 5. ადამიანის *CENP-A* ნუკლეოსომის სტრუქტურის ზოგადი სქემა.

[From Tachiwana et al., 2011].

ორი *CENP-A* ცილის მოლეკულა ნაჩვენებია ვარდისფრად და მწვანედ.

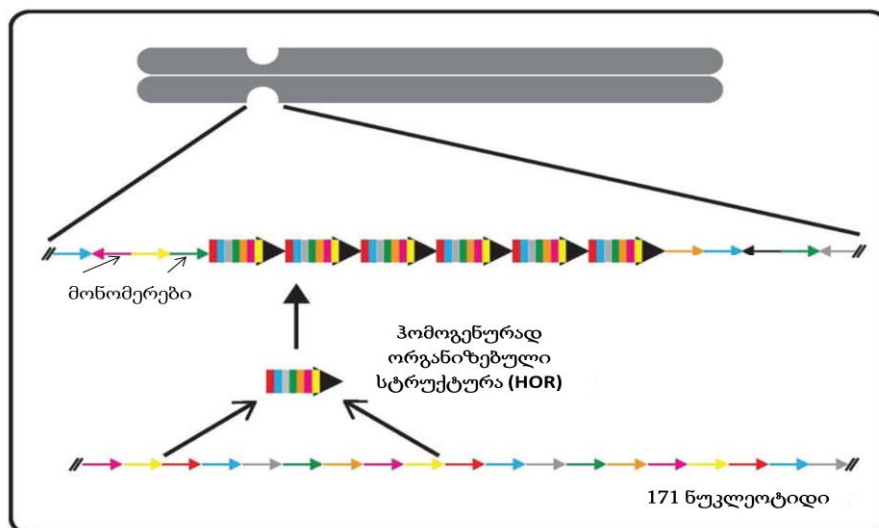
121 ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობისაგან შემდგარი დნმ-ი გამოსახულია მუქ ლურჯად.

ცნობილია, რომ უჯრედული ციკლის S -ფაზის შემდეგ *CENP-A* ცილა შვილეულ ქრომატინებში თანამზრად არის განაწილებული. რაც შეეხება, მიტოზს *CENP-A* ცილასა და *H3*-ის ნუკლეოსომური სტრუქტურები თითქმის თანაბარი რაოდენობითაა წარმოდგენილი [Ross et al., 2016].

### 1.3. სატელიტური დნმ-ი

ცენტრომერა, როგორც წესი, ხასიათდება დიდი რაოდენობით განმეორებადი ელემენტების არსებობით, რომელსაც სატელიტური დნმ-ი ჰქვია. ცნობილია, რომ სატელიტურმა დნმ-მა განიცადა სწრაფი ევოლუცია. სატელიტური დნმ-ის განმეორებადი ერთეულის სექვენსი არის ექსტრემალურად ცვლადი, მჭიდროდ დაკავშირებულ სახეობებშიც კი. ხშირად სატელიტური დნმ-ი განსხვავდება ცენტრომერის ცენტრალური და მიმდებარე პერიცენტრომერული თანმიმდევრობებისაგან. სატელიტური დნმ-ი, როგორც წესი, სხვადასხვა სახეობაში სხვადასხვა ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობისაა (მაგ. ადამიანში, თაგვში, ცხენისებრთა ოჯახის წარმომადგენლებში და სხვა).

პრიმატებში, ადამიანის ჩათვლით, ცენტრომერული განმეორებები, ეგრეთ წოდებული  $\alpha$ -სატელიტური დნმ-ი, იდენტიფიცირებულ იქნა ამ დრომდე გამოკვლეულ ყველა პრიმატში [Alexandrov et al., 2001;].  $\alpha$ -სატელიტური დნმ-ის მონომერი შედგება 171 ნუკლეოტიდისაგან, რომელიც ორგანიზებულია ტანდემურ განმეორებებად [Maio, 1971; Rosenberg et al., 1978].  $\alpha$ -სატელიტური დნმ-ის მონომერები ქმნიან მაღალი ხარისხით განმეორებად ელემენტებს, ე.წ. ჰომოგენურად ორგანიზებულ სტრუქტურას (HORs), რომლის სიგრძეც დაახლოებით 3-5 მგბ. ცნობილია, რომ ფუნქციონალური ცენტრომერას ფორმირება ხდება HOR რეგიონში [Fukagawa and Earnshaw, 2014] (სურ. 7).



სურ. 7.  $\alpha$ -სატელიტური დნმ-ის სქემატური გამოსახულება [Megan E. Aldrup-MacDonald et al., 2014]

არაერთი კვლევა იქნა ჩატარებული სხვადასხვა სახეობებში სატელიტური დნმ-ის ფუნქციის განსასაზღვრად. ცენტრომერებისა და სატელიტური დნმ-ის ადრეული მრავალრიცხოვანი კვლევების შედეგად გამოითქვა სამუშაო ჰიპოთეზა, რომ სატელიტური დნმ-ის განმეორებადი მონომერები დაახლოებით ნუკლეოსომური დნმ-ის ზომისაა [Shelby et al., 1997;]. მეორე, ღირებული ჰიპოთეზა შეეხება ცენტრომერული ფუნქციის მატარებელი დნმ-ის სექვენსის ისეთ მნიშვნელოვან ასპექტს, როგორცაა მისი მდგრადობა, რაც დაკავშირებულია გუანინ-ციტოზინის წყვილების შემცველობასთან (**GC-content**). აღნიშნული ჰიპოთეზის მიხედვით, ცენტრომერული ფუნქციის მატარებელი დნმ-ი შედარებით ღარიბია GC ნუკლეოტიდური წყვილებით. მოგვიანებით ას სახეობაში ჩატარებულმა კვლევებმა ცალსახად არ დაადასტურა აღნიშნული ჰიპოთეზა, თუმცა ცენტრომერული სექვენსი შედარებით მაღალი GC წყვილების შემცველობით ხასიათდებოდა [Melters et al., 2013]. ამგვარად, ყველაზე მნიშვნელოვანი საერთო მახასიათებელი, რომელიც სატელიტურ დნმ-ს ახასიათებს მისი განმეორებადი ბუნებაა.

ცნობილია, რომ სატელიტური დნმ-ი არ შეიცავს აქტიურ, ანუ ტრანსკრიპირებად გენებს. იგი ხელს უწყობს ჰეტეროქრომატინის ფორმირებას, რაც თავის მხრივ განსაზღვრავს ქრომოსომის სტაბილურობას მიტოზისა და მეიოზის განმავლობაში [Plohl et al., 2008, 2014]. ფიქრობენ რომ, სატელიტური დნმ-ი აუმჯობესებს შვილეული ქრომატიდების კოჰეზიასა და სეპარაციას. სატელიტური დნმ-ის ფუნქციის (რომელიც ცალსახად დადგენილი არ არის) მიუხედავად მისი შემცველობა არ არის აუცილებელი ცენტრომერის ფუნქციონირებისათვის. აღნიშნულ აზრს ადასტურებს ძუძუმწოვართა ზოგიერთ სახეობაში მოგვიანებით აღმოჩენილი უსატელიტო ცენტრომერების არსებობა [Plohl et al., 2012] უსატელიტო ფუნქციონალური ცენტრომერები, ადრე აღმოჩენილი კლინიკური უსატელიტო ცენტრომერებისგან განსხვავებით, ფიქსირებულნი არიან მოცემულ სახეობაში.

ცენტრომერას არსებობისთვის აუცილებელია სატელიტური დნმ-ი იყოს ტრანსკრიპირებული [Steiner and Henikoff, 2015]. მართლაც, განმეორებადი ელემენტების სწორ ტრანსკრიფციას ცენტრომერის რეგულატორული მექანიზმები არეგულირებენ და ტრანსკრიპირებულ აპარატში დეფექტის არსებობის შემთხვევაში ადგილი აქვს ქრომოსომის არასწორ სეგრეგაციას [Chan et al., 2012; ]. ცნობილია, რომ ცენტრომერული რნმ-ის ჰიპერმორფული ექსპრესია აზიანებს CENP-A-ს [Carone et al., 2013]. რაც შეეხება ცვალებადი სიგრძის ტრანსკრიპტებს, რომელიც ჰომოლოგიურია ცენტრომერული და

პერიცენტრომერული განმეორებადი სექვენსების, ეს უკანასკნელნი იდენტიფიცირებულ იქნენ რამოდენიმე ორგანიზმში: საფუარებში [Choi et al., 2012], თაგვებში [Ferri et al., 2009] და ადამიანებში [Wong et al., 2007].

#### 1.4. ნეოცენტრომერები

ცენტრომერების კვლევა გართულებულია მასთან ასოცირებული სატელიტური დნმ-ის გამო. ცენტრომერიზაცია ეს არის პროცესი, რომლის დროსაც ადგილი აქვს ცენტრომერის ფორმირებას ქრომოსომის რეგიონში. ტერმინი „ცენტრომერიზაცია“ ეკუთვნის Choo-ს. ცენტრომერიზაციის ფენომენი წარმართება იმ რეგიონში, სადაც არ აღინიშნება კლასიკური ცენტრომერა. ასეთი ტიპის ცენტრომერები ცნობილია ნეოცენტრომერების სახელით [Amor and Choo, 2002; Choo, 2000; Kalitsis and Choo, 2012]. ცნობილია ორი ტიპის ნეოცენტრომერები: კლინიკური ნეოცენტრომერები და ევოლუციურად ახალი ნეოცენტრომერები. კლინიკური ნეოცენტრომერები შემთხვევით წარმოქმნილია და არ გვხვდება პოპულაციაში, ხოლო ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები ფიქსირებულია სახეობაში. ნეოცენტრომერები პირველად აღწერილ იქნა მცენარეში Rhoades და Vilkomerson მიერ [Rhoades and Vilkomerson, 1942]. მცენარის ნეოცენტრომერები წარმოადგენს დამატებით ცენტრომერებს და თანაარსებობს ფუნქციონალურ ნორმალურ ცენტრომერებთან ერთად, მისი მოქმედება შემოიფარგლება მეიოზში და ისინი არ ფორმირებენ ტიპიურ კინეტოქორს [Amor and Choo, 2002; Rhoades and Vilkomerson, 1942].

##### 1.4.1 კლინიკური ნეოცენტრომერები

მას შემდეგ რაც აღმოჩენილ იქნა პირველი ნეოცენტრომერა [Voullaire et al., 1993] შესწავლილ იქნა ადამიანის 90-ზე მეტი ნეოცენტრომერა [Kalitsis and Choo, 2012; Marshall et al., 2008]. ზოგადად, ნეოცენტრომერიზაცია არის იშვიათი გადარჩენის მექანიზმი, რომელსაც შეუძლია თავიდან აირიდოს, ქრომოსომული რეარანჟირების შედეგად წარმოქმნილი, აცენტრული ქრომოსომული ფრაგმენტის დაკარგვა. ცნობილია, რომ ქრომოსომული რეარანჟირებები იწვევენ კარიოტიპის არასტაბილურობას, რაც

დამლუპველია ინდივიდისთვის. აღნიშნული ხსნის თუ რატომ არის ნეოცენტრომერები შემთხვევითი და არ არის ფიქსირებული სახეობაში [Amor and Choo, 2002; Marshall et al., 2008]. თუმცა არსებობს გამონაკლისებიც.

ადამიანის კლინიკური ცენტრომერა წარმოადგენს ცენტრომერას, რომელიც მოკლებულია სატელიტურ დნმ-ს [Amor and Choo, 2002; Kalitsis and Choo, 2012; Marshall et al., 2008]. წარმოიქმნება ეუქრომატინულ რეგიონში, თუმცა დადგენილ იქნა ჰეტეროქრომატინის მარკერები და ნეოცენტრომერები ავლენენ აშკარა ჰეტეროქრომატინის თვისებებს [Amor and Choo, 2002; Kalitsis and Choo, 2012]. მიუხედავად მათი სრული ფუნქციონირებისა, როგორც ცენტრომერული დომენი, გამოვლინდა გარკვეული განსხვავებები ნეოცენტრომერსა და იმ ცენტრომერს შორის (რომელიც შეიცავს სატელიტურ დნმ-ს). Irvine და მისმა კოლეგებმა აჩვენეს, რომ ნეოცენტრომერაში არის *CENP-A*-ს შემცირებული რაოდენობა, ტიპური ცენტრომერისგან განსხვავებით [Irvine et al., 2004]. ბოლო წლების კვლევებმა აჩვენა, რომ ნეოცენტრომერაში დაახლოებით 25%-ით ნაკლები *CENP-A* ცილაა, სატელიტური დნმ-ის შემცველი ცენტრომერისგან განსხვავებით [Bodor et al., 2014]. ნეოცენტრომერის სიგრძე მერყეობს 40 და 500 კბ-ს შორის [Hasson et al., 2013;] ისევე როგორც ტიპური ცენტრომერები ნეოცენტრომერებიც ტრანსკრიპირდებიან.

#### 1.4.2. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები (ENCs)

ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები (*ENCs, Evolutionarily New Centromeres*) წარმოიქმნება ქრომოსომის გასწვრივ ფუნქციონალური ცენტრომერის გადანაცვლების შედეგად. მარტივად რომ ვთქვათ, ევოლუციის რომელიმე მონაკვეთში, ცენტრომერის ფუნქციის მატარებელი ხდება ქრომოსომის ახალი ლოკუსი. აღნიშნული მოვლენა ცნობილია, როგორც ცენტრომერის ადგილის ცვლილება [*Centromere Repositioning*]. აღსანიშნავია, რომ ცენტრომერის ადგილმონაცვლეობას თან არ ახლავს ქრომოსომის რეარანჟირება. ქრომოსომის პოზიციური მარკერების მდებარეობა არ იცვლება. აღნიშნული მოვლენა პირველად აღწერილ იქნა პრიმატებში [Montefalcone et al., 1999]. მოცემული აღმოჩენის შემდეგ ნათელი გახდა, რომ ცენტრომერის ქრომოსომის გასწვრივ გადანაცვლების უნარი კარიოტიპის ევოლუციის მნიშვნელოვან მექანიზმს წარმოადგენს.

პრიმატებში აღმოჩენილი ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები შეიცავენ სატელიტურ დნმ-ს. პირველი, უსატელიტო, სახეობაში ფიქსირებული, ევოლუციურად ახალი ნეოცენტრომერა (ცხენის მე-11 ქრომოსომის (*ECA11*) ცენტრომერა) აღმოჩენილ იქნა პავის უნივერსიტეტის ბიოლოგიისა და ბიოტექნოლოგიის დეპარტამენტის უჯრედული და მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიაში [*Wade et al., 2009*]. ცხენის გენომის სრული სექვენსირებისა და მისი ანალიზის შედეგად დადგინდა იქნა, რომ *ECA11*-ის ცენტრომერული ფუნქციის მატარებელი დნმ-ის სექვენსი არ შეიცავს სატელიტურ ან სხვა ტიპის ტანდემურ განმეორებებს.

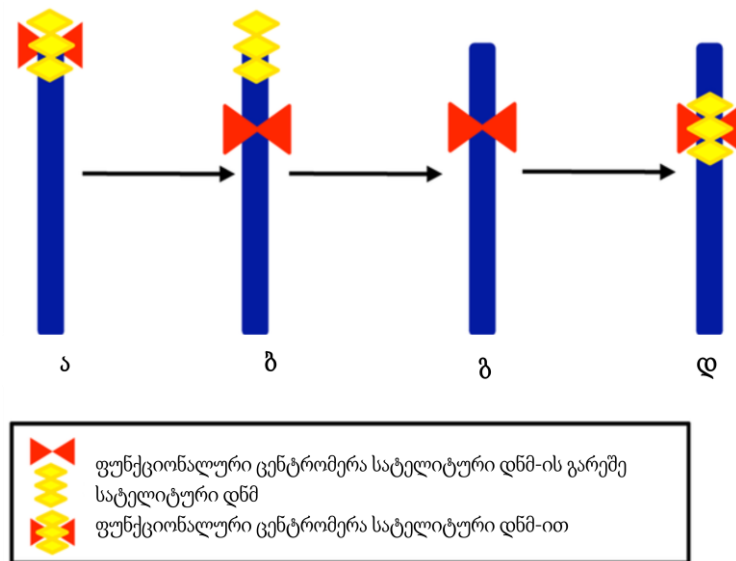
მომდევნო წლებში, პავის უნივერსიტეტის (იტალია) უჯრედული და მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიისა და სხვა ლაბორატორიებში ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ ევოლუციურად ახალი უსატელიტო ცენტრომერები არ წარმოადგენს გამონაკლისს. უსატელიტო ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები აღმოჩენილ იქნა სხვა სახეობის ძუძუმწოვრების უჯრედებშიც [*Piras et al., 2010; Shang et al., 2010*]. *ENC* წარმოადგენს მოუმწიფებელ ცენტრომერას (ასე უწოდეს უსატელიტო ცენტრომერას სატელიტური დნმ-ის შემცველი (მომწიფებელი) ცენტრომერებისგან განსასხვავებლად) *სურ.8* -ზე წარმოდგენილია ევოლუციის განმავლობაში ნეოცენტრომერის ფორმირების 4 თანმიმდევრული ეტაპი. აღნიშნული მოდელის ამოსავალი წერტილია ადრინდელი ციტოლოგიური კვლევების შედეგებზე დამყარებული ჰიპოთეზა (ცხენისებრთა ოჯახის სახეობების ქომოსომული კარიოტიპის შესახებ). ცხენისებრთა ოჯახის სახეობების საერთო წინაპრის ქრომოსომები აკროცენტრულია და ისინი წარმოადგენენ ევოლუციის განმავლობაში ჩამოყალიბებული კარიოტიპების საერთო წყაროს. აკროცენტრული (*Ancestral*) ქრომოსომათა ცენტრომერები შეიცავენ სატელიტურ დნმ-ს. ცენტრომერის გადაადგილების შემდეგ სატელიტური დნმ-ი რჩება თავდაპირველ პოზიციაზე. ანუ, ცენტრომერული ფუნქციის ქრომოსომის სხვა ლუკუსში გადაადგილებას არ ახლავს სატელიტური დნმ-ის გადაადგილება, ადგილს ინაცვლებს ფუნქცია და არა დნმ-ის სექვენსი. ამ მოვლენის შედეგად ქრომოსომზე ცენტრომერა ახალ ადგილასაა წარმოდგენილი, ხოლო სატელიტური დნმ-ი ძველ, ყოფილ, ინაქტივირებულ, ცენტრომერის ადგილას რჩება (*სურ. 8 ბ*).

ევოლუციის მომდევნო ეტაპზე, ძველი ცენტრომერის ლოკუსიდან ქრება სატელიტური დნმ-ი. ამავე დროს, ახალ, გადანაცვლებულ ცენტრომერას ჯერ კიდევ არა აქვს შექმნილი



სატელიტური დნმ-ი (სურ. 8 გ). მისი გამოჩენას ადგილი აქვს ევოლუციის შემდგომ ეტაპზე (სურ. 8 დ).

*ENC* ცენტრომერები აღწერილ იქნა ცხენისებრთა ოჯახის სხვა სახეობებშიც - ვირის, ზებრების და სხვა [Piras et al., 2010]. აღსანიშნავია, რომ ევოლუციურად ახალი ნეოცენტრომერა სატელიტებისგან თავისუფალია და ფიქსირებულია სახეობაში.



სურ.8. ნეოცენტრომერების ფორმირების სქემატური გამოსახულება.

[from Piras et al. 2010]

- ა) აკროცენტრული წინაპარი ქრომოსომის ცენტრომერა (წითელი) შეიცავს სატელიტურ დნმ-ს (ყვითელი).
- ბ) წარმოდგენილია სუბმეტაცენტრული ქრომოსომა ცენტრომერის რეპოზიციის დროს, სადაც სატელიტურ დნმ-ს თავდაპირველი პოზიცია არ შეუცვლია. ნეოცენტრომერა მოკლებულია სატელიტურ თანმიმდევრობას.
- გ) სუბმეტაცენტრული ქრომოსომა, რომელსაც დაკარგული აქვს სატელიტური თანმიმდევრობა ტერმინალურ ბოლოზე.
- დ) სუბმეტაცენტრული ქრომოსომა არის სრულიად „მომწიფებული“ და უკვე შეიცავს სატელიტურ თანმიმდევრობას.

### 1.5. ცხენისებრთა სახეობები, როგორც ცენტრომერათა ბიოლოგიის სამოდელიო სისტემა

ოჯახი *Equidae* ჩვენამდე მოღწეულ მხოლოდ ერთ -*Equus*-ის გვარს მოიცავს. თავის მხრივ Equus მოიცავს 8 სახეობას. ესენია: შინაური ცხენი (*E. Caballus*), პრეჟევალსკის

გარეული ცხენი (*E. Przewalskii*), ონაგრო (*E. hemionus onager*), კულანი (*E. hemionus kulan*), აფრიკული გარეული ვირი (*E. africanus somaliensis*), შინაური ვირი (*E. Asinus*), მთის ზებრა (*E. zebra hartmannae*), ბურკელის ზებრა (*E. Burchelli*) და გრეევი ზებრა (*E. grevyi*).

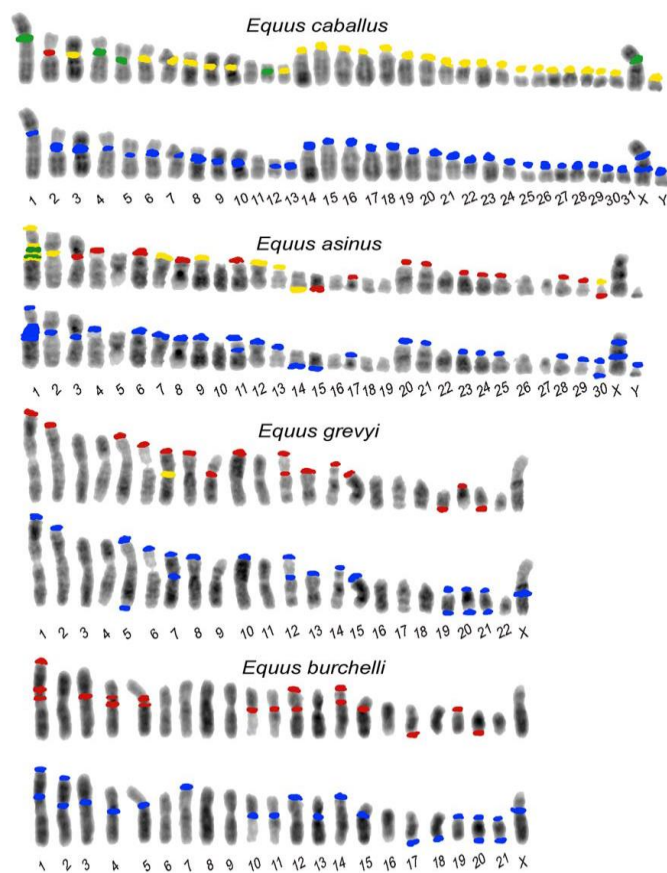
თითოეული სახეობის კარიოტიპი რადიკალურად განსხვავებულია. ცნობილია, რომ პრეჟევალსკის ცხენს ყველაზე დიდი ჰაპლოიდური ნაკრები ( $n=33$ ) აქვს სხვა სახეობებთან შედარებით. თითოეული სახეობის ქრომოსომული ნაკრებია: *EPR: 2n=66, EHO: 2n=56; ECA: 2n=64, EAS: 2n=62, EGR: 2n=46, EBU: 2n=44, EZH: 2n=32, EHK: 2n=54, EKI: 2n=52*

ცნობილია, რომ ცენტრომერის მდებარეობის ცვლილება მნიშვნელოვან როლს ასრულებს კარიოტიპის სწრაფ ევოლუციაში. Equus-ის გვარში რამდენიმე ათეული უსატელიტო ცენტრომერა იქნა დადგენილი აღნიშნული სახეობების ცხოველთა ქრომოსომების უსატელიტო ცენტრომერების არსებობის შესახებ პირველი მონაცემები ფლუორესცენტული *in situ* ჰიბრიდიზაციის მეთოდით (*FISH*) იქნა მიღებული. ფლუოროქრომული ზონდით მონიშნული ცხენის სატელიტური დნმ-ი (*37cen* და *2pl* სექვენსები), ისევე, როგორც თითოეული სახეობის მთლიანი უჯრედული დნმ-ი ჰიბრიდიზებულ იქნა ცხენის, ვირის და ზებრის ორი სახეობის - *Equus caballus, Equus asinus, Equus grevyi and Equus burchelli* - ინდივიდების მეტაფაზურ ქრომოსომებთან [*Piras et al., 2010; Wade et al., 2009*]. აღსანიშნავია, რომ ცხენის სატელიტური განმეორებები, *37cen* და *2pl*, კლონირებულ იქნა პავიის უნივერსიტეტის (იტალია) უჯრედული და მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიაში დაახლ. ოცი წლის წინ. პირველი *37cen* სექვენსი წარმოადგენს ცხენის მთავარ ცენტრომერულ სატელიტს. იგი ფიქსირდება ცხენის ყველა ცენტრომერულ უბანზე გარდა *ECA11* ქრომოსომისა (*სურ. 9*). აღმოჩნდა, რომ ცხენის მე-11 ქრომოსომა მოკლებული იყო *FISH*-ის სიგნალს. ყველა სხვა ცენტრომერა ანჟღავნებდა ჰიბრიდიზაციის ნიშანს. ანუ ცხენის ყველა ქრომოსომაში, გარდა *ECA11*-ისა, სატელიტური დნმ-ის სექვენსი ასრულებს ცენტრომერის ფუნქციას.

მთელმა რიგმა კვლევებმა გამოავლინა ვირისა და ზებრების უჯრედებში მრავალი უსატელიტო ცენტრომერა, განსხვავებით ცხენის ერთადერთი ქრომოსომისა [*Nergadze et al, 2018*]. როგორც ცხენის შემთხვევაში, ისევე სხვა სახეობების უჯრედებში, უსატელიტო ცენტრომერების არსებობის ფაქტი დადასტურებული იქნა დნმ-ის სექვენსის დონეზე.

დადგენილ იქნა, რომ *E. asinus* 33 ქრომოსომიდან 16-ის ცენტრომერა თავისუფალია ყოველგვარი სატელიტური დნმ-ისგან. 16-ვე ევოლუციურად ახალი ცენტრომერა სტაბილურია და მთელ სახეობაშია ფიქსირებული. მათი აბსოლუტური უმრავლესობა

არ შეიცავს ცილის მაკოდირებელ გენებს ანუ, წარმოადგენენ ე.წ. გენებისგან თავისუფალ უბნებს, რომელიც გამდიდრებულია AT-ნუკლეოტიდური წყვილებით და *LINE*-განმეორებადი ელემენტებით. ვირის უსატელიტო ცენტრომერებში *SINE*, *LINE*, *LTR* განმეორებადი ელემენტების რაოდენობა არ განსხვავდება ცხენის უჯრედებში არსებული ორთოლოგიური უბნების შემცველობისგან. ასევე, აღსანიშნავია, რომ GC-შემცველობა ორივე სახეობის ორთოლოგიურ უბნებში ერთნაირია. ვირის უსატელიტო ცენტრომერები არაცენტრომერულ უბნებთან შედარებით ღარიბია *SINE*-ელემენტით. *LTR* და სხვა განმეორებადი ელემენტების რაოდენობა იგივეა ცენტრომერულ და არაცენტრომერულ უბნებში [Nergadze et al, 2018].



**სურ. 9.** სქემატური გამოსახულება ცხენის, ვირის და ზებრის ორი სახეობის ქრომოსომების, სადაც ლურჯად, წითლად, ყვითლად და მწვანედ მონიშნულია სატელიტები. ცხენის 11-ე ქრომოსომის ცენტრომერა მოკლებულია *FISH* სიგნალს, შესაბამისათ სატელიტურ დნმ-ს. ხოლო ვირში და ზებრაში რამოდენიმე ცენტრომერაა მოკლებული სატელიტურ თანმიმდევრობას [from Piras et al. 2010].

სახეობის ორთოლოგიურ უბნებში ერთნაირია. ვირის უსატელიტო ცენტრომერები არაცენტრომერულ უბნებთან შედარებით დარბია *SINE*-ელემენტით. *LTR* და სხვა განმეორებადი ელემენტების რაოდენობა იგივეა ცენტრომერულ და არაცენტრომერულ უბნებში [*Nergadze et al, 2018*].

ამგვარად, ცხენისებრთა ოჯახის სახეობებში დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის დონეზე (კონფირმაციული მეთოდით) დამტკიცებულიქნა უსატელიტო ცენტრომერების არსებობა. სატელიტური დნმ-ისგან თავისუფალი ცენტრომერები კი, თავის მხრივ, წარმოადგენს უნიკალურ მოდელს ცენტრომერის ფუნქციის, ორგანიზაციისა და ევოლუციის შესასწავლად.

## თავი II მეთოდები

### 2.1 უჯრედული კულტურა [Piras et al., 2010]

ცენტრომერული დნმ-ის კვლევები მიმდინარეობდა ონაგროს ფიბრობლასტებიდან გამოყოფილ ქრომატინზე. ონაგროს ფიბრობლასტების კულტურა მიღებული იქნა კანის ქსოვილის ეპიდერმული შრიდან.

ქსოვილის დანამცეცების შემდეგ მისი დამუშავება მოხდა 0.25% ტრიფსინ-*EDTA*-თი, 10 წთ-ის განმავლობაში 37 °C-ზე. უჯრედები რამდენჯერმე იქნა გარეცხილი *DMEM*-ით, რომელთაც დამატებული ჰქონდა *FBS* 10% და ანტიბიოტიკები (პენიცილინ-სტრეპტომიცინი).

პირველადი ფიბრობლასტების გაზრდა მოხდა მაღალი გლუკოზის შემცველ *DMEM*-ში, რომელსაც დამატებული ჰქონდა 20% *fetal calf serum*, *NEAA (non essential amino acids, EuroClone)*, 2 მმოლ გლუტამინი და 1x პენიცილინ/სტრეპტომიცინი. უჯრედები გაზრდილ იქნა 37°C 5% *CO2* შემცველ გარემოში.

### 2.2 ქრომატინის იმუნოპრეციპიტაცია (CHIP) [Piras et al., 2010]

თითოეული IP რეაქციისთვის გამოიყენება, დაახლოებით 100 მილიონი უჯრედის საწყისი მასალა. უჯრედების ცენტრიფუგირებით შეგროვების შემდეგ (1700 rpm-ზე 7 წთ-ის განმავლობაში), ცილა/დნმ-ის მყარი კავშირისთვის 1%-იანი ფორმალდეჰიდით ფიქსაცია ტარდებოდა სანჯღრეველაში (*rocking*) 100 rpm 26°C -ზე 15 წუთის განმავლობაში. ფორმალდეჰიდის განეიტრალების მიზნით, 0,125 M გლიცინის დამატების შემდეგ, ნეიტრალიზაციის რეაქცია სანჯღრეველაში გრძელდება 10 წუთს 26°C -ზე. ფიქსირებული უჯრედები, 800 rcf, 5 წთ-ის განმავლობაში 4°C-ზე ცენტრიფუგურების შემდეგ, ინახება -80°C-ზე ერთი ღამით. ექსპერიმენტის მეორე დღეს 1x *PBS*-ით ორჯერ გარეცხილ უჯრედულ ნალექს ემატება 1x პროტეაზის ინჰიბიტორი (Roche).

ნალექი რესუსპენზირებული იქნა *CHIP*-ის ლიზის ბუფერში (*SDS 0,25%, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8*) *PIC*-თან ერთად (*Protease Inhibitor Cocktail*). *CHIP*-ის ლიზის ბუფერში რესუსპენზირებული უჯრედები დაყოფილ იქნა ხუთ თანაბარ ნაწილად - თითო სინჯარაში 20 მილიონ უჯრედით.

*Branson Sonifier 250* -ით უჯრედების სონიკაციის შედეგად მიღებული იქნა შემდგომი რეაქციებისთვის ოპტიმალური, 200-800 ნუკლეოტიდის სიგრძის შემცველი ფრაგმენტების შემცველი ქრომატინული მასა. ქრომატინის ფრაგმენტაციის ხარისხი (დნმ-ის ფრაგმენტების საშუალო სიგრძეები) მოწმდებოდა აგაროზის გელზე ელექტროფორეზის მეთოდით.

ქრომატინული ნიმუშების სუფთავებოდა ცენტრიფუგირებით (13000 rpm სიჩქარით 4 °C-ზე 10 წუთის განმავლობაში). სუპერნატანტი შეიცავს დაწყვეტილ ქრომატინს - ცილასთან დაკავშირებულ ფრაგმენტირებულ დნმ-ს. თითოეული *IP* (იმუნოგამოლექვა და შესაბამისი საკონტროლო ნიმუში, *Chip* და *Input*) შესრულდა 10 მილიონ უჯრედზე 1250 მკლ სარეაქციო ხსნარში. სუპერნატანტს ემატება *0,5% Nonidet P40, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl2, 150 mM NaCl*-ის შემცველი ხსნარი, პროტეაზის ინჰიბიტორთან ერთად.

გასაწმენდად გამოყენებულ იქნა გელის ბურთულაკები (*A/G beads*) (*Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow/Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare*). საიმუნოპრეციტიტაციო გელის ბურთულაკები მახლოკირებელი ბუფერით წინასწარ მუშავდებოდა სანჯღრეველაზე ერთი საათის განმავლობაში 4 °C-ზე. ამის შემდეგ, გელ-ბურთულაკები გამოლექილ იქნა ცენტრიფუგირებით - 400 rpm, 5 წუთის განმავლობაში 4 °C -ზე.

ქრომატინის ფრაგმენტებიანი სუპერნატანტის 240 მკლ გადადებულ იქნა კონტროლისთვის (*Input*). დარჩენილ სუპერნატანტს დაემატა სპეციფიური ანტისხეული. ჩვენს შემთხვევაში ანტისხეულს წარმოადგენდა ანტი-*CENP-A* (მთავარი ცენტრომერული ცილის ანტისხეული ერთი ბოლოთი დაკავშირებულია გელ-ბურთულაკის სფეროსთან - ანტისხეული ჩაშენებულია გელ-ბურთულაკის ზედაპირზე. ბურთულაკის მთელ არეზე „მიდუღებულია“ ათეულ მილიონობით ანტისხეული, რომელიც მყარად იკავშირებს („ჩაიჭერს“) *CENP-A*-ს მოლეკულას და მასთან დაკავშირებულ დნმ-ის ფრაგმენტს). იმუნოგამოლექვის რეაქცია მიმდინარეობს სანჯღრეველაზე 12-16 საათის განმავლობაში, 4 °C-ზე.

გელ-ბურთულაკები (მასთან დაკავშირებული ქრომატინით) გამოლექილ იქნა ცენტრიფუგირებით - 1200 rpm სიჩქარით, 4°C-ზე, 2 წთ. სუპერნატანტის მოცილების შემდეგ, გელ-ბურთულაკები გარეცხილ იქნა, ჯერ სპეციალური *Chip*-ის გასარეცხი ბუფერით 5 წუთის განმავლობაში, შემდეგ 0,25% *SDS*, 1% *TritonX-100*, 2 mM *EDTA pH 8*, 500 mM *NaCl*, 20 mM *Tris-HCl pH 8*-ის შემცველი ბუფერით.

ნიმუში ინკუბირებულ იქნა მთელი ღამით 65°C-ზე, რის შემდეგაც ცილებისგან თავისუფალი დნმ-ი გასუფთავებულ იქნა დნმ-ის გასასუფთავებელი კიტის საშუალებით (*Promega*).

### 2.3 CENP-A-სთან დაკავშირებული დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის დადგენა მომავალი თაობის სექვენსირები მეთოდით და ბიონფორმატიკული ანალიზი

იმუნოპრეციპიტირებული დნმ-ისა (*Chip*) და საკონტროლო (*Input* - არაიმუნოპრეციპიტირებული, მთლიანი ქრომატინი) ნიმუშები სექვენირებულ იქნა ილუმინას პლატფორმაზე შემდეგი თაობის სექვენსირების მეთოდით (*next generation sequencing, Illumina, IGA, Udine, Italy*). სექვენირებული თანმიმდევრობა გამდიდრებული იყო *Cenp-A* ცილასთან დაკავშირებული დნმ-ის სექვენსებით. კონტროლი სექვენირებულ იქნა ილუმინათი შემდეგი თაობის სექვენსირების მეთოდით (*next generation sequences*). სექვენირებული თანმიმდევრობა იყო გამდიდრებული *Cenp-A* ცილით.

გამდიდრებული დნმ-ის შემცველი უბნები (ეგრეთ წოდებული დნმ-ის სექვენსების პიკები) დადგენილ იქნა *MACS 2.0.10 software* პროგრამით.

პიკების მაპირებულ იქნა **NCBI-s** მონაცემთა ბაზის ცხენის სარეფერენტო გენომის *EquCab2.0* ვერსიის მიხედვით.

ბიონფორმატიკული ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა შემდეგი პროგრამები:

- Cygwin64 Terminal;
- <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> ;
- <https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat> ;
- <https://jamiemcg.github.io/bioinf/gc.html> ;
- <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>

## თავი III

### ექსპერიმენტული ნაწილი

#### 3.1. მთავარ ცენტრომერულ ცილასთან - CENP-A-სთან დაკავშირებული არაცენტრომერული დნმ-ის სექვენსები (მეორეული პიკები)

როგორც უკვე აღნიშნეთ ცენტრომერა (*CEN*)- ესაა სტრუქტურა, რომელიც უზრუნველყოფს ქრომატიდების განლაგების სისწორესა და შენარჩუნებას, ქრომოსომების სწორ განლაგებას მეტაფაზურ ფირფიტაში და მათ მიმაგრებას თითისტარას ძაფებთან. ცენტრომერა წამყვან როლს ასრულებს იმ პროცესებში, რომელთაც მივყავართ ანეუპლოიდიასა და პოლიპლოიდიასთან. აღნიშნულ პროცესები კი ხშირად დაკავშირებულია გენის ექსპრესიის დარღვევასთან და დამახასიათებელია მრავალი ტიპის კიბოსათვის [*О.И.Побгорная et al. 2009*].

მიუხედავად იმის, რომ გასაგები ხდება თუ რამდენად მნიშვნელოვანია ქრომოსომების ნორმალური სეგრეგაციის პროცესის ცოდნა და მისი მართვა, *CEN*-უბნის შესწავლა გარკვეულ სირთულეებთანაა დაკავშირებული. ცენტრომერების სრულყოფილ გენომურ ანალიზს აძნელებს ქრომოსომის აღნიშნულ უბნებში სატელიტური დნმ-ის შემცველობა, რაც განპირობებულია მაღალგანმეორებადი თანმიმდევრობების კლონირების სირთულით [*О.И.Побгорная et al. 2009*]. ბოლო დროინდელ კვლევებში აღმოჩენილ იქნა უსატელიტო ცენტრომერები ე.წ. ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები (*ENCs*) [*Wade et al., 2009*]. *ENCs* იძლევა კვლევის შესაძლებლობას რამეთუ არ შეიცავენ სატელიტურ დნმ-ს. ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, აღნიშნული სამაგისტრო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა:

- შეგვესწავლა ცხენისებრთა ოჯახის წარმომადგენელი- ონაგროს (*Equus hemionus onager*) ქრომოსომებში ცენტრომერული ცილა- A (*CENP-A*) ცილით გამდიდრებული დნმ თანმიმდევრობები. კერძოდ, ცენტრომერული პიკები და ე.წ მეორეული პიკები ( არაცენტრომერული, შედარებით მოკლე სექვენსები). რათა დაგვედგინა ცენტრომერული და ე.წ. მეორეული პიკების რაოდენობა და მდებარეობა ონაგროს გენომში. მოგვეხდინა მათი ბიოინფორმატიკული ანალიზი.



- მოგვეხსენიებინა ცენტრომერული სექვენსების დაწვრილებით ანალიზი. *Equus*-ის გვარში მათი ევოლუციური ცვლილებების შესწავლის მიზნით (ონაგროს ორი ცენტრომერის (*EHO22*- ისა და *EHO27*- ის) მაგალითზე).

გამოკვლევებმა უჩვენა, რომ ცხენის რეფერენტულ გენომთან მაპირებისას (დნმ-ის მონაკვეთის კოორდინატების დადგენა ცხენის რეფერენტულ გენომთან) ონაგროს ფიბრობლასტების უჯრედების *CENP-A*-თი გამდიდრებული დნმ-ის მონაკვეთის სექვენსებზე ( $2n=56$ ) ცენტრომერული და მეორეული პიკების საერთო რაოდენობა შეადგენდა 1065 პიკს, რომელიც მთელ გენომს შეესაბამება. სავარაუდოდ აღნიშნული პიკებიდან ცენტრომერულ პიკებს წარმოადგენდა 861, დარჩენილი 204 მეორეული პიკიდან 109-ის სექვენსი ემთხვეოდა დნმ-ის ცნობილი განმეორებადი ელემენტების ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას, როგორცაა: *LINE (long interspersed nuclear element)*, *SINE (Short Interspersed nuclear element)*, *LTR (long terminal repeat)* და სატელიტური დნმ-ი (*SAT\_EC*). აღსანიშნავია, რომ ცხენის სატელიტური დნმ-ი მხოლოდ ორ მეორეულ პიკზე მაპირდებოდა და გაზნეული იყო ცენტრომერისგან დაცილებულ გენომის უბნებზე. მაგ. ონაგროს *CENP-A*-თი გამდიდრებული დნმ-ის მონაკვეთის სექვენსის მაპირებისას ცხენის მე-20 (*ECA20*) ქრომოსომაზე, (22912275 ნუკლეოტიდიდან-22912544 ნუკლეოტიდამდე), აღნიშნული პიკი წარმოადგენდა ცნობილ განმეორებად ელემენტებს *SINE (ERE2)-ს (Equin Repetitive Element-2)*; *ECA21 (4220410-4220651)- LINE(L1MA6)-ს*; *ECA9 (36157501-36157854)- სატელიტურ დნმ-ს (SAT\_EC)*. მაგალითის სახით წარმოდგენილია ონაგროს მე-18 ქრომოსომა. (ცხრილი 1) ცხრილი 1.

ონაგროს მე-18 ქრომოსომის ცენტრომერული და მეორეული პიკები (EHO18 ორთოლოგიურია ECA10-ის)

No	ქრომოსომა	პიკის კოორდინატები		
1	chr10	1,676,409	1,676,650	line(L1MA9)
2	chr10	9,988,335	9,988,745	SINE(ERE1)
3	chr10	11,247,074	11,247,361	
4	chr10	11,249,110	11,249,370	
5	chr10	11,250,082	11,252,536	
6	chr10	11,252,809	11,257,899	
7	chr10	11,258,220	11,289,052	
8	chr10	11,289,376	11,325,758	
9	chr10	11,327,374	11,328,220	
10	chr10	11,328,535	11,329,652	
11	chr10	11,330,018	11,339,551	
12	chr10	11,340,005	11,367,230	

13	chr10	<b>11,367,417</b>	<b>11,370,205</b>	
14	chr10	11,370,366	11,370,958	
15	chr10	11,371,539	11,372,291	
16	chr10	11,372,577	11,375,419	
17	chr10	11,377,115	11,377,564	
18	chr10	11,380,373	11,380,644	
19	chr10	11,381,180	11,383,695	
20	chr10	11,383,966	11,391,878	
21	chr10	11,392,124	11,394,463	
22	chr10	11,394,702	11,395,624	
23	chr10	11,396,460	11,397,083	
24	chr10	11,398,393	11,398,757	
25	chr10	11,403,716	11,404,522	
26	chr10	11,405,444	11,405,993	
27	chr10	<b>11,406,959</b>	<b>11,415,986</b>	
28	chr10	<b>11,416,228</b>	<b>11,422,379</b>	
29	chr10	<b>11,422,653</b>	<b>11,429,211</b>	
30	chr10	11,429,426	11,430,557	
31	chr10	11,430,730	11,432,772	
32	chr10	11,432,903	11,434,163	
33	chr10	11,436,924	11,437,677	
34	chr10	11,439,028	11,440,594	
35	chr10	11,441,010	11,441,264	
36	chr10	11,442,657	11,447,161	
37	chr10	11,447,681	11,448,087	
38	chr10	11,448,326	11,449,005	
39	chr10	11,450,182	11,450,573	
40	chr10	11,450,806	11,455,270	
41	chr10	<b>11,455,728</b>	<b>11,480,025</b>	
42	chr10	<b>11,497,347</b>	<b>11,508,040</b>	
43	chr10	<b>11,509,545</b>	<b>11,521,377</b>	
44	chr10	11,521,510	11,523,293	
45	chr10	11,523,451	11,523,748	
46	chr10	11,524,390	11,525,749	
47	chr10	11,527,356	11,527,795	
48	chr10	11,528,211	11,528,756	
49	chr10	11,530,065	11,530,527	
50	chr10	11,536,716	11,537,024	
51	chr10	11,537,643	11,537,919	
52	chr10	11,544,833	11,545,564	
53	chr10	11,548,430	11,548,671	
54	chr10	14,591,264	14,591,601	sine,ltr
55	chr10	41,762,273	41,762,523	ltr(MER34)
56	chr10	65,068,577	65,068,870	RWDD1
57	chr10	73,766,080	73,766,362	SINE(ERE1)

გამოკვლევებმა უჩვენა, რომ ჩვენს მიერ შესწავლილ ონაგროს მე-18 ქრომოსომა (*EHO18*), რომელიც ორთოლოგიურია ცხენის მე-10 ქრომოსომის (*ECA10*), წარმოდგენილია 57 პიკი, სადაც 51 წარმოადგენს ცენტრომერულს (N3-53-ის ჩათვლით). ხოლო დარჩენილი 6 კი წარმოადგენს მეორეულ პიკს. მეორეული პიკებიდან 5 პიკი (N1; 2; 54; 55; 57), ემთხვევა ცნობილ განმეორებად ელემენტს, ხოლო 1- გენურ უბანს (N56). (*ცხრილი 1*)

ცნობილია, რომ ზემოთ აღნიშნული განმეორებადი ელემენტები მთელ გენომშია გაბნეული [*Kramerov DA 2005*]. აქედან გამომდინარე დნმ-ის მოცემული ფრაგმენტი გენომის სრულიად განსხვავებული ლოკუსის ან სულაც სხვა ქრომოსომის წარმომავლობის შეიძლება იყოს. ვვარაუდობთ, რომ ონაგროს *CENP-A*-თი გამდიდრებული დნმ-ის სექვენსები (ე.წ. *Sequence reads*), ცხენის რეფერენტული გენომის მოცემულ უბანზე დიდი მსგავსების გამოა შეცდომით მაპირებული. ცნობილი განმეორებადი ელემენტების სექვენსების შემცველი პიკები არაინფორმატიულია ჩვენი კვლევის მიზნებისა და ამოცანებისათვის. შესაბამისად ასეთი, არაინფორმატიული პიკები გამორიცხულ იქნა ანალიზიდან.

გამოკვლევებმა უჩვენა, რომ ონაგროს მეორეული პიკებიდან გენურ უბანს შეესაბამება 70 პიკი, რომელიც მაპირდებოდა ცხენის ქრომოსომათა იმ ლოკუსებში, რომლებიც ასევე მაკოდირებელ გენებს შეიცავენ. მაგ. ონაგროს მეორეული პიკი, რომელიც შეესაბამება ცხენის მეშვიდე ქრომოსომას (28951205 ნუკლეოტიდიდან 28951446 ნუკლეოტამდე), წარმოადგენს *SORL1* გენის (*sortilin related receptor 1*) ლოკუსს.

შემდგომ ეტაპზე საინტერესო იყო მეორეულ პიკებში მაკოდირებელი გენების შესწავლით დაგვედგინა *CENP-A*-ს როლი გენის ექსპრესიის რეგულაციაში.

აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ანალოგიური, წინასწარი კვლევები, ჩატარებულ იქნა ცხენის და ვირის უჯრედებზე (*Chip-seq* მეთოდით, ანტი-*CENP-A*-ანტისხეულების გამოყენებით) [*Wade et al, 2009 და Nergadze et al, 2018*]. წინასწარ კვლევებში დეტალურად იქნა გააანალიზებული ის მეორეული პიკები, რომლებიც მაპირდებიან გენურ უბანში. აღნიშნული გენების ექსპრესია შესწავლილ იქნა სხვადასხვა ქსოვილში. აღმოჩნდა, რომ მაკოდირებელი გენების უმრავლესობა (68%) არტრანსკრიბირდება საკვლევ ფიბრობლასტებში. სხვა ქსოვილებში კი, აღნიშნული გენები ექსპრესიის მაღალი დონით ხასიათდებიან. აღსანიშნავია, რომ მათი უმეტესობის შედარებით მაღალი ტრანსკრიბცია დაფიქსირდა ტვინის უჯრედებში. აღნიშნულ შედეგებზე დაყრდნობით შემუშავებულ იქნა სამუშაო ჰიპოთეზა, რომ *CENP-A* ცილა, შესაძლებელია, არეგულირებდეს,

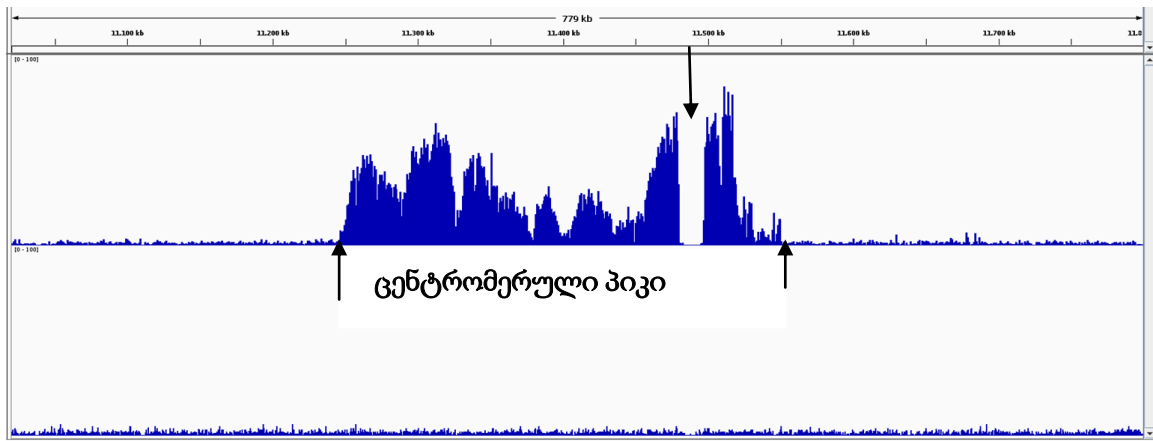
მოცემული გენის ექსპრესიას ქსოვილების მიხედვით (ე.წ. ქსოვილ-სპეციფიური ექსპრესია). ფიქრობენ, რომ აღნიშნული გენების ტრანსკრიბცია არ წარიმართება ფიბრობლასტებში, მასთან **CENP-A** ცილის დაკავშირების გამო. სამუშაო ჰიპოთეზის დასადასტურებლად ან უარყოფისათვის დაწყებული კვლევები გრძელდება. სწორედ ამ პროექტის ერთ-ერთ, შემადგენელ ნაწილს წარმოადგენს ონაგროს ფიბრობლასტებში მაკოდირებელი გენების შესწავლა.

კვლევებმა აჩვენა, რომ მაკოდირებელი გენების უმრავლესობა (70 გენიდან 42-გენი) ყველა ქსოვილში მეტ-ნაკლებადაა ექსპრესირებული. ონაგროს უჯრედებში არ ფიქსირდებოდა ისეთივე ეფექტი, როგორც ცხენისა და ვირის უჯრედებში. შესაბამისად, ვვარაუდოთ, რომ ონაგროს უჯრედებში **CENP-A** ცილის როლი გენის რეგულაციაში გამოკვეთილად არ ჩანს. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით, შეგვიძლია გამოვთქვათ მოსაზრება, რომ ონაგროს შემთხვევაში, განსხვავებით ცხენისა და ვირისაგან **CENP-A**-ნუკლეოსომების არსებობა ხელს არ უშლის ტრანსკრიპციული აპარატს, სხვა სიტყვებით, რომ ვთქვათ **CENP-A**-იანი ნუკლეოსომების არსებობა შესაძლებელია არ იყოს ტრანსკრიბციისთვის შეუთავსებელი.

### **2.3 მთავარ ცენტრომერულ ცილასთან- CENP-A-სთან დაკავშირებული ცენტრომერული დნმ-ის სექვენსები (ცენტრომერული პიკები)**

როგორც უკვე ზემოთ აღვნიშნეთ, ონაგროს ფიბრობლასტებში **CENP-A**-თი გამდიდრებული დნმ სექვენსების ცხენის რეფერენტულ გენომთან მაპირებისას ცენტრომერული და მეორეული პიკების საერთო რაოდენობა შეადგენდა 1065. სავარაუდოდ აღნიშნული პიკებიდან ცენტრომერულ პიკებს წარმოადგენდა 861. აქედან 646 შეესაბამებოდა 17 ქრომოსომის ნეოცენტრულ უბნებს, ხოლო დანარჩენი კი სატელიტური დნმ-ის შემცველ ცენტრომერულ პიკებს. აქედან გამომდინარე ჩვენი კვლევის შემდგომ ეტაპს წარმოადგენდა **CENP-A-სთან დაკავშირებული ცენტრომერული დნმ-ის სექვენსების ე.წ ცენტრომერული პიკების შესწავლა და ანალიზი.**

გამოკვლევებმა უჩვენა, რომ ონაგროს ცენტრომერული უბნები ფარავს ცხენის გენომზე ფართო მონაკვეთს, ანუ მოცემული ორი სახეობის დნმ მონაკვეთი აბსოლუტურად იდენტური არ არის, შესაბამისად ჩვენს მიერ მიღებულ ცენტრომერულ პიკებს შორის დაფიქსირდა წყვეტები. (სურ.1)



**სურ.1. CENP-A-სთან დაკავშირებული ონაგროს 18-ე ქრომოსომის ცენტრომერული პიკი (მაპირებული ცხენის მე-10 ქრომოსომაზე)**

ონაგროს მე-18 ქრომოსომის ცენტრომერული პიკების გრაფიკული გამოსახულება ნაჩვენებია სურ.1 -ზე. ცენტრომერული პიკის კოორდინატებია 11 247 074 ნუკლეოტიდიდან 11 548 671 ნუკლეოტიდამდე. იგი არაა გაუსის ტიპის პიკი, რაც შესაძლებელია, განპირობებული იყოს ონაგროსა და ცხენის ორთოლოგიური უბნებში ევოლუციის განმავლობაში ორი სახეობის შესაბამისი უბნების დამოუკიდებელი რეარანჟირებით (ინსერციები, დელეციები, ინვერსიები და სხვ. დაწვრილებით რეარანჟირების შესახებ იხ. მომდევნო თავში). აქვე უნდა აღინიშნოს მსგავს დაკვირვებას ადგილი ჰქონდა ვირისა და ზებრის უჯრედებში ნეოცენტრომერების შესწავლის შემთხვევაში [Nergadze et al. 2018].

3'-ბოლოზე პიკებს შორის არსებული წყვეტა (სურ.1), დიდი ალბათობით, განპირობებულია ონაგროს გენომში დნმ-ის ფართო ფრაგმენტის დელეციით ან ცხენის ორთოლოგიურ სექვენსში ფრაგმენტის ინსერციით.

რაც შეეხება ონაგროს 17-ვე უსატელიტო ცენტრომერულ პიკს მათი ანალიზი წარმოდგენილია ცხრილში 2-ში, რომელშიც მოწოდებულია ორთოლოგია ცხენსა და ონაგროს ქრომოსომებს შორის [Vladimir A. Trifonov, 2007]. ასევე, ცხრილ 2-ში წარმოდგენილია ჩვენს მიერ დადგენილი ონაგროს ცენტრომერული უბნების კოორდინატები ცხენის რეფერენტული გენომის მიხედვით, ცენტრომერული სექვენსების სიგრძე და შეიცავს თუ არა აღნიშნული სექვენსები ცხენის გენომის ორთოლოგიურ ლოკუსში რომელიმე გენს.

ონაგროს CENP-A-სთან დაკავშირებული 17 უსატელიტო ცენტრომერული პიკი

Equus Hemionus onager EHO	კოორდინატები	სიგრძე	გენის უბნის შემცველობა	GC შემცველობა (%)
EHO2	ECA18: 7,841,989-8,339,672	497,683	-	37,51%
EHO8	ECA24: 170,633-526,066	355,433	-	39,53%
EHO9	ECA21: 9,968,325-10,884,696	916,371	<b>Predicted: IPO11(importin 11) Transcribed highly in testis (in other very low transcription) ECA21:10559962-10774660</b>	39,17%
EHO10	ECA13: 7,077,681-7,732,545	654,864	-	39,40%
EHO11	ECA16:48,870,258-49,557,933	687,675	<b>Predicted: ARPP21(cAMP regulated phosphoprotein 21) Transcribed highly in brain ECA16:49038648-49188052</b>	37,37%
EHO12	ECA9: 37,051,882-37,397,004	345,122	-	37,26%
EHO13	ECA5: 21,914,972-21,949,691	34,719	<b>Predicted: SWT1 (RNA endoribonuclease homolog) Transcribed highly in testis (in other very low transcription). ECA5: 21916931-22004717</b>	35,91%
EHO14				
Peak-1	ECA20: 26,295,094-26,461,279	166,185	-	36,01%
Peak-2	ECA20: 28,485,212-	131,358	-	37,56%

	28,616,570			
EHO15	ECA8: 90,090,965-90,121,167	30,202	-	41,14%
EHO16 Peak-1	ECA22: 22,261,782-22,402,737	140,955	-	37,44%
Peak-2	ECA22: 23,940,390-24,221,336	280,946	-	46,71%
EHO18	ECA10: 11,247,074-11,548,671	301,597	-	40,83%
EHO21	ECA11: 46,664,109-46,875,143	211,034	-	39,01%
EHO22	ECA26: 20,754,461-20,972,949	218,488	-	35,00%
EHO23 Peak-1	ECA15: 24,341,655-24,548,158	206,503	-	38,53%
Peak-2	ECA15: 25,226,854 - 25,395,202	168,348	-	34,80%
EHO24	ECA2: 73,585,092-73,603,074	17,982	-	36,91%
EHO26	ECA29: 978,264-1,012,596	34,332	-	40,24%
EHO27	ECA30: 17,523,150-17,883,499	360,349	-	35,24%

მაგ. **EHO22** ქრომოსომის ორთოლოგიურია **ECA26** -ი (**ცხრილი2**) ცენტრომერა მაპირდება 20754461 ნუკლეოტიდიდან 20972949-ნუკლეოტიდამდე, სიგრძე შეესაბამება 218488 ნუკლეოტიდს და ცხენის რეფერენტული გენომი მოცემულ სექვენსში არ შეიცავს გენს.

რაც შეეხება ონაგროს ქრომოსომების უსატელიტო ცენტრომერულ პიკებს, ეს უკანასკნელი ფარავს ცხენის ფართო, რამოდენიმე ასეული ათასი ნუკლეოტიდური წყვილის მონაკვეთს. კერძოდ, **EHO9** რომლის პიკი მოიცავს ცხენის გენომზე 916 371 ნუკლეოტიდს, **EHO10**- 654 864 ნუკლეოტიდს, **EHO11** -687 675. აღნიშნული ფაქტი შეიძლება აიხსნას ერთი მხრივ

ა) ორი ჰომოლოგიური ქრომოსომის ცენტრომერის კოორდინატების წანაცვლებით ცხენის რეფერენტულ გენომზე (*Centromere sliding*) [Purgato et al. 2015]

ბ) და მეორეს მხრივ კი შესაძლებელია განპირობებული იყოს ონაგროს უსატელიტო ცენტრომერული დნმ-სა და ცხენის შესაბამის სარეფერენტო დნმ-ს შორის არსებული გარკვეული ნუკლეოტიდური წყვეტებით. აღნიშნული კი შესაძლებელია განპირობებული იყოს ევოლუციის განმავლობაში ონაგროს მოცემულ უბანში ფართო მონაკვეთების დელეციებით ცხენის ორთოლოგიურ უბნებთან შედარებით. როგორც ცხენის მე-11 ქრომოსომისა და ვირის 16 ქრომოსომის ცენტრომერებზე იქნა ნაჩვენები, ცენტრომერული პიკების სიგანე დაახლოებით 100 000 ნუკლეოტიდური წყვილის ფარგლებში მერყეობს [Wade et al, 2009 და Nergadze et al, 2018]. ონაგროს რამოდენიმე ცენტრომერული უბანი, რომელთა სიგრძე ნაკლებია ცხენის ორთოლოგიურ უბნებთან შედარებით, ფარავს ცხენის სარეფერენტო გენომზე ფართო მონაკვეთებს.

წარმოდგენილი 17 უსატელიტო ცენტრომერიდან მხოლოდ სამ ევოლუციურად ახალ ცენტრომერაში დაფიქსირდა მაკოდირებელი გენის უბანი, რომლებიც ნაწილობრივ ფარავენ ცენტრომერულ უბანს. კერძოდ, ონაგროს მე- 5, მე-16 და 21-ე ქრომოსომებში, დანარჩენი 14-ი არ შეიცავდა მაკოდირებელი გენის ლოკუსს. (ცხრილი 2)

აღნიშნული შედეგები ფაქტობრივად ამყარებს მოსაზრებას რომ ცენტრომერები წარმოიქმნებიან ქრომოსომის იმ უბნებში რომლებიც არ შეიცავენ ცილის მაკოდირებელ გენებს, რასაც ასევე ამყარებს ვირის უჯრედებიდან მიღებულ შედეგები [Nergadze et al, 2018].

კვლევის შემდგომ ეტაპზე ასევე, შესწავლილ იქნა ონაგროს ნეოცენტრომერებში, რომელიც მაპირებული იყო ცხენის რეფერენტულ გენომზე, GC-წყვილების შემცველობა. GC-შემცველობა მერყეობდა 34,80%-დან 46,71%-მდე. ჩვენს მიერ გაანალიზებული ონაგროს 20 პიკიდან (17 უსატელიტო ცენტრომერული დნმ-ის მონაკვეთის მატარებელი ქრომოსომიდან 14-ს ქრომოსომას შეესაბამება CENP-A-თი გამდიდრებული 1 ცენტრომერული პიკი, ხოლო 3-ს - 2 პიკი) GC შემცველობა 40%-ზე მეტი არის 4 შემთხვევაში, ხოლო დარჩენილი 16-ის GC შემცველობა 40%-ნაკლებია (ანუ, AT ნუკლეოტიდური წყვილებითაა შედარებით გამდიდრებული). ლიტერატურიდან ცნობილია ცხენის მე-11 ქრომოსომისა და ვირის 16 ქრომოსომის უსატელიტო ცენტრომერების ანალიზის შედეგი. აღმოჩნდა, რომ ევოლუციურად ახალი ცენტრომერების (ENCs) უმეტესობა AT-წყვილებით არის შედარებით გამდიდრებული



(ანუ ცენტრომერული ფუნქციის გადანაცვლება როგორც წესი ხდება AT-წყვილებით მდიდარ უბნებში) [Wade et al, 2009 და Nergadze et al, 2018]. ცნობილია, რომ მაღალი GC-შემცველობა დამახასიათებელია ქრომოსომათა იმ უბნებისთვის, რომლებიც მაკოდირებელ სექვენსებს შეიცავენ (უმრავლეს შემთხვაში გენური უბნის მანიშნებელია). მაღალი GC- შემცველობის დნმ-ის უბნები უფრო სტაბილურია, ვიდრე მაღალი AT-შემცველობისა [Henikoff et al., 2001].

ამგვარად, ონაგროს უსატელიტო ევოლუციურად ახალი ცენტრომერების ანალიზი და შედეგები კიდევ უფრო ამყარებენ ჰიპოთეზას - ცენტრომერული ფუნქციის წარმოქმნა და გადანაცვლება ხდება ქრომოსომის ახალ, AT ნუკლეოტიდური წყვილებით შედარებით გამდიდრებულ უბანზე.

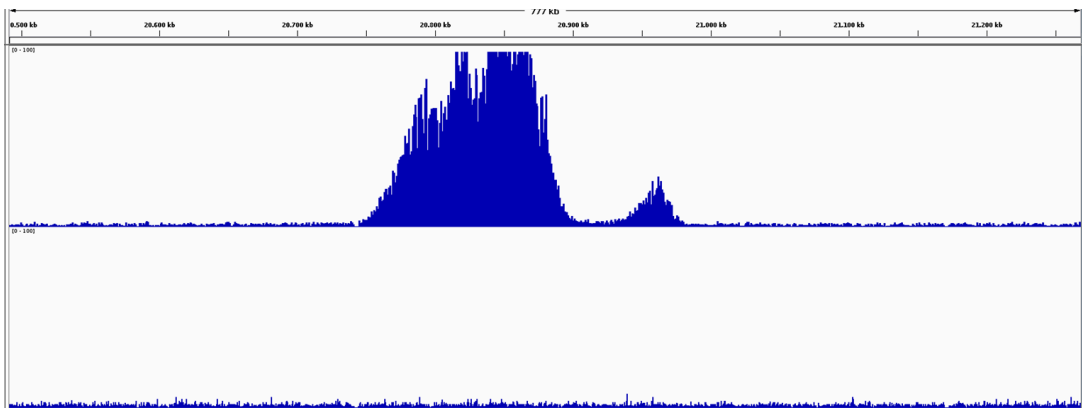
### 3.2 EHO22 და EHO27 ქრომოსომათა ნეოცენტრომერების ანალიზი

ცნობილია, რომ ევოლუციურად ახალი ცენტრომერები (*ENCs, Evolutionarily New Centromeres*) წარმოიქმნება ქრომოსომის გასწვრივ ფუნქციონალური ცენტრომერის გადანაცვლების შედეგად. ვარაუდობენ, რომ ევოლუციის გარკვეულ მონაკვეთში, ცენტრომერის ფუნქციის მატარებელი ხდება ქრომოსომის ახალი ლოკუსი. აღნიშნული მოვლენა ცნობილია, როგორც ცენტრომერის ადგილის ცვლილება [Centromere Repositioning]. აღსანიშნავია, რომ ცენტრომერის ადგილმონაცვლეობას თან არ ახლავს ქრომოსომის რეარანჟირება. არ იცვლება ქრომოსომის პოზიციური მარკერების მდებარეობაც. აღნიშნული მოვლენა პირველად აღწერილ იქნა პრიმატებში [Montefalcone et al., 1999]. შესაბამისად ნათელი გახდა, რომ ცენტრომერის ქრომოსომის გასწვრივ გადანაცვლების უნარი კარიოტიპის ევოლუციის მნიშვნელოვან მექანიზმს წარმოადგენს [Rocchi et al., 2012].

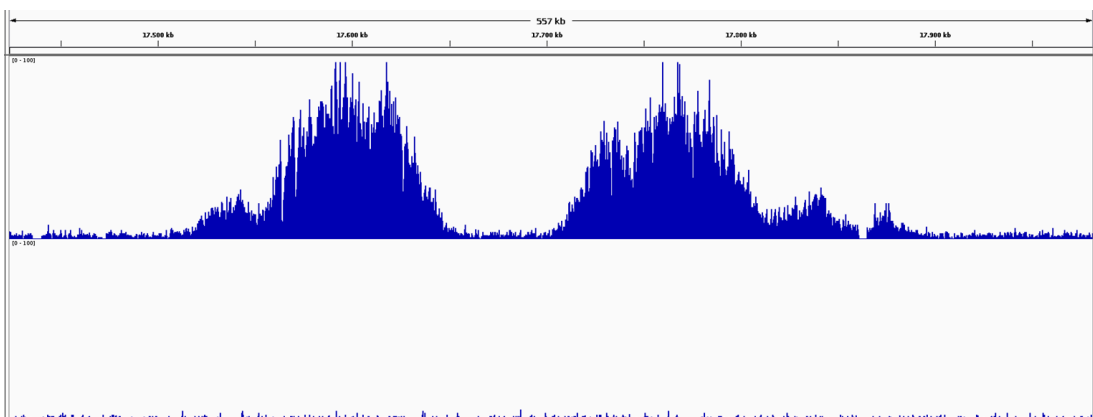
კვლევის შემდგომ ეტაპზე, ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა ონაგროს ნეოცენტრომერების დნმ-ის იმ მონაკვეთების ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობები, რომელთანაც დაკავშირებულია *CENP-A* ცილა. აღნიშნული მიზნის მისაღწევად სექვენირებულ იქნა *CENP-A* ჰისტონის შემცველი ნუკლეოსომების დნმ-ი. დეტალური ანალიზისთვის შერჩეულ იქნა ონაგროს ორი ქრომოსომის *EHO22* და *EHO27* ნეოცენტრომერა. აღნიშნულ ნეოცენტრომერებში შესწავლილ იქნა მათი ჰომოლოგია (%) ორთოლოგიურ ცხენის

გენომის სექვენსთან. ასევე *EHO22* და *EHO27* ნეოცენტრომერებში *GC* წყვილების შემცველობა, ცნობილი განმეორებადი ელემენტების ტიპები და რაოდენობა, ინსერცია/დელეცია (ალიგმენტირებული შედარებული იყო ცხენის რეფერენტულ გენომთან). (ცხრილი 3)

*სურ. 2*-ზე და *სურ. 3*-ზე წარმოდგენილია *CENP-A*-სთან დაკავშირებული ონაგროს 22-ე და 27-ე ქრომოსომების ცენტრომერული პიკები, რომელიც შესაბამისად ორთოლოგიურია ცხენის 26-ე და 30-ე ქრომოსომების. *სურ. 2*-ზე და *სურ. 3*-ზე ნათლად ჩანს, რომ ონაგროს 22-ე ქრომოსომის ცენტრომერა წარმოდგენილია ერთი ფართო პიკით. ხოლო ონაგროს 27-ე ქრომოსომა წარმოდგენილია ორი პიკით.



*სურ.2 CENP-A-სთან დაკავშირებული ონაგროს 22-ე ქრომოსომის ცენტრომერული პიკი (მაპირებული ცხენის 26 ქრომოსომაზე)*



*სურ.3 CENP-A-სთან დაკავშირებული ონაგროს 27-ე ქრომოსომის*

**ცენტრომერული პიკი (მაპირებული ცხენის 30 ქრომოსომაზე)**

ონაგროს 27-ე ქრომოსომის შემთხვევაში ორი პიკის არსებობა ცხენის რეფერენტულ გენომზე, სავარაუდოდ გამოწვეული უნდა იყოს ონაგროს 27-ე ჰომოლოგიური ქრომოსომების ცენტრომერული უბნების წანაცვლებით. (*Centromere sliding*) [Purgato et al. 2015]. ლიტერატურიდან ცნობილია, ასევე რომ ჰომოლოგიურ ქრომოსომებში ხშირია ცენტრომერული უბნების ურთიერთწანაცვლება, ანუ შესაძლებელია ერთი ჰომოლოგის ცენტრომერული უბანი ზუსტად არ ემთხვეოდეს მისი ჰომოლოგიური ქრომოსომის ცენტრომერულ უბანს [Wade et al. 2009].

ცნობილია, რომ ცხენისებრთა ოჯახის სხვადასხვა წარმომადგენლებში, ნეოცენტრომერის უბნის სიგრძე მერყეობს 100-დან 150 kb-მდე (1kb=1000 ნუკლეოტიდს) [Wade et al, 2009 და Nergadze et al, 2018]. EHO22-ის ნეოცენტრომერის პიკის შესწავლამ უჩვენა, რომ მისი სიგრძე დაახლოებით 150kb სიგრძის, ხოლო EHO27-ის ორი პიკიდან, თითოეული პიკის სიგრძე არის დაახლოებით 130 kb. მიღებული შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ უსატელიტო ცენტრომერული ლოკუსის სიგრძე ონაგროში დაახლოებით იგივეა, რაც დღემდე გამოკვლეულ ცხენისებრთა ოჯახის სხვა სახეობებში და არ განიცდის ცვლილებას.

შემდგომ ეტაპზე შესწავლილ იქნა EHO22 და EHO27 ნეოცენტრომერების ჰომოლოგია (%). ბიოინფორმატიკულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ EHO22-ის ცენტრომერსა და მის ორთოლოგიურ რეგიონს შორის ECA26-ში ჰომოლოგია 98,46%-ია, ხოლო EHO27-სა და ECA30-შორის ჰომოლოგია 98,2%-ია. (ცხრილი 3)

**ცხრილი 3.**

**ონაგროს ორი ნეოცენტრომერის (EHO22 და EHO27) ბიოინფორმატიკული ანალიზის შედეგები**

ქრომო სომა	GC შემცველ ობა %	ჰომოლოგია %	ინსერცია/დელეცია (EHO/ECA)	ცნობილი განმეორებადი ელემენტები	შენიშვნები
EHO22- ECA26	35,12%	98,46%	<u>ინსერცია</u> - 40	LTR - 55 (LTR79, RMER12, LTR91A, MLT1D,	ინსერირებულ ია - SINE-

			<p><u>დელეცია</u> - 36</p>	<p>RLTR21 MLT2B1)  <b>LINE</b> - 65  (L1M5,L2a,L2c, L1-5A2_EC, HAL1, L1MD2, L1MB7, L1ME2 )  <b>SINE</b> - 61  (MIR3, ERE3, ERE3b ERE3C, MIR, MIRb, ERE3D, ERE1, ERE2, SINE2-1_EC)  <b>Simple_repeat</b> - 45  ((TTTG)n , (TATCTATC)n, (CAC)n )  <b>Low_complexity</b> - 8  (A-rich , GA-rich)  <b>DNA ცნობილი ელემენტები</b> - 10  (Tigger13a, MER94, UCON55, Tigger3c)  <b>Satellite</b> - 2  (Sat-1_TSy)</p>	<p>ERE1;   <u>დელეციებზე</u>  <u>ლია</u> - SINE-ERE1;</p>
EH027-ECA30	35,96%	98.2%	<p><u>ინსერცია</u> - 70</p> <p><u>დელეცია</u> - 103</p>	<p><b>Ltr</b> - 91  (LTR82A, MLT1A, ERV1-I_EC, MER34B_EC, MLT1A0)  <b>Simple repeat</b> - 54,  ((TTTA)n, (AAT)n (T)n, (TC)n,(AT)n  <b>Sine</b> - 87  (MIR, ERE3, ERE1B, MIRB ERE2, ERE3D)  <b>Line</b> - 132  (L2c, L1MB5, L1M4, L1Meg, L3, L1MEc, L2d)  <b>Dna ცნობილი ელემენტები</b> - 25  (Eulor8, Charlie18a, MER53, MER63B, MER45R)  <b>Low complexity</b> -</p>	<p><u>ინსერციებზე</u>  <u>ლია</u> - LTR-ERV1-I_EC, LTR- HERVL74-int, LINE - L1Meg, LTR - MLT1C2, Simple repeat (T)n, SINE- ERE2;   <u>დელეციებზე</u>  <u>ლია</u> - 2- SINE-ERE1;</p>

				15 (A-rich ,GA-rich) <b>Satellite - 12</b>	
--	--	--	--	--	--

ორივე ნეოცენტრომერის *GC* წყვილების შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი არის დაბალი (>36%) . კერძოდ, *EHO22*-ში არის 35,12% და *EHO27*-ში - 35,96%. რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს იმას, რომ ნეოცენტრომერული უბანი ხასიათდება *AT*-ის მაღალი და *GC*-ის დაბალი შემცველობით.

ბიონფორმატიკული ანალიზით დავადგინეთ წარმოდგენილ ორივე ნეოცენტრომერაში ცნობილი განმეორებადი ელემენტები. *EHO22*-ის ნეოცენტრომერული უბანი შეიცავს 246 ცნობილ განმეორებად ელემენტს. კერძოდ:

- **LTR - 55 ელემენტი** (LTR79, RMER12, LTR91A, MLT1D, RLTR21, MLT2B1)
- **LINE - 65 ელემენტი** (L1M5,L2a,L2c, L1-5A2\_EC, HAL1,
- **SINE - 61 ელემენტი** (MIR3, ERE3, ERE3b ERE3C, MIR, MIRb, ERE3D, ERE1, ERE2, SINE2-1\_EC)
- **Simple\_repeat - 45 ელემენტი** ((TTTG)<sub>n</sub>, (TATCTATC)<sub>n</sub>, (CAC)<sub>n</sub>)
- **Low\_complexity - 8 ელემენტი** (A-rich , GA-rich)
- **დნმ-ის სხვა, ცნობილი ელემენტები - 10 ელემენტი** (Tigger13a, MER94, UCON55, Tigger3c)
- **Satellite - 2** (Sat-1\_TSy)

*EHO27*-ის ნეოცენტრომერული უბანი შეიცავს 416 ცნობილ განმეორებად ელემენტს. კერძოდ:

- **Ltr - 91 ელემენტი** (LTR82A, MLT1A, ERV1-I\_EC, MER34B\_EC, MLT1A0)
- **Simple repeat - 54 ელემენტი** ((TTTA)<sub>n</sub>, (AAT)<sub>n</sub>, (T)<sub>n</sub>, (TC)<sub>n</sub>,(AT)<sub>n</sub> )
- **Sine - 87 ელემენტი** (MIR, ERE3, ERE1B, MIRB, ERE2, ERE3D)
- **Line - 132 ელემენტი** (L2c, L1MB5, L1M4, L1Meg, L3, L1MEc, L2d)
- **Dna ცნობილი ელემენტი - 25 ელემენტი** (Eulor8, Charlie18a, MER53, MER63B, MER45R)
- **Satellite - 12 ელემენტი** (Sat-1\_TSy)
- **Low complexity - 15 ელემენტი** (A-rich ,GA-rich)

წარმოდგენილ ორივე ნეოცენტრომერაში დაფიქსირდა უცხო სატელიტური დნმ-ის (*Sat-1\_TSy*) მცირე რაოდენობა, რომელიც არ წარმოადგენს ცხენის სატელიტური დნმ-ს და წარმომავლობით ემსგავსება *Tarsius syrichta*-ს სატელიტურ დნმ-ს. ონაგროში დაფიქსირებული *Sat-1\_TSy* არ არის იდენტური *Tarsius syrichta*-ს სატელიტური დნმ-ის და მათ შორის მსგავსება დაბალი ხარისხით ვლინდება.

გამოკვლევებმა უჩვენა, რომ *EHO22*-ის ცენტრომერას სექვენსა და ცხენის *ECA26*-ს ორთოლოგიურ სექვენსს შორის გარდა ჰომოლოგიისა ფიქსირდება განსხვავებებიც. აღნიშნული განსხვავებები გამოწვეულია ონაგროს ცენტრომერულ სექვენსში 40 ინსერციითა და 36 დელეციით. აღსანიშნავია, რომ სხვადასხვა მონაკვეთზე როგორც ინსერცირებული ასევე, დელეცირებული იყო ცნობილი განმეორებადი თანმიმდევრობა *SINE-ERE1*.

რაც შეეხება *EHO27*-ის ცენტრომერას გამოვლინდა 70 ინსერცია და 130- დელეცია. ინსერცირებულთა შორის იყო შემდეგი ელემენტები *LTR - ERV1-I\_EC, LTR- HERVL74-int, LINE - LIMeg, LTR - MLT1C2, Simple repeat (T)n, SINE*, ხოლო დელეცირებული იყო 2 - *SINE- ERE1*.

გამოკვლევებმა უჩვენა, რომ ონაგროში ნეოცენტრომერული უბნები გამდიდრებულია *LINE* ელემენტით. ონაგროს 22-ე ქრომოსომის ცენტრომერაში (სიგრძე 150000 ნუკლეოტიდი) *LINE* ელემენტი გვხვდება დაახლოებით ყოველ 2300 ნუკლეოტიდში ერთი. ხოლო, ონაგროს 27-ე ქრომოსომის ცენტრომერაში (სიგრძე 260000 ნუკლეოტიდი) *LINE* ელემენტი მეორდება დაახლოებით 2000 ნუკლეოტიდში ერთი.

## თავი IV დასკვნები:

### მიღებული მონაცემების საფუძველზე

- პირველად გამოვლენილ იქნა, რომ ონაგროს უჯრედებში, განსხვავებით ცხენისა და ვირის უჯრედებისაგან, CENP-A ნუკლეოსომების არსებობა ხელს არ უშლის ტრანსკრიბციული აპარატის მუშაობას;
- დადგენილ იქნა ონაგროს უჯრედებში 17 ევოლუციურად ახალი ცენტრომერის არსებობა, რომლებიც წარმოიქმნებიან ქრომოსომის გარკვეულ უბნებში და არ შეიცავენ ცილის მაკოდირებელ გენებს. ასევე, აღნიშნული ცენტრომერები ხასიათდებიან AT-ნუკლეოტიდური წყვილებით შედარებით მდიდარი და GC წყვილების ღარიბი შემცველობით,
- გამოვლენილ იქნა ონაგროში უსატელიტო ცენტრომერული ლოკუსის სიგრძე (ორი ცენტრომერის მაგალითზე EHO22 -ისა და EHO27), რაც დაახლოებით იგივეა რაც დღემდე გამოკვლეულ ცხენისებრთა ოჯახის სხვა სახეობებში. ონაგროს ნეოცენტრომერული უბნები გამდიდრებულია LINE ელემენტით;

## თავი V

### გამოყენებული ლიტერატურა

1. Cheeseman, I.M., Desai, A., Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 2008, 33–46.
2. Wade SL, et al.//The Snf1 kinase and proteasome-associated Rad23 regulate UV responsive gene expression// *EMBO J* , 2009, 28(19):2919-31
3. Cleveland, D.W., Mao, Y., Sullivan, K.F., Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signalling, 2003, *Cell* 112, 407–421.
4. Pluta, A.F., Mackay, A.M., Ainsztein, A.M., Goldberg, I.G., Earnshaw, W.C., The centromere: hub of chromosomal activities, 1995, *Science* 270, 1591–1594.
5. Choo, K.H.A., Centromerization. *Trends in Cell Biology* 10, 182–188, 2000, 1016/S0962-8924(00)01739-6
6. Clarke, L., Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr. Opin. Genet*, 1998, *Dev.* 8, 212–218
7. Nagaki, K., Kashihara, K., Murata, M., Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*, 2005, *Plant Cell* 17, 1886–1893.
8. Kalitsis, P., Choo, K.A., The evolutionary life cycle of the resilient Centromere, 2012, *Chromosoma* 121, 327–340.
9. Plohl, M., Meštrović, N., Mravinac, B., Centromere identity from the DNA point of view, 2014, *Chromosoma* 123, 313–325.
10. Plohl, M., Meštrović, N., Mravinac, B., Satellite DNA evolution, 2012, *Genome Dyn* 7, 126–152.
11. Malik, H.S., Henikoff, S., Major evolutionary transitions in centromere Complexity, 2009, *Cell* 138, 1067–1082.
12. Black, B.E., Cleveland, D.W., Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes, 2011, *Cell* 144, 471–479.
13. Kato, H., Jiang, J., Zhou, B.-R., Rozendaal, M., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T.S., Straight, A.F., Bai, Y., A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C, 2013, *Science* 340, 1110–1113.
14. Maddox, P.S., Corbett, K.D., Desai, A., Structure, assembly and reading of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet*, 2012, *Dev.* 22, 139–147.
15. Bensasson, D., Evidence for a high mutation rate at rapidly evolving yeast Centromeres, 2011, *BMC Evolutionary Biology* 11, 211.
16. Earnshaw, W.C., Migeon, B.R., Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome, 1985, *Chromosoma* 92, 290–296.
17. Cooke, C.A., Bernat, R.L., Earnshaw, W.C., CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *The Journal of Cell Biology* 110, 1475–1488.
18. Muro, Y., Masumoto, H., Yoda, K., Nozaki, N., Ohashi, M., Okazaki, T., Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box, 1992, *The Journal of cell biology* 116, 585–596
19. Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., Okazaki, T., A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite, 1989, *The Journal of Cell Biology* 109, 1963–1973.



20. Yoda, K., Nakamura, T., Masumoto, H., Suzuki, N., Kitagawa, K., Nakano, M., Shinjo, A., Okazaki, T., Centromere protein B of African green monkey cells: gene structure, cellular expression, and Centromeric localization. *Mol. Cell. Biol.* 1996, 16, 5169–5177.
21. Ohzeki, J., Nakano, M., Okada, T., Masumoto, H., CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *The Journal of cell biology*, 2002, 159, 765–775.
22. Okada, T., Ohzeki, J., Nakano, M., Yoda, K., Brinkley, W.R., Larionov, V., Masumoto, H., CENP-B Controls Centromere Formation Depending on the Chromatin Context, 2007, *Cell* 131, 1287–1300.
23. Cheeseman, I.M., Desai, A., Molecular architecture of the kinetochore– microtubule interface. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 2008, 33–46.
24. Fukagawa, T., Brown, W.R., Efficient conditional mutation of the vertebrate CENP-C gene. *Human molecular genetics* 6, 1997, 2301–2308
25. Petrovic, A., Keller, J., Liu, Y., Overlack, K., John, J., Dimitrova, Y.N., Jenni, S., van Gerwen, S., Stege, P., Wohlgemuth, S., Rombaut, P., Herzog, F., Harrison, S.C., Vetter, I.R., Musacchio, A., Structure of the MIS12 Complex and Molecular Basis of Its Interaction with CENP-C at Human Kinetochores, 2016, *Cell* 167, 1028–1040.e15.
26. Amor, D.J., Choo, K.H.A., Neocentromeres: Role in Human Disease, Evolution, and Centromere Study. *The American Journal of Human Genetics* 71, 2002, 695–714.
27. Henikoff, S., Ahmad, K., Malik, H.S., The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA, 2001, *Science* 293, 1098–1102.
28. Allshire, R.C., Karpen, G.H., 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? 2008, *Nat Rev Genet* 9, 923–937.
29. Tachiwana, H., Müller, S., Blümer, J., Klare, K., Musacchio, A., Almouzni, G., HJURP involvement in de novo CenH3(CENP-A) and CENP-C Recruitment, 2015, *Cell Rep* 11, 22 32.
30. Ross, J.E., Woodlief, K.S., Sullivan, B.A., Inheritance of the CENP-A chromatin domain is spatially and temporally constrained at human centromeres, 2016, *Epigenetics Chromatin* 9, 20.
31. Alexandrov, I., Kazakov, A., Tumeneva, I., Shepelev, V., Yurov, Y., Alphasatellite DNA of primates: old and new families, 2001, *Chromosoma* 110, 253–266.
32. Rosenberg, H., Singer, M., Rosenberg, M., Highly reiterated sequences of SIMIANSIMIANSIMIANSIMIANSIMIAN, 1978, *Science* 200, 394–402.
33. Maio, J.J., DNA strand reassociation and polyribonucleotide binding in the African green monkey, *Cercopithecus aethiops*. *J. Mol. Biol.* 56, 1971, 579–595.
34. Shelby, R.D., Vafa, O., Sullivan, K.F., Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites, 1997, *The Journal of cell biology* 136, 501–513.
35. Melters, D.P., Bradnam, K.R., Young, H.A., Telis, N., May, M.R., Ruby, J.G., Sebra, R., Peluso, P., Eid, J., Rank, D., Garcia, J.F., DeRisi, J.L., Smith, T., Tobias, C., Ross-Ibarra, J., Korf, I., Chan, S.W.L., Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution, 2013, *Genome Biol.* 14, R10.
36. Steiner, F.A., Henikoff, S., Diversity in the organization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet.* 2015, *Dev.* 31, 28–35.
37. Chan, F.L., Marshall, O.J., Saffery, R., Kim, B.W., Earle, E., Choo, K.A., Wong, L.H., Active transcription and essential role of RNA polymerase II at the centromere during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2012, 1979–1984.
38. Carone, D.M., Zhang, C., Hall, L.E., Oberfell, C., Carone, B.R., O'Neill, M.J., O'Neill, R.J.,

- Hypermorphic expression of centromeric retroelement-encoded small RNAs impairs CENP-A loading, 2013, *Chromosome research* 21, 49–62.
39. Choi, E.S., Strålfors, A., Catania, S., Castillo, A.G., Svensson, J.P., Pidoux, A.L., Ekwall, K., Allshire, R.C., Factors That Promote H3 Chromatin Integrity during Transcription Prevent Promiscuous Deposition of CENP-A Cnp1 in Fission Yeast, 2012, *PLoS Genet* 8, e1002985.
  40. Ferri, F., Bouzinba-Segard, H., Velasco, G., Hube, F., Francastel, C., Noncoding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase, 2009, *Nucleic acids research* gkp529.
  41. Wong, L.H., Brettingham-Moore, K.H., Chan, L., Quach, J.M., Anderson, M.A., Northrop, E.L., Hannan, R., Saffery, R., Shaw, M.L., Williams, E., Choo, K.H.A., Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere, 2007, *Genome Res.* 17, 1146–1160.
  42. Rhoades, M.M., Vilkomerson, H., 1942. On the anaphase movement of chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 28, 1942, 433–436.
  43. Voullaire, L.E., Slater, H.R., Petrovic, V., Choo, K.H., A functional marker centromere with No detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? *American journal of human genetics* 52, 1993, 1153.
  44. Marshall, O.J., Chueh, A.C., Wong, L.H., Choo, K.H.A., Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution, 2008, *Am. J. Hum. Genet.* 82, 261–282.
  45. Irvine, D.V., Amor, D.J., Perry, J., Sirvent, N., Pedoutour, F., Choo, K.H.A., Saffery, R., Chromosome size and origin as determinants of the level of CENP-A incorporation into human centromeres, 2004, *Chromosome Res.* 12, 805–815.
  46. Bodor, D.L., Mata, J.F., Sergeev, M., David, A.F., Salimian, K.J., Panchenko, T., Cleveland, D.W., Black, B.E., Shah, J.V., Jansen, L.E., The quantitative architecture of centromeric chromatin, 2014, *Elife* 3, e02137.
  47. Hasson, D., Panchenko, T., Salimian, K.J., Salman, M.U., Sekulic, N., Alonso, A., Warburton, P.E., Black, B.E., The octamer is the major form of CENP-A nucleosomes at human centromeres, 2013, *Nature structural & molecular biology* 20, 687–695.
  48. Montefalcone, G., Tempesta, S., Rocchi, M., Archidiacono, N., Centromere Repositioning, 1999, *Genome Research* 9, 1184–1188.
  49. Piras, F.M., Nergadze, S.G., Poletto, V., Cerutti, F., Ryder, O.A., Leeb, T., Raimondi, E., Giulotto, E., Phylogeny of horse chromosome 5q in the genus *Equus* and centromere repositioning, 2009, *Cytogenet, Genome Res.* 126, 165–172.
  50. Shang, W.-H., Hori, T., Toyoda, A., Kato, J., Pependorf, K., Sakakibara, Y., Fujiyama, A., Fukagawa, T., Chickens possess centromeres with both extended tandem repeats and short non-tandem-repetitive sequences, 2010, *Genome research* 20, 1219–1228.