

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Tena Gržan

Centromerna epigenetika vrsta roda *Tribolium*

Doktorska disertacija

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

CENTROMERNA EPIGENETIKA VRSTA RODA *TRIBOLIUM*

Tena Gržan

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mentori: dr. sc. Brankica Mravinac, prof. dr. sc. Miroslav Plohl

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Centromere su kromosomske regije odgovorne za pravilno razdvajanje genetičkog materijala tijekom diobe stanica. U ovom radu istražena su centromerna područja blisko srodnih kukaca brašnara *Tribolium castaneum* i *Tribolium freemani*. U obje vrste otkrivene su vrsno-specifične varijante centromernih proteina CenH3 te meta-policentrična građa centromernih regija. Analiza centromernih DNA pokazala je složeni sastav vrsno-specifičnih ponavljajućih sekvenca među kojima dominiraju glavne satelitne DNA. U skladu s teorijom centromernog paradoksa, utvrđene značajne razlike u proteinskim i DNA sastavnicama centrokromatina mogle bi imati ulogu u specijaciji dviju sestinskih vrsta.

Broj stranica: 117

Broj slika: 29

Broj tablica: 19

Broj literaturnih navoda: 146

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: centromere, CenH3, *Tribolium castaneum*, *Tribolium freemani*, meta-policentromere, centromerni paradoks

Datum obrane: 25. rujna 2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Ivica Rubelj
2. prof.dr.sc. Vera Cesar
3. dr.sc. Ksenija Zahradka
4. (zamjena) dr.sc. Snježana Mihaljević

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

CENTROMERE EPIGENETICS OF SPECIES FROM THE GENUS *TRIBOLIUM*

Tena Gržan

Thesis performed at: Laboratory for Structure and Function of Heterochromatin, Department of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia

Supervisors: Brankica Mravinac, PhD, prof. Miroslav Plohl, PhD

Short abstract:

Centromeres are chromosomal regions responsible for the proper segregation of genetic material during cell division. In this research, the centromere regions of closely related flour-beetle species *Tribolium castaneum* and *Tribolium freemani* were investigated. In both species, species-specific variants of CenH3 centromeric proteins and meta-polycentric structure of centromeric regions were discovered. Centromeric DNA analysis revealed a complex content of species-specific repetitive sequences, dominated by major satellite DNAs. Consistent with the centromere paradox theory, significant differences between protein and DNA components of centromeric regions, may play a role in the speciation of two sister species.

Number of pages: 117

Number of figures: 29

Number of tables: 19

Number of references: 146

Original in: Croatian

Key words: centromeres, CenH3, *Tribolium castaneum*, *Tribolium freemani*, meta-polycentromeres, centromere paradox

Date of the thesis defense: 25. September 2020.

Reviewers:

1. prof. Ivica Rubelj, PhD
2. prof. Vera Cesar, PhD
3. Ksenija Zahradka, PhD
4. (substitute) Snježana Mihaljević, PhD

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Brankice Mravinac i prof. dr. sc. Miroslava Plohla u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Centromerna genomika beskralježnjaka“ (IP-2014-09-3183).

Zahvale

Posebnu zahvalnost upućujem mentorici dr.sc. Brankici Mravinac na stručnom vodstvu, posvećenosti, trudu, razumijevanju i savjetima tijekom provedbe istraživanja i izrade doktorskog rada.

Također se srdačno zahvaljujem mentoru i voditelju laboratorija prof.dr.sc Miroslavu Plohu na potpori, razumijevanju i korisnim sugestijama koji su doprinijeli realizaciji ovog rada.

Zahvaljujem se kolegici mag.biol.mol Evelin Despot-Slade na velikoj pomoći i sugestijama. Hvala i ostalim članovima Laboratorija za strukturu i funkciju heterokromatina dr.sc. Nevenki Meštrović Radan, dr.sc. Evi Šatović, dr.sc. Martini Pavlek, dr.sc. Tanji Vojvodi Zeljko i mag.biol.mol Moniki Tunjić Cvitanić na pomoći i potpori tijekom izrade ovo rada.

Želim se zahvaliti i dr.sc. Anamariji Brozović i dr.sc. Kseniji Zahradki na praćenju napredovanja mog doktorskog rada.

Također se zahvaljujem mag.biol.mol. Luciji Horvat na susretljivosti prilikom dogovaranja termina korištenja konfokalnog mikroskopa, gđi Mariji Kober na pomoći, razumijevanju i strpljenju prilikom obavljanja administrativnih poslova, g. Hrvoju Dageliću na informatičkoj potpori i gđi Izeti Petrijevcin na svim pruženim informacija i podršci tijekom doktorskog studija.

Zahvaljujem prijateljima na podršci tijekom izrade doktorata.

I na kraju, ali ne i manje važno, velika zahvala mojoj obitelji i dečku *na svemu*.

Popis kratica

CATD- CENP-A ciljajuća domena histona CenH3 (eng. *CENP-A targeting domain*)

cCenH3- cetromerna varijanta histona H3 vrste *Tribolium castaneum*

cCenH3-ChIP- skup očitavanja dobiven NGS sekvenciranjem frakcije DNA vrste *T. castaneum*, koja je imunoprecipitirana protutijelom protu-cCenH3

CENP-A- centromerni protein A, humani histon CenH3

CenH3- cetromerna varijanta histona H3

ChIP- kromatinska imunoprecipitacija (eng. *chromatin immunoprecipitation*)

fCenH3- cetromerna varijanta histona H3 vrste *Tribolium freemani*

fCenH3-ChIP- skup očitavanja dobiven NGS sekvenciranjem frakcije DNA vrste *T. freemani*, koja je imunoprecipitirana protutijelom protu-fCenH3

FISH- fluorescencijska hibridizacija *in situ*

HOR- ponavljanje višeg reda (eng. *higher order repeat*)

HiSeq- visoko protočni sustav sekvenciranja nove generacije

IF- imunofluorescencija

IF-FISH- kombinirana imunofluorescencija i fluorescencijska hibridizacija *in situ*

NGS- sekvenciranje nove generacije (eng. *next generation sequencing*)

RE2- „Repeat Explorer 2“, bioinformatički alat za otkrivanje i karakterizaciju ponavljajućih sekvenci DNA iz NGS očitavanja

RT-PCR- reverzna transkripcija praćena lančanom reakcijom polimerazom

TAREAN- bioinformatički alat za identifikaciju satelitnih DNA iz NGS očitavanja (eng. *tandem repeat analyzer*)

TCAST- glavna satelitna DNA vrste *T. castaneum*

TFREE- glavna satelitna DNA vrste *T. freemani*

WGS- sekvenciranje cijelog genoma (eng. *whole genome sequencing*)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Centromere	2
1.1.1. Funkcija centromera	2
1.1.2. Struktura i organizacija centromera.....	5
1.1.2.1. Centromerni proteini	5
1.1.2.2. Centromerna DNA.....	7
1.1.2.3. Tipovi centromera	9
1.1.2.4. Genetičke i epigenetičke karakteristike centromera	11
1.1.3. Evolucija centromera	14
1.2. Kukci roda <i>Tribolium</i>	16
1.2.1. Vrste <i>Tribolium castaneum</i> i <i>Tribolium freemani</i>	17
1.2.2. Satelitne DNA vrsta roda <i>Tribolium</i>	19
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	21
2.1. Ciljevi istraživanja	22
2.2. Hipoteze istraživanja	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Materijali	24
3.1.1. Modelni organizmi	24
3.1.2. Kemikalije.....	24
3.1.3. Pufferi i otopine.....	25
3.1.4. Protutijela.....	27
3.1.5. Enzimi	28
3.1.6. PCR početnice	28
3.1.7. Elektroforetski biljezi.....	29
3.1.8. Kompleti reagensa	29
3.1.9. Laboratorijski pribor.....	30
3.1.10. Uređaji.....	30
3.2. Metode.....	32
3.2.1. Izolacija genomske DNA	32
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	32
3.2.2.1. Dizajn i sinteza početnica	32
3.2.2.2. Reakcija PCR.....	33
3.2.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu	33
3.2.3. Izolacija ukupne RNA.....	34

3.2.4. Reverzna transkripcija praćena reakcijom PCR (RT-PCR)	34
3.2.5. Produkcija protutijela.....	35
3.2.6. Izolacija ukupnog sadržaja proteina	35
3.2.7. Western blot	36
3.2.8. Izolacija nativnog kromatina	38
3.2.9. Kromatinska imunoprecipitacija (ChIP).....	39
3.2.10. Sekvenciranje nove generacije (NGS).....	41
3.2.11. Citogenetićke metode	42
3.2.11.1. Priprema citogenetićkih preparata	42
3.2.11.1.1. Priprema citogenetićkih preparata s metafaznim kromosomima.....	42
3.2.11.1.2. Priprema citogenetićkih preparata s izduljenim kromatinskim nitima	43
3.2.11.2. Imunofluorescencija (IF).....	44
3.2.11.3. Fluorescencijska hibridizacija <i>in situ</i> (FISH)	45
3.2.11.3.1. Umnažanje i obilježavanje sonde biotinom	45
3.2.11.3.2. Priprema ChIP-DNA sonda metodom random priming.....	45
3.2.11.3.3. Predtretman preparata	46
3.2.11.3.4. Hibridizacija sonde na kromosomima	46
3.2.11.3.5. Imunodetekcija specifićno vezane sonde obilježene biotinom.....	47
3.2.11.4. Kombinirana metoda imunofluorescencije i fluorescencijske hibridizacije <i>in situ</i> (IF-FISH) na metafaznim kromosomima i izduljenim kromatinskim nitima	47
3.2.11.5. Konfokalno mikroskopiranje	48
3.2.12. Bioinformatićeke analize.....	49
3.2.12.1. Analiza Repeat Explorer 2	49
3.2.12.2. Analiza ChIP-Seq Mapper	50
4. REZULTATI	51
4.1. Dokazivanje transkripcije gena <i>fCenH3</i>	52
4.2. Testiranje protutijela protu-fCenH3.....	54
4.3. Utvrđivanje centromerne lokalizacije proteina cCenH3 i fCenH3.....	56
4.4. Identifikacija centromerno-kompetentnih sekvenci DNA vrsta <i>T. castaneum</i> i <i>T. freemani</i>	58
4.4.1. Izolacija nativnog kromatina vrsta <i>T. castaneum</i> i <i>T. freemani</i>	59
4.4.2. Imunoprecipitacija CenH3 kromatina	60
4.4.3. Formiranje baza ponovljenih sekvenci DNA u vrstama <i>T. castaneum</i> i <i>T. freemani</i>	62
4.4.3.1. Ponovljene DNA vrste <i>T. castaneum</i>	63
4.4.3.2. Ponovljene DNA vrste <i>T. freemani</i>	65
4.4.4. Centromerno kompetentne sekvence DNA vrste <i>T. castaneum</i>	66
4.4.5. Centromerno kompetentne sekvence DNA vrste <i>T. freemani</i>	69

4.5. Citogenetička potvrda centromernih sekvenci DNA u vrstama <i>T. castaneum</i> i <i>T. freemani</i>	71
4.5.1. Kolokalizacija proteina cCenH3 i satelitne DNA TCAST vrste <i>T. castaneum</i>	71
4.5.2. Kolokalizacija proteina fCenH3 i satelitne DNA TFREE vrste <i>T. freemani</i>	75
4.6. Usporedba centrokromatinskih komponenata vrsta <i>T. castaneum</i> i <i>T. freemani</i>	78
4.6.1. Usporedba proteina cCenH3 i fCenH3	78
4.6.2. Usporedba centromernih DNA kod vrsta <i>T. castaneum</i> i <i>T. freemani</i>	81
5. RASPRAVA	83
6. ZAKLJUČCI	95
7. LITERATURA	97
8. SAŽETAK	109
9. SUMMARY	112
10. ŽIVOTOPIS	115

1. UVOD

1.1. Centromere

Centromere su domene kromosoma odgovorne za pravilno razdvajanje genetičkog materijala tijekom staničnih dioba. Nefunkcionalne centromere koje dovode do nepravilne raspodjele genetičkog materijala uzrokuju ozbiljne poremećaje u funkcioniranju stanice što može dovesti do razvoja tumora, neplodnosti i urođenih anomalija (Barra, V., i Fachinetti, 2018). Iako su ove regije esencijalne za homeostazu stanice i posljedično organizma, često su izostavljene iz posloženih sekvenciranih genoma zbog visokog sadržaja ponavljajućih DNA koje ih izgrađuju. Podrobna istraživanja ovih regija od velikog su značaja za unapređenje osnovnih bioloških spoznaja, ali i biomedicinskih aspekata dijagnostike i liječenja bolesti povezanih s poremećajima funkcioniranja ovih dijelova kromosoma (McKinley i Cheeseman, 2016).

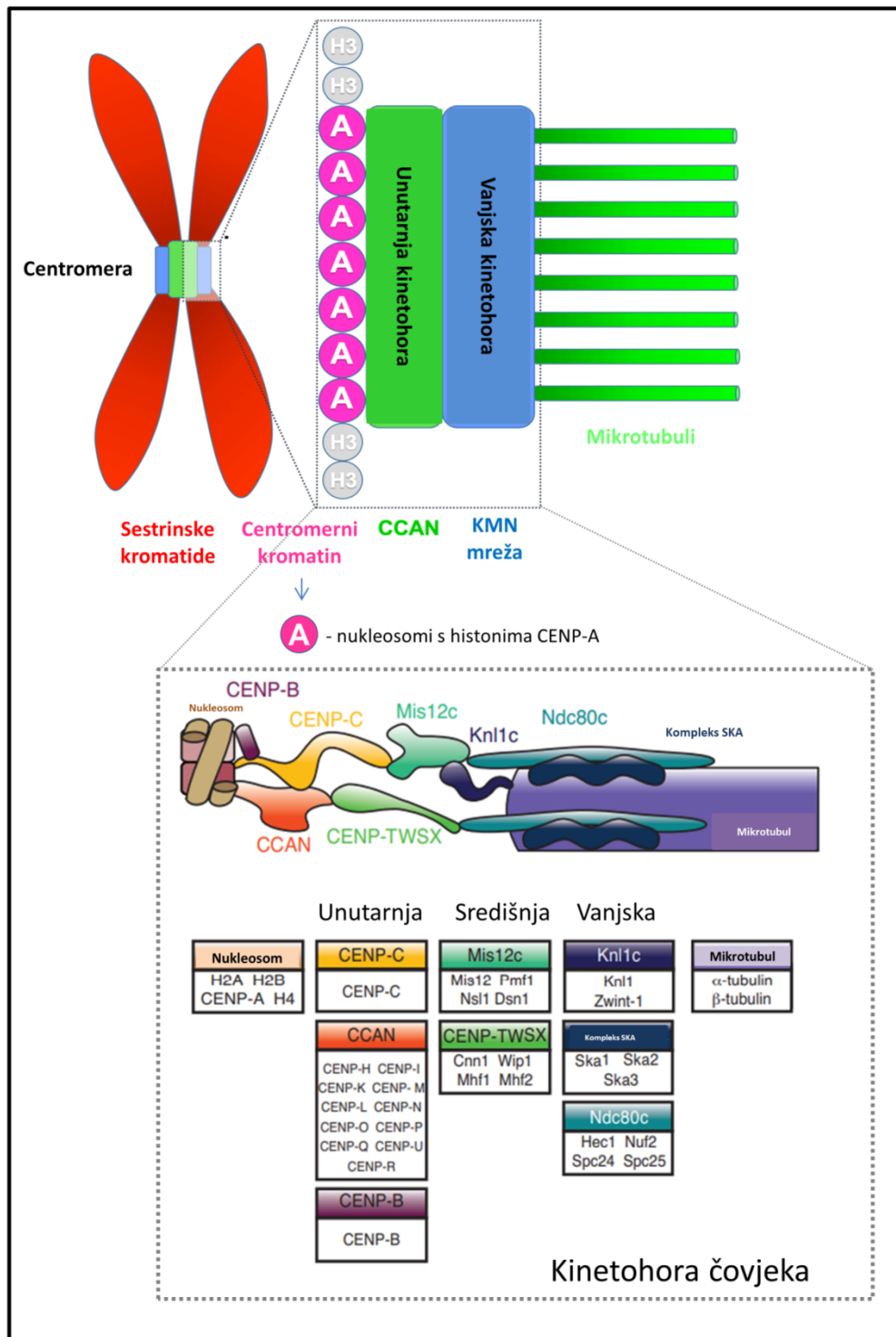
1.1.1. Funkcija centromera

Primarna uloga centromera je u lokalizaciji i posredovanju sastavljanja multiproteinskog kompleksa koji se naziva kinetohorni aparat, tijekom mejoze i mitoze. Kinetohore sudjeluju u povezivanju centromera s nitima diobenog vretena tzv. mikrotubulima. Mikrotubuli skraćivanjem razdvajaju i povlače sestrinske kromatide u mitozu i mejozi II te homologne kromosome u mejozi I, na suprotne polove stanice (Musacchio i Desai, 2017).

Kinetohorni aparat, koji se formira na području centromere, sastoji se od proteina unutarnje, središnje i vanjske kinetohore (Slika 1). Unutarnji sloj kinetohore u interakciji je s centromerama preko specifičnog prepoznavanja centromerne varijante histona H3, CenH3. Utvrđeno je da proteini unutarnje kinetohore, CENP-C i CENP-N, specifično prepoznaju protein CenH3, kojeg razlikuju od kanonske varijante histona H3. CENP-N prepoznaje domenu CATD (eng. *CENP-A targeting domain*) proteina CenH3, dok CENP-C prepoznaje domenu CATD i C-terminalnu domenu proteina CenH3 (Slika 1). U sklopu unutarnje kinetohore nalazi se i protein CENP-B koji je prema dosadašnjim spoznajama u sisavaca jedini protein iz kinetohornog kompleksa koji prepoznaje specifičan DNA slijed centromerne DNA (Masumoto i sur., 1989). CENP-B se veže na motiv CENP-B (eng. *CENP-B box*), kratku konzerviranu sekvencu dugačku 17 parova baza (pb) (pregledno prikazano u Musacchio i Desai, 2017). Motiv CENP-B može varirati u nukleotidnom slijedu, što utječe na njegovu funkcionalnost. Literaturni podaci upućuju da se vezanjem proteina CENP-B na motiv CENP-B centromerne DNA, stabiliziraju centromerni nukleosomi. Osim toga, CENP-B međudjeluje s proteinom CENP-C te posljedično pomaže dodatnu regrutaciju proteina

CENP-C na centromernim nukleosomima. Međutim, miševi kojima je deletiran protein CENP-B metodom „knock-out“, kao i neocentromere i humani Y kromosom koji ne sadrže motiv CENP-B, zadržavaju svoju centromernu funkcionalnost (Hudson i sur., 1998; Kapoor i sur., 1998). Stoga se smatra da protein CENP-B nije esencijalan za održavanje centromerne funkcije, već doprinosi točnosti segregacije kromosoma i stvaranju centromera *de novo* (Fachinetti i sur., 2015). Osim što ostvaruje interakcije s histonom CENP-A, protein CENP-C također, blizu svog N-terminalnog kraja, veže i kompleks Mis12 koji je gradivni dio središnje kinetohore (Screpanti i sur., 2011). Protein CENP-C i proteini mreže CCAN (eng. *constitutively centromere-associated network*, CCAN) predstavljaju karike koje povezuje centromerni kromatin i središnju kinetohoru (Slika 1) (Hamilton et al., 2019). Vanjska kinetohora direktno stupa u kontakt s mikrotubulima pretvarajući silu nastalu depolimerizacijom mikrotubula u silu koja uzrokuje razdvajanje i pomicanje kromosoma. Multiproteinski kompleks vanjske kinetohore naziva se mreža KMN (kompleks Knl1, kompleks Mis12 i kompleks Ndc80) i sastoji se od 10 podjedinica koje ostvaruju međusobne interakcije, a uloga cijelog kompleksa je prihvaćanje mikrotubula (Cheeseman i sur., 2006). Veza između unutarnje i vanjske kinetohore ostvaruje se proteinima središnje kinetohore putem dvaju mehanizama: interakcijom proteina CENP-C s proteinima kompleksa Mis12c koji se dodatno vežu na proteine vanjske kinetohore (kompleks Ndc80 i Knl1) te direktnim vezanjem proteina CENP-T s proteinskim kompleksom Ndc80 (pregledno prikazano u Musacchio i Desai, 2017) .

Osim uloge u iniciranju sastavljanja kinetohorog aparata, centromere također imaju važnu ulogu u povezivanju sestrinskih kromatida. Naime, tijekom replikacije genoma, kompleks kohezina se uspostavlja i povezuje dva replicirajuća lanca DNA. Tijekom prijelaza između profaze i metafaze mitoze, kohezinski kompleks se otpušta s krakova sestrinskih kromatida, nakon čega ostaje prisutan samo u područjima centromerama i pericentromera, tvoreći karakterističan izgled kromosoma u obliku slova „X“. Na početku anafaze cijepa se preostali kohezin u područjima centromera, što rezultira pravilnim i pravovremenim razdvajanjem sestrinskih kromatida (pregledno prikazano u Mirkovic i Oliveira, 2017). Razlika između mitoze i mejoze leži u prvoj mejotskoj diobi u kojoj se specifično sparuju homologni kromosomi, među kojima se potom stvara sinaptonemalni kompleks i dolazi do procesa rekombinacije, nakon čega se kromosomi razdvajaju. Centromere igraju esencijalnu ulogu u posredovanju navedenih procesa specifičnih za mejozu I.



Slika 1. Prikaz strukturne građe kinetohornog aparata. Preuzeto i prilagođeno prema (<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/how-chromosomes-are-bound-to-be-separated-in-cell-division/> i Hamilton i sur., 2019).

1.1.2 Struktura i organizacija centromera

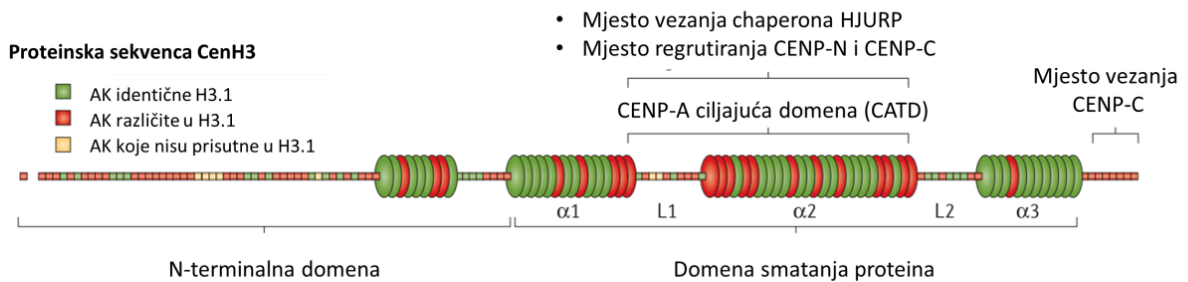
Uloga centromera u pravilnoj segregaciji udvostručenog genetičkog materijala očuvana je kod svih eukariotskih organizama. Međutim, struktura centromera koja se sastoji od proteina CenH3 te sekvenci DNA, značajno varira čak i među blisko srodnim vrstama. Budući da su slijed i sastav centromernih DNA izrazito varijabilni i ne dijele homologiju u sekvenci među vrstama, prema dosadašnjim spoznajama identitet centromera definiran je epigenetički, prvenstveno putem histona CenH3 (McKinley i Cheeseman, 2016). Radi boljeg razumijevanja strukture centromera, detaljniji opisi centromernih proteina, tipova centromera, centromernih sekvenci DNA kao i epigenetički karakter centromera navedeni su u sljedećim potpoglavljima.

1.1.2.1. Centromerni proteini

Za centromerne nukleosome karakteristično je prisustvo centromerne varijante histona H3. Centromerna varijanta histona H3, prvotno otkrivena autoimunim protutijelima u serumima pacijenata s bolesti CREST, nazvana je centromerni protein A, CENP-A (Earnshaw i Rothfield, 1985). Daljnjim istraživanjima otkriveni su homolozi proteina CENP-A i u drugim skupinama organizama. Ovi homolozi dobivali su specifične nazive za svaku vrstu: primjerice, centromerni histon Cid u vinskoj mušici *Drosophila melanogaster* (Henikoff i sur., 2000), Cnp1 u kvascu *Schizosaccharomyces pombe* (Takahashi i sur., 2000), Cse4 u pivskom kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (Meluh i sur., 1998) i HCP-3 u obliku *Caenorhabditis elegans* (Buchwitz i sur., 1999). Danas se za centromernu varijantu histona H3 sve češće univerzalno upotrebljava naziv CenH3, posebno kad je riječ o organizmima koji ne spadaju u skupinu sisavaca (Talbert i sur., 2002).

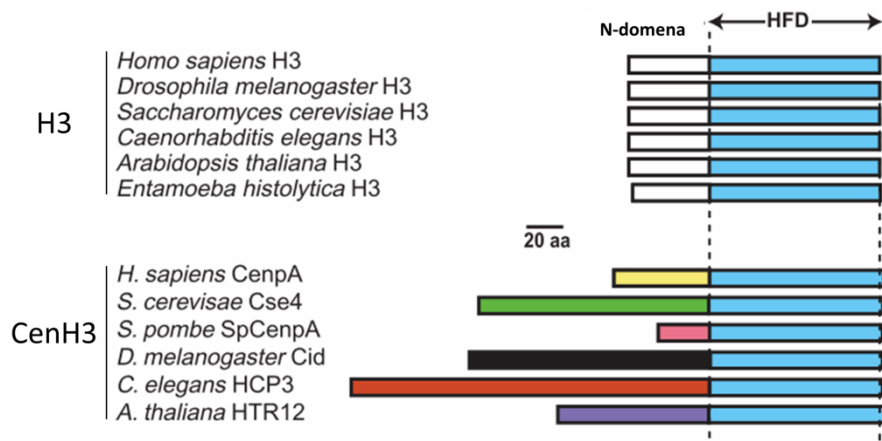
Osnova građe histona CenH3 tipična je za sve histone: sadrži globularnu domenu smatanja proteina (eng. *histone folding domain, HFD*), koja se smješta u centromerni nukleosom, te N-terminalnu domenu, koja se nalazi izvan histonskog oktamera. CenH3 dijeli homologiju s kanonskim histonom H3, ali posjeduje i specifične razlike koje utječu na funkciju, a služe i za identifikaciju CenH3 u genomskim bazama podataka. Spomenuta specifična svojstva histona CenH3 odnose se na domenu CATD koja, u odnosu na domenu CATD histona H3, sadrži dulju petlju 1 (eng. *loop1, L1*) i specifičnu zavojnicu $\alpha 2$ kojima CenH3 ostvaruje interakciju s DNA unutar centromernih nukleosoma (Slika 2) (Tachiwana i sur., 2011). Osim toga, humani protein pratitelj (eng. *chaperone*) HJURP, ostvaruje interakciju upravo s domenom CATD histona CenH3 u procesu transporta i integracije histona CenH3 u centromerne nukleosome tijekom G1 faze staničnog ciklusa. Također, protein CenH3 stupa u interakciju s već spomenutim proteinima

unutarnje kinetohore (CENP-N, CENP-C) preko domene CATD, potičući pritom njihovo nakupljanje u centromernim regijama (Slika 2) (Pregledno prikazano McKinley i Cheeseman, 2016).



Slika 2. Građa humanog histona CENP-A. Preuzeto i prilagođeno prema (McKinley i Cheeseman, 2016).

Uspoređujući domene smatanja histona CenH3 različitih skupina organizama s domenama smatanja njihovih histona H3 utvrđeno je da dijele oko 50% međusobne sličnosti, dok N-terminalne domene proteina CenH3 i histona H3 ne dijele značajniju sličnost niti u dužini niti u sastavu sekvenci (Slika 3) (Henikoff i sur., 2001). Osim toga, uočena je značajna varijabilnost sljedova N-terminalnih domena između histona CenH3 različitih skupina eukariotskih organizama. Nasuprot tomu, N-terminalne domene H3 histona među udaljenim eukariotima konzervirane su u svojoj dužini i slijedu (Slika 3) (Malik i Henikoff, 2003). Upravo varijabilnost histona CenH3 među eukariotima upućuje na njegovu brzu evoluciju, dok histoni H3 zadržavaju visoku razinu konzerviranosti sekvence.



Slika 3. Shematski prikaz strukturnih razlika histona H3 i histona CenH3 među različitim skupinama eukariotskih organizama. Preuzeto i prilagođeno prema (Malik i Henikoff, 2003).

1.1.2.2. Centromerna DNA

Centromerne sekvence DNA većine eukariotskih organizama su ponavljajućeg karaktera, najčešće izgrađene od satelitnih DNA i mobilnih elementa (Plohl i sur., 2014). Analizom centromernih regija 280 biljaka i životinja utvrđena je značajna raznolikost centromernih sekvenci DNA između filogenetski udaljenih skupina organizama (Melters i sur., 2013). Valja naglasiti da čak i između blisko srodnih vrsta postoji značajna divergencija u količini i slijedu centromernih satelitnih DNA.

Satelitne DNA su najčešća gradivna DNA komponenta eukariotskih centromera. To su uzastopno ponovljene sekvence DNA, čije su osnovne jedinice ponavljanja, tzv. satelitni monomeri, najčešće dugačke između 150-180 pb i 300-360 pb (Garrido-Ramos, 2017). Takvi monomeri, smješteni jedan iza drugog u orijentaciji „glava-rep“, tvore dugačke nizove DNA. Više uzastopnih satelitnih monomera mogu tvoriti novu, složeniju jedinicu, koja se naziva jedinica ponavljanja višeg reda (eng. *higher order repeat*, skraćeno HOR). Ova jedinica također se uzastopno ponavlja i na taj način tvori složene nizove. Sukladno tome, monomeri humanog α -satelita dužine 171 pb u genomu nalaze se u 2 forme: u tipičnoj monomernoj organizaciji i u organizaciji ponavljanja višeg reda (Aldrup-MacDonald i Sullivan, 2014). U HOR strukturama α satelita nalaze se od dva do 21 monomera α -satelita koji se uzastopno ponavljaju i također formiraju satelitne nizove (Rudd i sur., 2006). Monomerna organizacija α satelita je svojstvena pericentromernim regijama, dok je HOR organizacija tipična za funkcionalne centromere.

Suvremenom tehnologijom sekvenciranja nove generacija i naprednim bioinformatičkim alatima, u genomima eukariota otkrivaju se sveukupni sadržaji porodica satelitnih DNA, tzv. satelitomi. Tom metodologijom otkriveno je primjerice 15 porodica satelitnih DNA u vrsti *Pisum sativum* (Macas i sur., 2007) i 62 porodice satelitnih DNA u vrsti *Locusta migratoria* (Ruiz-Ruano i sur., 2016). Iako postoje brojne porodice satelitnih DNA u genomima pojedinih vrsta, najčešće su jedna ili nekoliko porodica satelitnih DNA dominantno prisutne u genomima eukariota (Macas i sur., 2007, Meštrović i sur., 1998, Mravinac i sur., 2002, Ruiz-Ruano i sur., 2016). Satelitne DNA mogu biti vrsno-specifične, što ukazuje na njihovu brzu stopu evolucije. Međutim, postojanje homolognih porodica satelitnih DNA u srodnim vrstama upućuje i na očuvanost određenih satelitnih motiva. Satelitne DNA izgrađuju heterokromatinske regije kromosoma, u prvom redu (peri)centromerne i subtelomerne regije (López-Flores i Garrido-Ramos, 2012). Udjeli satelitnih DNA u genomima eukariotskih organizama značajno variraju, kod biljaka čine između 0,1% i 36%

genoma, dok kod životinja zauzimaju udio od 0,5% pa više od 50% genoma (Garrido-Ramos, 2017).

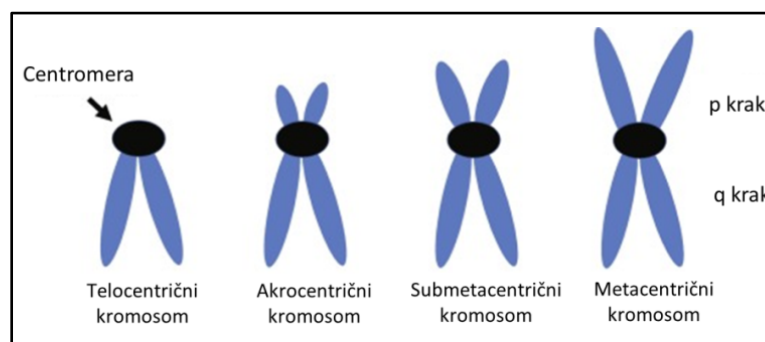
Mobilni elementi, transpozoni i retrotranspozoni, su ponavljajuće sekvence DNA raspršene po genomu mehanizmima transpozicije i retrotranspozicije. U literaturi je evidentirana obogaćena prisutnost LTR retrotranspozona (eng. *long terminal repeat*) u centromernim regijama raznih vrsta biljaka i životinja (pregledno prikazano u Plohl i sur., 2014). U animalnim skupinama organizama pronađeni su centromerno obogaćeni i non-LTR retrotranspozoni (Chang i sur., 2019). Pretpostavlja se da se preferentna integracija specifičnih retrotranspozona u centromerna područja zasniva na prepoznavanju određenih epigenetičkih oznaka (Tsukahara i sur., 2012), dok se amplifikacija retrotranspozona u centromernim regijama može dodatno događati uslijed segmentalne duplikacije koja je karakteristična za propagaciju satelitnih DNA (Ma i Jackson, 2006). Za centromere biljaka tipična je složena kompozicija centromerne DNA koja se sastoji od izmjeničnih satelitnih DNA nizova i sekvenci retrotranspozona (Ma i sur., 2007). Detaljnom bioinformatičkom analizom utvrđena je i složena organizacija centromerne DNA kod vrste *D. melanogaster* (Chang i sur., 2019). Kod spomenute vrste su utvrđeni sljedovi centromerne DNA specifični za svaki kromosom, dok je svim centromerama zajednička obogaćena prisutnost non-LTR retrotranspozona G2/Jockey-3 (Chang i sur., 2019). Zanimljivo, blisko srodna vrsta *D. simulans*, također sadrži non-LTR retrotranspozone G2/Jockey-3 u svojim centromerama. Konzerviranost retrotranspozonskog elementa za razliku od varijabilnosti u satelitnim DNA sekvencama, upućuje na funkcionalni značaj specifičnog retrotranspozona G2/Jockey-3 u centromernim područjima vrsta *D. melanogaster* i *D. simulans*.

Centromere izgrađene od jedinstvene sekvence DNA, bez tipičnog ponavljajućeg karakter, otkrivene su kod pupajućeg kvasca *S. cerevisiae*. Centromere kvasca *S. cerevisiae* sastoje se od jedinstvenog, konzerviranog slijeda DNA, nukleosomne dužine 125 pb, koji je neophodan za sastavljanje kinetohornog aparata i funkciju centromera (Clarke i Carbon, 1980). Dok su kod pupajućih kvasaca centromere definirane genetički, putem jedinstvenog slijeda DNA, kod većine ostalih eukariota centromerni identitet određen je epigenetički, odnosno histonom CenH3. Prve indicije o tome da centromerna DNA ne definira centromerni identitet dobivene su istraživanjima dicentričnih kromosoma i otkrićem humanih neocentromera (Earnshaw i Migeon, 1985, Voullaire i sur., 1993). Opaženo je da kod humanih dicentričnih kromosoma, koji posjeduju dvije centromerne regije, dolazi do epigenetičkog utišavanja jedne centromere bez promjena u centromernoj sekvenci DNA, što ukazuje da centromerna DNA nije dovoljna za osiguravanje centromerne funkcije. Na taj zaključak upućivalo je i otkriće neocentromera (Voullaire i sur.,

1993). Naime, neocentromere su genomska područja izvan nativnih centromera, koje sadrže protein CENP-A u svojim nukleosomima, ali im nedostaju pripadajuće tipične sekvence centromernog DNA. Iako humane neocentromere nemaju karakteristične centromerne nizove α -satelita, one uspijevaju ostvariti centromernu funkciju. Osim toga, pronađene su centromere bez ponavljajućih DNA, na jednom ili više kromosoma kod konja, orangutana, domaće kokoši i krumpira, što ide u prilog tezi da specifični centromerni satelitni nizovi DNA nisu esencijalni za realiziranje centromerne uloge (pregledno prikazano u McKinley i Cheeseman, 2016). Međutim, uočeno je da evolucijski nove centromere (eng. *evolutionary new centromeres*, ENC) kod makaki majmuna, koje inicijalno nemaju ponavljajući karakter, pokazuju tendenciju nakupljanja ponavljajućih nizova α -satelita (Ventura i sur., 2007). To opažanje navodi na pretpostavku da se tijekom „sazrijevanja“ evolucijski novih centromera nakupljaju ponavljajuće DNA koje imaju ulogu u stabilizaciji centromerne strukture (Marshall i sur., 2008)

1.1.2.3. Tipovi centromera

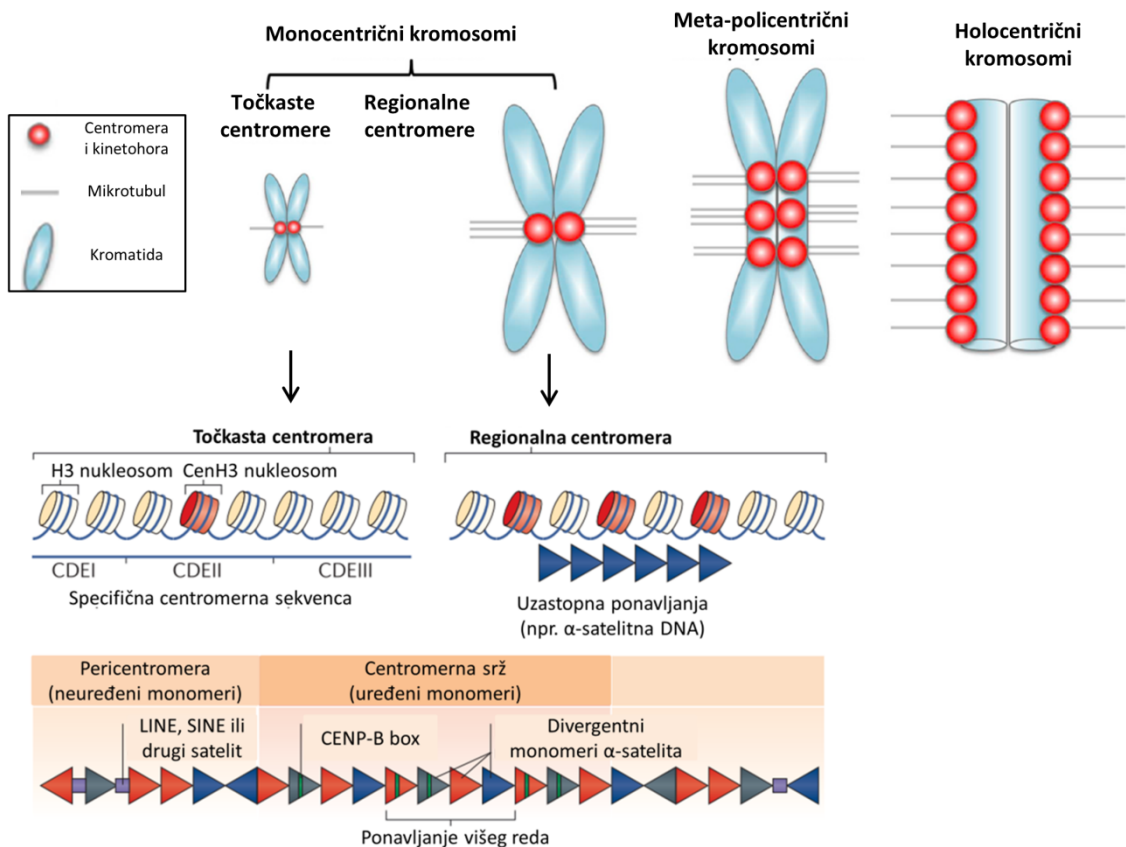
Prema strukturalnoj građi centromera, kod eukariotskih organizama generalno razlikujemo monocentrične i holocentrične kromosome. Monocentrični kromosomi sadrže aktivne centromerne smještene na jednom mjestu na kromosomu koje se citološki očituju kao mjesto suženja odnosno primarne konstrikcije kromosoma. Monocentrični kromosomi mogu sadržavati točkaste ili regionalne centromere. Točkaste centromere tipične su za pupajuće kvasce *S. cerevisiae*, čije se centromere sastoje od specifične sekvence DNA približne duljine jednog nukleosomnog namotaja (Hieter i sur., 1985). Kod preostalih eukariota s monocentričnim kromosomima, centromere su regionalne, što znači da zauzimaju dugačke poteze DNA od najmanje nekoliko stotina kilobaza (Malik i Henikoff, 2001). Ovisno o lokaciji monocentričnih centromera na kromosomima, sukladno citogenetičkim opažanjima, kromosomi se svrstavaju u metacentrične, submetacentrične, akrocentrične i telocentrične kromosome (Slika 4).



Slika 4. Vrste monocentričnih, regionalnih centromera. Preuzeto i prilagođeno prema (Shen, 2019).

Za razliku od monocentričnih kromosoma, centromere holocentričnih kromosoma prostiru se cijelom dužinom kromosoma (Slika 5). Holocentrične kromosome citogenetički karakterizira odsutnost primarnog suženja i paralelni položaj sestrinskih kromatida u odnosu na polove diobenog vretena prilikom njihovog razdvajanja u anafazi. Potonje je rezultat jednolikog povlačenja mikrotubula cijelom dužinom kromatida, dok se kod monocentričnih kromosoma povlače regionalne centromere, pri čemu kromosomski krakovi zaostaju za centromernim regijama u procesu povlačenja (Cuacos i sur. 2015). Holocentričnim kromosomima je svojstveno sastavljanje kinetohornih ploča duž vanjskih strana sestrinskih kromatida, osim na samim krajevima kromatida, u procesu mitoze (pregledno prikazano u Marques i Pedrosa-Harand, 2016). Holocentrični kromosomi su rjeđe prisutni među eukariotima, a nalazimo ih kod nematoda, nekih biljaka i nekih kukaca. Pretpostavlja se da je holocentričnost konvergentno evoluirala u 13 eukariotskih skupina (Melters i sur., 2012). Evolucijska prednost holocentričnih kromosoma objašnjava se njihovom otpornosti na gubitak genetičkog materijala uslijed lomova kromosoma. Naime, odlomljeni fragmenti holocentričnih kromosoma zadržavaju centromernu funkciju i sposobnost sastavljanja kinetohora, što osigurava pravilno nasljeđivanje u stanice kćeri. S druge strane, acentrični fragmenti monocentričnih kromosoma se nasumično nasljeđuju u stanice kćeri i posljedično gube daljnjim staničnim diobama. Holocentričnost ima i svoje nedostatke koji su potencijalni uzroci rjeđe prisutnosti ove vrste centromera u domeni eukariota. Holocentričnost je utvrđena kod četiri filogenetski udaljenih skupina kukaca (Drinnenberg i sur., 2014). Smatra se da je kod ovih skupina kukaca holocentričnost neovisno evoluirala iz monocentrične organizacije, pri čemu je došlo do gubitka histona CenH3 i proteina CENP-C (Drinnenberg i sur., 2014). Nasuprot tome, evolucija holocentričnosti kod biljaka i nematoda nije praćena delecijom histona CenH3 (Marques i sur., 2015, Momen i sur., 2005)

U recentnim istraživanjima centromera mahunarki iz rodova *Pisum* i *Lathyrus*, navodi se nova vrsta organizacije centromera koja potencijalno predstavlja prijelazni oblik između monocentričnosti i holocentričnosti, a naziva se meta-policentričnost. Meta-policentrični kromosomi vrste *Pisum sativum* sadrže izduljenu primarnu konstrikciju, dužine jedne trećine cijelog kromosoma, koja sadrži 3-5 odvojenih centromernih domena (Slika 5) (Neumann i sur., 2012, Schubert i sur., 2020). U dvjema vrstama mahunarki *P. sativum* i *Lathyrus sativus* u kojima je utvrđena meta-policentričnost, ustanovljeno je postojanje dvije varijante histona CenH3 koje kolokaliziraju u spomenutim subdomenama, s tim da je jedna varijanta prevalentno prisutna u centrokromatinu (Neumann i sur., 2016).



Slika 5. Prikaz kategorizacije centromera s obzirom na strukturnu građu. Preuzeto i prilagođeno prema (Wong i sur., 2020, McKinley i Cheeseman, 2016).

1.1.2.4. Genetičke i epigenetičke karakteristike centromera

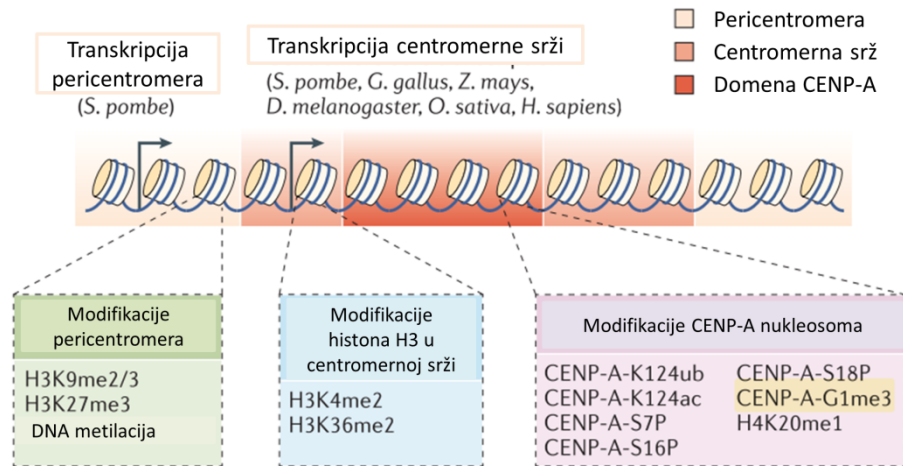
Funkcionalne centromere ili centromerne srži regionalnih centromera razlikuju se od okolnog pericentromernog heterokromatina u sastavu DNA i u epigenetičkim oznakama koje utječu na strukturne razlike kromatina dviju regija, iz kojih proizlaze njihove specifične funkcije (Schalch i Steiner, 2017).

Razlike u kompoziciji ponavljajućih sljedova DNA centromera i pericentromera opažene su i detaljno istražene kod čovjeka. Naime, humane centromere su izgrađene od satelitne DNA koja se naziva α -satelit. Unutar centromerne srži monomeri α -satelita su posloženi u HOR organizaciji s pojedinačnim monomerima koji sadrže motive CENP-B. S druge strane, okolne pericentromerne regije sadrže nizove α -satelita u neuređenoj, monomernoj organizaciji sa značajnom razlikom u homologiji (50-70%) između pojedinačnih monomera (Akihiko i sur. 2014). Osim toga, humane pericentromere su obogaćene mobilnim elementima, poput elemenata LINE (eng. *long*

interspersed nuclear elements) i SINE (eng. *short interspersed nuclear elements*) te sadrže i druge vrste satelitnih DNA (Slika 5) (pregledno prikazano u McKinley i Cheeseman, 2016). Kod miševa centromere i pericentromere su izgrađene od različitih porodica satelitnih DNA. Tako centromere izgrađuje manja satelitna DNA „minor“, monomera dužine 120 pb, dok se pericentromere sastoje od veće satelitne DNA „major“ koju karakteriziraju monomeri duljine 234 pb (Iwata-Otsubo i sur., 2017). Vrsta *D. melanogaster* u svojim centromernim regijama sadrži šest porodica jednostavnih minisatelita s dužinama monomera od 4-12 pb, dok *D. simulans* sadrži složenije satelitne DNA s dužim jedinicama ponavljanja (Talbert i sur., 2018). Kod vrste *D. melanogaster* je utvrđen distinktivan sastav centromerne i pericentromerne DNA. Funkcionalne centromere izgrađene su od kompleksne DNA obogaćene retroelementima, dok pericentromere čine nizovi jednostavnih i kratkih satelitnih DNA (Chang i sur., 2019).

Centromerna srž sadrži naizmjenične nukleosome s histonima CenH3 i nukleosome s kanonskim histonima H3 (McKinley i Cheeseman, 2016). Obje vrste histona podložne su epigenetičkim modifikacijama koje utječu na strukturne razlike centrokromatina od okolnog pericentromernog kromatina. Kanonski histoni H3 centromerne srži sadrže obogaćeno prisutne dimetilacijske modifikacije lizina na položajima 4 i 36 (Slika 6), dok je histon H2B centromerne srži označen monoubikvitinom. Navedene epigenetičke oznake karakteristične su za otvoreni i transkripcijski aktivan kromatin. Pokazano je da odsutnost epigenetičke oznake H3K4me2 u centrokromatinu dovodi do utišavanja transkripcije α -satelita i posljedično do nemogućnosti regrutiranja proteina pratitelja HJURP (Bergmann i sur., 2011). Opisane su brojne post-translacijske modifikacije histona CenH3, a uključuju metilaciju, acetilaciju, ubikvitinaciju i sumoilaciju (Slika 6). Navedene modifikacije histona su detaljno regulirane tijekom staničnog ciklusa i imaju ulogu u pravovremenoj ugradnji histona CenH3, održavanju stabilnosti nukleosoma CenH3 i funkciji centromera. Od brojnih modifikacija proteina CenH3, valja istaknuti fosforilaciju serina 7 N-terminalne domene histona CenH3 koja se pojavljuje u profazi, vrhunac postiže u metafazi i polako se smanjuje u anafazi, a čiji nedostatak dovodi do pogrešaka u poravnanju homolognih kromosoma, smanjene povezanosti sestrinskih kromatida i smanjene lokalizacije proteina CENP-C (pregledno prikazano u Wong, i sur., 2020). Također, smatra se da trimetilacija glicina 1 histona CENP-A pospješuje interakciju CENP-A s centromernim α -satelitom, dok fosforilacije serina 16 i 18 imaju ulogu u razdvajanju kromosoma u mitozu (Bailey i sur., 2013). S druge strane, pericentromerne regije dominantno su označene di- i trimetilacijskom modifikacijom lizina 9 te trimetilacijom lizina 27 histona H3, koje predstavljaju represivne, heterokromatinske histonske oznake tipične za kondenzirani i utišani kromatin (Sadeghi i sur., 2014, Sullivan i Karpen, 2004,

Lam i sur., 2006). Također, metilacija DNA svojstvena je kako centromernim tako i pericentromernim regijama (Scelfo i Fachinetti, 2019).



Slika 6. Epigenetičke modifikacije histona centromerne srži i pericentromera. Preuzeto i prilagođeno prema (McKinley i Cheeseman, 2016).

U skladu s navedenim opažanjima, prisustvo primarnih transkripata centromernih sekvenci DNA sekvenci svjedoči o transkripcijskoj aktivnosti centromernih regija koja je prvo opisana u miševima (Cohen i sur., 1973, Harel i sur., 1968). Danas se smatra da je transkripcija centromera evoluirala kao osnovno obilježje ovih struktura u cijeloj domeni eukariota (Perea-Resa i Blower, 2018). Pokazano je da heterokromatinizacija centromerne srži dovodi do poremećaja u funkcioniranju centromera, što ukazuje na važnost održavanja epigenetičke razlike između centromerne srži i pericentromera (Nakano i sur., 2008). Pretpostavka je da otvoreni kromatin i transkripcija centromera pospješuje integraciju histona CenH3 u centromerni kromatin i slaganje kinetohornog aparata na površini centrokromatina (Schalch i Steiner, 2017).

1.1.3. Evolucija centromera

Centromere su dinamične regije kromosoma s karakterističnom brзом evolucijom centromerne DNA i histona CenH3, koja utječe na promjenu strukture, ali ne i funkciju centromera. Spomenuti fenomen brze evolucije centromernog kromatina koji ne utječe na funkciju centromera naziva se centromerni paradoks (Henikoff i sur., 2001). Smatra se da takva strukturalna i organizacijska promjenjivost ovih regija doprinosi nastajanju reproduktivne barijere i razdvajanju vrsta, odnosno specijaciji.

Jedna od teorija kojom se pokušava objasniti centromerni paradoks jest hipoteza centromernog „drive“-a (Henikoff i sur., 2001, Rosin i Mellone, 2017). Prema spomenutoj teoriji, uzrok brzoevoluirajućem centrokromatinu leži u ženskoj gametogenezi. Naime, prilikom oogeneze, diobom primarne oocite nastaju ukupno 4 gamete, od kojih tri, tzv. polarna tijela, propadaju, dok jedna opstaje i razvija se u jajnu stanicu. Takozvani „sebični“ genetički elementi su sljedovi DNA koji se preferentno nasljeđuju u odnosu na druge sljedove DNA, s tim da ne moraju nužno imati pozitivni efekt na fenotip. Takvi „sebični“ elementi imaju tendenciju selektivne segregacije u jajnu stanicu, čime izmiču nasumičnom nasljeđivanju u četiri novonastale gamete. Mehanizam kojim se „sebični“ genetički elementi preferentno nasljeđuju u jajnu stanicu očituje se u asimetričnom diobenom vretenu sekundarne oocite. „Sebični“ elementi se vežu za stranu diobenog vretena kojom će se naslijediti u novonastalu jajnu stanicu. Navedeni fenomen naziva se mejotski „drive“, a po istom principu funkcionira centromerni „drive“, kojim se sebični centromerni elementi povlašteno nasljeđuju u jajnu stanicu. Centromerni „drive“ dokazan je u mišjem hibridnom soju CHPO (Iwata-Otsubo i sur., 2017). Naime, to je soj koji sadrži haploidni set kromosoma s većim centromerama, koje posjeduju duže nizove centromerne satelitne DNA, te haploidni set kromosoma s manjim centromerama, koje imaju kraće nizove centromerne satelitne DNA i ukupno manje histona CenH3. U metafazi mejoze I, prilikom formiranja bivalenata, uočeno je da su kromosomi s većim centromerama pozicionirani prema strani diobenog vretena koji vodi u novonastalu jajnu stanicu (Iwata-Otsubo i sur., 2017, Rosin, L. F., i Mellone, 2017). Uzrok tome je što veće centromere regrutiraju više proteina kinetohornog aparata koje putem BUB1 signalnog puta privlače više destabilizirajućih faktora diobenog vretena. Na taj način se velike centromere odvajaju od strane diobenog vretena koja vodi u polarno tijelo i okreću prema polu koji vodi u jajnu stanicu (Akeri i sur., 2019). Centromerni „drive“ potvrđen je i u vrstama biljnog roda *Mimulus*, kod kojih se preferentno nasljeđuju duplicirani aleli lokusa D putem ženske roditeljske linije (Fishman i Willis, 2005). Međutim, povećane centromere i centromerni „drive“ uzrokuju nepoželjne efekte kao što su muška

sterilnost, aneuploidija i poremećeni omjer spolova (Malik, 2009). Stoga se smatra da proteini CenH3 i/ili CENP-C ubrzano evoluiraju kako bi suprimirali centromerni „drive“ (Talbert i sur., 2004). Kod sisavaca nije utvrđena adaptivna evolucija CenH3, međutim dokazana je adaptivna evolucija proteina CENP-C u domenama koje imaju afinitet vezanja DNA (Talbert i sur., 2004). Adaptivna evolucija CENP-C utvrđena je i u brojnim životinjskim i biljnim skupinama. S druge strane, N-terminalne domene histona CenH3 izrazito su varijabilne u svojem slijedu i dužini čak i među blisko srodnim vrstama, dok domene smatanja ovog proteina evoluiraju pod pozitivnim selektivnim pritiskom, kao što je slučaj kod vrsta roda *Drosophila* i kod vrste *A. thaliana* (Malik i Henikoff, 2001, Talbert i sur., 2002). Kod roda *Drosophila* utvrđeno je da je petlja 1, odgovorna za lokalizaciju histona CenH3, pod snažnim pozitivnim selektivnim pritiskom (Malik, 2009). Pretpostavlja se da evolucijske promjene u petlji 1 utječu na afinitet vezanja histona CenH3 za nukleosomalnu DNA. Promijenjeni afinitet utječe i na stopu integracije histona CenH3 u centrokromatin, što posljedično utječe i na robusnost kinetohornog aparata i brojnost povezanih mikrotubula. Pretpostavlja se da smanjeni afinitet proteina CenH3 za vezanje na centromernu DNA na velikim centromerama, kao i adaptivna evolucija proteina CENP-C utišavaju centromerni „drive“ (Malik, 2009).

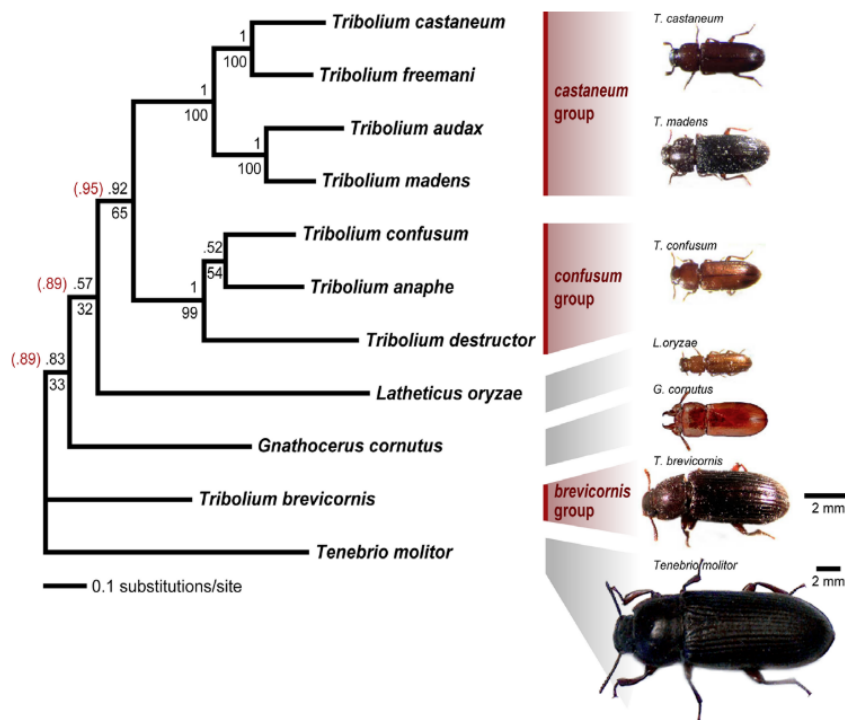
Međutim, u pojedinim vrstama biljaka, evolucija centromera ne može se objasniti mehanizmom centromernog „drive“-a. Primjerice, kod različitih linija kukuruza nije primijećeno značajno odstupanje od standardnog omjera Mendelovog nasljeđivanja, između homolognih kromosoma s većim i manjim centromerama (Han i sur., 2018). Kod vrsta tribusa (eng. *tribe*) Fabeae nije utvrđena adaptivna evolucija histona CenH3 koja bi upućivala na pozitivnu selekciju domena histona CenH3 koje su u interakciji s centromernom DNA i posljedično utjecala na promjenu afiniteta za centromernu DNA (Robledillo i sur., 2020). Osim toga, kod vrsta tribusa Fabeae utvrđeno je više satelitnih DNA u centromernim regijama koje su najčešće vrsno-specifične. Isto tako, utvrđeno je da se centromerne satelitne DNA mogu nalaziti i u područjima izvan samih centromera. Kod ovih vrsta, evolucija CenH3 nije u direktnoj vezi s evolucijom specifične centromerne DNA, kao što se predviđa teorijom centromernog „drive“-a. U konačnici, evolucija svih eukariotskih centromera ne može se objasniti teorijom centromernog „drive“-a te su stoga potrebna daljnja istraživanja u svrhu rasvjetljavanja različitih mehanizama evolucije centromera.

1.2. Kukci roda *Tribolium*

Kukci roda *Tribolium* svrstavaju se u porodicu crnokrilaca (Tenebrionidae) koja pripada redu kornjaša (Coleoptera). Red Coleoptera je najbrojniji red živih bića koji broji više od 380 000 opisanih vrsta, što ukupno čini 40% svih vrsta kukaca i 25% svih životinjskih vrsta (Zhang, 2011). Vrste reda Coleoptera su holometabolični kukci, prilagođeni različitim ekološkim nišama, a upravo je vrsta *Tribolium castaneum* najbolje istražena vrsta iz spomenutog reda.

Rod *Tribolium* broji 36 opisanih vrsta (Angelini i Jockusch, 2008). Deset vrsta iz roda *Tribolium* štetnici su na uskladištenoj hrani, uključujući i glavnog predstavnika roda *T. castaneum*, što ih čini ekonomski važnim organizmima (Nakakita, 1983). Vrste *T. castaneum* i *Tribolium confusum* su kozmopolitske vrste, raširene po cijelom svijetu upravo ljudskim djelovanjem putem modernog transporta brašna i žitarica (Angelini i Jockusch, 2008).

Srodstveni odnosi između 36 opisanih vrsta ovog roda su vrlo složeni (Angelini i Jockusch, 2008, Meštrović i sur., 2006). Filogenetskom analizom temeljenom na više molekularnih biljega, definirane su grupe *castaneum* i *confusum* kao čvrste monofiletske skupine koje su međusobno blisko srodne (Angelini i Jockusch, 2008). Unutar grupe *castaneum* utvrđena je sestrinska srodnost između vrsta *T. castaneum* i *Tribolium freemani*, dok navedeni par dijeli blisku srodnost sa sestrinskim parom *Tribolium madens* i *Tribolium audax* (Slika 7). Dobro filogenetski definirani srodstveni odnosi unutar grupe *castaneum* zajedno s dobro razvijenim eksperimentalnim, genetičkim tehnikama na modelnom organizmu *T. castaneum* čine rod *Tribolium* odličnim sustavom za izučavanje genetičkih razlika između srodnih vrsta.



Slika 7. Filogenetski odnosi vrsta roda *Tribolium*. Preuzeto iz (Angelini i Jockusch, 2008).

1.2.1. Vrste *Tribolium castaneum* i *Tribolium freemani*

Vrsta *T. castaneum* (Herbst, 1797), poznata pod hrvatskim nazivom kestenjasti brašnar, je podrobno izučavani modelni organizam i kao takav je predstavnik roda *Tribolium*. U laboratorijskim istraživanjima je prisutan već do 1924. godine (Chapman, 1924). Inicijalno je izabran je kao modelni organizam zbog lakog uzgoja, kratkog generacijskog vremena (najkraće 20 dana), mnogobrojnog potomstva, holometabolije i lakog stvaranja genetičkih mutanata. Navedene pogodnosti ovog modelnog organizma učinile su ga poželjnom vrstom u znanstvenim istraživanjima, pa je stoga proučavan u brojnim granama biologije kao što su razvojna biologija, funkcionalna genomika i populacijska genetika. Osim toga, izuzetno je pogodan organizam za manipulacijske tehnike interferencije RNA (eng. *RNA interference*), odnosno utišavanja gena (Kumar i sur., 2018). Pokazalo se da se putem jednostavnog ubrizganja specifičnih dvolančanih RNA, lako može stvoriti fenotip „knock out“ koji značajno olakšava istraživanja funkcije gena u bilo kojem razvojnom stadiju ove vrste (Arakane i sur., 2005). Na ovoj vrsti također se provode istraživanja bazirana na transgenetici i insercijskoj mutagenezi (Kumar i sur., 2018). Genom vrste *T. castaneum* sekvenciran je pristupom “shot gun” 2008. godine. Pritom je 80% genoma posloženo u 10 tzv. *linkage* grupa koji predstavljaju 9 autosomalnih kromosoma i spolni kromosom X, dok je 20% genoma ostalo neposloženo. Neposloženi dijelovi su djelomično

sastavljeni u kraće poteze nazvane „scaffolds“ i „singletons“ (Richards i sur., 2008). Značajno je istaknuti da je glavnina visokorepetitivnih (peri)centromernih regija ostala neposložena čak i u najnovijoj verziji asembliranog genoma vrste *T. castaneum* Tcas5.2 (Herndon i sur., 2020).

Vrsta *T. freemani* je incijalno pronađena u Indiji (pokrajna Kašmir), a opisao ju je Hinton (1948). Naknadno je pronađena kao nametnik na uvezenim uskladištenim žitaricama u Japanu. Vrsta *T. freemani* sestrinska je vrsta kukca *T. castaneum*. Bliska srodnost vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* očituje se kroz mogućnost međusobnog križanja i stvaranja potomstva (Wade i Johnson, 1994). Međutim, križanci vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* su nezdravi, uglavnom sterilni i malobrojni. Utvrđeno je da je reproduktivna izolacija između dviju vrsta postkopulatorna i prezigotna, što je pokazano križanjem ženki vrste *T. castaneum* naizmjenično s mužjacima vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* (Robinson i sur., 1994). Iako su ženke kopulirale s mužjacima obje vrste, potomstvo je u 99% slučajeva bilo porijeklom od mužjaka iste vrste, što ukazuje da se reproduktivna barijera između dvije vrste nalazi nakon kopulacije, a prije stvaranja zigote. Unatoč bliskoj srodnosti ovih dviju vrsta, zasad u literaturi ne nalazimo detaljnije studije njihove genetičke sličnosti. Procijenjena veličina genoma *T. castaneum* je oko 204 Mb (Brown i sur., 1990), dok je veličina genoma vrste *T. freemani* veća i iznosi oko 232.7 ± 2.93 Mb (Alvarez-Fuster i sur., 1991). Genom vrste *T. freemani* je sekvenciran, međutim, nije posložen i mapiran u *linkage* grupe kao što je to napravljeno na genomu vrste *T. castaneum*. Nukleotidni sljedovi dobiveni sekvenciranjem genoma vrste *T. freemani* zasad su posloženi tek u kraće složene nizove (eng. *scaffolds*).

Sa citogenetičkog aspekta, ove vrste također pokazuju kariotipsku sličnost. Naime, diploidna kromosomska garnitura vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* sastoji se od 20 kromosoma. Mejotska formula za obje vrste glasi $9+Xy_p$, a karakterizira ju 9 autosoma te jedan spolni kromosom. Par spolnih kromosoma kod ženki sastoji se od dva kromosoma X, dok mužjake karakterizira spolni par sastavljen od većeg kromosoma X te malog kromosoma y_p . Konfiguracija „padobrana“ (eng. *parachute configuration*) koju tvori spolni bivalent Xy_p , česta je karakteristika kukaca reda Coleoptera (Dutrillaux i Dutrillaux, 2017). Kromosomi dviju vrsta su relativno mali, 2.5-3.5 μm u vrsti *T. castaneum* (Shimeld, 1989) te 1-3 μm u vrsti *T. freemani* (Juan i sur., 1993).

1.2.2. Satelitne DNA vrsta roda *Tribolium*

Satelitne DNA vrsta roda *Tribolium* su podrobno istražene (Tablica 1). Za vrste ovog roda karakterističan je visoki udio vrsno-specifičnih satelitnih DNA u genomu. Najčešće se radi o jednoj dominantnoj satelitnoj DNA koja se primarno lokalizira u (peri)centromernom heterokromatinu te se zbog visoke zastupljenosti naziva glavna satelitna DNA. Dosad su opisane glavne satelitne DNA u vrstama *T. castaneum* (Ugarković i sur., 1996b), *T. freemani* (Juan i sur., 1993), *T. madens* (Mravinac i Plohl, 2007, Ugarković i sur., 1996a), *T. audax* (Mravinac i Plohl, 2010), *T. confusum* (Plohl i sur., 1993), *T. anaphe* (Mravinac i sur., 2004), *T. destructor* (Mravinac i sur., 2004) i *T. brevicornis* (Mravinac i sur., 2005). Udio glavnih satelitnih DNA vrsta roda *Tribolium* varira od 13,2 pa do 40% genoma, s iznimkom vrste *T. destructor* kod kojeg udio glavne satelitne DNA čini tek 0,7% genoma (Mravinac i sur., 2004).

Tablica 1. Obilježja satelitnih DNA vrsta roda *Tribolium*

Vrsta	Satelitna DNA	Udio satelita u genomu (%)	Broj kopija u genomu	Duljina monomera (pb)	Varijabilnost monomera (%)	AT sastav monomera (%)
<i>T. anaphe</i> ¹	TANAPH	13,2	1,68x10 ⁵	161	1,1	68,9
<i>T. destructor</i> ¹	TDEST	0,7	7,67x10 ³	145	2,7	79,3
<i>T. brevicornis</i> ²	TBREV	21,2	7,07x10 ⁴	1061	1,6	69,2
<i>T. audax</i> ³	TAUD1	40,0	5,11x10 ⁵	112	6,3	72,3
	TAUD2	19,3	1,93x10 ⁴	1412	1,1	70,8
<i>T. madens</i> ⁴	MAD1	30,0	3,16x10 ⁵	225	4,1	74,0
	TMAD2	4,0	1,35x10 ⁴	704	1,6	68,8
<i>T. confusum</i> ⁵	TCONF	40,0	5,82x10 ⁵	158	2,0	73,4
<i>T. freemani</i> ⁶	TFREE	31,0	4,05x10 ⁵	166	3,0	69,9
<i>T. castaneum</i> ⁷	TCAST	17,0	8,76x10 ⁴	360	3,6	73,1

¹Mravinac i sur., 2004; ²Mravinac i sur., 2005; ³Mravinac i Plohl, 2010; ⁴Ugarković i sur., 1996a, Mravinac i Plohl, 2007; ⁵Plohl i sur., 1993; ⁶Juan i sur., 1993; ⁷Ugarković i sur., 1996b.

Iako glavne satelitne DNA vrsta *T. castaneum*, *T. freemani*, *T. confusum*, *T. madens*, *T. anaphe* i *T. destructor* ne dijele homologiju u sekvenci, svima je svojstven visoki udio AT baza, koji je jednak ili veći od 69%. Unutar satelitnih DNA, nalaze se nasumično pozicionirani AT blokovi koji se razlikuju u nukleotidnom slijedu. Glavne satelitne DNA vrsta *T. castaneum*, *T. freemani*, *T. anaphe*, *T. confusum*, *T. destructor* i *T. madens* (satelit II) imaju organizane AT blokove u nizovima od ≥3 adenina ili timina, distribuiranih periodično u monomernim sekvencama (Mravinac i sur., 2004). Također, utvrđeno je da glavne satelitne DNA u vrstama *T. castaneum*, *T. freemani*, *T. confusum* i *T. madens* sadrže invertna ponavljanja u blizini AT blokova koja mogu tvoriti sekundarne strukture ukosnice (Ugarković i sur., 1996b). Invertna ponavljanja se, međutim, razlikuju u slijedu

i dužini i ne dijele međuvrsku homologiju. Naizmjenično smješteni AT blokovi u monomerima glavnih satelita mogu utjecati na zakrivljenost osi DNA što se pak može odraziti na povećanu gustoću pakiranja (peri)centromernog heterokromatina (Barceló i sur., 1998). Budući da sljedovi glavnih satelita vrsta roda *Tribolium* ne dijele međusobno značajnu homologiju, pretpostavlja se da nisu evoluirali od jedinstvene ancestralne satelitne DNA. Međutim, usprkos divergenciji primarnih sljedova glavnih satelitnih DNA vrsta roda *Tribolium*, zajedničke karakteristike, kao što su spomenuta invertna ponavljanja i AT blokovi, upućuju na funkcionalni značaj takvih svojstava (Ugarković i sur., 1996b).

Sastav satelitnih DNA vrsta *T. castaneum* je dobro istražen, a uključuje opisanu glavnu satelitnu DNA TCAST (Ugarković, i sur., 1996b) te još devet eukromatinskih satelitnih DNA (Pavlek i sur., 2015). Glavna satelitna DNA TCAST sastoji se od monomera dugačkih prosječno 360 pb, međutim, njihova duljina može varirati od 332 do 384 pb. Nukleotidni sljedovi monomera TCAST također značajno variraju u međusobnoj sličnosti. Temeljem razlika u sekvenci DNA i do 30%, utvrđeno je postojanje pet distinktivnih potporodica satelitne DNA TCAST (Pavlek i sur., 2015). Procijenjeno je da udio TCAST čini 17% genoma (Ugarković, i sur., 1996b), dok u posloženom sekvenciranom genomu zauzima tek 0.3% (Richards i sur., 2008). Stoga se može zaključiti da većina nizova TCAST nije posložena u bazi asembliranog genoma, odnosno da satelitna DNA TCAST čini znatan udio viskorepetitivnog, neposloženog dijela genoma (Pavlek i sur., 2015). Citogenetički je pokazano da TCAST zauzima primarno (peri)centromerne regije svih 20 kromosoma, uključujući i spolne kromosome Xy_p (Ugarković, i sur., 1996b). Analizom neposložjenih „scaffold“-a dokazane su različite vrste HOR organizacije satelitne DNA TCAST (Vlahović i sur., 2017). Nasuprot tome, pokazano je da su kraći monomerni nizovi i pojedinačni monomeri TCAST prisutni u eukromatinu, a dokazana je i njihova uloga u regulaciji genske ekspresije nakon toplinskog stresa (Felicciello i sur., 2015).

Glavna satelitna DNA vrste *T. freemani* TFREE građena je od monomera prosječne duljine 166 pb koji u uzastopnim nizovima čini 31% ukupnog genoma (Juan i sur., 1993). Monomer satelitne DNA TFREE sadrži čak 4 para invertiranih ponavljanja koja mogu tvoriti ukosnice duljine 20 pb ili manje te zajedno potencijalno mogu tvoriti križnu sekundarnu strukturu (eng. *cruciform*). Također je utvrđena (peri)centromerna lokalizacija TFREE satelita na kromosomima *T. freemani*. Iako vrste sestrinskog para *T. castaneum* i *T. freemani* mogu kopulirati i producirati potomstvo, njihove glavne satelitne DNA ne dijele homologiju u sekvenci.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Sveobuhvatni cilj ovog rada bio je istražiti centromerna područja sestrinskih vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*.

U sklopu istraživanja definirani su sljedeći pojedinačni ciljevi:

- 1) identificirati centromerne proteine CenH3 vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* te producirati na njih specifična protutijela
- 2) upotrebom protutijela protu-CenH3 izolirati centromerni kromatin
- 3) sekvenciranjem nove generacije odrediti nukleotidne sljedove DNA prisutne u centromernom kromatinu.

Finalni cilj istraživanja bio je usporedbom proteina CenH3 i centromernih sekvenca DNA utvrditi sličnosti i/ili razlike u centromernoj epigenetici vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, te na temelju dobivenih rezultata pokušati razjasniti moguću ulogu centromerne epigenetike u procesu specijacije ovih dviju blisko srodnih vrsta.

2.2. Hipoteze istraživanja

Dosadašnja istraživanja vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* pokazala su da spomenute vrste, usprkos zadržanoj sposobnosti međusobnog križanja i produciranja potomstva, ne dijele glavne satelitne DNA.

Početna pretpostavka ovog istraživanja je da glavne satelitne DNA kukaca *T. castaneum* i *T. freemani*, iako međusobno značajno različite u nukleotidnim sljedovima, izgrađuju njihove centromerne regije.

Sukladno teoriji centromernog paradoksa i brze koevolucije gradivnih komponenata centromernog kromatina, osnovna hipoteza istraživanja je da se centromerni proteini CenH3 dviju vrsta također razlikuju u svojim aminokiselinskim sljedovima.

Krajnja pretpostavka je da su razlike u centromernom kromatinu, koje uključuju razlike u proteinima CenH3 i centromernim sekvencama DNA, utjecale na specijaciju vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* te da bi mogle utjecati na kvalitetu njihovog križanog potomstva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Modelni organizmi

Za potrebe ovog istraživanja nabavljene su kulture vrste *Tribolium castaneum* soja Georgia 2 (GA2) i vrste *Tribolium freemani* iz američkog insektarija USDA-ARS (United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, Kansas, SAD). Pribavljene inicijalne kulture kukaca uspješno su propagirane u stabilnim laboratorijskim uvjetima pri temperaturi od 28°C na hranjivoj podlozi od integralnog brašna i ječmene kaše. Kulture su presađivane jednom mjesečno na nove hranjive podloge.

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u istraživanju navedene su u tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije korištene u istraživanju.

Naziv kemikalija	Proizvođač (kataloški broj)
Agaroz „SeaKem LE“	Lonza (207-594-3400)
Aminoallyl-dUTP-Cy3	Jena Bioscience (NU-803-CY3)
Bezvodni glicerol	Applichem (A2926,0500)
Biotin-16-dUTP	Roche (11093070910)
Blokirajući reagens	Roche (11096176001)
Blokirajući reagens (eng. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Applichem (A1391)
Bradfordov reagens	PanReac Applichem (A6932,0500)
BSA	NEB (B9001S)
Dekstran sulfat natrijeve soli	Sigma Aldrich (D8906)
Dynabeads Protein A	Invitrogen (10001D)
Etanol	Kemika (0505001)
Etidijev bromid	Serva (21251.01)
Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (P7626)
Fiksir G338	AGFA (3M9QX)
Formaldehid	Sigma Aldrich (F8775)
Formamid	Millipore (1096841000)
Glicin	Sigma Aldrich (G8898)
Pojačivač signala “Image IT FX Signal Enhancer”	Invitrogen (I36933)
Kalij dihidrogenfosfat	Kemika (11123)
Kalij klorid	Kemika (11496)
Kolcemid	Sigma Aldrich (10295892001)
Kompleksal III (EDTA)	Kemika (11368 08)
Magnezij klorid heksahidrat	Kemika (1301707)
Metanol	Kemika (1308901)
Mowiol 4-88	Sigma Aldrich (81381)

Natrij acetat, bezvodni	Kemika (1441908)
Natrij citrat dihidrat	Kemika (1405407)
Natrij deoksikolat	PanReac Applichem (A1531,002)
Natrij dodecil sulfat (SDS)	Sigma Aldrich (L5750)
Natrij hidrogenfosfat	Kemika (1409806)
Natrij hidroksid	Kemika (1452506)
Natrij klorid	Carlo erba (479687)
Octena kiselina	Sigma Aldrich (33209)
Orange G	Sigma Aldrich (O3756)
Poli-D-lizin hidrobromid	Sigma Aldrich (P1149)
Razvijač G138i	AGFA (33FYW)
Saharoza	Kemika (1800408)
Spermidin	Sigma Aldrich (S0266)
Spermin	Sigma Aldrich (S3256)
Sprej RNase away	Termo Scientific (10666421)
Supstrat Pierce ECL Western Blotting (detekcijski reagens 1 i detekcijski reagens 2)	Termo Scientific (32209)
Tablete „cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail“	Roche (4693159001)
Trikloroctena kiselina	(10063-AT0-G0100-1)
Triton X-100	Promega (H5142)
Trizma baza	Sigma Aldrich (T1503)
Tween 20	Sigma Aldrich (P1379)

3.1.3. Puferi i otopine

Sastavi korištenih ishodišnih pufera i otopina opisani su tablici 3.

Tablica 3. Ishodišni puferi i otopine korištene u istraživanju.

Naziv ishodišnih pufera i otopina	Sastav
Pufer 10xPBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (autoklavira se, čuvan na sobnoj temperaturi)
Pufer 20xSSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-citrat, pH 7,0 (autoklaviran, pohranjen na sobnoj temperaturi)
Pufer 50xTAE	2 M Tris, 1 M octena kiselina, 50mM EDTA, pH 8,0 (čuvan na sobnoj temperaturi)
Lizirajući pufer	200 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM EDTA, 0,2% SDS, 1mM PMSF (svježe pripreman)
Pufer DeSO ₄	20% (m/v) DeSO ₄ , 50 mM NaPO ₄ (pH 7,0) u puferu 4xSSC (aliquoti skladišteni na -20°C)
FISH denaturacijska otopina	70% (v/v) fomamid u puferu 2XSSC (čuvan na sobnoj temperaturi)
Pufer 4M	5% (m/v) reagens Blocking u puferu 4xSSC (aliquoti skladišteni na -20°C)
Pufer 4T	0,05% (v/v) Tween 20 u puferu 4xSSC (svježe pripreman)

Pufer 4xLaemmli	200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% glicerol, 8% SDS, 0,02% bromofenol blue (čuvan na sobnoj temperaturi)
Pufer 10xNative PAGE	250 mM Tris, 1,92 M glicin, pH ~8,3 (pH se ne namješta, čuvan na 4°C)
Pufer 10xSDS-PAGE	250 mM Tris, 1,92 M glicin, 1% SDS, pH ~8,3 (čuvan na 4°C)
Pufer 1xTransfer (Towbin)	25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol (pripreman 10xNative PAGE, upotrebljavan višekratno, čuvan na 4°C)
Pufer 10xTBS (skraćeno od eng. <i>Tris-buffered saline</i>)	200 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,6 (čuvan na sobnoj temperaturi)
Pufer TBS/T (eng. <i>Tris-buffered saline + Tween 20</i>)	1xTBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6), 0,1% Tween 20 (svježe pripreman)
5%-tna otopina BSA u puferu TBS/T	1xTBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6, 0,1% Tween 20) 5% BSA (svježe pripreman, čuvan na 4°C)
Otopina Ponceau S	0,1% w/v Ponceau S, 5% acetic acid (čuvana na sobnoj temperaturi)
Razvijač	25% otopine A, 2,5% otopina B, 2,5% otopina C u reH ₂ O
Fiksir	20% otopine A (G338), 5% otopine B (G338) u reH ₂ O
Pufer za izolaciju kromatina (Chromatin Isolation Buffer, CIB)	15 mM Tris HCl, pH 7,5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,34 M saharoza, 0,15 mM spermin, 0,5 mM spermidin (sterilno filtriran kroz pore veličina 0,2 μm, skladištenje na 4°C)
Pufer ChIP	0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris-HCl pH 8,1, 167mM NaCl (sterilno filtriran kroz pore 0,2 μm, čuvan na 4°C)
Pufer High RIPA	0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH 8,1), 500mM NaCl (steriliziran kroz filter 0,2 μm, čuvan na 4°C)
Pufer Low RIPA	0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH 8,1), 150mM NaCl (sterilno filtriran kroz pore 0,2 μm, čuvan na 4°C)
Pufer LiCl	0,25M LiCl, 1% IGEPAL-CA630 (ili Triton-X-100), 1% natrij deoksikolat, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8,1) (sterilno filtriran kroz pore 0,2 μm, čuvan na 4°C)
Pufer TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0
Elucijski pufer	1% SDS, 0,1M NaHCO ₃ (uvijek svježe pripremljen)
Pufer RIPA (eng. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)	150 mM NaCl, 1,0% Triton X-100, 0,5% natrij deoksikolat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
PMSF	100 mM otopina inhibitora PMSF u izopropanolu; skladištena u alikvotima na -20°C, Prije korištenja kristali koji se precipitiraju tijekom čuvanja na -20°C, su otopljeni vorteksiranjem
Tableta „Roche cOmplete Mini protease inhibitor cocktail“ bez	1 tableta u 10 ml ekstrakcijskog pufera ili ishodišna otopina (koncentrirana 7x - 10x) u reH ₂ O ili u 100

odatka EDTA	mM fosfatnog pufera, pH 7,0
Bradfordov reagens	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) etanol, 8,5% (w/v) H ₃ PO ₄ (filtriran koristeći papir Whatman #1 kako bi se uklonili precipitati netom prije upotrebe, čuvan na 4°C)
Smjesa 10x biotin-dNTP	0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,32 mM dTTP i 0,18 mM biotin-16-dUTP

3.1.4. Protutijela

U istraživanju su korištena komercijalno dostupna protutijela (Tablica 4) te protutijela izrađena prema narudžbi (eng. *custom-made antibodies*).

Tablica 4. Komercijalna protutijela korištena u istraživanju.

Naziv protutijela	Proizvođač (kataloški br.)
Poliklonalno protutijelo „Normal Rabbit IgG“	Cell Signaling Technology (2729)
Biotinilirano protu-avidin protutijelo	Vector Laboratories (BA-0300)
Fluorescein avidin D (FITC)	Vector Laboratories (A-2001)
Poliklonalno protutijelo „anti rabbit“ konjugirano fluorokromom Alexa Fluor 594	Abcam (ab150080)
Protutijelo „anti rabbit“ konjugirano s horseradish peroksidazom	Cell Signaling Technology (7074S)

S obzirom da protein CenH3 vrste *T. castaneum* (cCenH3) i protein CenH3 vrste *T. freemani* (fCenH3) dosad nisu bili istraživani te za njih nisu postojala komercijalno dostupna protutijela, bilo ih je potrebno izraditi prema narudžbi. Za spomenute proteine napravljena je analiza proteinskih sekvenci te su u vrsno specifičnim N-terminalnim domenama definirani potencijalni epitopi za uspješan razvoj protutijela (Slika 8). Sinteza peptida i produkcija poliklonalnih protutijela na spomenute peptide napravljene su u servisu Pineda (Berlin, Njemačka).



Slika 8. Proteinska sekvenca histona CenH3 vrsta *T. castaneum* (protein cCenH3) i *T. freemani* (protein fCenH3) s crveno označenim epitopima odabranim za sintezu peptida na koja su producirana protutijela protu-cCenH3 i protu-fCenH3.

3.1.5. Enzimi

Enzimi upotrebljavani u ovom istraživanju navedeni su u tablici 5.

Tablica 5. Enzimi korišteni u istraživanju.

Naziv enzima	Proizvođač (kataloški br.)
Mikrokokalna nukleaza	Termo Scientific (88216)
RNaza A	Roche (10109169001)
DNaza RQ1	Promega (M6101)
Proteinaza K (20 mg/ml) iz kompleta „Pierce Magnetic ChIP Kit“	Termo Scientific (26157)
Klenow fragment i pridruženi pufer 10x NEBuffer 2	NEB (M0212S)
Pepsin	Sigma Aldrich (P7000)

3.1.6. PCR početnice

PCR početnice korištene za umnažanja specifičnih gena i ponavljajućih sekvenci opisane su u tablici 6.

Tablica 6. PCR početnice korištene u istraživanju.

Naziv umnažanih gena/satelitnih DNA	Naziv početnica (orijentacija)	Optimalna temperatura sparivanja parova početnica	Nukleotidni sljedovi početnica
Satelitna DNA TCAST	TCastan1 (F)	57°C	TGTAGGACTAACCATAAGCG
	TCastan2 (R)		CAATGTTTGAGACGAAGACG
Satelitna DNA TFREE	TFREEsatpr3 (F)	60°C	CAAGGGTTCGAAACAGTTCCA
	TFREEsatpr4 (R)		CAGGCAATCGATTGAAGTTCAAAA
Gen <i>fCenH3</i> s okolnom regijom	fcH3flank1 (F)	60°C	TAAGGTAGGATAATGCCAATAG
	fcH3flank2 (R)	57°C	TAAATACAAAGACAACGACTCAACA
	fcH3flank3(F)		GTTTTACGTGGTTAGTTAGT
	fcH3flank4(R)	AAAAATCATGCCTTGTC	
Gen <i>fCenH3</i>	fcH3pr1 (F)	60°C	ATGGCTCGACTAAGAAAACC
	fcH3pr2 (R)		TTAACCCCTTCTTTTCCCTCC
	fcH3pr3 (R)		AAGCTTCTGCAATGCTTGT

3.1.7. Elektroforetski biljezi

U tablici 7. navedeni su korišteni elektroforetski biljezi.

Tablica 7. Elektroforetski biljezi korišteni u istraživanju.

Naziv elektroforetskih biljega	Proizvođač (kataloški broj)
Elektroforetski DNA biljeg „2-Log DNA Ladder“	NEB (N3200S)
Elektroforetski DNA biljeg „O’GeneRuler™ DNA Ladder Mix“	Thermo Scientific (SM1173)
Elektroforetski proteinski biljeg „PageRuler Prestained Protein Ladder“	Thermo Scientific (26616)

3.1.8. Kompleti reagensa

U istraživanju su korišteni kompleti reagensa navedeni u tablici 8.

Tablica 8. Kompleti reagensa korišteni u istraživanju.

Naziv kompleta reagensa	Proizvođač (kataloški broj)
Komplet „GoTaq Flexi DNA Polymerase“ za lančanu reakciju polimerazom, koji sadrži: DNA polimerazu GoTaq (5U/μl), 5x koncentrirani pufer GoTaq Flexi i 25mM MgCl ₂	Promega (M8291)
Komplet „Qubit DSDNA BR Assay“ za određivanje koncentracija dvolančanih DNA	Invitrogen (Q32853)
Komplet „QIAquick PCR Purification Kit“ za pročišćavanje produkata reakcije PCR	Qiagen (28106)
Komplet „One Step RT-PCR Kit“ za reakciju reverzne transkripcije koju prati reakcija PCR	Qiagen (210210)
Komplet „DNeasy Blood and Tissue Kit“ za izolaciju genomske DNA	Qiagen (69506)
Komplet „RNeasy Mini Kit“ za izolaciju ukupne stanične RNA	Qiagen (74104)
Komplet „Dynabead Protein A Immunoprecipitation kit“ za kromatinsku imunoprecipitaciju	Invitrogen (10006D)
Komplet „RQ1 RNase-Free DNase“ za uklanjanje DNA iz izolata RNA koji sadrži: enzim RQ1 RNase-Free DNase, 10X reakcijski pufer (400mM Tris-HCl [pH 8,0 at 25°C], 100mM MgSO ₄ , 10mM CaCl ₂) i pufer Stop (20mM EGTA [pH 8,0 at 25°C])	Promega (M6101)

3.1.9. Laboratorijski pribor

Korišten laboratorijski pribor naveden je u tablici 9.

Tablica 9. Laboratorijski pribor korišten u istraživanju.

Naziv laboratorijskih pribora	Proizvođač (kataloški broj)
Tubice Protein LoBind	Eppendorf (030108116)
Tubice DNA LoBind	Eppendorf (030108051)
Pokrovna stakalca (18 mm x 18 mm, 24 mm x 40/60 mm)	Menzel (BB018018A1, BB024040A1, BB024060A1)
Pokrovna stakalca (24 mm x 40 mm)	Marienfeld (000101192)
Predmetna stakalca	Menzel (AB00008032E)
Stakalca Cytospin	Termofisher Scientific (5991056)
Filter kartice za stakalca Cytospin	Termo Scientific (5991022)
Filter jedinice Amicon	Milipore (UFC503096)
Magnetski stalak	Invitrogen (CS15000)
Gelovi Mini-PROTEAN TGX (4-20%)	Bio-rad (4561095)
Tubice Qubit assay	Invitrogen (Q32856)
Stanična mrežica (veličina pora 40 μM i 100 μM)	LLG Labware (6268093, 6268091)
Homogenizator SAFE-SEAL	GPE Scientific Limited (20601)
Nitrocelulozne membrane (0,2 μm)	Amersham (10600054)
Röntgenski filmovi CL-XPOSURE	Termo Scientific (34093)
Filter jedinice za sterilizaciju (veličina pora 0,22 μm)	Jet Bio-Filtration (FPE204250)
Tubice Safe Lock (1,5 ml)	Eppendorf (0030 120.086)
Filteri za špricu veličine pora 0,20 μm	Sartorius (16534K)
Pastile i tubice za tkivni mikser	Fisher Scientific (F650009006)
Ljepilo Fixogum	Marabu

3.1.10. Uređaji

Uređaji korišteni u istraživanju navedeni su u tablici 10.

Tablica 10. Uređaji korišteni u istraživanju.

Naziv uređaja	Proizvođač (kataloški broj)
Spektrofotometar BioSpec-nano	Shimadzu Biotech (2062630042)
Fluorometar Qubit	Invitrogen (Q32857)
Citocentrifuga Cytospin 4	Termo Scientific (A78300004)
Centrifuga s hlađenjem 5424R	Eppendorf (5404000413)
Rotator	Biosan (BS-010117)
Konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X	Leica Microsystems
Uređaj PCR T100 Thermo Cycler	Bio-rad (1861096)
Tkivni mikser (homogenizator)	Fisher Scientific (F650000000)
Uređaj za brzo sušenje uzoraka Speed vac DNA120	Thermo (13094)

Aparatura za Western blot	Bio-rad (1660828EDU)
Spektrofotometar Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences (80-2112-21)
Stolna mikrocentrifuga Minispin	Eppendorf (5452000010)
Aparatura za horizontalnu elektroforezu u agaroznom gelu	Bio-Rad
Stolna tresilica Vibramax	Heidolph
Termoblok	Bioblock Scientific
Uređaj za sušenje uzoraka Speed vac Savant DNA 120	Thermo Scientific (20-548-130)
Inkubator	Sutjeska
Vodena kupelj	Inkolab
Crvena lampa	Kaiser
Uređaj za zataljivanje najlonskih vrećica	Gorenje
UV transiluminator sa sustavom za snimanje GBox - Chemi 16 Bio	Syngene
Magnetska mješalica MSH-300	Biosan (BS-010302-OAA)

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA iz 12 odraslih jedinki vrste *T. castaneum* ukupne mase 25 mg i iz 5 odraslih jedinki vrste *T. freemani* ukupne mase 22 mg izvedena je prema uputama kompleta „DNeasy Blood and Tissue Kit“. Jedinke su smrznute u tekućem dušiku i potom usitnjene do praha tučkom u ohlađenom tarioniku. Tkivni prah je prebačen u 180 μ l pufera ATL s dodatkom 20 μ l enzima proteinaze K iz navedenog kompleta. Nakon pulsirajućeg vorteksiranja u trajanju od 10 sekundi, tkivne suspenzije su inkubirane 3h na 56°C. Uzorci su tijekom inkubacije višekratno vorteksirani. Daljnji postupak je proveden prema uputama s iznimkom upotrebe 10 μ l enzima RNase A (10 mg/ml), 15 minuta na 37°C. Genomska DNA je finalno eluirana u 200 μ l pufera EB (iz kompleta „Qiaquick PCR Purification Kit“). Elucijski pufer AE iz kompleta „DNeasy Blood and Tissue Kit“ sadrži 0,5 mM EDTA, koja može ometati reakciju pripreme biblioteke za sekvenciranje nove generacije pa je stoga korišten pufer EB bez dodatka EDTA. Odvojeni alikvot (7 μ l) je upotrebljen za određivanje koncentracije na uređaju Qubit i za vizualizaciju kvalitete izolata genomske DNA elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Eluati genomske DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* pohranjeni su na -20°C.

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

3.2.2.1. Dizajn i sinteza početnica

Početnice navedene u tablici 6. dizajnirane su u programu Primer3web ili u programu Geneious R9.1. Sintaza dizajniranih početnica napravljena je u servisu Macrogen (Amsterdam, Nizozemska) s odabranim parametrima: skala sinteze od 0,02 μ mol i uz odstranjenje soli prilikom purifikacije (eng. *desalted*). Početnice su zaprimljene u liofiliziranom obliku te je pripremljena matična otopina početnica koncentracija 100 pmol/ μ l otapanjem u vodi MQ (eng. *Milli-Q water*). Koncentracije radnih otopina početnica iznosile su 10 pmol/ μ l. Otopine početnica su pohranjene na -20°C.

3.2.2.2. Reakcija PCR

Početnice su inicijalno testirane metodom gradijenti PCR, u cilju određivanja optimalne temperature sparivanja početnica (eng. *annealing temperature*). U slučaju postojanja dva para početnica za jednu sekvencu DNA, odabran je par koji je učinkovitije umnažao ciljnu sekvencu. Reakcijska smjesa sastojala se od finalnih koncentracija sljedećih komponenti: pufer 1x Green Taq, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP smjese (svakog nukleotida), 0,4 μM svake početnice, Taq polimeraze (2,5U/50 μl), genomske DNA *T. castaneum* odnosno *T. freemani* (50 ng genomske DNA/50 μl PCR reakcije) i vode MQ do konačnog volumena. Program reakcija PCR naveden je u tablici 11. Korišteni su parovi početnica TFREEpr1 i TFREEpr2, fch3flank1 i fch3flank2, fch3flank3 i fchflank4, fch3pr1 i fch3pr2 te fch3pr1 i fch3pr3. Za potrebe RT-PCR eksperimenta izabrana je temperatura od 60°C za sparivanje parova početnica fch3flank1 i fch3flank2 te fch3pr1 i fch3pr2 .

Tablica 11. Program reakcije PCR

Korak reakcije PCR	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95°C	5 minuta	1
Amplifikacijska denaturacija	95°C	20 sekundi	30
Sparivanje početnica	48°C-64°C ¹ 48°C-56°C ²	20 sekundi	30
Elongacija	72°C	40 sekundi	30
Završna elongacija	72°C	7 minuta	1

¹ Temperaturni raspon za parove početnica fch3flank1 i fch3flank2, fch3flank3 i fchflank4, fch3pr1 i fch3pr2 te fch3pr1 i fch3pr3

² Temperaturni raspon za par početnica TFREEpr1 i TFREEpr2

3.2.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Provjera obrasca, kvalitete i kvantitete dobivenih produkata reakcije PCR provedena je elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen otapanjem agaroze u puferu 1xTAE s dodatkom etidij bromida (0,2 μg/ml) u mikrovalnoj pećnici. Elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNA provedeno je u puferu 1xTAE s dodatkom EtBr (0,2 μg/ml) pri naponu od 75 V. Gel je snimljen dokumentacijskim sustavom za snimanje GBox-Chemi 16 Bio. Približna veličina odsječaka DNA određena je usporedbom s odsječcima biljega DNA poznate duljine.

3.2.3. Izolacija ukupne RNA

U svrhu provjere transkripcije gena *fCenH3*, iz ličinaka vrste *T. freemani* izolirana je ukupna RNA prema uputama iz kompleta „RNeasy Mini Kit“. Ulazni materijal ličinaka bio je 47 mg. Ličinke su raspodijeljene u dvije tubice s približno jednakim masama koje su potom tretirane kao dva uzorka kroz eksperiment. Najprije su ličinke usitnjene tkivnim mikserom 20 sekundi u 100 μ l RLT pufera s dodatkom β -merkaptetanola (12 μ l β -merkaptetanola/1200 μ l pufera RTL). Nakon usitnjavanja, u tkivne suspenzije je dodano po 500 μ l RLT pufera s β -merkaptetanolom te je nastavljena izolacija RNA prema uputama proizvođača. Finalno su dva eluata ukupne RNA po 50 μ l spojena u jedinstveni eluat od 100 μ l, nakon čega je uzorak od 7 μ l izdvojen u svrhu određivanja koncentracija na uređaju Nanodrop i vizualizaciju obrasca RNA molekula ukupnog izolata pri elektroforetskom razdvajanju u agaroznom gelu. Eluati RNA su raspodijeljeni u alikvote po 8 μ l i potom čuvani do upotrebe na -80°C .

3.2.4. Reverzna transkripcija praćena reakcijom PCR (RT-PCR)

Radi uklanjanja potencijalno zaostalih molekula DNA prilikom izolacije RNA, koje bi mogle dati lažno pozitivne rezultate, izolat RNA vrste *T. freemani* je tretiran enzimom DNaza RQ1 koji razgrađuje DNA. U 7 μ l odmrznutog izolata RNA dodano je 2 μ l enzima DNase RQ1 i 1 μ l pratećeg reakcijskog pufera, nakon čega je smjesa inkubirana 30 minuta na 37°C . Reakcija je zaustavljena dodatkom 1 μ l otopine Stop RQ1 te inkubacijom smjese 10 minuta na 65°C .

Smjese za reakciju RT-PCR pripremljene su u konačnom volumenu od 25 μ l po reakciji prema uputama kompleta „One Step RT PCR Kit“. Korišteni su parovi početnica fch3flank1 i fch3flank2 te fch3pr1 i fch3pr2, a kao kalup je upotrebljen 1 μ l izolata RNA vrste *T. freemani* tretiranog enzimom DNase RQ1. Dvije negativne kontrole predstavljale su uzorak bez dodatka kalupa i uzorak s dodanim kalupom, koji nije prošao reakciju reverzne transkripcije, no naknadno je dodan u reakciju PCR. Reakcija reverzne transkripcije (RT) provedena je 30 minuta na 50°C u uređaju PCR T100 Termo Cycler. Odmah potom nastavljena je reakcija PCR u sljedećim uvjetima: 15 minuta inicijalne denaturacije na 95°C , praćena s 35 ciklusa: 30 sekundi denaturacije na 95°C , 30 sekundi sparivanja početnica na 60°C i 1 minutu ekstenzije na 72°C . Finalna ekstenzija je provedena na 72°C tijekom 7 minuta. Uzorci su pročišćeni kompletom „QIAquick PCR Purification Kit“ prema uputama proizvođača i eluirani u 30 μ l pufera EB. Uspješnost eksperimenta je provjerena pomoću elektroforetske reakcije u 1%-tnom agaroznom gelu. Svi uzorci osim negativnih kontrola poslani su na sekvenciranje u servis MacroGen (Amsterdam, Nizozemska), gdje su sekvencirani korištenjem početnica fch3pr1 i fch3pr2

te fCenH3flank1 i fCenH3flank2. Dobivene sekvence su analizirane programima Geneious R9.1 i BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999) u cilju usporedbe *fCenH3* s detektiranom genomskom sekvencom.

3.2.5. Produkcija protutijela

Produkcija specifičnih protutijela na protein fCenH3 vrste *T. freemani* napravljena je prema protokolu koji je prethodno razradila dr.sc. B. Mravinac za produkciju protutijela na protein cCenH3 vrste *T. castaneum*. Specifično protutijelo na protein fCenH3 vrste *T. freemani* dobiveno je produkcijom protutijela na peptid aminokiselinskog slijeda NH₂-ARTKKTPTKERPTSTCYFIGN-COOH, karakterističan za N-terminalni dio proteina fCenH3 (Slika 8). Usluga sinteze peptida i produkcije poliklonalnog protutijela na spomenuti peptid naručena je u servisu Pineda (Berlin, Njemačka). Sintetizirani peptid konjugiran je s proteinom tiroglobulinom kao proteinskim nosačem. Spomenutim konjugatom imunizirana su tri kunića kroz četiri mjeseca. Metodom Western blot, uz preimunizacijske serume, testirani su uzorci dobivenih seruma 60, 90 i 120 dana od imunizacije. Po obustavi imunizacije, serumi su afinitetno pročišćeni na sefarnim kolonama, koje su u matriksu sadržavale vezan specifični peptid, te su tako dobivene pročišćene monospecifične frakcije IgG seruma fCenH3, koje su također testirane metodom Western blot. Dobivene monospecifične frakcije IgG uskladištene su na tri različita načina: jedna trećina volumena protutijela pospremljena je u alikvotima od po 500 µl na -80°C, druga trećina volumena je sterilno filtrirana i pohranjena u alikvotima po 500 µl na 4°C, dok je preostala trećina volumena ugušćena 25x na kolonama Amicon, potom pomiješana s jednakim volumenom glicerola i zatim pohranjena u alikvotima od 40 µl na -20°C.

3.2.6. Izolacija ukupnog sadržaja proteina

U cilju izolacije proteina korištene su odrasle jedinke vrste *T. freemani*. Životinjski materijal je smrznut u tekućem dušiku i usitnjen u prah u ohlađenom tarioniku s tučkom. Odmah nakon usitnjavanja, tkivni prah je prebačen u ledeno hladni pufer RIPA u omjeru 20 mg tkiva na 1 ml pufera RIPA s dodanim proteinaznim inhibitorima (1x cOmplete Mini protease inhibitor cocktail tablete, 2 mM PMSF). Tkivna suspenzija je potom promiješana magnetičem na magnetskoj miješalici. U ohlađenom homogenizatoru smještenom na ledu, oslobođene su jezgre s ukupno 15 do 20 udaraca pastilom, a suspenzija je potom prebačena u hladnu tubicu Falcon zapremine 50 ml. Nadalje, suspenzija je ostavljena na orbitalnoj rotaciji pri 7 rpm, 2 sata na temperaturi 4°C. Nakon dvosatne

rotacije, suspenzija je podijeljena u alikvote i centrifugirana u mikrocentrifugi pri brzini 12 000 rpm, 20 minuta na 4°C. Supernatanti koji sadrže proteinski ekstrakt sakupljeni su u jednu tubicu Falcon držanu u ledu, raspodijeljeni u alikvote (od 20-400 µl) i pohranjeni na -80°C sve do upotrebe za Western blot. Dio proteinskog ekstrakta odvojen je za spektrofotometrijsku provjeru koncentracije ukupnog proteinskog sadržaja.

U svrhu određivanja koncentracije ukupnog proteinskog izolata vrste *T. freemani* te koncentracija monospecifičnih IgG pročišćenih frakcija protutijela protu-cCenH3 i protu-fCenH3 ugušćenih na koloni Amicon, napravljen je proteinski test prema Bradfordu. Za potrebu određivanja standardne krivulje proteina, pripremljena je koncentracija proteina BSA od 1 µg/µl. Potom je napravljena serija od 6 razrjeđenja s 1, 2, 4, 6, 8 i 10 µg BSA u konačnom volumenu BSA i vode MQ od 100 µl. Po istom principu je napravljeno nekoliko koncentracija uzorka ukupnog proteinskog sadržaja vrste *T. castaneum*, tako da su dodani volumeni proteina od 1 µl, 1,5 µl i 2 µl, koji su nadopunjeni vodom MQ do konačnog volumenu od 100 µl. Pripremljena su razrjeđenja uzoraka ugušćenih monospecifičnih IgG frakcija protutijela protu-cCenH3 i protu-fCenH3 razrijeđenih 2x, 4x i 8x te je potom 1 µl svakog razrjeđenja dodan u 99 µl vode MQ. Pripravljena su razrjeđenja uzoraka ugušćenih monospecifičnih IgG frakcija protutijela kako bi se osiguralo da njihova koncentracija ulazi u linearni raspon standardne krivulje BSA. Prethodno lagano promiješani Bradfordov reagens na sobnoj temperaturi dodan je u svaki pripremljeni uzorak u volumenu od 1 ml. Uzorci su potom dobro promiješani vorteksiranjem i ostavljeni na sobnoj temperaturi 5 do 10 minuta. Apsorbancije su izmjerene pri valnoj duljini 595 nm na spektrofotometru. Nepoznata koncentracija proteina od interesa je određena pomoću jednadžbe pravca dobivenog iz poznatih koncentracija BSA (x os) i njima pridruženih vrijednosti apsorbancija (y os), uvrštavanjem vrijednosti apsorbancija proteina nepoznate koncentracije u jednadžbu. Dobivene koncentracije protutijela su pomnožene s faktorom razrjeđenja i tako je određena inicijalna koncentracija protutijela.

3.2.7. Western blot

Za metodu Western blot korišten je ukupni proteinski izolat vrste *T. freemani* koji odgovara masi od približno 30 µg proteina po uzorku. Dodan je odgovarajući volumen pufera Laemmli u finalnoj koncentraciji 1x i 100 mM DTT. Smjesa je denaturirana 10 minuta na 65°C (ili alternativno 30 minuta na 37°C) te je potom ohlađena na sobnoj temperaturi i centrifugirana 1 minutu pri brzini 10 000 rpm. Na 4-20%-tni gradijenti poliakrilamidni gel SDS PAGE nanoseno je po 12 µl denaturiranih

proteinskih uzoraka i po 5 μ l proteinskog biljega, a elektroforetska reakcija je provedena u puferu 1xSDS PAGE pri konstantnoj vrijednosti električnog napona od 200 V u vremenskom rasponu od 30 do 35 minuta. Prije transfera proteina s gela na membranu, gel je ekvilibriran u ledeno hladnom puferu 1xTransfer 15 minuta. Nitrocelulozna membrana s porama veličine 0,2 μ m namočena je 20 sekundi u reH₂O i potom prebačena u hladni pufer 1xTransfer na 5 minuta. U kazeti za transfer posloženi su sljedeći slojevi: spužva, dva filter papira (dimenzija malo većih od membrane), potom gel, pa membrana i na kraju ponovo dva filter papira i spužva. Nakon dodatka filter papira i membrane, valjkom su istisnuti zaostali mjehurići. Kazeta je potom zatvorena i smještena u pravilnoj orijentaciji u centralnu jedinicu posude za transfer. U posudu su dodani magneti i hladna jedinica ohlađena na -20°C, nakon čega je posuda napunjena hladnim puferom 1xTransfer do odgovarajuće oznake na posudi. Prijenos proteina proveden je pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA, 40 minuta pri hladnim uvjetima na magnetskoj mješalici. Odmah nakon završetka prijenosa, membrana je inkubirana 5 minuta u otopini za detekciju proteina Ponceau S i potom ispirana nekoliko puta u destiliranoj vodi u trajanju od po 1 minutu. Nakon što su preneseni proteini vizualizirani na membrani, membrana je isprana puferom TBS/T 3 puta po 5 minuta na sobnoj temperaturi te je potom inkubirana u blokirajućem agensu, koji čini 5%-tna otopina BSA u puferu TBS/T, 1 sat na sobnoj temperaturi. Dijelovi membrane inkubirani su zasebno s preimunoserumima fCenH3 sva tri kunića i ugušćenim monospecifičnim IgG pročišćenim serumima fCenH3 sva tri kunića, razrijeđenim u 5%-tnoj blokirajućoj otopini BSA u puferu TBS/T u omjeru 1:500. Inkubacija je provedena preko noći pri temperaturi od 4°C uz lagano ljuljanje membrana. Sljedeći dan, višak protutijela ispran je puferom TBS/T, 5 puta po 5 minuta na sobnoj temperaturi pri laganom tresenju, a zatim je membrana inkubirana sa sekundarnim protutijelom „anti-rabbit“ konjugiranim s enzimom HRP (eng. *horseradish peroxidase*), koji je razrijeđen 1:2000 u 5%-tnoj BSA/TBS/T, 1 sat pri sobnoj temperaturi na laganom tresenju. Nakon što su membrane isprane od suviška sekundarnog protutijela 5 puta po 5 minuta u puferu TBS/T pri sobnoj temperaturi na laganom tresenju, membrane su inkubirane 1 minutu u smjesi reagensa za detekciju. Poslije uklanjanja suviška otopine reagensa za detekciju, membrana je stavljena u prozirni najlonski omot te položena u ekspozicijsku kazetu. U mraku je iznad membrane položen Röntgen film koji je eksponiran u različitim vremenskim intervalima, najčešće 1, 5 i 10 minuta. Nakon predviđenog izlaganja, signali na filmu su vizualizirani razvijanjem Röntgen filmova u razvijачu i fiksiru za ručnu obradu filmova.

3.2.8. Izolacija nativnog kromatina

Nativni kromatin vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* izoliran je za potrebe eksperimenata kromatinske imunoprecipitacije. Ulazna količina materijala u metodi izolacije nativnog kromatina bila je 750 mg odraslih jedinki *T. castaneum* i 250 mg odraslih jedinki *T. freemani*, koja je smrznuta u tekućem dušiku i usitnjena do praha u ohlađenom tarioniku. Tkivni prah vrste *T. castaneum* prebačen je u 10 ml ekstrakcijskog pufera CIB s proteinaznim inhibitorima (1/2 cOmplete Mini protease inhibitor cocktail tablete, 2 mM PMSF) i 0,5% tritonX-100, dok je tkivni prah *T. freemani* prebačen u 5 ml istog pufera, nakon čega je dobro promiješan magnetičem na magnetskoj miješalici. Alikvoti dobivene tkivne suspenzije od 2,5-3 ml su dodavani u hladni homogenizator u ledu, u kojem su jezgre izolirane udarcima pastile u trajanju od 3-4 minute za *T. castaneum* (otprilike 50 udaraca), te 0,5-1 minute za *T. freemani* (otprilike 15 udaraca) za svaki alikvot. Nakon homogeniziranja, uveden je dodatni korak u protokolu vrste *T. castaneum* u kojem je suspenzija jezgara vrste *T. castaneum* propuštena kroz staničnu mrežicu s porama veličine 40 µm i sakupljena u tubicu Falcon volumena 50 ml. Poslije centrifugiranja na brzini 2500x g, 5 minuta pri 4°C, uklonjen je supernatant te je dodano ukupno 8 ml, u protokolu za vrstu *T. castaneum*, odnosno 4,1 ml, u protokolu za vrstu *T. freemani*, pufera CIB bez proteinaznih inhibitora u kojem su talozi resuspendirani te je potom ponovljeno centrifugiranje pri istim uvjetima. Ponovljeni su koraci uklanjanja supernatanta, dodavanja jednakog volumena pufera CIB bez inhibitora i centrifugiranja pri istim parametrima. Poslije uklanjanja supernatanta, na taloge vrste *T. castaneum* dodano je ukupno 1,5 ml pufera CIB s dodatkom 1 mM CaCl₂ i 4 mM MgCl₂, dok je 3 ml istog pufera dodano na taloge vrste *T. freemani*. Nakon resuspendiranja taloga, stanična suspenzija je spojena i promiješana te ponovo raspodijeljena u 5 tubica Eppendorf u protokolu optimiziranom za vrstu *T. castaneum*, odnosno 6 tubica u protokolu optimiziranom za vrstu *T. freemani* u jednakim volumenima. Za vrstu *T. castaneum*, na svaki alikvot suspenzije jezgara dodano je 42 U enzima mikrokokalne nukleaze (aktivnost enzima 212 U/µl) s duljinom inkubacije od 30 minuta na 37°C uz povremeno lagano miješanje. S druge strane, u protokolu optimiziranom za vrstu *T. freemani*, suspenzije jezgara su spojene te im je dodano 720 U mikrokokalne nukleaze, nakon čega je suspenzija inkubirana 20 minuta na 37°C uz povremeno lagano miješanje. Dodatkom EDTA finalne koncentracije 10 mM zaustavljena je enzimatska aktivnost enzima mikrokokalne nukleaze, što je praćeno centrifugiranjem na brzini 8000x g, 5 minuta pri 4°C. Poslije dodavanja pufera 1xPBS s otopljenim 0,5 M NaCl (1200 µl za vrstu *T. castaneum*, odnosno 600 µl za vrstu *T. freemani*), talozi su pipetom resuspendirani i inkubirani 2 h na orbitalnom rotatoru pri brzini rotacije od 7 rpm na 4°C. Nakon centrifugiranja 15 minuta brzinom 15 000x g tijekom 15 minuta na temperaturi od 4°C, supernatanti su sakupljeni u jednu tubicu, od čega je ~5% volumena odvojeno za

provjeru razgrađenog kromatina, dok je preostali volumen u alikvotima po 100 µl spremljen na -80°C do upotrebe u metodi kromatinske imunoprecipitacije. Alikvot odvojen za provjeru digeriranog kromatina je tretiran 30 minuta s 1 µl enzima RNaza A (10 mg/ml, 37°C) pa potom s 0,5 µl enzima proteinaze K (20 mg/ml, 55°C). Reakcija je finalno pročišćena kompletom „QIAquick PCR Purification Kit“ prema uputama proizvođača i eluirana u 50 µl pufera EB. Profil DNA provjeren je elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu, a koncentracija je određena pomoću kompleta „Qubit dsDNA BR assay“ na uređaju Qubit prateći upute proizvođača.

3.2.9. Kromatinska imunoprecipitacija (ChIP)

U cilju izdvajanja centromerne frakcije iz ukupnog kromatina, provedena je kromatinska imunoprecipitacija. U spomenutoj metodi korišteni su nativni kromatini vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, magnetske kuglice Dynabeads obložene proteinom A, po narudžbi dobivena protutijela protu-cCenH3 (kunić 2) i protu-fCenH3 (kunić 1) te komercijalno protutijelo „normal rabbit IgG“, upotrebljeno kao negativna kontrola. Količina nativnog kromatina po reakciji ChIP bila je 3000 ng u protokolu optimiziranom za vrstu *T. castaneum* i 2600 ng u protokolu modificiranom za vrstu *T. freemani*. Kuglice Dynabeads vorteksirane su oko 60 sekundi te je odvojeno 45 µl Dynabeads kuglica po uzorku ne brojeći ulazni materijal, što uključuje 15 µl za čišćenja kromatina i 30 µl za reakciju ChIP, u tubice Protein LoBind. U protokolu proizvođača predviđeno je 50 µl kuglica Dynabeads po reakciji ChIP, međutim, radi ekonomičnosti taj volumen je smanjen na 30 µl po reakciji ChIP. Odmjerenom količini kuglica Dynabeads dodano je oko 4,5-6 volumena sterilnog pufera 1xPBS u kojem su kuglice blago promiješane te je potom dodani pufer uklonjen pomoću magnetskog stalka koji omogućuje razdvajanje magnetskih kuglica i pufera. Nakon što je magnetskim kuglicama dodano 4,5-6 volumena hladnog blokirajućeg pufera 1%-tnog BSA otopljenog u 1xPBS, otopina je blago promiješana i inkubirana na orbitalnoj rotaciji na brzini od 7 rpm, na 4°C. Nakon uklanjanja blokirajućeg pufera, ponovljen je korak inkubacije s blokirajućim puferom i njegovo prateće uklanjanje. Ispranim i blokiranim Dynabeads kuglicama dodan je inicijalni volumen hladnog pufera ChIP s dodanim proteinaznim inhibitorima (1 mM PMSF, 1x cOMplete Mini protease inhibitor cocktail tablete), kuglice su potom promiješane i ostavljene na 4°C do upotrebe. Nativnom kromatinu je dodano 4-5 volumena pufera ChIP s proteinaznim inhibitorima te odgovarajući volumen ispranih i blokiranih kuglica Dynabeads namijenjenih za pročišćavanje kromatina. Pročišćavanje kromatina kuglicama Dynabeads provedeno je na orbitalnoj rotaciji (7 rpm), 1 sat pri 4°C. Pročišćeni kromatin je odvojen na magnetskom staklu i sačuvan. 5-7% pročišćenog kromatin izdvojeno je za reakciju ulaznog materijala koji predstavlja sadržaj prije ChIP reakcije, dok je ostatak pročišćenog kromatina

raspodijeljen na predviđeni broj reakcija ChIP. Protokol ChIP prilagođen za vrstu *T. freemani* djelomično se razlikuje od protokola provođenog za vrstu *T. castaneum*, a radi lakšeg praćenja, razlike redoslijeda i trajanja inkubacija kromatina s protutijelima i magnetskim kuglicama Dynabeads prikazane su u tablici 12.

Tablica 12. Redoslijed i uvjeti inkubacija kromatina, protutijela protu-CenH3 i Dynabeads kuglica u protokolima za vrste *T. castaneum* i *T. freemani*.

<i>T. castaneum</i>		<i>T. freemani</i>	
Koraci	Trajanje/ Temperatura	Koraci	Trajanje/ Temperatura
1) Inkubacija protutijela protu-cCenH3 s Dynabeads kuglicama	30 minuta/4°C	1) Inkubacija fragmentiranog kromatina s protutijelima protu-fCenH3	preko noći/ 4°C
2) Inkubacija kuglica s vezanim protutijelima protu-cCenH3 i fragmentiranog kromatina	1,30-2 sata/4°C	2) Inkubacija kromatina s vezanim protutijelima protu-fCenH3 i Dynabeads kuglica	1 sat/ 4°C

Sukladno tome, pročišćeni kromatin vrste *T. freemani* raspodijeljen je u podjednakim volumenima u 3 tubice, od kojih je u dva alikvota kromatina dodano po ~ 5 µg ugušćene monolIgG frakcije protutijela protu-fCenH3 (kunić 1), a u treći alikvot kromatina je dodano 5 µg protutijela „normal rabbit IgG“. Sljedeći dan dodano je po 30 µl pročišćenih i blokiranih kuglica Dynabeads u 3 alikvota kromatina s protutijelima.

S druge strane, u protokolu prilagođenom za kromatin vrste *T. castaneum*, u predviđeni broj tubica DNA LoBind koji odgovara broju uzoraka ChIP, dodano je po 30 µl pročišćenih i blokiranih kuglica Dynabeads kojima je uklonjen supernatant na magnetskom stalku i kojima je dodano po 120 µl pufera Binding and Washing iz kompleta Dynabeads. Odmah potom je u jedan uzorak dodano 5 µg, a u drugi uzorak 8 µg protutijela protu-cCenH3 dobivenog imunizacijom kunića 2, dok je u treći uzorak dodano, 5 µg „normal rabbit IgG“. Navedeni uzorci su inkubirani 1,30-2h na 4°C pri orbitalnoj rotaciji. Kompleks kuglica s vezanim protutijelima je odvojen na magnetskom staklu pri čemu je supernatant s viškom protutijela uklonjen, a zatim su otopinama koje sadrže komplekse kuglice-protutijelo dodani podjednaki volumeni pročišćenog kromatina.

Nakon uklanjanja supernatanta koji sadrži nevezani kromatin na magnetskom stalku, provedena je serija ispiranja u trajanju po 5 minuta svakog, na rotacijskoj brzini 7 rpm pri 4°C. U protokolu za vrstu *T. castaneum* ispitana su dva načina ispiranja, blago i pojačano, na sljedeće načine:

1) blago ispiranje: tri puta po 200 μ l pufera Binding and Washing iz kompleta „Dynabead Protein A Immunoprecipitation Kit“

2) pojačano ispiranje: tri ispiranja po 500 μ l pufera Low RIPA, tri ispiranja po 500 μ l pufera High RIPA, jedno ispiranje u 500 μ l pufera LiCl i dva ispiranja po 500 μ l puferom TE (pH 8).

Slijed različitih pufera za ispiranje u protokolu za vrstu *T. freemani* sastojao se od dva ispiranja puferom Low RIPA, dva ispiranja puferom High RIPA, jednog ispiranja puferom LiCl i dva ispiranja puferom TE (pH 8). Svako ispiranje provedeno je u volumenu po 200 μ l pufera.

Kompleksi protutijela i nukleosoma eluirani su s kuglica pomoću 100 μ l elucijskog pufera za svaku reakciju u 2 navrata. Obje inkubacije su trajale po 15 minuta pri 55°C. Nakon odvajanja magnetskih kuglica, sačuvani su i spojeni eluati svake reakcije zasebno. U reakciji ulaznog materijala je također dodano 200 μ l elucijskog pufera te je potom svim reakcijama dodano redom: 10 μ l NaCl (5M), 10 μ l Tris-HCl (1M, pH 6,5) i 5 μ l EDTA (0,5M, pH 8). Svaki uzorak je tretiran s 1 μ l 10 mg/ml RNaze A tijekom 30 minuta pri 37°C. Potom su uzorci tretirani s 0,5 μ l 20mg/ml Proteinaze K tijekom 30 minuta na 55°C. Pročišćavanje imunoprecipitirane DNA izvedeno je pomoću kompleta „QIAquick PCR Purification Kit“ sljedeći upute proizvođača. DNA je eluirana s kolona s 50 μ l pufera EB po reakciji. Identično provedene reakcije fCenH3-ChIP su spojene u jedan eluat. Prije pohranjivanja ChIP eluata na -20°C, izmjerena je njihova koncentracija na fluorometru Qubit.

3.2.10. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Uzorci cCenH3-imunoprecipitirane DNA, fCenH3-imunoprecipitirane DNA i njima pridruženi uzorci ulaznog materijala (eng. *input sample*) kao i uzorci genomskih DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* poslani su na sekvenciranje u servis Admera Health LCC (South Plainfield, New Jersey, SAD). U servisu su uzorci prošli inicijalnu provjeru kvalitete te su genomске DNA fragmentirane na odsječke duljine 500 pb. Biblioteke uzoraka za NGS sekvenciranje pripremljene su upotrebom kompleta „KAPA Hyper Prep“ ili „Kapa DNA Library“. Sekvenciranje NGS (eng. *Next-Generation Sequencing*) provedeno je na platformi Illumina HiSeq i NextSeq, pri čemu su fragmenti DNA očitani s oba kraja što je rezultiralo sparenim nukleotidnim sljedovima (eng. *paired end reads*). Dodatni podaci o NGS sekvenciranju su navedeni u tablici 13.

Tablica 13. Podaci o skupovima očitavanja CenH3-ChIP DNA, ulaznog materijala i genomske DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* dobivenim sekvenciranjem nove generacije

Uzorak sekvenciranja	Broj sparenih očitavanja	Vrsta korištene biblioteke	Illumina platforma	Duljina očitavanja (pb)
cCenH3-ChIP (5 µg protutijela protu-cCenH3, jako ispiranje)	2x 5 452 347	KAPA Hyper Prep	HiSeq	151
cCenH3-ChIP (8 µg protutijela cCenH3, jako ispiranje)	2x 5 770 626			
cCenH3-ChIP (5 µg protutijela cCenH3, blago ispiranje)	2x 4 980 069			
cCenH3-ChIP (8 µg protutijela cCenH3, blago ispiranje)	2x 4 417 439			
Ulazni material <i>T. castaneum</i>	2x 4 616 162			
Genomske DNA <i>T. castaneum</i>	2x 4 832 071	Kapa DNA Library	NextSeq/HiSeq	101/151
fCenH3-ChIP (5 µg protutijela protu-fCenH3)	2x 5 310 667			
Ulazni materijal <i>T. freemani</i>	2x 4 402 073			
genomska DNA <i>T. freemani</i>	2x 5629 632			

3.2.11. Citogenetičke metode

3.2.11.1. Priprema citogenetičkih preparata

3.2.11.1.1. Priprema citogenetičkih preparata s metafaznim kromosomima

Citogenetički preparati su pripremani iz testisa kukuljica vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*. Najprije su muške jedinke odvojene od ženskih prema morfološkim razlikama dvaju spolova. Testisi muških kukuljica izolirani su i inkubirani u citostatiku kolcemidu (10 µg/ml) sat vremena. Zatim su gonade premještene u hipotoničnu otopinu, a potom u fiksativ (Tablica 14). Koraci ispiranja viška fiksativa u pripremi preparata za metode imunofluorescencije (IF) i kombinirane metode imunofluorescencije i fluorescencijske hibridizacije *in situ* (IF-FISH) uključuju korištenje pufera 1xPBS, u dva-tri navrata s ukupnim trajanjem od 10 do 15 minuta, s napomenom da u pripremi preparata za metodu IF prvo ispiranje sadrži otopinu glicina (30 mM) u puferu 1x PBS. Nadalje, dvije do tri gonade su položene na sredinu predmetnog stakalca prethodno obloženog poli-D-lizinom prema uputama

proizvođača. U pripremi preparata za metodu FISH na gonade je dodano 50 µl 45%-tne otopine octene kiseline, dok je u pripremi preparata za metode IF i IF-FISH dodano 35 µl otopine 0,05 M NaOH. Preparati su uklopljeni tehnikom „squash“: pokrovno stakalce (24 x 40 mm) je lagano položeno na gonade uz pomoć iglice te je potom snažno pritisnuto dlanom u svrhu razbijanja tkiva. Stakalce je zatim uronjeno u tekući dušik 1 minutu, nakon čega je pokrovnica uklonjena nožićem. Stakalca s preparatima pripremljenim za metode IF i IF-FISH uskladištena su na temperaturi od -80°C, dok su stakalca za metodu FISH pospremljena na -20°C do upotrebe.

Tablica 14. Vrste hipotoničnog šoka i fiksacije tkiva korištene u pripremi citogenetičkih preparata za metode IF, FISH i IF-FISH.

Korak pripreme citogenetičkih preparata	Metoda	Korištena kemikalija	Vrijeme inkubacije
Hipotonični šok	IF	0,5% natrij citrat	5 minuta
	FISH	0,075M kalij klorid	15 minuta
	IF-FISH		
Fiksacija tkiva	IF	Predgrijani 2%-tni paraformaldehid na 37°C	10 minuta
	FISH	Smjesa octene kiseline i etanola u omjeru 1:3	30 minuta
	IF-FISH	Otopina 3,7%-tnog formaldehida i 5%-tne octene kiseline u 0,9%-tnoj otopini natrij klorida	18 minuta

3.2.11.1.2. Priprema citogenetičkih preparata s izduljenim kromatinskim nitima

Priprema preparata s izduljenim kromatinskim nitima započeta je izolacijom gonada (jajnika i testisa) te unutarnjih organa (osim probavila) kukuljica i odraslih jedinki vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* u sterilnom 1xPBS-u s dodatkom 1 mM PMSF. Navedeni pufer u kojem su se nalazila tkiva je promijenjen te je dodano 100 µl čistog pufera, nakon čega su tkiva usitnjena tkivnim mikserom sa sterilnim jednokratnim nastavkom u trajanju od točno 30 sekundi. Nakon dodatka odgovarajućeg volumena 1xPBS s 1 mM PMSF, računajući konačni volumen od 400 µl stanične suspenzije po citostakalcu, stanična suspenzija je propuštena kroz staničnu mrežicu s porama veličine 100 µm. Potom je po 400 µl stanične suspenzije raspodijeljeno u svaki cito-lijevak pričvršćen na predmetno

stakalce. Suspenzije su centrifugirane u citocentrifugi Cytospin 4 pri brzini od 1200 rpm u trajanju od 10 minuta. Nakon kratkog sušenja preparata, na svaki preparat je dodano 15 µl lizirajućeg pufera te je položeno pokrovno stakalce dimenzija 18 x 18mm s duljinom trajanja inkubacije od 4-10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka lizirajuće reakcije, pokrovnica je uklonjena nožićem te je uslijedila fiksacija sa svježe pripremljenim 2%-tnim formaldehidom otopljenim u puferu 1xPBS, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksativ je ispran 3 puta po 5 minuta u 1xPBS-u uz laganu trešnju, nakon čega je uslijedila metoda imunofluorescencije te prateća fluorescencijska hibridizacija *in situ*.

3.2.11.2. Imunofluorescencija (IF)

Imunofluorescencija je korištena u svrhu određivanja specifične lokalizacije protutijela protu-CenH3. Sva ispiranja u metodi IF provedena su pri sobnoj temperaturi u posudici Coplin na tresilici. Preparati tkiva vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, pripremljeni za metodu IF odmrznuti su na sobnoj temperaturi. Preparati su najprije ispirani 2 minute puferom 1xPBS, a potom su inkubirani u ohlađenom permeabilizacijskom puferu 1xPBS s dodatkom 1% tritonX-100 25 minuta na ledu. Permeabilizacijski pufer je ispiran 3 puta po 5 minuta puferom 1xPBS s otopljenim 0,2% Tween 20 (PBST). Blokirajući agens 2,5%-tni BSA s dodatkom 0,3 M glicina u puferu PBST u volumenu od 200 µl po preparatu je dodan na pokrovno stakalce (24 mm x 40 mm), nakon čega je na blokirajući reagens prislonjeno predmetno stakalce s preparatom, pri čemu se pokrovnica adherirala za predmetnicu. Stakalce je položeno u vlažnu komoricu u orijentaciji s pokrovnicom okrenutom prema dnu komorice te tako inkubirano 1 sat na 37°C. Sljedeći korak predstavljao je inkubaciju preparata *T. castaneum* i *T. freemani* s ugušćenim primarnim protutijelima protu-cCenH3, odnosno protu-fCenH3. Navedena primarna poliklonalna protutijela razrijeđena su, u omjeru 1:400 za preparate s metafaznim kromosomima i u omjeru 1:200 za preparate s izduljenim nitima, u blokirajućem puferu u volumenu od 200 µl (u slučaju kada je korištena pokrovnica dimenzija 24 x 40 mm) ili 300 µl (u slučaju kada je korištena pokrovnica dimenzija 24 x 60 mm) po preparatu. Inkubacija se odvijala u vlažnoj komorici na 37°C preko noći. Nakon ispiranja 5 puta po 5 minuta s puferom PBST, preparati su inkubirani u otopini sekundarnog protutijela „anti-rabbit“ s konjugiranim fluorokromom Alexa594 razrijeđenog u omjeru 1:1000 u 2,5%-tnoj otopini BSA u puferu PBST. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom s konjugiranim fluorokromom, daljnji koraci provedeni su u zatamnjanim Coplin posudicama. Višak sekundarnog protutijela je ispran 5 puta po 5 minuta s puferom PBST i jednom na 5 minuta u 1xPBS, nakon čega su preparati inkubirani 10-15 minuta u otopini fluorescentne boje DAPI (50 ng/ml) razrijeđene u puferu 2xSSC. DAPI je ispran nekoliko minuta u vodovodnoj vodi, a potom u destiliranoj vodi, nakon čega su preparati ostavljeni na sušenju u mraku. Suhim preparatima je dodano po 45 µl

otopine protiv blijedenja (eng. *antifade*) Mowiol 4-88, nakon čega su stakalca pokrivena pokrovnim stakalcem (24 x 40 mm). Pritiskom dlana na pokrovnicu uklonjen je višak reagensa i ujedno je učvršćeno pokrovno za predmetno stakalce. Opisan postupak uklapanja zajednički je svim korištenim citogenetičkim metodama. Preparati su potom spremljeni na 4°C do pregledavanja na konfokalnom mikroskopu.

3.2.11.3. Fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH)

3.2.11.3.1. Umnažanje i obilježavanje sonde biotinom

Umnažanje i obilježavanje sonde biotinom provodilo se standardnom reakcijom PCR s razlikom korištenja smjese deoksiribonukleotida s dodatkom nukleotida dUTP koji je konjugiran s biotinom (biotin-16-dUTP). Smjesa nukleotida sadržavala je 0,5 mM dATP, 0,5mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,32 mM dTTP i 0,18 mM biotin-16-dUTP. U pripremi sonde glavnog satelita vrste *T. castaneum* TCAST korišteni su plazmidi TCAST8 i TCAST19, čiji su klonirani inserti umnažani početnicama Tcastan1 i Tcastan2. U pripremi sonde glavnog satelita vrste *T. freemani* TFREE kao kalupi korišteni su plazmidi TFREE14 i TFREE16, a njihovi su klonirani inserti umnažani početnicama TFREEpr3 i TFREEpr4. Temperatura sparivanja za par početnica TCastan1 i TCastan2 iznosila je 57°C, a za TFREEpr3 i TFREEpr4 60°C. Dobivene sonde pročišćene su kompletom „QIAquick PCR Purification Kit“ prema uputama proizvođača uz finalnu eluciju s 50 µl eluirajućeg pufera, čiji je alikvot od 5 µl korišten za provjeru uspješnosti reakcije PCR pomoću elektroforeze u agaroznom gelu. Alikvot od 1 µl je upotrebljen za određivanje koncentracija dobivene sonde upotrebom kompleta „Qubit dsDNA BR assay“ na uređaju Qubit.

3.2.11.3.2. Priprema ChIP-DNA sonda metodom random priming

DNA fragmenti, dobiveni eksperimentima cCenH3-ChIP i fCenH3-ChIP, ugušćeni su do koncentracije 10 ng/µl. 65 ng svakog DNA kalupa denaturirano je 10 minuta u ključajućoj vodi. Odmah zatim denaturirani kalup DNA sonde stavljen je u led te mu je dodano redom 2 µl 10x nasumičnih heksamerskih početnica, 4 µl 10x cijanin3-dNTP smjese, 2 µl 10x pufer NEB 2 i 1 µl enzima Klenow fragment (5U/µl). Smjesa je inkubirana preko noći na 37°C u vodenoj kupelji. Reakcija je stopirana dodatkom 0,8 µl 0,5M EDTA pH 8. Uzorak je pročišćen kompletom „QIAquick PCR

Pufication Kit“ s finalnom elucijom u 100 µl pufera EB. Koncentracija sonde je određena uređajem Qubit.

3.2.11.3.3. Predtretman preparata

Preparati tkiva vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* pripremljeni za metodu FISH su najprije inkubirani u 45%-tnoj octenoj kiselini, 10 min, a potom su isprani 5 minuta u puferu 2xSSC na 37°C uz lagano tresenje. Nakon toga je slijedila inkubacija s 200 µl otopine enzima RNaza A (100 µg/ml) u puferu 2xSSC po preparatu, u vlažnoj komorici u trajanju od sat vremena na 37°C. RNaza A je isprana u 3 navrata po 5 minuta na tresilici otopinom 2xSSC na 37°C, a potom je uslijedila inkubacija s enzimom pepsin (100 µg/ml) u otopini 10 mM HCl tijekom 10 minuta na 37°C. Pepsin je ispran u puferu 1xPBS, dva puta po 5 minuta, a zatim 5 minuta u otopini 1xPBS s otopljenim 50 mM MgCl₂ na sobnoj temperaturi. Preparati su postfiksirani u otopini 1%-tnog formaldehida otopljenog u puferu 1xPBS s 50 mM MgCl₂.

3.2.11.3.4. Hibridizacija sonde na kromosomima

Višak fiksativa na preparatima ispran je 5 minuta u puferu 1xPBS pri laganom tresenju, a potom su preparati dehidrirani kroz seriju etanola različitog postotka (70%-tni → 90%-tni → 100%-tni), ohlađenih na -20°C, po 3 minute u pojedinačnom razrjeđenju etanola. Nakon dehidracije preparati su osušeni na sobnoj temperaturi. Prije denaturacije, osušeni preparati su predgrijani na 50-60°C na poklopcu vodene kupelji. Preparati su potom denaturirani u denaturacijskoj otopini (70%-tni formamid u 2xSSC) 2 minute na 70°C u vodenoj kupelji, nakon čega je ponovo uslijedila dehidracija u nizu rastućih koncentracija hladnih etanola (70%-tni → 90%-tni → 100%-tni, po 3 minute u svakom razrjeđenju) i sušenje preparata na sobnoj temperaturi. Sonda TCAST sastojala se od biotinom obilježenih odsječaka dugačkih oko 200 bp, od kojih su 50% odsječaka dobiveni umnažanjem plazmida TCAST19, a 50% odsječaka dobiveni umnažanjem plazmida TCAST8. Sonda TFREE također je predstavljala kombinaciju biotinom obilježenih i umnoženih odsječaka plazmida TFREE14 i TFREE16 u omjeru 1:1 dužine oko 120 bp. Odogovarajući volumen biotinom obilježene sonde mase 150 ng po preparatu je liofiliziran u uređaju Speed vac te potom otopljen vorteksiranjem u 15 µl hibridizacijske otopine (60% formamid, 40% DeSO₄ pufer). Sonda je denaturirana na 75°C 5 minuta u vodenoj kupelji, nakon čega je ostavljena nekoliko minuta u ledu i potom dodana na dehidrirane preparate. Preparat sa sondom je prekriven pokrovnim stakalcem dimenzija 24 x 40 mm,

koje je potom oblijepljeno lateks ljepilom. Hibridizacija se odvijala u vlažnoj komorici na 37°C preko noći. Sljedeći dan, preparati su ispirani u predgrijanoj otopini 50%-tnog formamida u 2xSSC-u 4 puta po 5 minuta na 37°C uz lagano tresenje, nakon čega su uslijedila još 3 ispiranja po 5 minuta u 2xSSC-u na 37°C na tresilici.

3.2.11.3.5. Imunodetekcija specifično vezane sonde obilježene biotinom

Imunodetekcija hibridiziranih sondi na denaturiranim kromosomima započela je inkubacijom preparata u blokirajućem puferu 4M u vlažnoj komorici 30 minuta na 37°C. Nakon blokiranja nespecifičnih vezujućih mjesta, preparati su inkubirani u otopini protutijela fluorescein avidin D (avidin-FITC) razrijeđenog u omjeru 1:500 u puferu 4M u vlažnoj komorici na 37°C u periodu od 30 minuta. Od ovog koraka preparati su tijekom ispiranja i sušenja držani u mraku. Suvišak protutijela avidin-FITC uklonjen je ispiranjem 3 puta po 5 minuta u puferu 4T na tresilici na sobnoj temperaturi. Potom je uslijedila amplifikacija signala 20-minutnom inkubacijom preparata s biotiniziranim protutijelom protu-avidin, razrijeđenim u omjeru 1:100 u puferu 4M u vlažnoj komorici na 37°C. Preparati su isprani tri puta po 5 minuta puferom 4T na laganom tresenju pri sobnoj temperaturi i zatim inkubirani u razrijeđenoj otopini protutijela avidin-FITC (1:2000) u puferu 4M, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 3 puta po 5 minuta s puferom 4T na tresilici na sobnoj temperaturi i jednog ispiranja s puferom 1xPBS 5 minuta, preparati su dehidrirani u seriji hladnih etanola (70%-tni → 90%-tni → 100%-tni, po 5 minuta). Nakon što su preparati osušeni u mraku, tretirani su otopinom boje DAPI (50 ng/ml) u 2xSSC-u 20 minuta. DAPI je ispiran tijekom nekoliko minuta u vodovodnoj vodi, a potom u destiliranoj vodi. Naposljetku su preparati ostavljeni da se osuše na zraku. Suhi preparati su uklopljeni u otopinu protiv blijedenja Mowiol 4-88 i pokriveni pokrovnim stakalcem dimenzija 24 x 40 mm, nakon čega su uskladišteni na 4°C do pregledavanja na konfokalnom mikroskopu, najčešće dan poslije.

3.2.11.4. Kombinirana metoda imunofluorescencije i fluorescencijske hibridizacije *in situ* (IF-FISH) na metafaznim kromosomima i izduljenim kromatinskim nitima

Metoda IF-FISH optimizirana je kombinacija opisanih protokola metoda IF i FISH za tkiva vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, s ciljem istovremene detekcije signala proteina CenH3 (metodom IF) i centromernih sekvenci (metodom FISH). Razlike IF dijela IF-FISH protokola za preparate s izduljenim kromatinskim nitima u odnosu na samostalni IF protokol je inkubacija s dodatnim blokirajućim

agensom Image IT (4 kapi po preparatu) u vremenskom intervalu od 30 minuta na sobnoj temperaturi, kojeg prate tri ispiranja po 5 minuta u puferu 1xPBST, nakon čega slijedi standardna inkubacija s blokirajućom otopinom 2,5%-tnom BSA (bez dodatka glicina)/1xPBST u vlažnoj komorici, 1 sat na 37°C. Preparati s izduljenim nitima inkubirani su u otopini primarnog protutijela u omjeru 1:200, dok su preparati s metafaznim kromosomima inkubirani u standardnom razrjeđenju primarnog protutijela u omjeru 1:400. U metodi IF na preparatima s izduljenim kromatinskim nitima smanjen je broj ispiranja u PBST-u, s pet ispiranja na tri.

Nakon završetka koraka metode IF preparati se mogu tretirati bojom DAPI, uklopiti u medij protiv blijeđenja i provjeriti uspješnost provedene IF metode na konfokalnom mikroskopu ili se može odmah nastaviti s metodom FISH. Ako su preparati prethodno pregledavani na konfokalnom mikroskopu i zbog toga bili uklopljeni u medij protiv blijeđenja, prije ulaska u eksperiment FISH, preparati su inkubirani u 100%-tnom etanolu u trajanju od najmanje 30 minuta na tresilici pri sobnoj temperaturi, zaklonjeni od svjetla. Nakon 15-20 minuta s preparata je oprezno uklonjena olabavljena pokrovnica. Potom su preparati isprani u dva navrata u 1xPBS, po 5 minuta, te je nastavljeno s metodom FISH. Prvi dan metode FISH je značajno izmijenjen u predtretmanu preparata s metafaznim kromosomima i izduljenim kromatinskim nitima za potrebe IF-FISH protokola. Nakon ispiranja sekundarnog antitijela s konjugiranim fluorokromom Alexa594, preparati su isprani s puferom 1xPBS/50 mM MgCl₂ i potom dodatno fiksirani u 1%-tnom formaldehidu, čime su preskočeni koraci inkubacije u 45%-tnoj octenoj kiselini, u otopinama enzima RNaza A i pepsina te njima pridruženim ispiranjima. Također je izostavljena zadnja dehidracija u seriji etanola prije tretmana s otopinom boje DAPI. Preparati s izduljenim nitima inkubirani su u koncentriranoj otopini boje DAPI (2 µg/ml), dok su metafazni preparati tretirani u standardnoj koncentraciji otopini boje DAPI (50 ng/ml).

3.2.11.5. Konfokalno mikroskopiranje

Preparati, koji su prošli postupke metoda IF, FISH i IF-FISH, pregledani su i dokumentirani uz upotrebu konfokalnog mikroskopa Leica TCS SP8 X. Konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X povezan je s računalnim programom LasX, u kojemu se namještaju parametri za fotografiranje odabranih područja na preparatu. Parametri uključuju odabir rezolucije fotografija, valne duljine ekscitacije fluorokroma (Tablica 15), raspon detekcije emitiranog svjetla fluorokroma, intenzitet signala i kreiranje Z slojeva (eng. *Z stacks*) koji se odnose na broj fotografija i njihov raspon kroz vertikalni prerez stanica. Dobivene fotografije su naknadno obrađene u programima ImageJ (Schneider i sur., 2012) i Adobe Photoshop CS2 u svrhu pojačavanja specifičnih signala i smanjenja nespecifičnih pozadinskih signala.

Tablica 15. Vrijednosti valnih duljina ekscitacije fluorokroma i vrhunac valne duljine emisije.

Fluorokrom	Valna duljina ekscitacije (nm)	Vrhunac valne duljine emisije (nm)
DAPI	358	461
Alexa594	590	617
Cijanin 3	550	570
FITC	495	519

3.2.12. Bioinformatičke analize

3.2.12.1. Analiza Repeat Explorer 2

Nukleotidni sljedovi dobiveni sekvenciranjem nove generacije analizirani su bioinformatičkim alatom Repeat Explorer 2 (Novák i sur., 2010, 2013), dostupnim na serveru (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy/>). Spomenuti program omogućava detekciju ponavljajućih sekvenca iz skupa nukleotidnih sljedova kratkih očitavanja genomske DNA. Na spomenutom serveru nalaze se također programski paketi s alatima za inicijalnu analizu NGS sljedova. Dobiveni setovi podataka očitavanja genomskih DNA (eng. *whole genome sequences, WGS*) vrste *T. castaneum* i *T. freemani* prvo su analizirani pomoću alata FAST QC kako bi se provjerila kvaliteta zasebno lijevih i desnih očitavanja zapisanih u fastaq formatu. Sljedovi su potom obrađeni u alatu „Preprocessing fastaq paired-end reads“ po zadanim postavkama: „quality cutoff“=10 i „Percent above cutoff“=95. Inicijalnim očitanjima WGS vrste *T. castaneum* uklonjena su prva 4 pb, koja značajnije variraju u postocima pojedinih baza (A,T i G,C), što je indikator smanjene kvalitete očitavanja. Na isti način, očitanjima WGS vrste *T. freemani* uklonjeno je prvih 9 pb bioinformatičkim alatom „Trimm sequences“. Inicijalna analiza Repeat Explorer 2 (RE2) vrste *T. castaneum* napravljena je na randomiziranom broju od 83 264 sparenih očitavanja dugačkih 147 pb (0,06x pokrivenost genoma), dok je vrste *T. freemani*, napravljena je na nasumično odabranom broju od 98 028 sparenih očitavanja dugačkih 142 pb (0,06x pokrivenost genoma). Navedeni randomizirani brojevi su blizu gornje granice maksimalnog broja očitavanja koje alat RE2 može analizirati, a razlog te limitiranosti je veliki udio istih sekvenci u analizi.

Konkretno, kod spomenutih dviju vrsta roda *Tribolium* radilo se o sekvencama glavnih satelita TCAST i TFREE.

3.2.12.2. Analiza ChIP-Seq Mapper

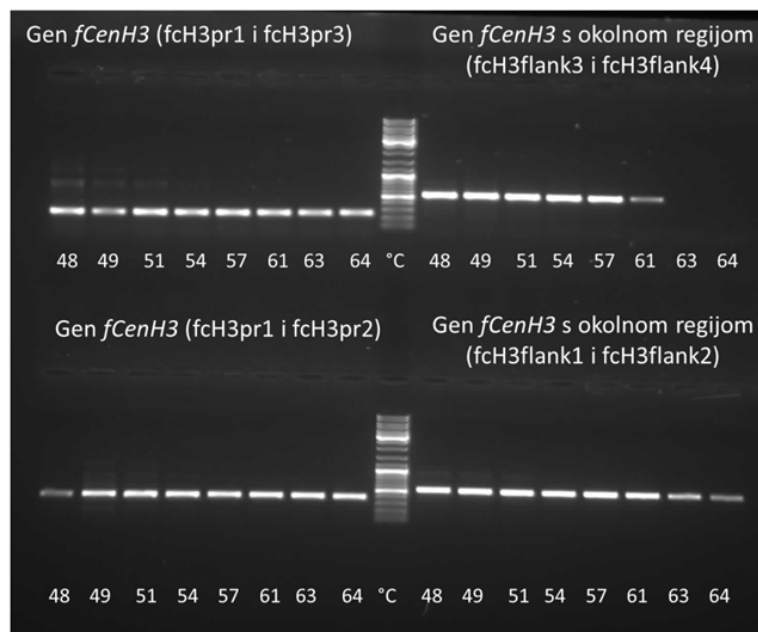
Analiza u svrhu dobivanja podataka o obogaćenim sekvencama u centromernoj frakciji genoma napravljena je pomoću alata ChIP-Seq mapper, dostupnog na serveru <https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/>. Analiza se sastojala od mapiranja jednakog broja sekvenci CenH3-ChIP i sekvenci pripadajućeg ulaznog materijala na *cluster*-e dobivene RE2 analizom genomskih DNA. *Cluster*-i se sastoje od jednog ili više kontinga, s tim da zastupljeniji *cluster*-i sadrže više *contig*-a, dok manje zastupljeni *cluster*-i najčešće sadrže jedan ili dva kontinga. Kontinzi su kratki konsenzusi sekvenca DNA, nastali preklapanjem sekvenci očitavanja WGS-a. U ChIP mapper analizama korišteno je 1 000 000 očitavanja CenH3-ChIP i 1 000 000 očitavanja odgovarajućeg ulaznog materijala. Postavka „*bit score threshold*“ inicijalno je postavljena sukladno uputama koje se odnose na dužinu ulaznih očitavanja. Variranjem vrijednosti *bit score threshold* pronađene su optimalne vrijednosti tog parametra, koje rezultiraju brojevima ChIP pogodaka i pogodaka ulaznog materijala (po 1 000 000) koje su najbliže brojevima ulaznih ChIP i input očitavanja (po 1 000 000). Za očitavanja vrste *T. castaneum* postavljena je vrijednost *bit score threshold* 30, a za očitavanja vrste *T. freemani* izabrana je vrijednost *bit score threshold* u iznosu od 115.

4. REZULTATI

4.1. Dokazivanje transkripcije gena *fCenH3*

Analizom odsječaka sekvenciranog genoma (eng. *scaffolds*) vrste *T. freemani*, dostupnih na serveru <http://beetlebase.org/blast/blast.html>, *in silico* je utvrđena sekvenca potencijalnog gena *fCenH3*, centromerne varijante histona H3 vrste *T. freemani* (B. Mravinac). Pronađena sekvenca gena *fCenH3* dužine 375 pb, poslužila je za dizajniranje različitih parova početnica (B. Mravinac), koji su korišteni za umnažanje PCR odsječaka gena *fCenH3* iz genomske DNA vrste *T. freemani* te za provjeru transkripcijske aktivnosti spomenutog gena.

Iz genomske DNA vrste *T. freemani* metodom PCR umnoženi su odsječci gena *fCenH3* te gena *fCenH3* uključujući i njegove okolne regije. Pritom su korištena četiri para početnica u rasponu temperatura sparivanja početnica od 48 do 64°C, a za svaki par početnica utvrđena je optimalna temperatura sparivanja metodom gradijentni PCR (Slika 9).



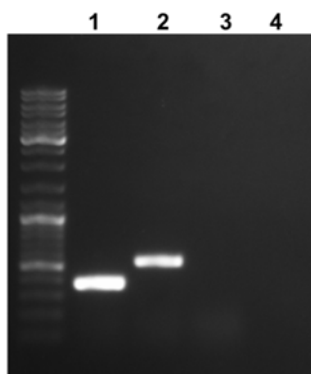
Slika 9. Određivanje optimalnih temperatura sparivanja početnica specifičnih za gen *fCenH3* te gen *fCenH3* uključujući i njegove okolne regije, pomoću metode gradijentni PCR.

PCR fragmenti umnoženi parovima početnica fcH3flank1 i fcH3flank2 te fcH3flank3 i fcH3flank4 sekvencirani su Sangerovom metodom. Dobiveni nukleotidni sljedovi su uspoređeni sa sekvencom potencijalnog gena *fCenH3* utvrđenog u genomskom „scaffold“-u 12 vrste *T. freemani* (Slika 10). Navedenom komparativnom analizom potvrđena je ispravnost nukleotidnog slijeda gena *fCenH3* detektiranog u genomskom „scaffold“-u.

gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	ATGGCTCGCACTAAGAAAACCCCAACGAAGGAGCGTCCAACCTCCACCTG
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	TTATTTTATTGGAAACAAACAATATCGCATAAGATTAAAGCTCCTGAGGA
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	TCATTAAGAAGCTGCAAATGTCTACTGAGTTATGCATCCCAAACTACCG
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	TTCTCAAGACTTATCCGTGAACTTCTCCAAAATCATAGTCGGGGGGCAGC
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	GGATTTTATGATAATGAAAAGTGCTTTACAAGCATTGCAGGAAGCTTCCG
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	AGGCGTATTTGATTTCACTTTTCGCGGACAGCAACTTGTGGCGGCACAT
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	GCAAACCGGTTACTATAAAGCCGCGGATCTGGCACTCTGCCTGTATAT
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gen	<i>fCenH3</i>	(scaffold 12)	GAGGAGGGAAAAAGAAGGGGGTTAA
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)
gDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank3/4)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3pr1/2)
cDNA	<i>fCenH3</i>	(fcH3flank1/2)

Slika 10. Usporedba nukleotidnog slijeda gena *fCenH3* identificiranog *in silico* u „scaffold“-u 12, PCR odsječaka dobivenih umnažanjem gena *fCenH3* iz genomske DNA vrste *T. freemani* (**gDNA *fCenH3***), kao i komplementarnih DNA (**cDNA *fCenH3***) nastalih sintezom na temelju transkripata gena *fCenH3*. U zagradama su navedeni parovi korištenih PCR početnica. Nukleotidni slijed gena *fCenH3* prikazan je punim zapisom, a točke u sravnjenju sekvenca označavaju podudarnost.

Metodom reverzne transkripcije praćene reakcijom PCR testirana je transkripcija gena *fCenH3* u vrsti *T. freemani* (Slika 11). U reakciji reverzne transkripcije, korišten je izolat ukupne RNA vrste *T. freemani*. Reakcije reverzne transkripcije i amplifikacije komplementarnih DNA (cDNA) napravljene su pomoću parova početnica za gen *fCenH3* (uzorak 1) i za gen *fCenH3* s okolnim regijama (uzorak 2). U uzorku 1 umnožena je cDNA duga 375 pb što odgovara duljini gena *fCenH3*. U negativnim kontrolama nisu umnoženi PCR odsječki (uzorak 3 i 4), dokazujući da izolat RNA i reagensi korišteni u RT-PCR eksperimentu nisu bili kontaminirani genomskom DNA (Slika 11). PCR odsječki dobiveni u uzorcima 1 i 2 sekvencirani su Sangerovom metodom. Usporedba sekvenca cDNA sa sekvencom gena *fCenH3* pokazala je potpunu homologiju nukleotidnih sljedova (Slika 10). Uz to što su rezultati RT-PCR eksperimenta potvrdili da je gen *fCenH3* transkripcijski aktivan, također su pokazali i da ne sadrži introne.

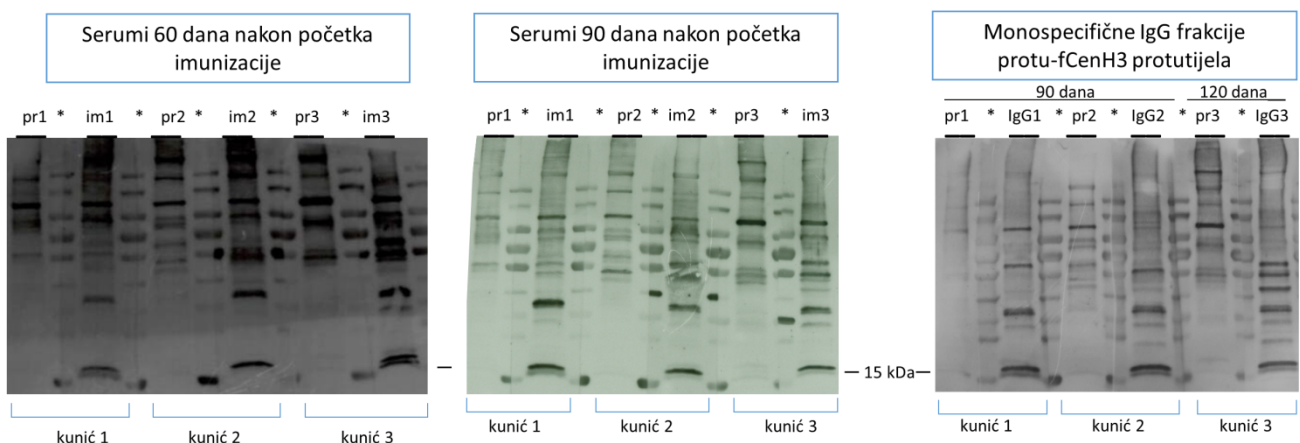


Slika 11. Potvrda transkripcije gena *fCenH3* metodom RT-PCR. Uzorak 1 predstavlja umnožene PCR odsječke gena *fCenH3* iz cDNA, a uzorak 2 PCR odsječke gena *fCenH3* s okolnim regijama umnožene iz cDNA. Uzorak 3 predstavlja negativnu kontrolu bez reakcije reverzne transkripcije, a uzorak 4 negativnu kontrolu bez kalupa RNA.

4.2. Testiranje protutijela protu-fCenH3

Protutijela protu-fCenH3, dobivena imunizacijom triju kunića, testirana su na ukupnom proteinskom izolatu vrste *T. freemani* metodom Western blot. Testirani su alikvoti seruma triju kunića uzetih 60 i 90 dana od početka imunizacije te serum kunića br. 3 nakon 120 dana od inicijalne imunizacije. Testirani su i afinitetno pročišćeni serumi, odnosno monospecifične frakcije IgG protutijela protu-fCenH3 dobiveni terminalnim iskrvarenjem životinja. Na slici 12 prikazani su rezultati testiranja seruma protu-fCenH3 i njima pripadajućih preimunoseruma uzetih iz kunića prije postupka imunizacije. Za razliku od preimunoseruma koji u proteinskom izolatu vrste *T. freemani* nisu detektirali postojanje ciljnog proteina, u uzorcima imuniziranih seruma uočen je signal koji svojim

položajem odgovara proteinu veličine 15 kDa, koliko iznosi i pretpostavljena veličina proteina fCenH3. Opažen signal na visini ~15 kDa ukazuje na uspješnu produkciju protutijela specifičnih za peptid proteina fCenH3 (peptidna sekvenca prikazana na slici 8). Dobivena protutijela protu-fCenH3 su poliklonalnog tipa, što znači da se sastoje od smjese različitih IgG protutijela, koja prepoznaju niz različitih staničnih proteina vrste *T. freemani*. U serumima uzetim 60 dana nakon početka imunizacije, zamjetni su intenzivni signali malo poviše ~15 kDa, koji se nisu vidljivo pojačali nakon dodatnih 30 dana imunizacije. Budući da su signali od interesa poželjnog intenziteta dobiveni već nakon 90 dana imunizacije, prekinuta je imunizacija kunića br. 1 i br. 2, dok je imunizacija kunića br. 3 produžena do 120. dana. Nakon završetka imunizacije, serumi kunića br. 1, 2 i 3 su afinitetno pročišćeni na sefarnoj koloni s imobiliziranim peptidom fCenH3. Signali proteina fCenH3 prepoznati protutijelima protu-fCenH3 sastoje se od dva bliska signala veličine ~15 kDa, od kojih gornji signal najvjerojatnije predstavlja posttranslacijski modificirani histon fCenH3, a donji nedomodificirani fCenH3. Za potrebe daljnjih eksperimenata imunofluorescencije i kromatinske imunoprecipitacije korišteno je protutijelo protu-fCenH3 dobiveno imunizacijom kunića br. 1, koje pokazuje intenzivno specifično vezanje na histon fCenH3, a ujedno najmanje nespecifično prepoznavanje drugih staničnih proteina. Također, dobiveni su rezultati koji potvrđuju uspješni postupak imunizacije kunića 1 i 2, peptidom proteina cCenH3. Navedeni rezultati dobiveni su testiranjem protutijela protu-cCenH3 metodom Western blot, koje je provedeno prije izrade ove doktorske disertacije, stoga nisu prikazani u ovom radu. Prethodno validirano protutijelo protu-cCenH3 korišteno je u citogenetičkim eksperimentima i u metodi kromatinske imunoprecipitacije načinjenim u sklopu ovog dokorskog rada



Slika 12. Western blot testiranje ukupnih staničnih proteina vrste *T. freemani* serumima triju kunića imuniziranih peptidom fCenH3. Stupci obilježeni oznakom „pr“ predstavljaju proteine prepoznate inkubacijom s preimunizacijskim serumima, oznaka „im“ predstavlja proteine detektirane imunizacijskim serumima, dok sufiksi 1,2 i 3 označavaju redni broj kunića. Kratica „lgG“ označava proteine prepoznate monospecifičnim IgG frakcijama protutijela protu-fCenH3 triju kunića. Zvezdica (*) označava biljeg veličine proteina.

4.3. Utvrđivanje centromerne lokalizacije proteina cCenH3 i fCenH3

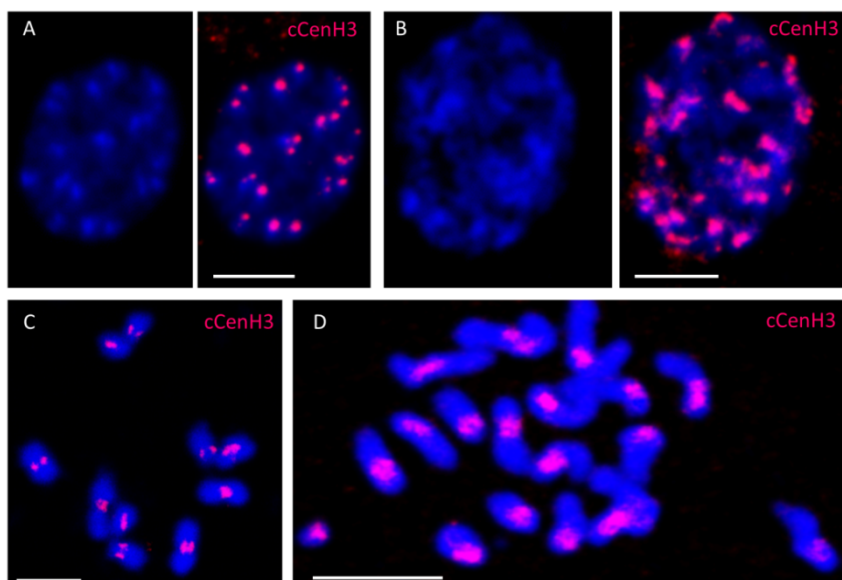
Smještaj proteina cCenH3 i fCenH3 na kromosoma vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* istražen je pomoću imunofluorescencije uz upotrebu monospecifičnih IgG frakcija protutijela protu-cCenH3 i protu-fCenH3 (Slika 13 i 14).

U obje vrste, u interfaznim jezgrama uočeni su točkasti signali smješteni unutar heterokromatinskih regija. Broj heterokromatinskih blokova odgovara diploidnom broju kromosoma ($2n=20$), unutar kojih se nalaze pojedinačni točkasti signali kod vrste *T. castaneum* (Slika 13A) ili po 3 i više točkastih signala kod vrste *T. freemani* (Slika 14A-C). U profazi, točkasti signali stapaju se u izduljene, nitaste signale koji zauzimaju značajne udjele u heterokromatinskim regijama (Slika 13B i 14D). U stadiju metafaze, na svakom kromosomu vidljiva su dva signala u paru, po jedan na svakoj kromatidi, a zauzimaju metacentrični, submetacentrični ili akrocentrični položaj na kromosomima obiju vrsta (Slike 13C-D i 14E-F). Spomenuta distribucija signala potvrđuje da su proteini cCenH3 i fCenH3 smješteni u centromernim regijama kromosoma vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* te se mogu uistinu smatrati centromerno-specifičnim varijantama histona H3.

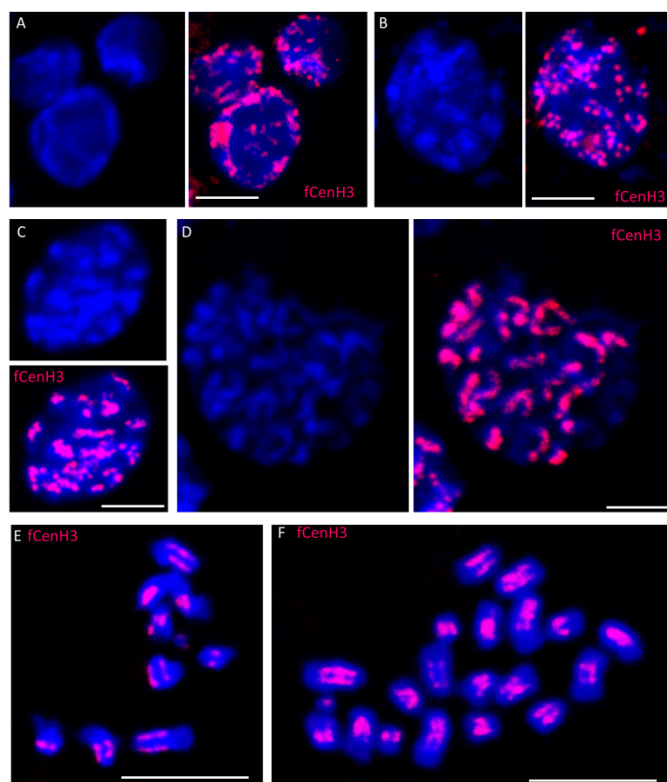
Uočeno je da su na manjim kromosomima vrste *T. castaneum* signali cCenH3 točkasti, a na većim kromosomima izduženi (Slika 13C). Na slabije kondenziranim metafaznim kromosomima proteini cCenH3 zauzimaju neuobičajeno izdužene regije sastavljene od niza 4-5 točkastih signala (Slika 15), što je karakteristika meta-policentričnih kromosoma. Meta-policentrični cCenH3 signali prate izduljenu primarnu konstrikciju cijelom dužinom. S druge strane, na metafaznim kromosomima većeg stupnja kondenziranosti, cCenH3 signali se stapaju u jedinstvene linearne signale (Slika 13C-D).

Slično distribuciji proteina cCenH3 na kromosomima vrste *T. castaneum*, signali proteina fCenH3 na većim kromosomima vrste *T. freemani* pokazuju izduženu regionalnu lokalizaciju, a na nekoliko takvih kromosoma je razlučivo da se kontinuirani linearni centromerni signali također sastoje od niza od 3-4 točkasta signala (Slika 16). Izduljeni meta-policentrični signali fCenH3 također se smještaju na vanjskim, lateralnim stranama primarnih konstrikcija. Na manjim kromosomima, uključivo i spolni kromosom y_p , signali imaju točkastu organizaciju (Slika 14E, 16).

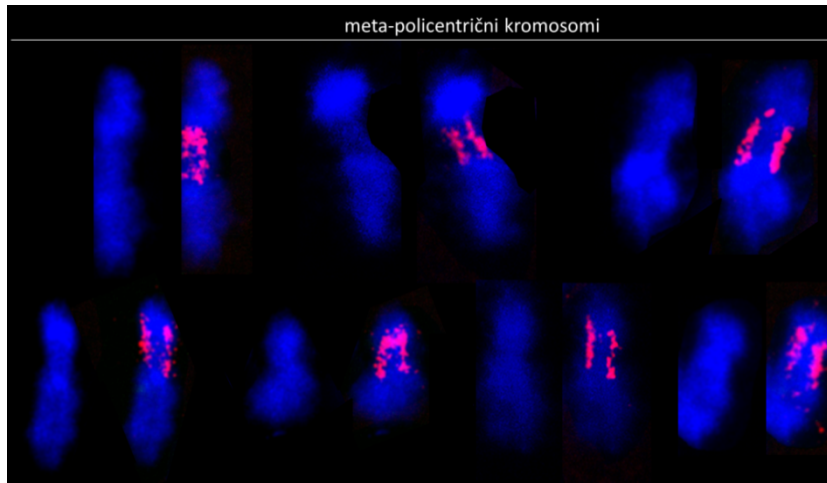
Meta-policentrični signali histona cCenH3 (Slika 15) zauzimaju 26-36% ukupne dužine kromosoma vrste *T. castaneum*, dok se meta-policentrični signali fCenH3 u vrsti *T. freemani* protežu na većoj dužini, koja zauzima 40-61% kromosoma (Slika 16). Uzimajući u obzir ukupnu veličinu genoma, procijenjeno je da duljina meta-policentromera u vrsti *T. castaneum* ukupno zauzima regije kumulativne veličine oko 61 Mb, dok u vrsti *T. freemani* meta-policentromere čine oko 116 Mb



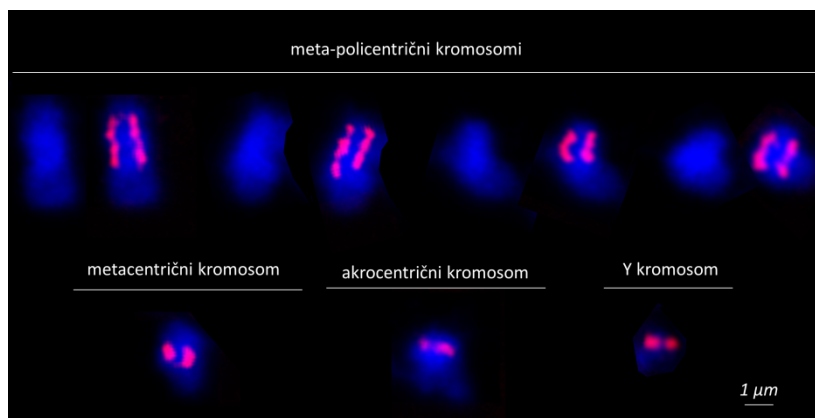
Slika 13. Lokalizacija proteina cCenH3 u različitim stadijima staničnog ciklusa vrste *T. castaneum*: (A) interfaza, (B) profaza, (C) haploidni set metafaznih kromosoma i (D) diploidni set metafaznih kromosoma. Na kromosomima obojanim fluorescencijskom bojom DAPI, položaj protutijela protu-CenH3 prikazan je crvenom bojom. Crtica predstavlja 5 μm .



Slika 14. Lokalizacija proteina fCenH3 u različitim stadijima staničnog ciklusa vrste *T. freemani*: (A, B, C) interfaza, (D) profaza, (E) haploidni set metafaznih kromosoma i (F) diploidni set metafaznih kromosoma. Signali CenH3 prikazani su crvenom bojom, dok je kromatin obilježen bojom DAPI prikazan plavom bojom. Crtica predstavlja 5 μm .



Slika 15. Karakteristična meta-policentrična organizacija cCenH3 domena na nekoliko izdvojenih kromosoma vrste *T. castaneum*. Lijevo kromosom bez signala IF, desno kromosom sa signalnom IF. Crtica predstavlja 1 μm .



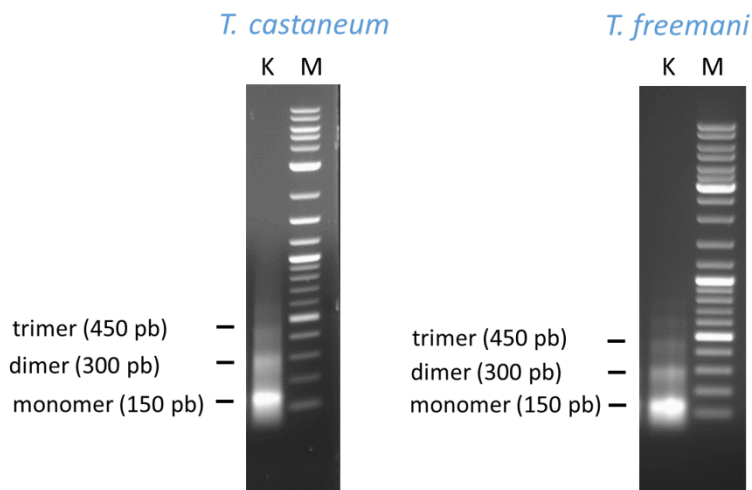
Slika 16. Meta-policentrična organizacija signala fCenH3 (gornji red) i monocentrična organizacija signala fCenH3 (donji red) na nekoliko kromosoma vrste *T. freemani*. Crtica predstavlja 1 μm .

4.4. Identifikacija centromerno-kompetentnih sekvenci DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*

U svrhu identifikacije centromerno-kompetentnih sekvenci DNA, korištena su protutijela koja specifično prepoznaju centromerne varijante histona H3 vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, odnosno proteine cCenH3 i fCenH3. Metodom kromatinske imunoprecipitacije uz upotrebu spomenutih protutijela, izolirani su kromatinski odsječci koji sadrže cCenH3 odnosno fCenH3 nukleosome te su metodom sekvenciranja nove generacije analizirani odsječci DNA koji su s njima u interakciji.

4.4.1. Izolacija nativnog kromatina vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*

Kromatin vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* ekstrahiran je metodom nativne izolacije te je enzimom mikrokokalne nukleaze pocijepan na odsječke duljine mono-, di- i trinukleosoma, što odgovara odsječcima DNA u rasponu duljina od ~150-450 pb. Literaturno predložena optimalna duljina fragmentiranog kromatina za eksperimente kromatinske imunoprecipitacije iznosi ~140-150 pb, što odgovara duljini mononukleosomskog DNA namotaja (Neumann et al., 2012). Prilikom optimizacije količine mikrokokalne nukleaze i vremena inkubacije kromatina vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* s navedenim enzimom, najbliže optimalnoj digestiji pokazali su se kromatini pocijepani na mono-, di- i trinukleosome. Snažnije digestije vodile su u cijepanje kromatina u submononukleosomske frakcije, koje zbog kratkoće DNA odsječaka (<100 pb) nisu bile upotrebljive za daljnje eksperimente kromatinske imunoprecipitacije. Iako se izolirani, pocijepani kromatin vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* u konačnici sastojao od fragmenata mono-, di- i trinukleosomske duljine, na slici 17 jasno je vidljivo da je pruga duljine 150 pb najintenzivnija, što znači da mononukleosomi čine najveći udio u skupu kromatinskih fragmenata. Izolirani i pocijepani kromatini, prikazani na slici 17, korišteni su u narednim eksperimentima kromatinske imunoprecipitacije.



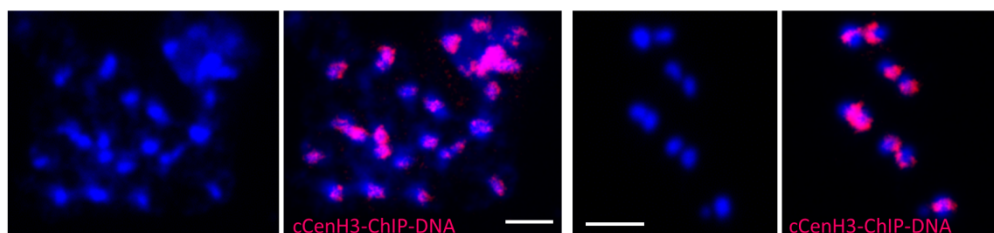
Slika 17. Sastav fragmenata izoliranih nativnih kromatina vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, korištenih u eksperimentima kromatinske imunoprecipitacije. Oznaka K predstavlja nativni kromatin, dok oznaka M predstavlja biljeg veličina DNA fragmenata.

4.4.2. Imunoprecipitacija CenH3 kromatina

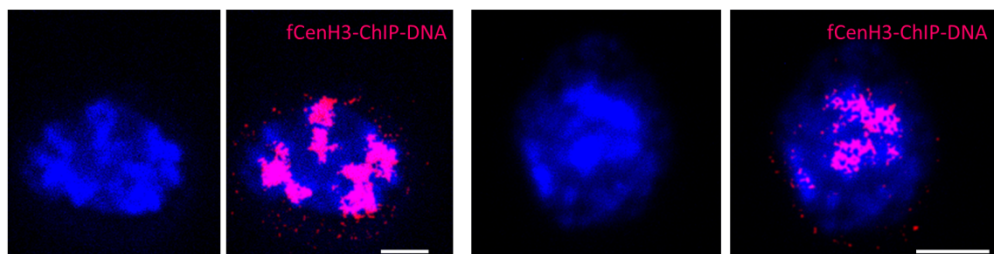
Metodom kromatinske imunoprecipitacije izdvojeni su odsječci kromatina vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* koji u svom sastavu imaju cCenH3 odnosno fCenH3 nukleosome na način kako je detaljno opisano u Metodama, poglavlje 3.2.9. Količina imunoprecipitiranog kromatina procijenjena je fluorometrijskim određivanjem koncentracija dvolančanih DNA u imunoprecipitiranim eluatima. Udio cCenH3-immunoprecipitirane DNA iznosio je 0,86% količine ulaznog kromatina, dok je udio fCenH3-immunoprecipitirane DNA iznosio 7,92% količine ulaznog kromatina. U negativnim kontrolama ovih dviju vrsta korištena su poliklonalna protutijela „normal rabbit IgG“ koja sadrže protutijela IgG porijeklom iz kunića. Upotrebom protutijela „normal rabbit IgG“ u svojstvu negativne kontrole, provjeravana je potencijalna nespecifična precipitacija kromatina ovih dviju vrsta. U imunoprecipitatima negativnih kontrola nije detektirana DNA (granica osjetljivosti fluorometrijskog instrumenta iznosi $<0,05$ ng/ μ l) pa je zaključeno da u eksperimentima kromatinske imunoprecipitacije nije došlo do značajnijeg nespecifičnog precipitiranja DNA. Razlog povećanom udjelu fCenH3-immunoprecipitirane DNA u odnosu na cCenH3-immunoprecipitiranu DNA može biti smanjeni broj ispiranja koji se provodio u eksperimentu kromatinske imunoprecipitacije vrste *T. freemani*, pri čemu je potencijalno ispran manji udio kromatina. Povećani broj ispiranja u eksperimentu kromatinske imunoprecipitacije *T. castaneum* uveden je upravo u svrhu reduciranja mogućeg nespecifično precipitiranog kromatina. Također, dodatan razlog povećanoj količini fCenH3-immunoprecipitirane DNA je i potencijalna veća frakcija centromernog kromatina u vrsti *T. freemani*.

Kako bi se provjerio kromosomski smještaj CenH3-vezanih DNA odsječaka, imunoprecipitirana DNA svake vrste obilježena je fluorokromom cijanin 3 te je korištena kao sonda u metodi FISH na jezgrama vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*. U oba slučaja, CenH3-immunoprecipitirana i obilježena DNA vezala se na komplementarne sekvence DNA smještene u heterokromatinskim područjima (Slika 18). Heterokromatinska lokalizacija imunoprecipitiranih DNA ukazuje na specifičnu imunoprecipitaciju centromernog kromatina s protutijelima protu-cCenH3 i protu-fCenH3. Intenzivni signali dobiveni ChIP-FISH eksperimentima također sugeriraju da imunoprecipitirane DNA sadrže velik udio ponavljajućih sekvenca.

T. castaneum cCenH3-ChIP-FISH

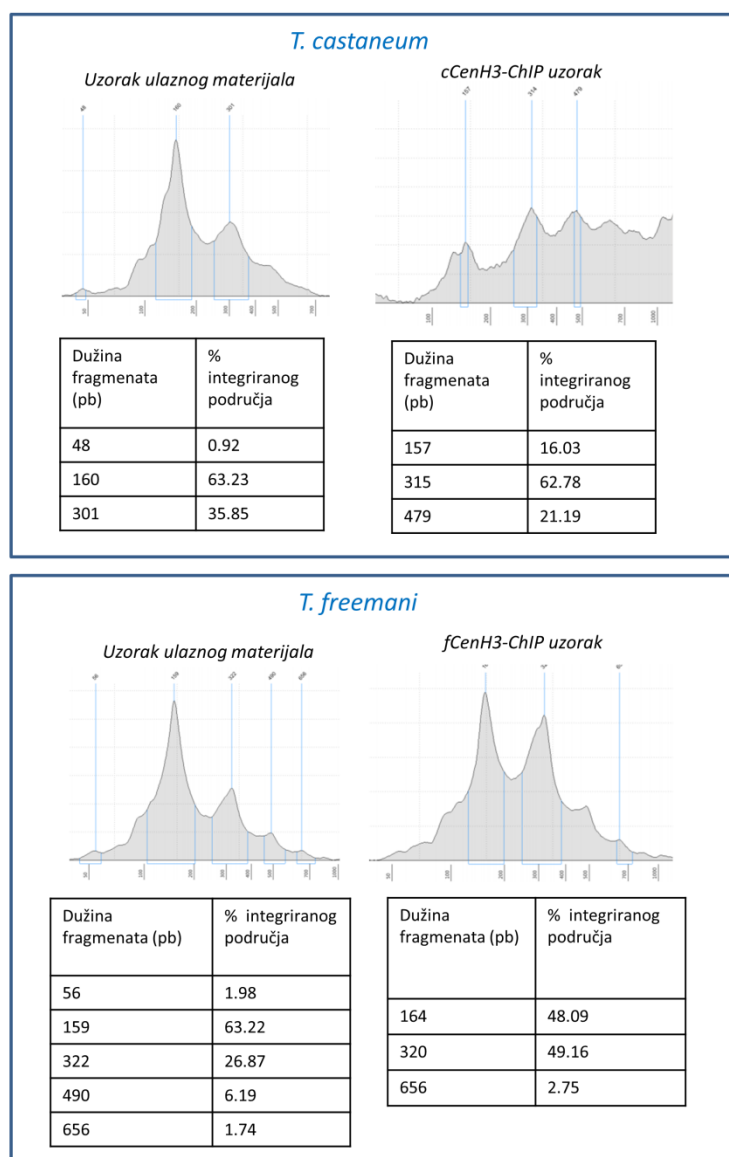


T. freemani fCenH3-ChIP-FISH



Slika 18. Lokalizacija cCenH3-ChIP i fCenH3-ChIP sonde obilježene cijaninom 3 u heterokromatinskim područjima kromosoma vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*. Crtica predstavlja 5 μm .

U okviru eksperimenata kromatinske imunoprecipitacije također je napravljena usporedba sastava fragmenata u ulaznom materijalu (nativnom pocijepanom kromatinu) i u CenH3-imunoprecipitiranoj frakciji kromatina. Između ova dva uzorka uočeni su različiti udjeli pojedinih duljina fragmenata DNA (Slika 19). U cCenH3- i fCenH3-imunoprecipitiranim uzorcima opažen je relativno povećani udio fragmenata dinukleosomske duljine te smanjen udio fragmenata mononukleosomske duljine u odnosu na uzorke ulaznih kromatina (Slika 19). U cCenH3-ChIP eksperimentu korišteno je pojačano ispiranje puferima u odnosu na fCenH3-ChIP eksperiment, što korelira s povećanim imunoprecipitiranjem di- i trinukleosomskih fragmenata i potencijalno povećava specifičnost precipitacije centrokromatina. Razlika udjela dužina fragmenata između uzoraka ulaznog materijala i CenH3-imunoprecipitiranih uzoraka ukazuje na specifično CenH3-imunoprecipitiranje kromatina. Također upućuje na preferencijalno cijepanje centrokromatina enzimom mikrokokalne nukleaze na di- i trinukleosome kod vrste *T. castaneum* te dinukleosome kod vrste *T. freemani*.



Slika 19. Usporedba duljina fragmenata DNA u uzorcima ulaznog kromatina te u CenH3-ChIP uzorcima.

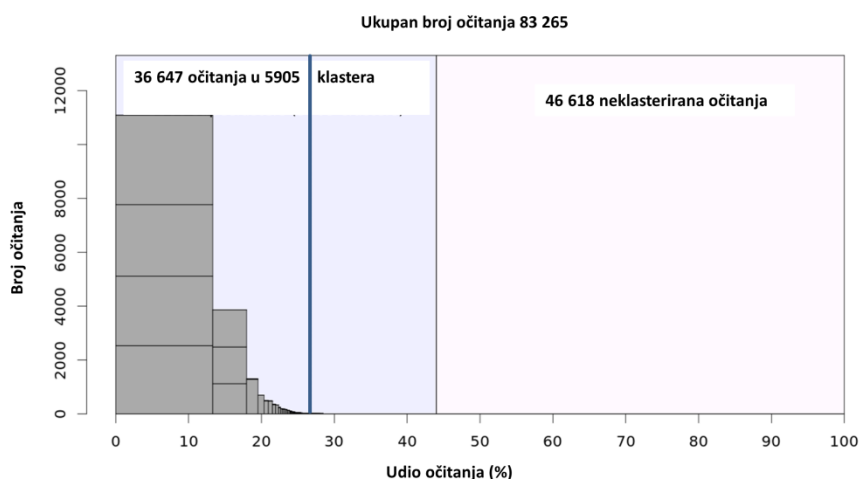
4.4.3. Formiranje baza ponovljenih sekvenci DNA u vrstama *T. castaneum* i *T. freemani*

Prije no što se pristupilo analizi nukleotidnih sljedova CenH3-vezanih DNA, bilo je potrebno formirati baze ponovljenih sekvenci DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*. U svrhu identifikacije ponovljenih sekvenci, genomi dviju vrsta sekvencirani su metodom sekvenciranja nove generacije. Genomske DNA su fragmentirane na duljine od 500 pb. Fragmenti DNA sekvencirani su s oba kraja u duljini od 151 pb na platformi Illumina. Dobiveni nukleotidni sljedovi kratkih očitavanja genomske DNA, nazvanih očitavanja WGS (eng. *whole genome sequence*), analizirani su pomoću bioinformatičkog alata Repeat Explorer 2 (RE2) u svrhu detekcije i identifikacije ponovljenih sekvenci DNA. Kako bi

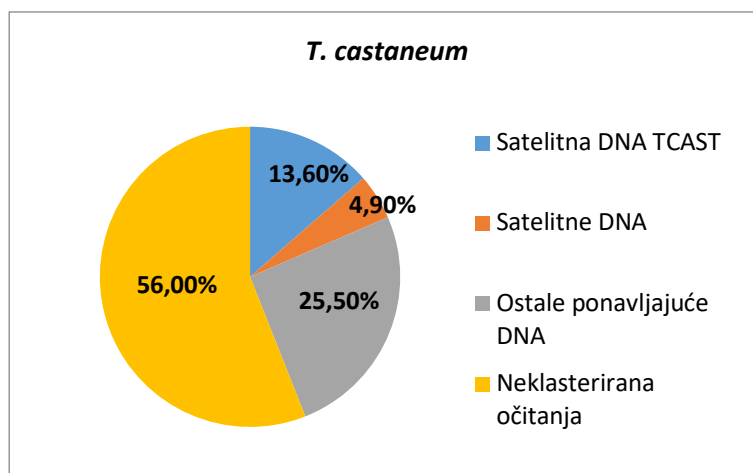
kriteriji analiza RE2 za obje vrste bili isti, analiza je provedena s brojem očitavanja koji odgovara pokrivenosti genoma od 0,06x. Za vrstu *T. castaneum* analizirano je 83 268 očitavanja, a za vrstu *T. freemani* 98 028 očitavanja.

4.4.3.1. Ponovljene DNA vrste *T. castaneum*

U RE2 analizi očitavanja WGS vrste *T. castaneum*, 44% očitavanja svrstalo se u 5905 cluster-a, od kojih 27% cluster-a predstavljaju glavne, visoko zastupljenije *cluster-e*, dok je 56% očitavanja ostalo nesvrstano u obliku pojedinačnih očitavanja (Slika 20). Glavna satelitna DNA TCAST raspodijeljena je u 4 najzastupljenija *cluster-a* koji pripadaju zajedničkom *supercluster-u* 1, čineći 13,6% genoma. Treba istaknuti da analiza RE2 u svojoj klasifikaciji ponovljenih sekvenca, nije prepoznala satelit TCAST kao satelitnu DNA. Otežanoj identifikaciji su potencijalno doprinijeli: 1) značajna varijabilnost monomerne sekvence među TCAST potporodicama (Pavlek i sur. 2015), 2) složenost organizacije satelitnih nizova TCAST, koja uključuje ponavljanja višeg reda (eng. *higher order repeat, HOR*) (Vlahović i sur., 2017), te 3) postojanje pojedinačnih monomera u eukromatinu (Felicciello i sur. 2015). Uz TCAST, dodatne satelitne DNA utvrđene analizom RE2 čine 4,9% genoma (Slika 21). Preostale ponavljajuće DNA, čiji identitet nije utvrđen ovom analizom, zauzimaju 25,5% genoma. Ostatak predstavljaju neklastirana očitavanja koja su najvjerojatnije jedinstvene genomske sekvence (Slika 21).



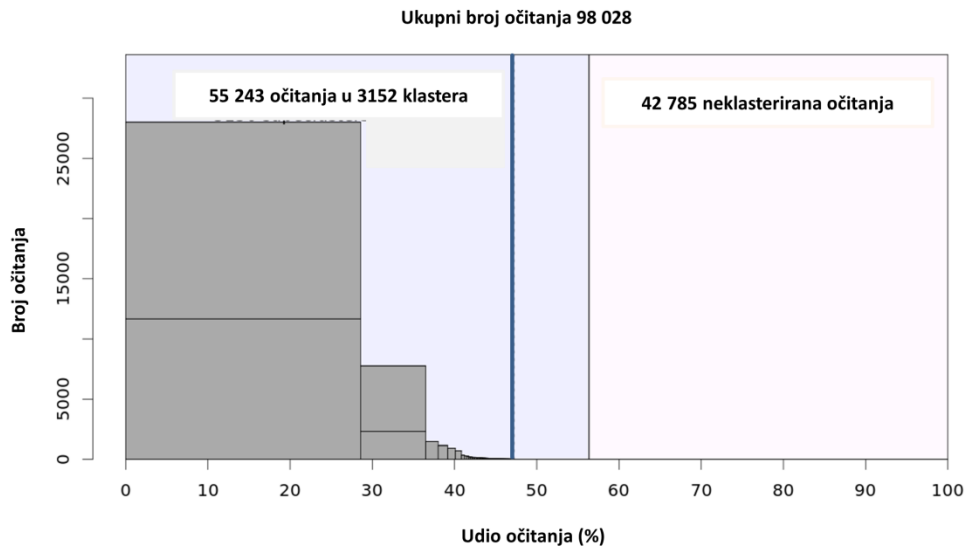
Slika 20. Rezultat RE2 analize očitavanja WGS vrste *T. castaneum*. Stupci predstavljaju *supercluster-e*, dok pravokutnici unutar stupaca predstavljaju *cluster-e* međusobno povezane u zajedničke *supercluster-e*. Na osi x očitava se udio svakog *cluster-a* ili *supercluster-a* u ukupnom broju očitavanja, a na osi y je prikazan broj očitavanja u svakom *cluster-u* odnosno *supercluster-u*. Plava okomita linija odvaja *cluster-e* s većom zastupljenošću (lijevo), od *cluster-a* s manjom zastupljenošću u WGS rezultatima (desno).



Slika 21. Udjeli ponavljajućih DNA i neklasteriranih očitavanja u genomu vrste *T. castaneum*.

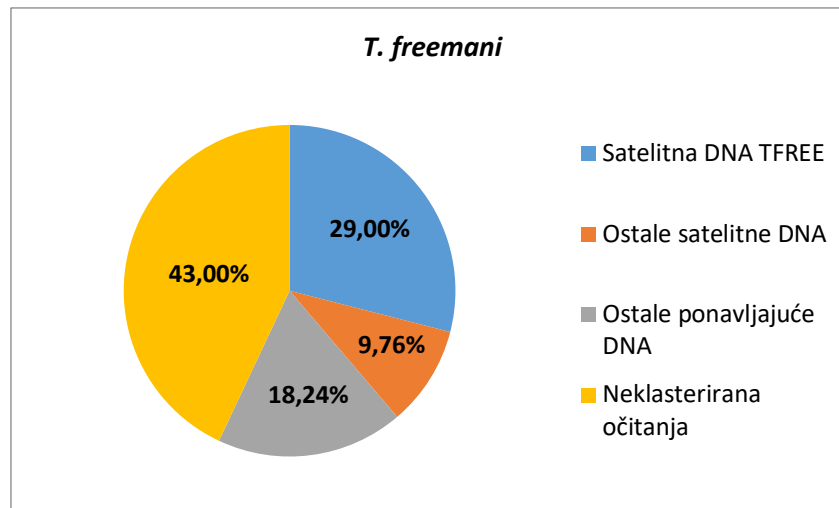
4.4.3.2. Ponovljene DNA vrste *T. freemani*

Analizom RE2 za vrstu *T. freemani* dobiveno je ukupno 3152 *cluster*-a koji čine 57% ukupnih očitavanja, unutar koji se nalazi 47% najzastupljenijih *cluster*-a. Nesvrstana, pojedinačna očitavanja čine 43% ukupnih očitavanja (Slika 22).



Slika 22. Rezultat analize očitavanja WGS vrste *T. freemani* u bioinformatičkom alatu Repeat Explorer 2. U lijevom dijelu grafa prikazani su udjeli i broj očitavanja za 3152 *cluster*-a. *Cluster*-i su označeni sivim pravokutnicima. Sivi pravokutnici u stupcima predstavljaju *cluster*-e povezane u zajedničke *supercluster*-e. Plava linija odvaja značajno zastupljene *cluster*-e od *cluster*-a s manjom zastupljenošću očitavanja. U desnom dijelu grafa prikazan je udio i broj neklasteriranih očitavanja.

Glavna satelitna DNA vrste *T. freemani* TFREE raspodijeljena je u dva *cluster*-a koji zajedno čine 29% genoma. Ostale identificirane satelitne DNA zauzimaju 9,76% genoma, dok su preostale neidentificirane ponovljene DNA prisutne u 18,24% genoma, a neklasterirane, jedinstvene sekvence čine 43% genoma (Slika 23). Satelitna DNA TFREE *cluster*-a 1 je prepoznata kao satelitna DNA u analizi TAREAN, dok satelitnoj DNA TFREE *cluster*-a 2 nije utvrđen satelitni DNA karakter. Razlog tomu može biti niža vrijednosti indeksa P u iznosu od 0,29 za *cluster* 2, od vrijednosti P u iznosu od 0,44 za *cluster* 1. Indeks P označava kompletnost sparenih očitavanja, odnosno udio sparenih očitavanja prisutnih u pojedinom *cluster*-u (Novák i sur., 2017).



Slika 23. Udjeli ponavljajućih DNA i neklasteriranih očitavanja u genomu vrste *T. freemani*.

4.4.4. Centromerno kompetentne sekvence DNA vrste *T. castaneum*

Upotrebom bioinformatičkog alata ChIP-Seq mapper utvrđeno je koje ponovljene sekvence DNA prevladavaju u centromernim regijama analiziranih vrsta. Nakon što su klasteriranjem WGS očitavanja formirane baze ponovljenih sekvenca (opisane u potpoglavljima 4.4.3.1. i 4.4.3.2.), na Illumina platformi sekvencirani su također odsječki DNA dobiveni CenH3-ChIP eksperimentima, a kao referentna vrijednost sekvencirani su i odsječki DNA ekstrahirani iz ulaznog kromatina. ChIP-Seq mapper analiza pridružila je očitavanja CenH3-ChIP i očitavanja ulaznog kromatina prethodno definiranim WGS *cluster*-ima, a na temelju omjera pogodaka CenH3-ChIP i ulaznog kromatina definirani su *cluster*-i obogaćeni u centromernim područjima.

Za analizu ChIP-Seq mapper vrste *T. castaneum* uzeto je 1 000 000 nasumično odabranih očitavanja cCenH3-ChIP i 1 000 000 nasumično odabranih očitavanja ulaznog kromatina. Odabrana očitavanja analizirana su spram prvih 414 najzastupljenijih WGS *cluster*-a. Kao kriterij obogaćenja uzet je omjer očitavanja cCenH3:ulaznog materijala ≥ 2 uz minimalno 100 očitavanja prisutnih u CenH3-ChIP uzorku. U kategoriju obogaćenih *cluster*-a dodatno je uvršteno 9 *cluster*-a, koji su pokazali značajnu zastupljenost u cCenH3-ChIP uzorku (≥ 4000 pogodaka), a čiji je faktor obogaćenja iznosio $\geq 1\%$.

Od četiri *cluster*-a (*cluster*-i 1-4) koji čine glavnu satelitnu DNA TCAST, *cluster* 2 obogaćen je 15% u cCenH3-ChIP frakciji u odnosu na frakciju ulaznog materijala (Tablica 16). TCAST *cluster*i 1 i 3 pokazuju omjer pogodaka CHIP/ulazni materijal 0,87 i 0,83, dok TCAST *cluster*a 4 pokazuje neznatno obogaćenje od 2%. Između četiri spomenuta *cluster*-a satelita TCAST ispitane su razlike sastava monomernih varijanti koje čine pojedini *cluster* ne bi li se pronašle varijante specifične upravo za područja funkcionalnih centromera. Naime, prethodnim istraživanjima utvrđeno je da se satelitne DNA TCAST sastoje od pet divergentnih potporodica, međusobno različitih i do 30% prema sastavu monomera koji im pripadaju (Pavlek i sur., 2015). Sastav varijanata satelitne DNA TCAST *cluster*-a 2 zastupljenih u cCenH3-ChIP frakciji izrazito je heterogen: 41,3% očitavanja pripada potporodici 1, 11,9% pripada potporodici 2, 4,54% pripada potporodici 3, 33,3% pripada potporodici 4, dok 3,21% pripada potporodici 5. Sastav potporodica satelitne DNA TCAST *cluster*-a 4 u cCenH3-ChIP frakciji također je raznolik: 62,9% pripada potporodici 3, 29,6% pripada potporodici 5, 4,67% pripada potporodici 4, 0,75% pripada potporodici 1, dok 0,54% pripada potporodici 2. Iz navedenog proizlazi da provedenom analizom nije utvrđena specifična varijanta satelita TCAST, koja bi bila dominantno prisutna u funkcionalnim centromerama. Dobiveni rezultati ukazuju na zaključak da se centrokromatin vrste *T. castaneum* sastoji od monomera različitih potporodica satelita TCAST.

Uz dominantno prisutnu satelitnu DNA TCAST, centromerno obogaćen pokazao se i *cluster* 10, okarakteriziran kao dosad neopisana satelitna DNA vrste *T. castaneum*. *Cluster* 10 centromerno je obogaćen 95% u odnosu na ulazni materijal (Tablica 16), a procijenjen je kao satelitna DNA niske vjerojatnosti s duljinom monomera od 1071 pb i udjela u genomu od 0,47%. Nadalje, analizom je utvrđeno da se u centromerno obogaćene sekvence svrstava i *cluster* 23, koji čini 0,11% genoma, a obogaćen je 36%. *Cluster* 23 odgovara satelitnoj DNA Cast6, monomeri dužine 180 pb, čija je zastupljenost u genomu procijenjena na 0,5% pomoću metode dot blot (Pavlek i sur., 2015). Cast6 je jedina satelitna DNA od opisanih devet eukromatinskih satelitnih DNA obogaćeno prisutna u cCenH3-ChIP frakciji kromatina. Utvrđeni su nizovi satelitne DNA Cast6 u nepoloženim singletonima s duljinama monomera od 73 pb, što može predstavljati (peri)centromerne poteze DNA.

U centromerno obogaćene ponovljene sekvence svrstale su se i sekvence slične ribosomalnim genima 28S i 18S

koje pripadaju srednje i visoko zastupljenim *cluster*-ima 12, 14 i 18 (Tablica 16). Non-LTR retrotranspozon SARTTc1 vrste *T. castaneum* također je povišeno prisutan u centromernoj frakciji kromatina, a prepoznat je u tri centromerno obogaćena *cluster*-a (*cluster*-i 264, 271 i 292) (Tablica 16).

Preostali obogaćeni *cluster*-i, detektirani pretraživanjem sličnosti sa sekvencama pohranjenim u bazama NCBI i Repbase, pronalaze sličnost s neokarakteriziranim sekvencama mRNA i ncRNA (Talica 16).

Tablica 16. Centromerno obogaćene ponavljajuće DNA sekvence vrste *T. castaneum*

Kriterij cCenH3-ChIP obogaćenja	Cluster	cCenH3-ChIP pogodci	Pogodci ulaznog materijala	Omjer pogodaka cCenH3-ChIP/ulazni materijal	Vrsta ponavljajuće DNA*
cCenH3-ChIP pogodci ≥ 4000 i omjer pogodaka cCenH3-ChIP/ulazni materijal ≥ 1	2	38 706	33 712	1,15	• Glavni satelit TCAST vrste <i>T. castaneum</i> (Ugarković i sur., 1996b)
	4	48 894	47 997	1,02	• Glavni satelit TCAST vrste <i>T. castaneum</i> (Ugarković i sur., 1996b)
	10	44 018	22 586	1,95	• Satelitna DNA utvrđena analizom TAREAN, monomera dužine 1071 pb
	12	11 503	6196	1,86	• Sekvenca slična 28S rDNA
	14	10 483	7277	1,44	• Sekvenca slična 18S rDNA
	18	6681	3579	1,87	• Sekvenca slična 28S rDNA
	23	6944	5105	1,36	• Satelitna DNA Cast6 (Pavlek i sur., 2015)
	27	22 863	11 906	1,92	• Pretpostavljeno: ncRNA (LOC107397477) vrste <i>T. castaneum</i> ncRNA (pokrivenost 21%, identičnost 79%)
	382	8668	3547	2,44	• Nije utvrđeno
cCenH3-ChIP pogodci ≥ 100 i omjer pogodaka ChIP/ulazni materijal ≥ 2	78	1504	529	2,84	• Sekvenca slična 5S rDNA
	221	111	45	2,47	• Pretpostavljeno: mRNA (LOC100142548) poliproteina Pol iz transpozona 412 vrste <i>T. castaneum</i>
	264	202	64	3,16	• Non-LTR/R1 retrotranspozon SARTTc1
	271	168	60	2,8	• Non-LTR/R1 retrotranspozon SARTTc1
	272	1399	600	2,33	• Pretpostavljeno: djelomična mRNA mucin-21 (LOC107397713) vrste <i>T. castaneum</i> (pokrivenost 75%, identičnost 94%)
	292	212	92	2,30	• Non-LTR/R1 retrotranspozon SARTTc1
	391	211	105	2,01	• Pretpostavljeno: mRNA (LOC107398821) vrste <i>Tribolium castaneum</i>

*određeno usporedbom *cluster*-a sa sekvencama pohranjenim u bazama NCBI i Repbase i analizom TAREAN

4.4.5. Centromerno kompetentne sekvence DNA vrste *T. freemani*

U ChIP-Seq mapper analizi vrste *T. freemani* korišteno je 1 000 000 fCenH3-ChIP i 1 000 000 očitavanja ulaznog kromatina dužine 90 pb te prvih 430 najzastupljenijih WGS *cluster*-a dobivenih u analizi RE2 opisanoj u potpoglavlju 4.4.3.2. Centromerno obogaćeni *cluster*-i definirani su s obzirom na udio pogodaka fCenH3-ChIP te omjer pogodaka fCenH3-ChIP:ulazni kromatin. Na taj način određene su 3 skupine obogaćenih *cluster*-a:

1) Kategorija 1 - *cluster*-i visoke zastupljenosti: *cluster*-i prisutni s brojem pogodaka fCenH3-ChIP $\geq 250\,000$ (25% pogodaka fCenH3-ChIP od ukupnog broja pogodaka fCenH3-ChIP) i s omjerom pogodaka fCenH3-ChIP/ulazni materijal $\geq 0,75$.

2) Kategorija 2 – *cluster*-i srednje zastupljenosti: *cluster*-i zastupljeni s brojem pogodaka fCenH3-ChIP $\geq 10\,000$ (1% pogodaka fCenH3-ChIP od ukupnog broja pogodaka fCenH3-ChIP) i s omjerom pogodaka fCenH3-ChIP/ulazni materijal $\geq 1,0$.

3) Kategorija 3 – *cluster*-i niske zastupljenosti: *cluster*-i prisutni s brojem pogodaka fCenH3-ChIP ≥ 100 (0,01% fCenH3-ChIP pogodaka od ukupnog broja pogodaka fCenH3-ChIP) i s omjerom pogodaka fCenH3-ChIP/ulazni materijal $\geq 1,75$.

U kategoriju 1 svrstali su se *cluster*-i 1 i 2, koji oba pripadaju glavnoj satelitnoj DNA TFREE (Juan i sur., 1993). Satelitna DNA TFREE *cluster*-a 1 i 2, prisutna je u udjelu fCenH3-ChIP pogodaka u iznosu od 60,1% od ukupnog broja fCenH3-ChIP pogodaka, a u skupu pogodaka ulaznog materijala prisutna je u iznosu od 77,6%. U analizi RE2 sparenih očitavanja genomske DNA, udio glavne satelitne DNA TFREE procijenjen na 29%, što je 2,67 puta manje nego u skupu očitavanja ulaznog kromatinskog materijala, što ukazuje da uzorak ulaznog kromatina ne reflektira stvarnu kompoziciju genomske DNA. Prekomjerna zastupljenost sekvenci TFREE u uzorku korištenog kromatina može biti posljedica intenzivnog tretmana mikrokokalnom nukleazom, pri čemu je eukromatin u odnosu na heterokromatin prekomjerno digeriran na submononukleosomne duljine fragmenata koji se gube prilikom native izolacije kromatina ili prilikom kromatinske imunoprecipitacije. Upravo tako visok udio (77,6%) jednog tipa sekvenci, u ovom slučaju satelitne DNA TFREE u skupu sekvenci ulaznog kromatinskog materijala, ne ostavlja prostor za potencijalno značajne razine obogaćenja tih istih sekvenci u frakciji DNA fCenH3-ChIP. Važno je zapaziti da *cluster*-ima TFREE pripada značajni udio fCenH3-ChIP pogodaka u iznosu od 60,1% ukupnog broja fCenH3-ChIP pogodaka, što ukazuje da se u fCenH3-ChIP uzorku dominantno imunoprecipitirao kromatin koji sadrži glavnu satelitnu DNA TFREE. Značajan udio TFREE u frakciji kromatina fCenH3-ChIP ukazuje da satelitna DNA TFREE ima ulogu u

izgradnji funkcionalnih centromera te je zaključeno da satelitna DNA TFREE predstavlja centromerno kompetentnu DNA vrste *T. freemani*.

U kategoriji 2, srednje zastupljenih centromerno obogaćenih *cluster*-a, nalazimo satelitnu DNA niske vjerojatnosti *cluster*-a 3, monomera dužine 225 pb, obogaćene 17% u fCenH3 frakciji u odnosu na ulazni materijal. Također, u ovoj kategoriji centromernog obogaćena nalazi se i *cluster* 5 koji je prepoznat kao satelitna DNA niske vjerojatnosti, dužine monomera 1106 pb, obogaćenja 19% (Tablica 17).

U kategoriju 2 i 3 centromerno kompetentnih srednje nisko zastupljenih *cluster*-a, pretežno spadaju ponavljajuće sekvence DNA slične ribosomalnim sekvencama DNA 28S rDNA, 18S rDNA i 5.8S (*cluster*-i 35, 50, 79, 101, 127, 200 i 423). Osim što može biti riječ o ponavljajućim DNA nastalim iz dijela nukleotidnih sekvenci ribosomalnih gena, centromerno obogaćenje također može upućivati i na lokalizaciju ribosomalnih gena upravo u područjima funkcionalnih centromera. Također, u kategoriji 3 pronađen je centromerno obogaćen non-LTR retrotranspozon Jockey-1 vrste *T. castaneum* u iznosu od 2,15x. Jedan *cluster* je podudaran sa sekvencom histona H1, dok ostali *cluster*-i dijele homologiju s nekarakteriziranim sekvencama ncRNA i mRNA (Tablica 17).

Tablica 17. Centromerno obogaćene ponavljajuće DNA sekvence vrste *T. freemani*

Kriterij fCenH3-ChIP obogaćenja	Cluster	fCenH3-ChIP pogodci	Pogodci ulaznog materijala	Omjer pogodaka fCenH3-ChIP/ulazni materijal	Vrsta ponavljajuće DNA*
Kategorija 1: fCenH3-ChIP pogodci >250 000 (25%) Omjer pogodaka fCenH3-ChIP/ulazni materijal ≥ 0,75	1	254 964	321 053	0,79	• Satelitna DNA TFREE (Juan i sur., 1993)
	2	346 817	455 143	0,76	• Satelitna DNA TFREE (Juan i sur., 1993)
Kategorija 2: fCenH3-ChIP pogodci >10 000 (1%) Omjer pogodaka fCenH3-	3	119 929	102 448	1,17	• Satelitna DNA utvrđena analizom TAREAN, dužine monomera 225 pb
	5	19 325	16 223	1,19	• Satelitna DNA utvrđena analizom TAREAN, dužine

ChIP/ulazni materijal $\geq 1,0$					monomera 1106 pb
Kategorija 3: fCenH3-ChIP pogodci >100 (0,01%) Omjer pogodaka fCenH3-ChIP/ulazni materijal $\geq 1,75$	35	1025	546	1,88	• 28S rDNA slična ponavljajuća DNA
	50	611	315	1,94	• 5.8S, 28S rDNA slična ponavljajuća DNA
	79	554	287	1,93	• 5.8S, 28S rDNA slična ponavljajuća DNA
	101	304	154	1,97	• 18S rDNA slična ponavljajuća DNA
	120	192	100	1,92	• Pretpostavljeno: ncRNA (LOC107398887) vrste <i>T. castaneum</i>
	127	315	158	1,99	• 28S rDNA slična ponavljajuća DNA
	164	161	87	1,85	• Pretpostavljeno: djelomična mRNA histona H1 (LOC103313679) vrste <i>T. castaneum</i>
	200	202	91	2,22	• 28S rDNA slična ponavljajuća DNA
	224	103	48	2,15	• Non-LTR retrotranspozon Jockey-1 vrste <i>T. castaneum</i>
	227	117	65	1,80	• Pretpostavljeno: neopisana mRNA (LOC107398375) vrste <i>T. castaneum</i>
423	237	116	2,04	• 28S rDNA slična ponavljajuća DNA	

*određeno usporedbom *cluster*-a sa sekvencama pohranjenim u bazama NCBI i Repbase i analizom TAREAN

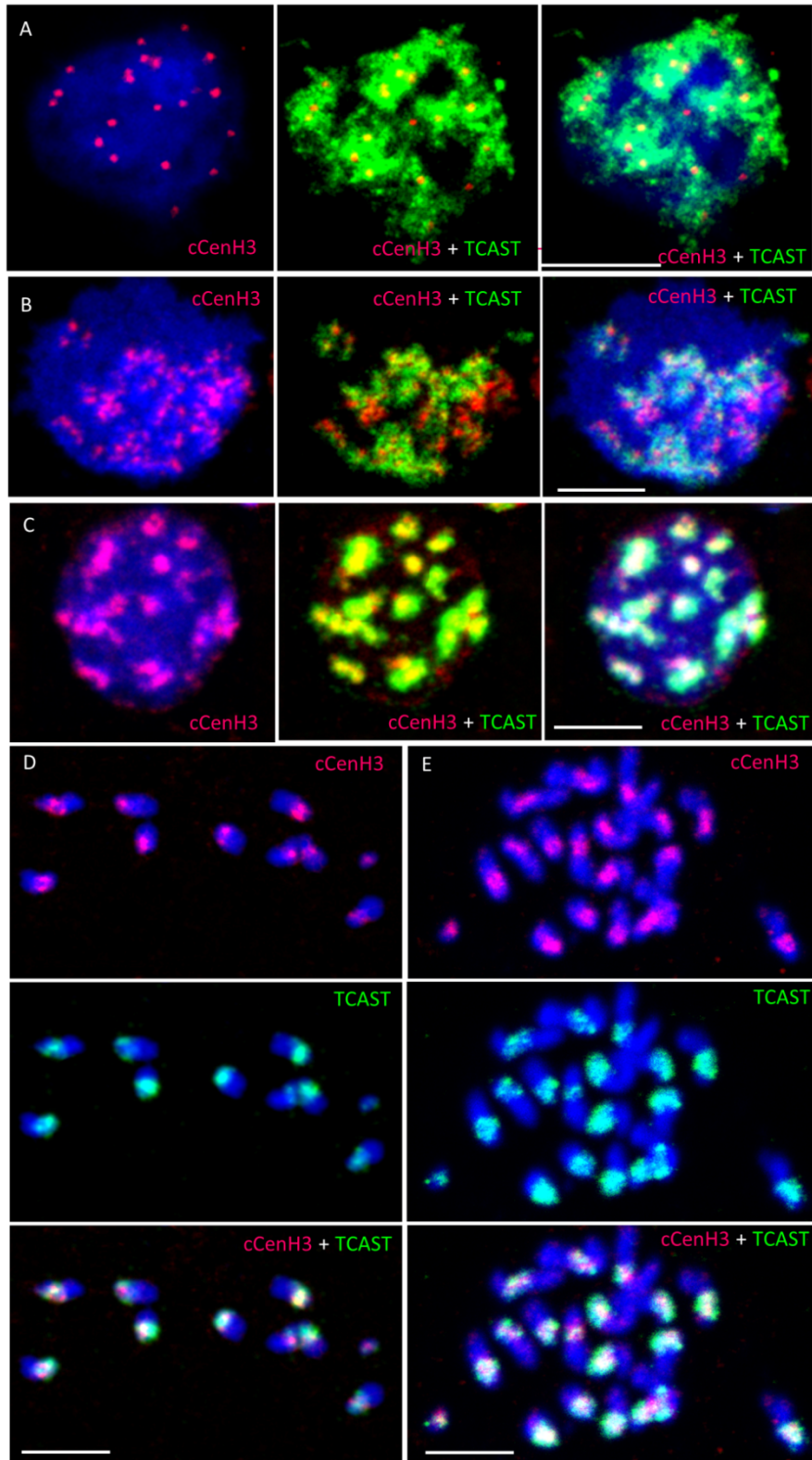
4.5. Citogenetička potvrda centromernih sekvenci DNA u vrstama *T. castaneum* i *T. freemani*

4.5.1. Kolokalizacija proteina cCenH3 i satelitne DNA TCAST vrste *T. castaneum*

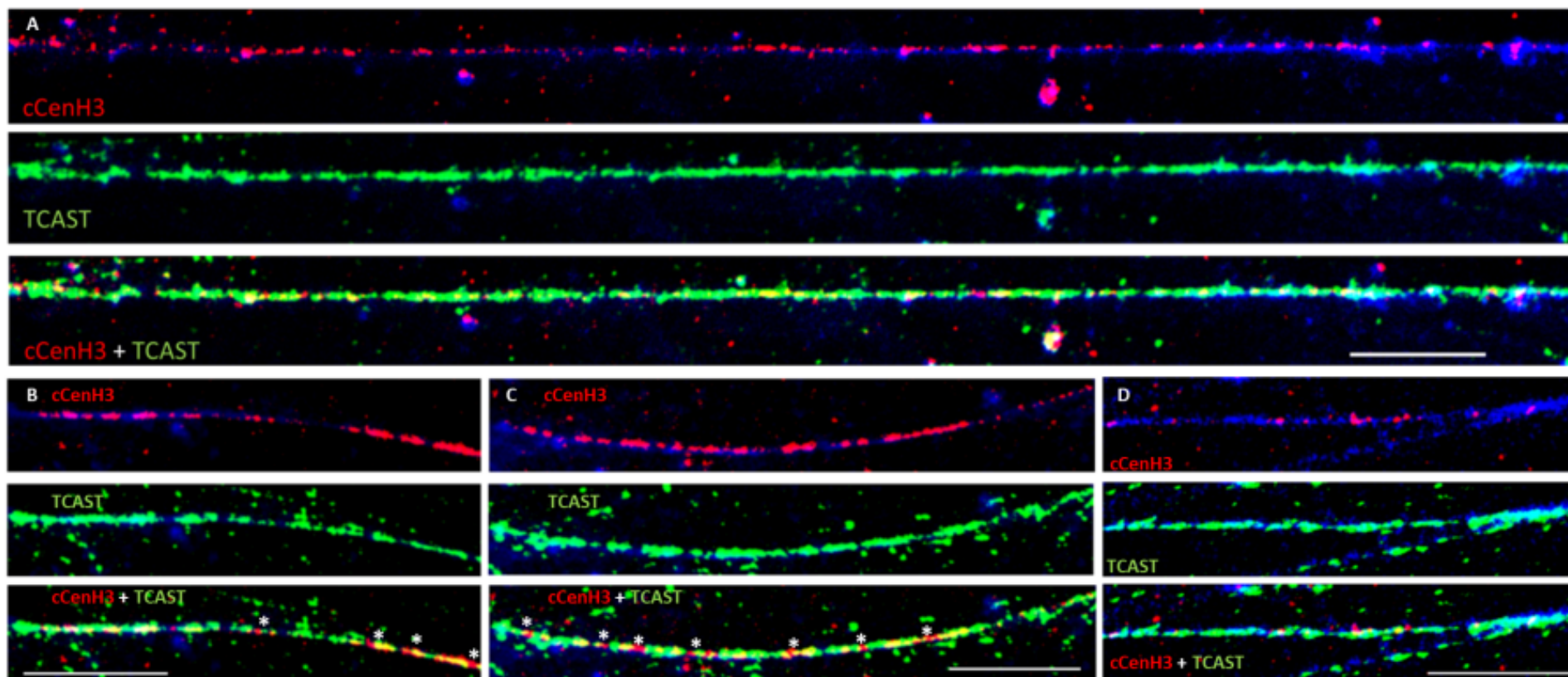
Kombiniranom metodom imunofluorescencije i fluorescencijske hibridizacije *in situ* (IF-FISH) na metafaznim kromosomima vrste *T. castaneum* potvrđena je kolokalizacija centromernog histona cCenH3 i glavne satelitne DNA TCAST. Satelitna DNA TCAST se nalazi na svih 20 kromosoma diploidnih jezgara te zauzima šire regije kromosoma unutar kojih se nalaze centromerna područja s

histonom cCenH3 (Slika 24). Smještaj satelita TCAST u potpunosti prati heterokromatinske regije, a odsutan je u eukromatinskim regijama. S obzirom na uočenu distribuciju satelitne DNA TCAST i njezinu kolokalizaciju s centromernim proteinom cCenH3, moguće je zaključiti da TCAST izgrađuje funkcionalne centromere, ali i da je sastavni dio okolnog, pericentromernog kromatina.

Na izduženim kromatinskim nitima koje omogućavaju veću razlučivost signala, preciznije je utvrđeno podudaranje signala histona cCenH3 i signala TCAST, što potvrđuje da je satelitna DNA TCAST doista centromerno kompetentna sekvenca DNA. Signal TCAST je najčešće intenzivan i kontinuiran s mjestimičnim prekidima, dok se signali histona cCenH3 manifestiraju kao kraći linearni signali sastavljeni od blisko smještenih točkastih fokusa u cCenH3-bogatim regijama (Slika 25A-C). Treba istaknuti da su također opažene kromatinske niti izgrađene od satelitne DNA TCAST, ali u kojima je udio cCenH3 nukleosoma znatno manji (Slika 25D). Moguće je da te kromatinske niti pripadaju pericentromernim regijama ili pak predstavljaju spojne regije između cCenH3-bogatih poteza meta-policentrične građe centromera vrste *T. castaneum*. Na istegnutim kromatinskim nitima uočena su mjesta na kojima signali histona cCenH3 ne kolokaliziraju sa signalima TCAST (Slika 25B i C, bijele zvjezdice), što ukazuje na prisutnost i drugih centromerno zastupljenih sekvenci DNA, kao što je pokazala i analiza CHIP-Seq mapper.



Slika 24. Kolokalizacija proteina cCenH3 i satelita TCAST u različitim staničnim stadijima vrste *T. castaneum*: (A) interfaza, (B-C) profaza, (D) haploidni set metafaznih kromosoma i (E) diploidni set metafaznih kromosoma. Crtica predstavlja 5 μm .

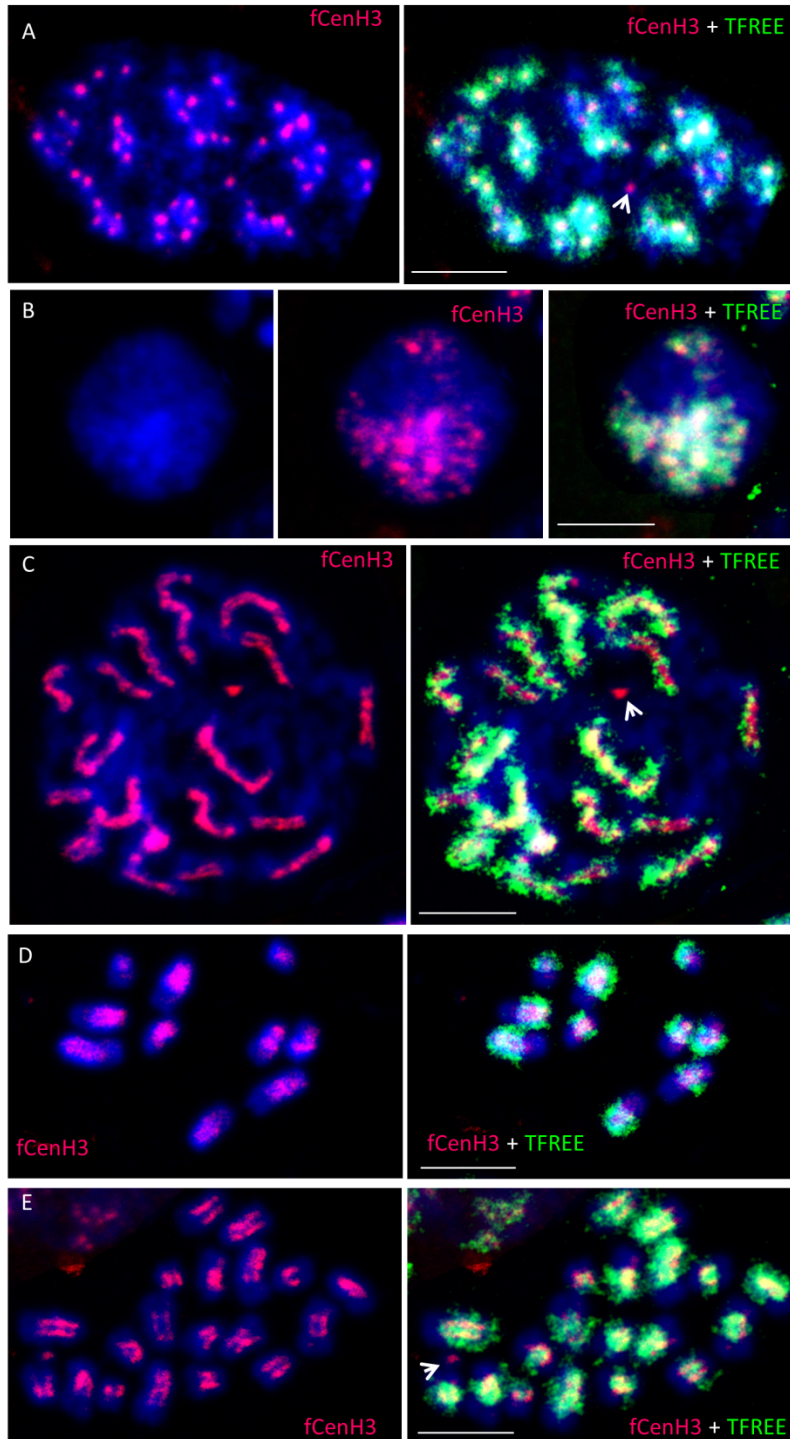


Slika 25. Kolokalizacija proteina cCenH3 (crveni signali) i satelitne DNA TCAST (zeleni signali) na izduljenim kromatinskim nitima vrste *T. castaneum* (paneli A-D). Kromatinske niti obojane su plavom fluorescencijskom bojom DAPI. Na panelima B i C zvjezdicama su označena mjesta gdje se signali cCenH3 ne poklapaju sa signalima satelitne DNA TCAST. Crtica predstavlja 10 μm .

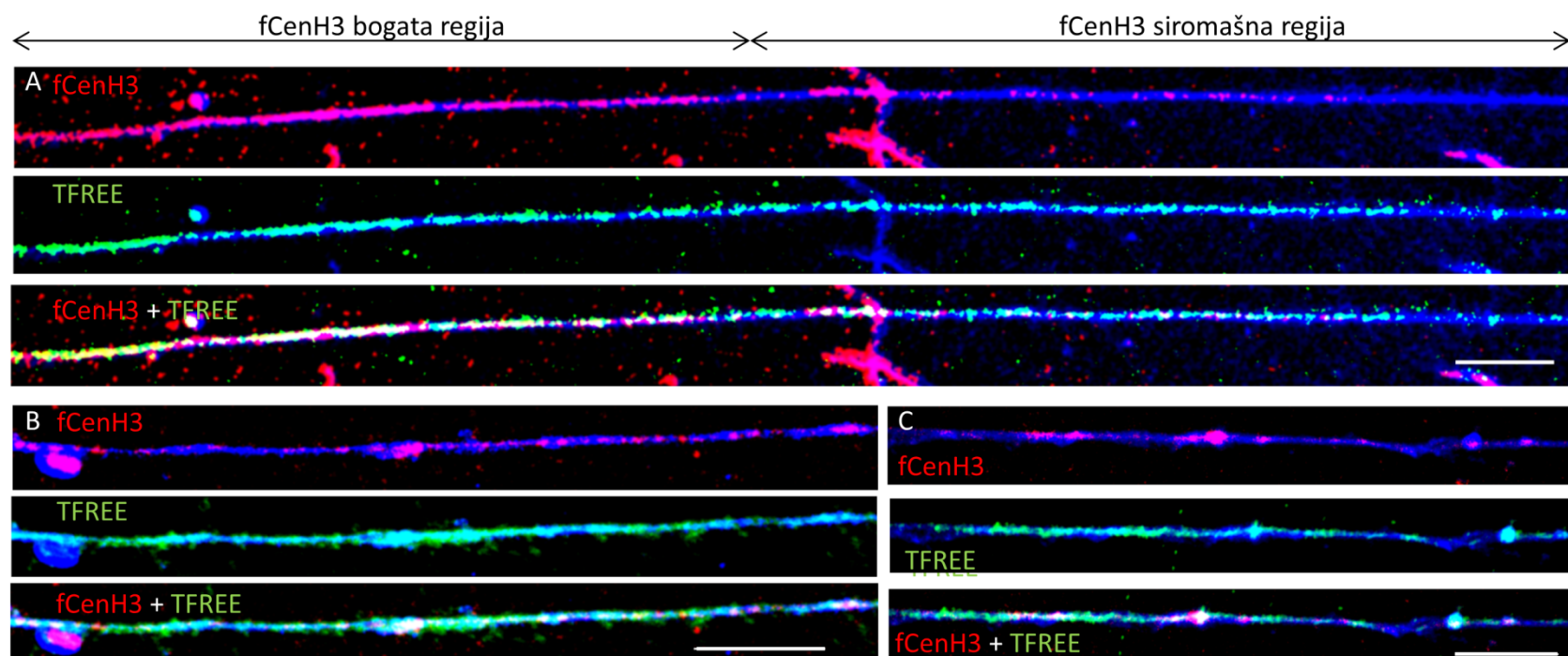
4.5.2. Kolokalizacija proteina fCenH3 i satelitne DNA TFREE vrste *T. freemani*

IF-FISH metodom također je istražen prostorni smještaj proteina fCenH3 u odnosu na centromerno dominantnu sekvencu satelitne DNA TFREE u vrsti *T. freemani* (Slika 26). Preklapanje signala fCenH3 i TFREE dokazano je na svim metafaznim kromosomima osim na kromosomu Y (Slika 26A, C i E, bijela strelica). Satelitna DNA TFREE obuhvaća centromerne regije obilježene prisutnošću centromerog histona fCenH3, no također se širi i u područja pericentromera. Signali satelita TFREE podudaraju se u potpunosti s heterokromatinskim regijama, zauzimajući polovicu većine kromosomima. Uočeno je da kromosom Y ne sadrži signal glavnog satelita pa tako ni u svojim centromernim regijama, što dovodi do zaključka da centromeru kromosoma Y izgrađuje neka druga sekvenca DNA. Upravo centromerni signali kromosoma Y kojima nisu pridružene sekvence glavnog satelita su vjerojatni razlog zašto se na interfaznim i profaznim jezgrama jedan signal fCenH3 ne preklapa sa signalom satelita TFREE (Slika 26A, C i E, bijele strelice). Na slici 26 uočljive su različite faze staničnog ciklusa sa značajno različitom morfologijom signala fCenH3. Na slici 26A centromerni signali su prepoznatljivo točkasti i razmješteni unutar heterokromatinskih područja, dok je na slici 26B prikazana profaza I u kojoj se centromerni signali grupiraju na dva pola stanice. Na slici 26C, prikazan je stadij zigotena profaze I u kojem se centromerni signali fCenH3 povezanih homolognih kromosoma očituju kao dva paralelna izdužena signala na heterokromatinskim regijama. Intenzitet signala satelita TFREE varira između različitih kromosoma, što upućuje na to da su na nekim kromosomima nizovi sastavljeni od satelita TFREE brojniji nego na drugim kromosomima.

Na kromatinskim nitima vrste *T. freemani* potvrđeno je preklapanje signala proteina fCenH3 i signala satelitne DNA TFREE (Slika 27). Signali fCenH3 prisutni u fCenH3-bogatim regijama spajaju se u linearne signale odražavajući kontinuiranu prisutnost fCenH3-nukleosoma. Nasuprot tome, u fCenH3-siromašnim područjima fCenH3 signali manifestiraju se kao odvojeni točkasti signali raspršeni duž kromatinskih niti. Signali satelitne DNA TFREE se najčešće očituju kao kontinuirani signali prisutni duž niti, pri čemu se preklapaju s fCenH3 signalima, ali također zauzimaju i kromatinske regije na kojima fCenH3 signali nisu prisutni (Slika 27, donji paneli). Opaženo dovodi do zaključka da satelit TFREE izgrađuje kako funkcionalne centromere tako i okolni pericentromerni kromatin. Kao i kod vrste *T. castaneum*, ponegdje su prisutni signali proteina fCenH3 bez preklapajućih signala TFREE, što ukazuje na postojanje i drugih centromerno kompetentnih sekvenci DNA, sukladno rezultatima CHIP-Seq mapper analize.



Slika 26. Kolokalizacija proteina fCenH3 i satelita TFREE u različitim fazama staničnog ciklusa vrste *T. freemani*: (A) interfaza, (B) rana profaza I, (C) zigoten, (D) haploidni set metafaznih kromosoma i (E) diploidni set metafaznih kromosoma. Strelice na panelima (A), (C) i (E) označavaju centromeru Y kromosoma. Crtica predstavlja 5 μm.



Slika 27. Kolokalizacija proteina fCenH3 i satelitne DNA TFREE na kromatinskim nitima vrste *T. freemani* (paneli A-C). Crveni signali odgovaraju signalima proteina fCenH3, zeleni odgovaraju signalima satelitne DNA TFREE, a plavo obojenje predstavlja kromatin obojen bojom DAPI. Crtica predstavlja 10 μm .

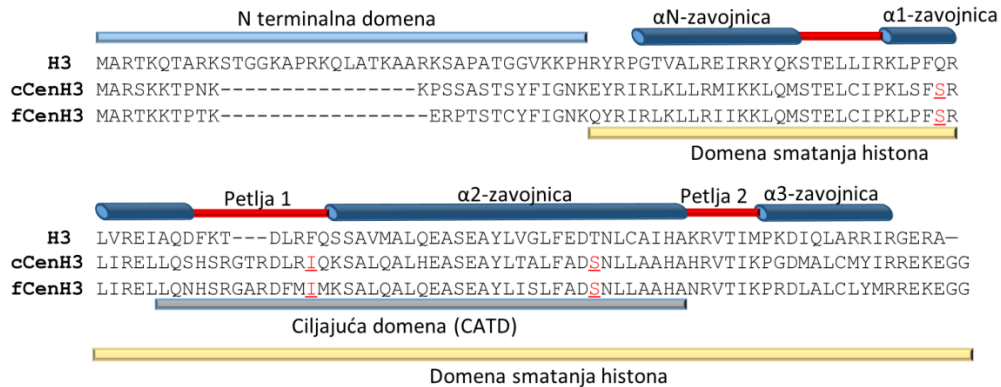
4.6. Usporedba centrokromatinskih komponenata vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*

4.6.1. Usporedba proteina cCenH3 i fCenH3

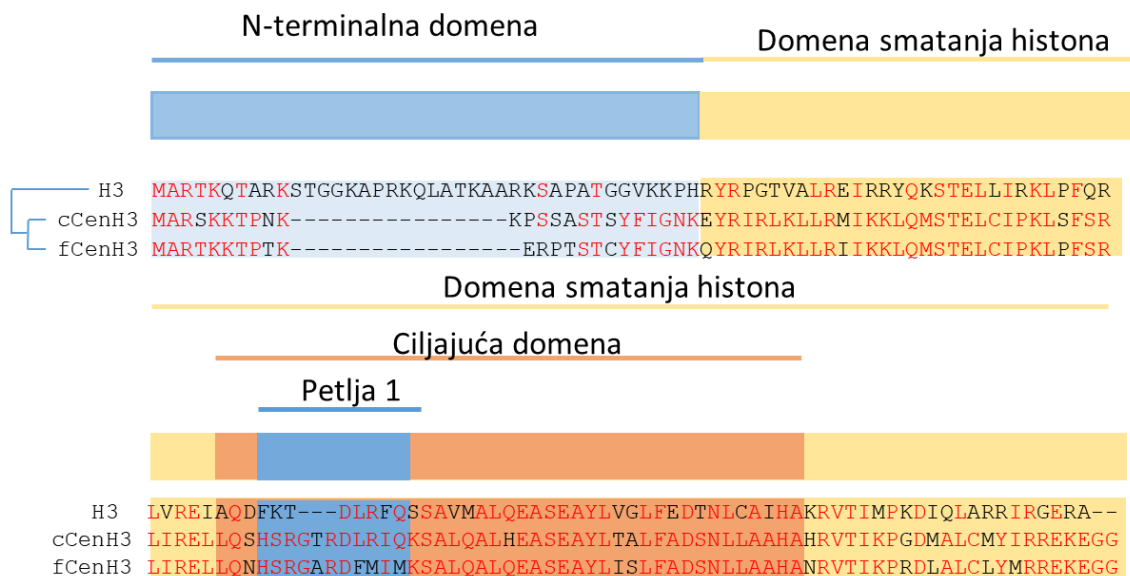
Iako su vrste *T. castaneum* i *T. freemani* blisko srodne, ovim radom je utvrđeno da ne posjeduju identične proteine CenH3. Usporedbom aminokiselinskih sljedova uočene su razlike između centromernih varijanata histona H3 ovih dviju vrsta.

Histoni cCenH3 i fCenH3 spadaju u kategoriju relativno malih proteina i prilično su podudarni u svojoj duljini. Protein cCenH3 je dugačak 125 aminokiselina te mu procijenjena molekulska težina iznosi 14,23 kDa, dok je protein fCenH3 dug 124 aminokiseline i sadrži odgovarajuću molekulska težinu u iznosu od 14,34 kDa (Slika 28). Međusobna sličnost proteinskih sekvenci cCenH3 i fCenH3 iznosi 80,8% (Slika 29). Najveća varijabilnost između proteinskih sekvenci cCenH3 i fCenH3 sadržana je u petlji 1, čija međusobna sličnost iznosi 63,6%, te u N-terminalnoj domeni u iznosu od 66,7% međusobne sličnosti. Relativno konzerviranije domene histona cCenH3 i fCenH3 su ciljajuća domena (CATD) s 81,4% identičnosti i domena smatanja proteina s homologijom od 84,2% (Slika 28 i 29). Usporedbom histona cCenH3 i fCenH3 s kanonskim H3 histonom vrste *T. castaneum*, uočavaju se značajne razlike u aminokiselinskim sljedovima. Uspoređujući cijele proteinske sekvence, cCenH3 dijeli 43,5%, dok fCenH3 dijeli 42% sličnosti s kanonskim histonom H3. N-terminalne domene cCenH3 i fCenH3 su značajno kraće naspram N-terminalne domene histona H3, a njihove duljine iznose 24 aminokiseline (cCenH3) odnosno 23 aminokiseline (fCenH3) u odnosu na 40 aminokiselina N-terminalne domene histona H3. S druge strane, histoni cCenH3 i fCenH3 imaju za 3 aminokiseline dužu petlju 1 naspram petlje 1 histona H3. Promijenjena N-terminalna domena i duža petlja 1 proteina CenH3 tipična su obilježja CenH3 histona i predstavljaju bioinformatičke kriterije za detekciju centromerne varijante H3 (Malik i Henikoff, 2003). Osim razlike u duljini, značajne su i razlike u sličnosti N-terminalnih domena, pri čemu cCenH3 i H3 dijele 18%, a fCenH3 i H3 20% sličnosti između N-terminalnih domena. S druge strane, usporedbom domena smatanja proteina histona CenH3 i H3, pronađena je očuvanija sličnost u sekvenci, koja iznosi 51% između cCenH3 i H3, te 44% između fCenH3 i H3. Još jedan značajan kriterij za utvrđivanje histona CenH3 su 3 dijagnostičke aminokiseline, koje su kod proteina CenH3 vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* promijenjene u odnosu na konzervirane aminokiseline histona H3, glutamin, fenilalanin i treonin na pozicijama 69, 85 i 108 (Slika 28, aminokiseline označene crvenom bojom).

Iz navedenih usporedbi razvidno je da oba proteina CenH3 potječu iz kanonskog histona H3. Uočene međusobne razlike proteina cCenH3 i fCenH3 navode na zaključak da je tijekom evolucije došlo do razvoja vrsno-specifičnih varijanata proteina CenH3 između blisko srodnih vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*.



Slika 28. Usporedba proteinskih sekvence kanonskog histona H3 vrste *T. castaneum* te histona cCenH3 i fCenH3. Na prikazu su označene domene, petlje i zavojnice histona. Crvenim slovima su označene dijagnostičke aminokiseline specifično promijenjene u histonima CenH3.



Usporedba sličnosti histona cCenH3 i fCenH3		cCenH3
fCenH3	Cijeli protein	80,8%
	Domena smatanja proteina	84,2%
	Ciljajuća domena (CATD)	81,4%
	N-terminalna domena	66,7%
	Petlja 1	63,6%

Slika 29. Prikaz komparacije proteinskih sekvenci kanonskog histona H3 vrste *T. castaneum* te histona cCenH3 i fCenH3. Na proteinskih sekvencama crvenom bojom su označene identične aminokiseline između dvije ili sve tri proteinske sekvence. Tablica prikazuje postotke sličnost između histona cCenH3 i fCenH3 te njihovih pojedinih domena.

4.6.2. Usporedba centromernih DNA kod vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*

Eksperimentima kromatinske imunoprecipitacije otkriveno je da centromerni histoni vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* stoje u kontaktu sa širokim spektrom različitih ponavljajućih sekvenci, koje izgrađuju velike regije kromosoma. Centomerne DNA kod vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* sastoje se od sekvenci glavnih satelitnih DNA, dodatnih satelitnih DNA, sekvenci sličnih ribosomalnim DNA i sekvenci retrotranspozona.

U obje vrste u frakciji centromernih DNA dominiraju glavne satelitne DNA, satelitna DNA TCAST u vrsti *T. castaneum*, odnosno satelitna DNA TFREE u vrsti *T. freemani*. Spomenute satelitne DNA ujedno predstavljaju i najzastupljenije sekvence u genomima ovih vrsta (Tablica 18). U samom nukleotidnom slijedu one ne dijele značajniju homologiju te se smatraju vrsno-specifičnim satelitnim DNA. Međutim, u prethodnim studijama utvrđeno je da satelitne DNA TCAST i TFREE sadrže slične strukturne elemente, kao što su udjeli AT baza, AT blokovi i invertna ponavljanja (Ugarković i sur., 1996b). Oba satelita dijele visoke udjele AT baza, monomeri TCAST sadrže udio od 73% AT baza, dok monomeri TFREE sadrže udio od 70,5% AT baza. Obje satelitne DNA u svojim monomerima posjeduju po jedan dugački blok dodatno obogaćen AT bazama. U monomeru TCAST taj blok je dugačak 27 pb i isključivo sastavljen od AT baza, a u monomeru TFREE dugačak je 42 bp, sastavljen od 97% AT baza. AT blokovi dviju satelitne DNA variraju u sekvenci, međutim unutar njih pronalaze se specifični motivi A₃₋₅TA. U blizini AT blokova monomera TCAST i TFREE nalaze se invertna ponavljanja koji mogu formirati sekundarne strukture ukosnice. Invertna ponavljanja u satelitnom monomeru TCAST nalaze se 21 nukleotid uzvodno od AT bloka, a u satelitnom monomeru TFREE nalaze se 26 nukleotida uzvodno od AT bloka.

Tablica 18. Usporedba veličina genoma i količine glavnog satelita vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*

	Veličina genoma	Udio glavne satelitne DNA u genomu	
<i>T. castaneum</i>	204 Mb	17%	(34,68 Mb)
<i>T. freemani</i>	232 Mb	29%	(67,28 Mb)

Usporedbom preostalih centromerno obogaćenih *cluster*-a vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, pronalazi se djelomična homologija između *cluster*-a ili pojedinačnih *contig*-a sa sekvencama sličnim ribosomalnim DNA 18S i 28S (Tablica 19). Iako je u pitanju sličnost koja zahvaća ispodpolovičnu duljinu uspoređivanih sekvenci, ovaj podatak govori da su sekvence slične ribosomalnim DNA svojstvo centromera ovih dviju blisko srodnih vrsta i upućuju na njihovu potencijalnu ulogu u centromernoj funkciji.

Preostale, nisko zastupljene satelitne DNA kao i retrotranspozoni, utvrđeni u centromernim regijama dviju vrsta, ne dijele značajnu sličnost u sekvenci DNA. Međutim, retrotranspozon SARTTc obogaćen u centromerama vrste *T. castaneum* i retrotranspozon Jockey-1 obogaćen u centromerama vrste *T. freemani* pripadaju tipu non-LTR retrotranspozona. Jockey-1 pripada grupi non-LTR retrotranspozona Jockey, dok SARTTc pripada grupi non-LTR retrotranspozona R1 (Fujiwara i sur. 2005). Prisutnost non-LTR retrotranspozona u centromerama vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* upućuje na mogući funkcionalni značaj specifičnog tipa retroelementa u centromernim regijama dviju spomenutih vrsta.

Tablica 19. Blast usporedba centromerno obogaćenih *cluster*-a između vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*.

Cluster vrste <i>T. castaneum</i>	Cluster vrste <i>T. freemani</i>	Međusobna sličnost	Pokrivenost sekvence	Opis sekvenci
CL18	CL35	98,5%	48,45%	Sekvenca slična 28S rDNA
CL14	CL17	99,3%	33,38%	Sekvenca slična 18S rDNA
CL14	CL63	90,6%	30,11%	Sekvenca slična 18S rDNA
CL12 <i>contig</i> 5	CL7 <i>contig</i> 16	79,1%	54,95%	Sekvenca slična 28S rDNA
CL12 <i>contig</i> 4	CL7 <i>contig</i> 16	94,4%	32,58%	Sekvenca slična 28S rDNA
CL12 <i>contig</i> 3	CL7 <i>contig</i> 16 CL50 <i>contig</i> 1 CL79 <i>contig</i> 1	98,1% 99,7% 99%	30,56% 21,52% 24,48%	Sekvenca slična 28S rDNA

5. RASPRAVA

Centromere predstavljaju strukturalna i funkcionalna središta eukariotskih kromosoma. Uslijed svoje važnosti, no i zbog epigenetički definiranog položaja i održavanja, centromere spadaju među najinformativnije kromosomske regije, čije istraživanje nosi niz metodoloških izazova. Primarni cilj ovog rada bio je istražiti strukturne komponente centromernog kromatina sestričkih vrsta kukaca brašnara *T. castaneum* i *T. freemani*.

Istraživanje proteinskih i DNA centromernih komponenata ovih dviju vrsta započeto je identifikacijom potencijalnih centromernih varijanata histona H3. Iako proteini CenH3 često variraju i između blisko srodnih vrsta, prema dosadašnjoj znanstvenoj literaturi još uvijek se smatraju najpouzdanijim biljezima centromernog identiteta (McKinley i Cheeseman, 2016). Vodeći se bioinformatičkim kriterijima definiranim za detekciju histona CenH3 *in silico* (Malik i Henikoff, 2003), u genomima vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* utvrđene su po jedna kopija gena potencijalnih proteina CenH3. Bioinformatički etablirani kriteriji podrazumijevaju univerzalne razlike između kanonskih histona H3 i njihovih centromernih inačica: duža petlja 1 (prva petlja u domeni smatanja histona) histona CenH3 u odnosu na H3, varijabilnost N-terminalne domene u duljini i sastavu te tri specifične sačuvane aminokiseline u histonu H3 koje su zamijenjene drugim aminokiselinama u histonu CenH3 (Drinnenberg i sur., 2014). Aminokiselinski sljedovi proteina cCenH3 i fCenH3 ispunjavaju sve navedene kriterije. Dužine histona cCenH3 odnosno fCenH3 iznose 125, odnosno 124 aminokiseline, što ih svrstava među najmanje histone CenH3, u usporedbi s drugim istraživanim vrstama. Primjerice, duljina humanog CENP-A iznosi 140 aminokiselina (Earnshaw i Rothfield, 1985), histona CenH3 vrste *A. thaliana* iznosi 178 aminokiselina (Talbert i sur., 2002), CenH3 vrste *D. melanogaster* 225 aminokiselina (Henikoff i sur., 2000), CenH3 vrste *S. cerevisiae* 229 aminokiselina (Meluh i sur., 1998), a histon CenH3 vrste *C. elegans* 288 aminokiselina (Buchwitz i sur., 1999). Literaturno je poznato da duljine N-terminalnih domena histona CenH3 variraju između filogenetski udaljenih skupina organizama u rasponu od 20 do 200 aminokiselina, a mogu biti duže ili kraće od N-terminalnih domena histona H3 (Henikoff i sur., 2001). Tako primjerice, N-terminalna domena histona CenH3 vrste *A. thaliana* iznosi 78 aminokiselina, što ju čini dužom od N-terminalne domene kanonskog histona H3 čija dužina iznosi 39 aminokiselina (Talbert i sur., 2002, Wang i sur., 2011). Vrsta *S. cerevisiae* ima značajno dužu N-terminalnu domenu histona CenH3 u iznosu od 135 aminokiselina, u usporedbi s N-terminalnom domenom histona H3 koja sadrži 40 aminokiselina (Keith i sur., 1999). U vrstama *T. castaneum* i *T. freemani* N-terminalne domene histona CenH3 dugačke su samo 24, odnosno 23 aminokiseline, što je 16, odnosno 17 aminokiselina kraća sekvenca od N-terminalne domene histona H3. Premda su kratke N-terminalne domene proteina cCenH3 i fCenH3 limitirale izbor mogućih epitopa za stvaranje protutijela, specifična protutijela protu-cCenH3 i protu-fCenH3 uspješno

su producirana. Iz aspekta homologije, N-terminalne domene histona CenH3 vrsta *T. freemani* i *T. castaneum* u usporedbi s N-terminalnom domenom histona H3 dijele vrlo malo sličnosti u proteinskoj sekvenci, 18% između cCenH3 i H3 te 20% između fCenH3 i H3. S druge strane, domene smatanja proteina dijele značajno veću sličnosti u slijedu, u iznosu od 51% između cCenH3 i H3, te 44% između fCenH3 i H3. Navedeni postotci sličnosti u skladu su sa smanjenom sličnošću N-terminalnih domena histona CenH3 i H3 te sličnošću domena smatanja proteina CenH3 i H3 u rasponu od 35-50%, opaženima u različitim skupinama organizama (Malik i Henikoff, 2001). Sljedovi histona H3 filogenetski udaljenih organizama pokazuju značajnu očuvanost sekvence i duljine N-terminalne domene, u skladu s velikom konzerviranošću histona (Henikoff i sur., 2001). Nasuprot tome, usporedbom histona CenH3 između različitih skupina organizama uočene su značajne razlike u sekvenci, posebice u sekvenci i duljini N-terminalnih domena, što upućuje na brzu evoluciju ovog proteina. Usporedba aminokiselinskih sljedova cCenH3 i fCenH3 pruža dodatan uvid u dinamiku evolucije histona CenH3 blisko srodnih vrsta. Naime, ovo istraživanje je pokazalo da su najbrže evoluirajuće domene histona cCenH3 i fCenH3 upravo N-terminalne domene i petlje 1. N-terminalne domene dijele 66,7% homologije, dok petlje 1 dijele 63,6% homologije, što pokazuje značajnu različitost aminokiselinskih sljedova između vrsta koje su se evolucijski odvojile prije 12-47 milijuna godina (Angelini i Jockusch, 2008). Komparacija proteina Cid (proteina CenH3 kod vrsta roda *Drosophila*) kod dvije blisko srodne vrste *D. melanogaster* i *D. simulans*, koje su se razdvojile prije samo dva milijuna godina, također je pokazala značajnu varijabilnost u N-terminalnoj domeni i petlji 1 (Malik i Henikoff, 2001). Dodatno je utvrđeno da su opažene nesinonimne mutacije u dvijema navedenim domenama proteina Cid dviju spomenutih vrsta, rezultat pozitivne selekcije odnosno adaptivne evolucije histona CenH3. Pretpostavlja se da opažene adaptivne promjene proteina Cid utišavaju centromerni „drive“. Također, analizom histona CenH3 u vrstama *A. thaliana* i *Arabidopsis arenosa* utvrđene su adaptivne promjene u N-terminalnoj domeni, međutim, adaptivne promjene nisu pronađene u domeni smatanja proteina, dok su u drugim ispitivanim vrstama iz skupine *Brassicaceae* utvrđene adaptivne promjene u obje navedene domene (Cooper i Henikoff, 2004). Budući da je petlja 1 u direktnoj interakciji s nukleosomalnom DNA, pretpostavlja se da je njezina adaptivna evolucija povezana s evolucijom centromerne DNA (Malik i Henikoff, 2001). Pretpostavlja se također da brza evolucija CenH3, u prvom redu petlje 1, utječe na smanjenje afiniteta vezanja proteina CenH3 za centromernu DNA povećanih centromera, a favorizira vezanje za centromernu DNA manjih centromera (Henikoff i sur., 2001). Na taj način se utišava centromerni „drive“ i sprječavaju posljedično negativni efekti poput neplodnosti mužjaka i poremećenog omjera spolova (Fishman i Saunders, 2008, Malik, 2009, Wallace i sur., 2002). Valja također spomenuti da geni za histone cCenH3 i fCenH3 ne sadrže

introne u svome sastavu. Nukleotidni zapis bez introna utvrđen je i u genima koji kodiraju histone Cid kod vrsta roda *Drosophila* (Malik i Henikoff, 2001). S druge strane, u biljnom rodu *Gossypium* histoni CenH3 sadrže 7 eksona i 6 introna, a takva kompozicija omogućuje alternativno izrezivanje (eng. *alternative splicing*) N-terminalne domene (Masonbrink i sur., 2014). Smatra se da upravo mehanizam alternativnog izrezivanja utječe na različite finalne sljedove histona nekih CenH3 kod spomenutog roda i može biti odgovor na brzu evoluciju centromerne DNA. Kod većine vrsta komaraca pronađena su dva paralogna gena *CenH3* (Kursel i sur., 2020), a kod većine vrsta roda *Drosophila* postoje dva ili tri paraloga ovog gena (Teixeira i sur., 2018). Navedeni paralozi histona CenH3 komaraca evoluirali su pod različitim selektivnim pritiscima, koji su utjecali na njihovu specijalizaciju u izvršavanju različitih uloga u tjelesnim i spolnim stanicama. Paralog *mosqCid1* koji je eksprimiran u somatskim stanicama, podvrgnut je pozitivnom selektivnom pritisku, dok paralog *mosqCid2* koji je eksprimiran u germinativnim stanicama nije pod utjecajem adaptivne evolucije (Kursel i sur., 2020). Na temelju tog opažanja se pretpostavlja da je somatska centromerna funkcija zadužena za prigušivanje negativnih učinaka centromernog „drive“-a.

Analizom CenH3-ChIP-Seq baza podataka vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* utvrđene su ponavljajuće sekvence DNA dominantno obogaćene u centromernim regijama. U obje vrste glavne satelitne DNA, TCAST i TFREE, čine značajni udio izolirane centromerne frakcije DNA. Glavna satelitna DNA TCAST *cluster-a 2* pokazuje 15% centromernog obogaćenja, što je relativno mala razina obogaćenja u usporedbi s razinama centromernih obogaćenja dobivenim u analizama CenH3-ChIP biljne vrste *P. sativum*. Naime, kod vrste *P. sativum* utvrđeno je 13 satelitnih DNA centromerno obogaćenih u usporedbi s ulaznim materijalom u iznosu od 5x do 102,9x (Neumann i sur., 2012). Razlog niskoj razini obogaćenja TCAST i TFREE može biti izrazito visoki udjeli glavnih satelitnih DNA u genomima vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* te izrazito visoki udjeli ovih satelitnih DNA u ulaznom kromatinu ChIP eksperimenta. Visoka zastupljenost glavnih satelitnih DNA, koje čine 17% genoma u vrsti *T. castaneum* i 31% genoma u vrsti *T. freemani*, smanjuje mogućnost detektiranja tih satelita kao višestruko centromerno obogaćenih sekvenci u metodi ChIP. Naime, prema teoretskom razmatranju, kada bi se centromerne frakcije vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* sastojale isključivo od sekvenci glavnog satelita, ChIP obogaćenje za TCAST iznosilo bi maksimalno 5-6x, dok bi TFREE ChIP obogaćenje moglo biti maksimalno 3x. Također, poznato je iz ranijih literaturnih navoda da satelitne DNA TCAST i TFREE, uz centromerne, zauzimaju pericentromerne regije (Ugarković i sur., 1996b, Juan i sur., 1993). To znači da tek jedan dio sekvenci glavnih satelitnih DNA, koji izgrađuje funkcionalne centromere, može biti učinkovito imunoprecipitiran protutijelima protu-CenH3, što može utjecati na stopu centromernog obogaćenja. Tu pretpostavku podupire činjenica da je samo 35% nizova α -satelitne DNA prisutno u humanim centromerama, dok ostatak izgrađuje

heterokromatinske regije (Lam i sur., 2006, Mravinac i sur., 2009, Sullivan i sur., 2011, Bailey i sur., 2016). Nadalje, funkcionalne centromere sadrže i nukleosome s kanonskim histonima H3 pa je tako u humanim epitelnim, pigmentnim stanicama mrežnice utvrđeno da CENP-A zauzima tek 4% nukleosoma u centrokromatinu (Bodor i sur., 2014). Takva kompozicija centrokromatina smanjuje broj nukleosoma funkcionalnih centromera koje se mogu imunoprecipitirati protutijelom protu-CenH3, što potencijalno također smanjuje razine CHIP obogaćenja centromernih ponavljajućih sekvenci DNA. U skladu s navedenim opažanjima, kod vrste *D. melanogaster* je pokazano da je visoko zastupljena satelitna DNA Prodsat smanjeno centromerno obogaćena u odnosu na satelitnu DNA AATAG, iako je satelit Prodsat sedam puta zastupljeniji u CenH3-CHIP frakciji od satelita AATAG (Talbert i sur., 2018). Stoga autori spomenutog rada naglašavaju da je prilikom određivanja centromerno kompetentnih sekvenci, uz relativno CHIP obogaćenje, potrebno uzeti u obzir i zastupljenost satelitne DNA u CenH3-CHIP frakciji. Sukladno tome, iako satelitna DNA TFREE u analizi CHIP-Seq mapper ne pokazuje centromerno obogaćenje, analizirajući samostalno fCenH3-CHIP frakciju DNA, utvrđeno je da TFREE zauzima značajan udio od 60,1% ukupne frakcije. Uzevši sve navedeno u obzir, satelitna DNA TFREE je proglašena centromerno kompetentnom sekvencom vrste *T. freemani* s dodatno potvrđenom kolokalizacijom histona fCenH3 i satelitne DNA TFREE na metafaznim kromosomima i kromatinskim nitima metodom IF-FISH. Isto tako, satelitna DNA TCAST s 15% centromernog obogaćenja je proglašena centromerno kompetentnom DNA sekvencom vrste *T. castaneum*, što je i potvrđeno kolokalizacijom histona cCenH3 i satelitne DNA TCAST na metafaznim kromosomima i kromatinskim nitima. Rezultati metode IF-FISH potvrdili su da satelitne DNA TCAST i TFREE zauzimaju uz područja funkcionalnih centromera također i pericentromerne regije, što je u skladu s lokalizacijom ovih satelitnih DNA u prijašnjim radovima (Ugarković i sur., 1996b, Juan i sur., 1993).

Satelitna DNA TCAST je detaljno istražena u literaturi, pri čemu je utvrđena varijabilnost u sastavu i duljini nukleotidnih sekvenci satelitnih monomera, prema kojoj su TCAST monomeri kategorizirani u 5 potporodica (Pavlek i sur., 2015). Također, utvrđena je i HOR organizacija glavne satelitne DNA TCAST, u neposloženim dijelovima genoma (Vlahović i sur., 2017). Analizirani HOR monomeri izgrađeni su od divergentnih monomera TCAST, a također sadrže i segmente nehomolognih sekvenci DNA. U ovom radu, analiza centromerno obogaćenog *cluster-a* 2 TCAST pokazala je homologiju sa svih pet potporodica TCAST. Takav rezultat navodi na zaključak da satelitni nizovi TCAST koji izgrađuju funkcionalne centromere sadrže heterogeni sastav različitih potporodica TCAST. Navedena organizacija je karakteristična za centromerne HOR monomere α -satelita, koji u svom sastavu često imaju divergentne monomere α -satelita, naspram visoko konzerviranih HOR monomera α -satelita (Schueler i Sullivan,

2006). Glavne satelitne DNA centromera vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, TCAST i TFREE, ne dijele homologiju u nukleotidnoj sekvenci niti sličnost u monomernoj duljini. U literaturi su poznati primjeri blisko srodnih vrsta, kao što su *D. melanogaster* i *D. simulans* koje također ne dijele homologiju u sastavu centromernih satelitnih DNA (Chang i sur., 2019, Talbert i sur., 2018). Vrsta *D. simulans* sadrži nizove kompleksnijih satelitnih DNA s dužim monomerima u centromernim regijama, dok vrsta *D. melanogaster* pretežito sadrži nizove jednostavnih i kratkih monomera satelitnih DNA.

U ovom istraživanju, još se jedna satelitna DNA vrste *T. castaneum* pokazala kao centromerno kompetentna, s razinom obogaćenja od 36%, a riječ je satelitnoj DNA Cast6. Satelitna DNA Cast6, monomerne duljine oko 180 pb, inicijalno je pronađena u eukromatinu gdje čini udio od 0,018% genoma, dok procijenjeni udio Cast6 u čitavom genomu iznosi 0,5% (Pavlek i sur., 2015). Nameće se zaključak da je veći udio postojećih nizova Cast6 smješten u zasad nesposloženim dijelovima genoma, koji primarno uključuju (peri)centromerne regije. Eksperimentom dvostrukog FISH-a, koji je uključivao lokalizaciju satelitnih DNA TCAST i Cast6, dokazano je da Cast6 kolokalizira s centromernim kromatinom barem jednog kromosoma (Pavlek i sur., 2015). Iz spomenutog proizlazi zaključak da satelitna DNA Cast6, ako i nije sastavni dio centromera svih kromosoma vrste *T. castaneum*, svakako pridonosi centromernom kromatinu barem nekih od njih. Sličan obrazac je opažen kod pojedinih vrsta biljnog tribusa Fabeae kod kojih su pojedine satelitne porodice (FabTR-1 i FabTR-12) prisutne samo na centromerama jednog ili dva para kromosoma, a također su pronađene i na necentromernim lokacijama na kromosomima (Robledillo i sur., 2020).

U literaturi se satelitne DNA navode kao glavne komponente funkcionalnih centromera, međutim utvrđeno je da su i mobilni elementi, u prvom redu retrotranspozoni, važni sastavni elementi centromera (Plohl i sur., 2014). Većina retrotranspozona nema preferenciju za određenu sekvencu DNA prilikom ugradnje, dok se manji udio retrotranspozona specifično integrira u određene sljedove DNA, na primjer u ribosomalne DNA ili telomerne nizove (Kojima i Fujiwara, 2003, Fujiwara i sur., 2005) U vrsti *T. castaneum* detektiran je non-LTR retrotranspozon SARTTc kao centromerno obogaćena sekvenca DNA. Zanimljivo, SARTTc je u literaturi opisan kao retrotranspozon koji se preferencijalno ugrađuje u telomerne ponavljajuće sljedove TCAGG vrste *T. castaneum* (Osanai-Futahashi i Fujiwara, 2011). Pretraživanjem posloženih i neposloženih dijelova genoma vrste *T. castaneum* u sklopu ovog istraživanja, SARTTc je pronađen isključivo u neposloženim sljedovima i to u blizini TCAGG ponavljajućih nizova, koji potencijalno mogu predstavljati centromerne intersticijalne telomerne sekvence (ITS). Iako su u literaturi ITS-ovi većinom detektirani u pericentromernim područjima, u vrstama roda *Solanum* koje

uključuju rajčicu, krumpir i patlidžan, ITS-ovi su pronađeni u područjima funkcionalnih centromera (He i sur., 2013). Kod vrste *T. freemani* utvrđeno je da je non-LTR retrotranspozon Jockey-1 vrste *T. castaneum* centromerno obogaćen. Zanimljivo, u vrsti *D. melanogaster*, također su centromerno obogaćeni non-LTR retroelementi iz obitelji Jockey (G2/Jockey-3, Doc-2 i Jockey-1), od kojih je G2/Jockey-3 prisutan u centromerama svih kromosoma (Chang i sur., 2019). Blisko srodna vrsta *D. simulans* također u svojim centromerama sadrži G2/Jockey-3, što ukazuje na očuvanost ovog retrotranspozona u centromerama dviju blisko srodnih vrsta. Općenito, brojni su dokazi prisutnosti upravo non-LTR retrotranspozona u funkcionalnim centromerama životinjskih vrsta, primjerice u šišmišu *Phyllostomid*, gibonu *Hoolock leuconedys* te čovjeku (Carbone i sur., 2012, de Sotero-Caio i sur., 2017, Miga i sur., 2014).

Sekvence slične ribosomalnim DNA 18S, 28S i 5.8S također su pronađene kao centromerno obogaćene u vrstama *T. castaneum* i *T. freemani*. U literaturi je opisana prisutnost ribosomalnih sekvenci u centromernim regijama u tri različite organizacije: funkcionalni *cluster*-i ribosomalnih gena, zatim pseudogeni ribosomalnih DNA odnosno nefunkcionalne kopije ribosomalnih gena te satelitne DNA koje dijele homologiju s ribosomalnim DNA (Robicheau i sur., 2017, Tong i sur., 2019, Vittorazzi i sur., 2011). Tako su u blizini humanih centromera detektirani ribosomalni pseudogeni (Robicheau i sur., 2017), dok se satelitna DNA porijeklom iz sekvence 5S rDNA nalazi se u centromernim regijama kod žabe *Physalaemus curiveri* (Vittorazzi i sur., 2011). Nadalje, u vrsti *D. melanogaster*, specifično na jednom kromosomu, pronađen je centromerno obogaćen uzastopno ponavljajući slijed ribosomalne intergenske razmaknice (eng. *intergenic spacer of the ribosomal genes*, IGS) (Chang i sur., 2019). U centromerama biljke *Panicum virgatum* utvrđena je intaktna kopija regije NTS i gena 5S rDNA, koji zadržava svoju kodirajuću funkciju (Yang i sur., 2018). 5S rDNA se također navodi kao konzervirana centromerna sekvenca između dviju blisko srodnih vrsta kvasaca *Schizosaccharomyces octosporus* i *Schizosaccharomyces cryophilus* (Tong i sur., 2019). Iako je iz kratkih očitavanja CenH3-ChIP frakcija vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* teško odrediti jesu li centromerno obogaćene ribosomalne sekvence pseudogeni ili intaktne funkcionalne kopije ribosomalnih gena, moguće je pretpostaviti da su sekvence slične ribosomalnim DNA konzervirane u centromernim regijama dviju spomenutih blisko srodnih vrsta, što može upućivati na njihov potencijalni funkcionalni značaj.

Sljedovi centromernih sekvenci DNA svih kromosoma vrste *D. melanogaster* rekonstruirani su pomoću sekvenciranja dugih sljedova DNA u kombinaciji s CenH3-ChIP sekvenciranjem kratkih očitavanja (Chang i sur., 2019). Najnovije spoznaje sastava centromerne DNA vrste *D. melanogaster* ukazuju da je 70%

centromerne DNA sastavljeno od kompleksne sekvence DNA, koja uključuje više vrsta satelitnih DNA i obogaćenu prisutnost non-LTR retroelemenata. Takvi otoci komplekse DNA okruženi su nizovima jednostavnih monomera satelitnih DNA. Iako kratkim Illumina ChIP-Seq očitajima nije bilo moguće rekonstruirati slijed funkcionalnih centromera vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, analizom ChIP-Seq mapper rezultata također je utvrđena značajna heterogenost ponavljajućih DNA u centromerama, koja obuhvaća satelitne DNA, non-LTR retrotranspozone i ribosomalne DNA kao centromerno obogaćene sekvence. Heterogene odnosno kompleksne centromere, koje nisu isključivo sastavljene od nizova satelitne DNA pronađene su i u kukuruзу (*Zea mays mays*) (Liu i sur., 2020). Manji broj centromera kukuruza sastavljen je od dugačkih nizova satelitne DNA CentC s visokim udjelom polimorfizma sekvence. Međutim, tri centromere ne sadrže satelitnu DNA CentC, već se sastoje od raznolikih transpozonskih elemenata. Osim toga, utvrđeno je da retrotranspozoni u prosjeku zauzimaju 31% centromera kukuruza, a nalaze se unutar nizova satelitne DNA CentC.

Strukturna organizacija centromernih regija, istraživana citogenetičkim metodama, pokazuje da su centromere vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*, značajno izduženije od tipičnih centromera monocentričnih kromosoma. Kromosomska distribucija proteina CenH3 otkrila je nekoliko zasebnih domena (najčešće 3-5) na vanjskim stranama primarne konstrikcije kromosoma. Na ponekim metafaznim pločama, centromerne domene optički se stapaju u jedinstvene linearne signale. Slična centromerna struktura s 3-5 uzduž poredanih domena opažena je kod biljnih vrsta roda *Pisum* i *Lathyrus* iz tribusa Fabeae (Neumann i sur., 2012, Neumann i sur., 2015, Neumann i sur., 2016). Autori su takav tip centromera nazvali meta-policentričnim, pretpostavivši da je riječ o centromerama koje bi mogle biti evolucijski intermedijer između monocentrične i holocentrične organizacije. Osim distinktivne centromerne organizacije meta-policentričnih kromosoma, kod vrsta roda *Pisum* i *Lathyrus* utvrđeno je postojanje dva paralogna gena *CenH3*, dupliciranih u ancestralnom pretku tribusa Fabeae (Neumann i sur., 2015). U meta-policentričnim subdomenama jedan paralog histona CenH3 je dominantno prisutan, dok je drugi zastupljen tek manjim udjelom. Međutim, oba paralogna proteina CenH3 kolokaliziraju u centromernim subdomenama. Zanimljivo, kod druga dva roda iz tribusa Fabeae, *Vicia* i *Lens*, koji sadrže klasičnu monocentričnu organizaciju centromera, jedan od dva paraloga *CenH3* je utišan ili je deletiran. Holocentričnost se u literaturi povezuje s duplikacijom gena *CenH3* (Marques i sur., 2015, Momen i sur., 2005, Oliveira i sur., 2020), stoga navedena opažanja u tribusu Fabeae također navode na pretpostavku da je meta-policentričnost produkt duplikacije gena *CenH3*. Međutim, utvrđene su i duplikacije gena *CenH3* u striktno monocentričnim vrstama (Kawabe i sur., 2006, Kursel i Malik, 2018). Stoga se evolucija meta-policentričnosti ne može pripisati isključivo povećanju količine histona CenH3 kao rezultatu

duplikacije gena. Budući da je u genomskim bazama podataka vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* pronađena samo jedna kopija gena *CenH3* za svaku vrstu, uzroci evolucije meta-policentričnosti u dvije navedene vrste nisu povezani s duplikacijom gena *CenH3*. S druge strane, hipotetski bi meta-policentričnost mogla evoluirati kroz fuzije kromosoma, poznatije kao Robertsonian središnje fuzije, koje ultimativno dovode do povećanja centromernih regija. Pokazano je da se fuzijski kromosomi s povećanim centromerama preferentno nasljeđuju u ženskoj mejozi kod čovjeka i u sojevima miševa s metacentričnim kariotipovima (Rosin i Mellone, 2017). Međutim, diploidan broj od 20 kromosoma, konzervirano je svojstvo reda Coleoptera, pa tako i u vrstama *T. castaneum* i *T. freemani*. Stoga nije za pretpostaviti da bi potencijalni robusni evolucijski rearanžmani u vidu spajanja nehomolognih kromosoma mogli biti uzrok povećanim centromernim regijama ovih dviju vrsta. Potencijalni alternativni mehanizam evolucije vrsno-specifičnih centromera blisko srodnih vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* predstavlja repozicioniranje centromera kojim ne dolazi do promjene broja kromosoma. Repozicioniranje centromera se odnosi na nastanak neocentromera na novim lokacijama na kromosomima, često bogatim AT sljedova, koje potom intenzivno nakupljaju ponavljajuće DNA, uključujući satelitne DNA i retrotranspozone (Bracewell i sur., 2019, McKinley i Cheeseman, 2016). Navedenim procesom sazrijevanja nastaju evolucijski nove centromere, dok se izvorne (peri)centromerne regije inaktiviraju i posljedično sažimaju gubitkom repetitivnih ponavljanja. Kod krumpira *Solanum tuberosum* opažene su dvije vrste centromera, centromere izgrađene od ponavljajućih DNA i centromere izgrađene od jedinstvenih sekvenci DNA (Gong i sur., 2012). Pretpostavlja se da su neocentromere krumpira sazrijevale nakupljanjem satelitnih DNA i postale centromere temeljene na ponavljajućim DNA. Centromerno repozicioniranje je utvrđeno kod vrsta grupe *Drosophila obscura*, koje su zadržale isti diploidni broj kromosoma, međutim citogenetički je uočena razlika između vrsta kromosoma s obzirom na poziciju centromera, što ukazuje na evolucijske tranzicije iz ancestralno telocentričnih kromosoma u metacentrične kromosome (Bracewell i sur., 2019). Takve tranzicije se mogu objasniti i inverzijom pericentromera, međutim, komparativna analiza genskih markera homolognih kromosoma između vrsta grupe *D. obscura*, ne upućuje na promjene rasporeda gena koje su tipična posljedica procesa inverzije pericentromera. U grupi *D. obscura*, glavne satelitne DNA koje se nalaze obogaćene u (peri)centromernim područjima specifične su za svaku filogenetsku subgrupu. Vrsta s ancestralnim, telocentričnim kromosomima *D. subobscura*, sadrži centromerno lokaliziranu satelitnu DNA monomerne dužine 12 bp. Uslijed visoke homogenosti, nizovi navedene satelitne DNA se nisu mogli uspješno bioinformatički posložiti. Kao obrazloženje navodi se da su starije centromere homogenije u sastavu, što otežava bioinformatičko slaganje, dok je kod novijih, odnosno

heterogenijih centromera (s dodatnim ponavljajućim DNA i retroelementima) lakše rekonstruirati izvorni genomski slijed. Brojni su primjeri detektiranih evolucijski novih centromera, koji podrazumijevaju proces centromernog reorganiziranja, a zabilježeni su kod gljive *Candida albicans* (Burrack i sur., 2016), primata (Chiatante i sur., 2017, Tolomeo i sur., 2017, Ventura i sur., 2007), roda *Equus* (konji, magarci, zebre) (Carbone i sur., 2006), općenito sisavaca (Rocchi i sur., 2012) i biljnog tribusa Arabideae (Mandáková i sur. 2020).

(Peri)centromerna područja vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* potencijalno su evoluirala uslijed ekspanzije vrsno-specifičnih centromerno kompetentnih satelitnih DNA, TCAST i TFREE. Iako je riječ o vrsno-specifičnim satelitnim DNA bez sličnosti u nukleotidnoj sekvenci, monomeri ovih dviju satelitnih DNA dijele strukturne sličnosti, kao što su udjeli AT baza, AT blokovi, i bliski smještaj AT blokova i invertiranih ponavljanja. Prisutnost sličnih strukturnih elemenata kod dvije navedene vrste satelitnih DNA, ukazuje na to da se u definiranju centromerne kompetencije potencijalno preferiraju specifična strukturna svojstva. Ekspanzija vrsno-specifične satelitne DNA u skladu je s teorijom centromernog „drive“-a, u kojoj su preferirani kromosomi s dužim sljedovima glavnih satelitnih DNA. Navedeni mehanizam potvrđen je u mišjem hibridnom soju CHPO, u kojem se centromere s dužim sljedovima satelitne DNA „minor“ i posljedično većom količinom histona CenH3 preferentno nasljeđuju u jajnu stanicu (Iwata-Otsubo i sur., 2017). Ekspanzija glavne satelitne DNA CenSol koja izgrađuje izduljene (peri)centromerne regije, opažena je kod vrste mrava *Solenopsis invicta* (Huang i sur., 2016). Nasuprot tome, primarne konstrikcije pericentromera blisko srodne vrste *Solenopsis geminata* značajno su manje u usporedbi s vrstom *S. invicta*, što korelira sa značajno manjim brojem kopija satelitne DNA CenSol. Pretpostavlja se da je u vrsti *S. invicta* glavna satelitna DNA ekspandirala uslijed procesa centromernog „drive“-a. Također, usporedbom centromera blisko srodnih vrsta *S. tuberosum* i *S. verrucosum*, utvrđeno je da samo jedan tip homolognih centromera dviju vrsta dijeli identičnu centromernu DNA, dok su četiri homologne centromere dviju vrsta izgrađene od različitih satelitnih DNA ili različitih jedinstvenih sekvenci DNA (Zhang i sur., 2014). Uslijed opažene značajne divergencije centromernih satelitnih DNA dviju spomenutih blisko srodnih vrsta, pretpostavlja se da centromerne satelitne DNA prolaze ciklus ekspanzije i redukcije, dok se u centromernim regijama ne zadrži ponavljajuća sekvenca DNA s poželjnim svojstvima.

Drastične razlike u broju kopija satelitnih DNA sačuvanih između blisko srodnih vrsta objašnjavaju se teorijom biblioteke (Fry i Salser, 1977). Naime, blisko srodne vrste dijele zajednički skup satelitnih DNA koje su naslijedile od zajedničkog pretka, a pojedine satelitne DNA u zasebnim vrstama, promjenom

broja kopija kreiraju vrsno-specifičan satelitni profil. Tako, centromerne satelitne DNA mogu neovisno ekspandirati u pojedinim vrstama, kreirajući vrsno-specifični profil. Centromere riže *Oryza sativa* sadrže satelitnu DNA CentO (Lee i sur., 2005), međutim CentO ne izgrađuje centromere srodnih vrsta *Oryza rhizomatis* i *Oryza brachyantha*. Osim toga, sukladno teoriji biblioteke, satelitna DNA CentO-C1 detektirana je u genomima vrsta *O. sativa* i *O. brachyantha*, međutim samo je u genomu vrste *O. brachyantha* amplificirana te je postala dijelom centromerne sekvence. Smatra se da ekspanzija specifičnih satelitnih DNA, uslijed procesa sazrijevanja evolucijski novih centromera, utječe na stvaranje reproduktivne barijere i na proces specijacije (Bracewell i sur., 2019). S obzirom da između visokozastupljenih satelitnih DNA TCAST i TFREE nema uočljivih sličnosti u nukleotidnom slijedu pa tako ni naznake da su evoluirale iz iste prasekvence, moguće je spekulirati da su spomenute sekvence sastavni dio satelitne biblioteke koja datira još iz vremena zajedničkog pretka vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*. Sukladno teoriji biblioteke, moglo bi se pretpostaviti da su se tijekom evolucije vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* pojedine sekvence propagirale u glavnu, brojem kopija dominantu satelitnu DNA. Teorija biblioteke eksperimentalno je potvrđena prvi put na kukcima tenebrionidnog roda *Palorus* (Meštrović i sur., 1998) te je pokazano da su neke od sekvenci spomenute biblioteke sačuvane i između evolucijski udaljenijih vrsta, tijekom 50-60 milijuna godina (Mravinac i sur., 2002).

Teorija centromernog paradoksa podrazumijeva rapidnu evoluciju centromerne DNA uslijed centromerenog „drive“-a i adaptivnu prilagodbu histona CenH3 novonastalim promjenama u DNA (Malik, 2009). Tom teorijom se pretpostavlja da je razdvajanje vrsta, odnosno specijacija posljedica brze evolucije centromernog kromatina (Henikoff i sur., 2001). Kod vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* opažena je značajna varijacija u centromernoj DNA te znatna divergencija histona CenH3. Spomenuta opažanja navode na zaključak da su histoni cCenH3 i fCenH3 evoluirali kao odgovor na rapidne promjene u pripadajućim centromernim DNA sekvencama. Opažene razlike u centrokromatinu dviju blisko srodnih vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* mogući su uzrok specijacije koja se dogodila prije 12-47 milijuna godina.

Brojnim studijama je dokazano da su centromere definirane epigenetički, putem histona CenH3. U ovom istraživanju, pokazano je da ispitivani histoni cCenH3 i fCenH3 predstavljaju epigenetičko obilježje centromera vrsta *T. castaneum* i *T. freemani*. Utvrđene varijacije, u prvom redu u petlji 1 i N-terminalnoj domeni histona CenH3 dviju blisko srodnih vrsta, govore o vrsnoj specifičnosti histona cCenH3 i fCenH3. Rapidna evolucija centromernih komponenata može biti važan čimbenik u procesu razdvajanja dviju spomenutih vrsta.

Dodatna istraživanja, koja bi obuhvaćala rekonstrukciju centromernih sljedova pomoću slaganja dugačkih očitavanja, u potpunosti bi utvrdila kompoziciju ponavljajućih DNA unutar centromernih područja vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* i pripomogla rasvjetljavanju mehanizama evolucije centomera ovih blisko srodnih vrsta. Nadalje, istraživanja centromera u drugim blisko srodnim vrstama roda *Tribolium*, čije su glavne satelitne DNA već podrobno istražene, pružile bi dopunjeni komparativni uvid u evolucijske trendove centromernih regija filogenetski srodnih vrsta. U konačnici, istraživanja kinetohornog aparata meta-policentričnih kromosoma vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* bila bi od velikoga značaja za razumijevanje ove vrste centromerne organizacije.

6. ZAKLJUČCI

1. Vrste *T. castaneum* i *T. freemani* posjeduju vrsno-specifične centromerne proteine CenH3, za koja su u sklopu ovog istraživanja razvijena specifična protutijela.
2. Upotrebom razvijenih protutijela potvrđena je centromerna lokalizacija proteina cCenH3 i fCenH3 na metafaznim kromosomima kukaca *T. castaneum* i *T. freemani*, pri čemu je također utvrđena meta-policentrična organizacija centromera ovih vrsta.
3. Bioinformatička analiza imunoprecipitiranih odsječaka DNA centromernog kromatina otkrila je da centromere ovih dviju vrsta sadrže skup različitih ponavljajućih sekvenca među kojima se ističu satelitne DNA, non-LTR retrotranspozoni i sekvence slične ribosomalnim DNA. Pritom je utvrđeno da u centromerama vrste *T. castaneum* dominira satelitna DNA TCAST, dok je u centromerama vrste *T. freemani* najzastupljenija satelitna DNA TFREE.
4. Kolokalizacija histona cCenH3 i fCenH3 i njima pripadajućih satelitnih DNA TCAST i TFREE potvrđena je kombiniranom metodom imunofluorescencije i fluorescencijske hibridizacije *in situ* na metafaznim kromosomima i izduženim kromatinskim nitima.
5. Uočene međuvrsne razlike navode na zaključak da histoni CenH3 i centromerne DNA dviju blisko srodnih vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* brzo koevoluiraju, sukladno teoriji centromernog paradoksa. Moguće je pretpostaviti da drastične razlike u proteinskim i DNA sastavnicama centrokromatina stoje u sprezi sa specijacijom ovih dviju sestrinskih vrsta.

7. LITERATURA

- Akera, T., Trimm, E., & Lampson, M. A. (2019). Molecular Strategies of Meiotic Cheating by Selfish Centromeres. *Cell*, *178*(5), 1132-1144.e10.
- Akihiko, K., Yuriko, H., Shoko, T., Israt, J., Sudarath, B., Visit, A., & Hirohisa, H. (2014). Evolutionary origin of higher-order repeat structure in alpha-satellite DNA of primate centromeres. *DNA Research*, *21*(4), 407–415.
- Aldrup-MacDonald, M. E., & Sullivan, B. A. (2014). The past, present, and future of human centromere genomics. *Genes*, *5*(1), 33–50.
- Alvarez-Fuster, A., Juan, C., & Petitpierre, E. (1991). Genome size in *Tribolium* flour-beetles: Inter- and intraspecific variation. *Genetical Research*, *58*(1), 1–5.
- Angelini, D. R., & Jockusch, E. L. (2008). Relationships among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *46*(1), 127–141.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Specht, C. A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M. D., Kanost, M., & Beeman, R. W. (2005). The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*, *14*(5), 453–463.
- Ávila Robledillo, L., Neumann, P., Koblížková, A., Novák, P., Vrbová, I., & Macas, J. (2020). Extraordinary Sequence Diversity and Promiscuity of Centromeric Satellites in the Legume Tribe Fabaeae. *Molecular Biology and Evolution*, *msaa090*.
- Bailey, A. O., Panchenko, T., Sathyan, K. M., Petkowski, J. J., Pai, P. J., Bai, D. L., Russell, D. H., Macara, I. G., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Black, B. E., & Foltz, D. R. (2013). Posttranslational modification of CENP-A influences the conformation of centromeric chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 11827–11832.
- Bailey, A. O., Panchenko, T., Shabanowitz, J., Lehman, S. M., Bai, D. L., Hunt, D. F., Black, B. E., & Foltz, D. R. (2016). Identification of the post-translational modifications present in centromeric chromatin. *Molecular and Cellular Proteomics*, *15*(3), 918–931.
- Barceló, F., Gutiérrez, F., Barjau, I., & Portugal, J. (1998). A theoretical perusal of the satellite dna curvature in tenebrionid beetles. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *16*(1), 41–50.
- Barra, V., & Fachinetti, D. (2018). The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nature Communications*, *9*(1), 4340.
- Bergmann, J. H., Rodríguez, M. G., Martins, N. M. C., Kimura, H., Kelly, D. A., Masumoto, H., Larionov, V., Jansen, L. E. T., & Earnshaw, W. C. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO Journal*, *30*(2), 328–340.
- 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. T. (2014). The quantitative architecture of centromeric chromatin. *ELife*, *3*, e02137.

- Bracewell, R., Chatla, K., Nalley, M. J., & Bachtrog, D. (2019). Dynamic turnover of centromeres drives karyotype evolution in drosophila. *ELife*, *8*, e49002.
- Brown, S. J., Henry, J. K., Black IV, W. C., & Denell, R. E. (1990). Molecular genetic manipulation of the red flour beetle: Genome organization and cloning of a ribosomal protein gene. *Insect Biochemistry*, *20*(2), 185–193.
- Buchwitz, B. J., Ahmad, K., Moore, L. L., Roth, M. B., & Henikoff, S. (1999). A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature*, *401*(6753), 547–548.
- Burrack, L. S., Hutton, H. F., Matter, K. J., Clancey, S. A., Liachko, I., Plemmons, A. E., Saha, A., Power, E. A., Turman, B., Thevandavakkam, M. A., Ay, F., Dunham, M. J., & Berman, J. (2016). Neocentromeres Provide Chromosome Segregation Accuracy and Centromere Clustering to Multiple Loci along a *Candida albicans* Chromosome. *PLOS Genetics*, *12*(9), e1006317.
- Carbone, L., Harris, R. A., Mootnick, A. R., Milosavljevic, A., Martin, D. I. K., Rocchi, M., Capozzi, O., Archidiacono, N., Konkel, M. K., Walker, J. A., Batzer, M. A., & De Jong, P. J. (2012). Centromere remodeling in Hoolock leuconedys (Hylobatidae) by a new transposable element unique to the gibbons. *Genome Biology and Evolution*, *4*(7), 648–658.
- Carbone, L., Nergadze, S. G., Magnani, E., Misceo, D., Francesca Cardone, M., Roberto, R., Bertoni, L., Attolini, C., Francesca Piras, M., de Jong, P., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Guérin, G., Archidiacono, N., Rocchi, M., & Giulotto, E. (2006). Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra. *Genomics*, *87*(6), 777–782.
- Chang, C. H., Chavan, A., Palladino, J., Wei, X., Martins, N. M. C., Santinello, B., Chen, C. C., Erceg, J., Beliveau, B. J., Wu, C. T., Larracuenta, A. M., & Mellone, B. G. (2019). Islands of retroelements are major components of *Drosophila* centromeres. *PLoS Biology*, *17*(5), e3000241.
- Chapman, R. N. (1924). Nutritional studies on the confused flour beetle, *tribolium confusum* duval. *Journal of General Physiology*, *6*(5), 565–585.
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M., & Desai, A. (2006). The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell*, *127*(5), 983–997.
- Chiatante, G., Capozzi, O., Svartman, M., Perelman, P., Centrone, L., Romanenko, S. S., Ishida, T., Valeri, M., Roelke-Parker, M. E., & Stanyon, R. (2017). Centromere repositioning explains fundamental number variability in the New World monkey genus *Saimiri*. *Chromosoma*, *126*(4), 519–529.
- Clarke, L., & Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*, *287*(5782), 504–509.
- Cohen, A. K., Huh, T. Y., & Helleiner, C. W. (1973). Transcription of satellite DNA in mouse L-cells. *Canadian Journal of Biochemistry*, *51*(5), 529–532.
- Cooper, J. L., & Henikoff, S. (2004). Adaptive evolution of the histone fold domain in centromeric histones. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(9), 1712–1718.
- de Sotero-Caio, C. G., Cabral-de-Mello, D. C., Calixto, M. da S., Valente, G. T., Martins, C., Loreto, V., de

- Souza, M. J., & Santos, N. (2017). Centromeric enrichment of LINE-1 retrotransposons and its significance for the chromosome evolution of Phyllostomid bats. *Chromosome Research*, *25*(3–4), 313–325.
- Drinnenberg, I. A., DeYoung, D., Henikoff, S., & Malik, H. S. (2014). Recurrent loss of CenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *ELife*, *3*, e03676.
- Dutrillaux, A. M., & Dutrillaux, B. (2017). Evolution of the Sex Chromosomes in Beetles. I. the Loss of the y Chromosome. *Cytogenetic and Genome Research*, *152*(2), 97–104.
- Earnshaw, W. C., & Migeon, B. R. (1985). Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma*, *92*(4), 290–296.
- Earnshaw, W. C., & Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, *91*(3–4), 313–321.
- Fachinetti, D., Han, J. S., McMahon, M. A., Ly, P., Abdullah, A., Wong, A. J., & Cleveland, D. W. (2015). DNA Sequence-Specific Binding of CENP-B Enhances the Fidelity of Human Centromere Function. *Developmental Cell*, *33*(3), 314–327.
- Feliciello, I., Akrap, I., & Ugarković, Đ. (2015). Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress. *PLoS Genetics*, *11*(8), 1–18.
- Fishman, L., & Saunders, A. (2008). Centromere-associated female meiotic drive entails male fitness costs in monkeyflowers. *Science*, *322*(5907), 1559–1562.
- Fishman, L., & Willis, J. H. (2005). A novel meiotic drive locus almost completely distorts segregation in *Mimulus* (monkeyflower) hybrids. *Genetics*, *169*(1), 347–353.
- Fry, K., & Salser, W. (1977). Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell*, *12*(4), 1069–1084.
- Fujiwara, H., Osanai, M., Matsumoto, T., & Kojima, K. K. (2005). Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*. *Chromosome Research*, *13*(5), 455–467.
- Garrido-Ramos, M. A. (2017). Satellite DNA: An evolving topic. *Genes*, *8*(9), 230.
- Gong, Z., Wu, Y., Koblížková, A., Torres, G. A., Wang, K., Iovene, M., Neumann, P., Zhang, W., Novák, P., Robin Buell, C., Macas, J., & Jianga, J. (2012). Repeatless and repeat-based centromeres in potato: Implications for centromere evolution. *Plant Cell*, *24*(9), 3559–3574.
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*.
- Hamilton, G., Dimitrova, Y., & Davis, T. N. (2019). Seeing is believing: our evolving view of kinetochore structure, composition, and assembly. *Current Opinion in Cell Biology*, *60*, 44–52.
- Han, F., Lamb, J. C., McCaw, M. E., Gao, Z., Zhang, B., Swyers, N. C., & Birchler, J. A. (2018). Meiotic

- studies on combinations of chromosomes with different sized centromeres in maize. *Frontiers in Plant Science*, 9, 785.
- Harel, J., Hanania, N., Tapiero, H., & Harel, L. (1968). RNA replication by nuclear satellite DNA in different mouse cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 33(4), 696–701.
- He, L., Liu, J., Torres, G. A., Zhang, H., Jiang, J., & Xie, C. (2013). Interstitial telomeric repeats are enriched in the centromeres of chromosomes in Solanum species. *Chromosome Research*, 21(1), 5–13.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J. S., & Van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 716–721.
- Henikoff, S., Ahmad, K., & Malik, H. S. (2001). The centromere paradox: Stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science*, 293(5532), 1098–1102.
- Herbst, J. F. W. (1797). Der Käfer. In J. F. . Jablonsky, C.G., Herbst (Ed.), *Natursystem aller bekannten in- und ausländischen Insecten, als eine Fortzetsung der von Büffonschen Naturgeschichte* (p. 346). J. Pauli.
- Herndon, N., Shelton, J., Gerischer, L., Ioannidis, P., Ninova, M., Dönitz, J., Waterhouse, R. M., Liang, C., Damm, C., Siemanowski, J., Kitzmann, P., Ulrich, J., Dippel, S., Oberhofer, G., Hu, Y., Schwirz, J., Schacht, M., Lehmann, S., Montino, A., ... Bucher, G. (2020). Enhanced genome assembly and a new official gene set for *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 21(1), 47.
- Hieter, P., Pridmore, D., Hegemann, J. H., Thomas, M., Davis, R. W., & Philippsen, P. (1985). Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell*, 42(3), 913–921.
- Hinton, H. E. (1948). A synopsis of the genus *tribolium macleay*, with some remarks on the evolution of its species-groups (coleoptera, tenebrionidae). *Bulletin of Entomological Research*, 39(1), 13–55.
- Huang, Y. C., Lee, C. C., Kao, C. Y., Chang, N. C., Lin, C. C., Shoemaker, D., & Wang, J. (2016). Evolution of long centromeres in fire ants. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 189.
- Hudson, D. F., Fowler, K. J., Earle, E., Saffery, R., Kalitsis, P., Trowell, H., Hill, J., Wreford, N. G., De Kretser, D. M., Cancilla, M. R., Howman, E., Hii, L., Cutts, S. M., Irvine, D. V., & Choo, K. H. A. (1998). Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *Journal of Cell Biology*, 141(2), 309–319.
- Iwata-Otsubo, A., Dawicki-McKenna, J. M., Aker, T., Falk, S. J., Chmátal, L., Yang, K., Sullivan, B. A., Schultz, R. M., Lampson, M. A., & Black, B. E. (2017). Expanded Satellite Repeats Amplify a Discrete CENP-A Nucleosome Assembly Site on Chromosomes that Drive in Female Meiosis. *Current Biology*, 27(15), 2365–2373.
- Juan, C., Vazquez, P., Rubio, J. M., Petitpierre, E., & Hewitt, G. M. (1993). in *Tribolium flour-beetles. Heredity*, 70, 1–8.
- Kapoor, M., Montes De Oca Luna, R., Liu, G., Lozano, G., Cummings, C., Mancini, M., Ouspenski, I., Brinkley, B. R., & May, G. S. (1998). The *cenpB* gene is not essential in mice. *Chromosoma*, 107(8),

570–576.

- Kawabe, A., Nasuda, S., & Charlesworth, D. (2006). Duplication of centromeric histone H3 (HTR12) gene in *Arabidopsis halleri* and *A. lyrata*, plant species with multiple centromeric satellite sequences. *Genetics*, *174*(4), 2021–2032.
- Keith, K. C., Baker, R. E., Chen, Y., Harris, K., Stoler, S., & Fitzgerald-Hayes, M. (1999). Analysis of Primary Structural Determinants That Distinguish the Centromere-Specific Function of Histone Variant Cse4p from Histone H3. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(9), 6130–6139.
- Kojima, K. K., & Fujiwara, H. (2003). Evolution of target specificity in R1 clade non-LTR retrotransposons. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(3), 351–361.
- Kumar, H., Panigrahi, M., Chhotaray, S., Bhanuprakash, V., Shandilya, R., Sonwane, A., & Bhushan, B. (2018). Red flour beetle (*Tribolium castaneum*): From population genetics to functional genomics. *Veterinary World*, *11*(8), 1043–1046.
- Kursel, L. E., Welsh, F. C. & Malik, H. (2020). Ancient co-retention of paralogs of Cid centromeric histones and Cal1 chaperones in mosquito species. *Molecular Biology and Evolution*, *206*.
- Kursel, L. E., & Malik, H. S. (2018). The cellular mechanisms and consequences of centromere drive. *Current Opinion in Cell Biology*, *52*, 58–65.
- Lam, A. L., Boivin, C. D., Bonney, C. F., Rudd, M. K., & Sullivan, B. A. (2006). Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(11), 4186–4191.
- Lee, H. R., Zhang, W., Langdon, T., Jin, W., Yan, H., Cheng, Z., & Jiang, J. (2005). Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(33), 11793–11798.
- Liu, J., Seetharam, A. S., Chougule, K., Ou, S., Swentowsky, K. W., Gent, J. I., Llaca, V., Woodhouse, M. R., Manchanda, N., Presting, G. G., Kudrna, D. A., Alabady, M., Hirsch, C. N., Fengler, K. A., Ware, D., Michael, T. P., Hufford, M. B., & Dawe, R. K. (2020). Gapless assembly of maize chromosomes using long-read technologies. *Genome Biology*, *21*(1), 121.
- López-Flores, I., & Garrido-Ramos, M. A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dynamics*, *7*, 1–28.
- Ma, J., Wing, R. A., Bennetzen, J. L., & Jackson, S. A. (2007). Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. *Trends in Genetics*, *23*(3), 134–139.
- Ma, J., & Jackson, S. A. (2006). Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome Research*, *16*(2), 251–259.
- Macas, J., Neumann, P., & Navrátilová, A. (2007). Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago*

- truncatula. *BMC Genomics*, 8, 427.
- Malik, H. S., & Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural Biology*, 10(11), 882–891.
- Malik, H. S. (2009). The centromere-drive hypothesis: a simple basis for centromere complexity. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 48, 33–52.
- Malik, H. S., & Henikoff, S. (2001). Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics*, 157(3), 1293–1298.
- Mandáková, T., Hlousková, P., Koch, M. A., & Lysak, M. A. (2020). Genome evolution in Arabideae was marked by frequent centromere repositioning. *Plant Cell*, 32(3), 650–665.
- Marques, A., & Pedrosa-Harand, A. (2016). Holocentromere identity: from the typical mitotic linear structure to the great plasticity of meiotic holocentromeres. *Chromosoma*, 125(4), 669–681.
- Marques, A., Ribeiro, T., Neumann, P., Macas, J., Novák, P., Schubert, V., Pellino, M., Fuchs, J., Ma, W., Kuhlmann, M., Brandt, R., Vanzela, A. L. L., Beseda, T., Šimková, H., Pedrosa-Harand, A., & Houben, A. (2015). Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), 13633–13638.
- Marshall, O. J., Chueh, A. C., Wong, L. H., & Choo, K. H. A. (2008). Neocentromeres: New Insights into Centromere Structure, Disease Development, and Karyotype Evolution. *American Journal of Human Genetics*, 82(2), 261–282.
- Masonbrink, R. E., Gallagher, J. P., Jareczek, J. J., Renny-Byfield, S., Grover, C. E., Gong, L., & Wendel, J. F. (2014). CenH3 evolution in diploids and polyploids of three angiosperm genera. *BMC Plant Biology*, 14, 383.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., & Okazaki, T. (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *Journal of Cell Biology*, 109(5), 1963–1973.
- McKinley, K. L., & Cheeseman, I. M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), 16–29.
- Melters, D. P., Paliulis, L. V., Korf, I. F., & Chan, S. W. L. (2012). Holocentric chromosomes: Convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research*, 20(5), 579–593.
- Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., & Smith, M. M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 94(5), 607–613.
- Meštrović, N., Mravinac, B., Plohl, M., Ugarković, Đ., & Bruvo-Madžari, B. (2006). Preliminary phylogeny of *Tribolium* beetles (Coleoptera: Tenebrionidae) resolved by combined analysis of mitochondrial genes. *European Journal of Entomology*, 103, 709–715.
- Meštrović, N., Plohl, M., Mravinac, B., & Ugarković, D. (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus

- Palorus - Experimental evidence for the “library” hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, 15(8), 1062–1068.
- Miga, K. H., Newton, Y., Jain, M., Altemose, N., Willard, H. F., & Kent, E. J. (2014). Centromere reference models for human chromosomes X and y satellite arrays. *Genome Research*, 24(4), 697–707.
- Mirkovic, M., & Oliveira, R. A. (2017). Centromeric Cohesin: Molecular Glue and Much More. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 56, 485–513.
- Monen, J., Maddox, P. S., Hyndman, F., Oegema, K., & Desai, A. (2005). Differential role of CENP-A in the segregation of holocentric *C. elegans* chromosomes during meiosis and mitosis. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1148–1155.
- Mravinac, B., & Plohl, M. (2007). Satellite DNA junctions identify the potential origin of new repetitive elements in the beetle *Tribolium madens*. *Gene*, 394(1–2), 45–52.
- Mravinac, B., & Plohl, M. (2010). Parallelism in evolution of highly repetitive DNAs in sibling species. *Molecular Biology and Evolution*, 27(8), 1857–1867.
- Mravinac, B., Plohl, M., Mestrovic, N., & Ugarkovic, D. (2002). Sequence of PRAT Satellite DNA “Frozen” in Some Coleopteran Species. *Journal of Molecular Evolution*, 54(6), 774–783.
- Mravinac, B., Plohl, M., & Ugarkovic, D. (2004). Conserved patterns in the evolution of *Tribolium* satellite DNAs. *Gene*, 332(1–2), 169–177.
- Mravinac, B., Sullivan, L. L., Reeves, J. W., Yan, C. M., Kopf, K. S., Farr, C. J., Schueler, M. G., & Sullivan, B. A. (2009). Histone modifications within the human X centromere region. *PLoS ONE*, 4(8), e6602.
- Mravinac, B., Ugarkovic, D., Franjevic, D., & Plohl, M. (2005). Long inversely oriented subunits form a complex monomer of *Tribolium brevicornis* satellite DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 60(4), 513–525.
- Musacchio, A., & Desai, A. (2017). A molecular view of kinetochore assembly and function. *Biology*, 6(1), 5.
- Nakakita, H. (1983). Rediscovery of *Tribolium freemani* Hinton: a stored product insect unexposed to entomologists for the past 100 years. *Jarq*, 16(4), 239–245.
- Nakano, M., Cardinale, S., Noskov, V. N., Gassmann, R., Vagnarelli, P., Kandels-Lewis, S., Larionov, V., Earnshaw, W. C., & Masumoto, H. (2008). Inactivation of a Human Kinetochore by Specific Targeting of Chromatin Modifiers. *Developmental Cell*, 14(4), 507–522.
- Neumann, P., Navrátilová, A., Schroeder-Reiter, E., Koblížková, A., Steinbauerová, V., Chocholová, E., Novák, P., Wanner, G., & Macas, J. (2012). Stretching the rules: Monocentric chromosomes with multiple centromere domains. *PLoS Genetics*, 8(6), e1002777.
- Neumann, P., Pavlíková, Z., Koblížková, A., Fuková, I., Jedličková, V., Novák, P., & Macas, J. (2015). Centromeres off the hook: Massive changes in centromere size and structure following duplication of cenH3 gene in fabae species. *Molecular Biology and Evolution*, 32(7), 1862–1879.

- Neumann, P., Schubert, V., Fuková, I., Manning, J. E., Houben, A., & Macas, J. (2016). Epigenetic histone marks of extended meta-polycentric centromeres of *Lathyrus* and *Pisum* chromosomes. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–11.
- Novák, P., Neumann, P., & Macas, J. (2010). Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, *11*, 378.
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., & MacAs, J. (2013). RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, *29*(6), 792–793.
- Novák, P., Robledillo, L. Á., Koblížková, A., Vrbová, I., Neumann, P., & Macas, J. (2017). TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Research*, *45*(12), e111.
- Oliveira, L., Neumann, P., Jang, T. S., Klemme, S., Schubert, V., Koblížková, A., Houben, A., & Macas, J. (2020). Mitotic Spindle Attachment to the Holocentric Chromosomes of *Cuscuta europaea* Does Not Correlate With the Distribution of CENH3 Chromatin. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1799.
- Osanai-Futahashi, M., Fujiwara, H. (2011). Coevolution of telomeric repeats and telomeric repeat-specific non-LTR retrotransposons in insects. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(11), 2983–2986.
- Pavlek, M., Gelfand, Y., Plohl, M., & Meštrović, N. (2015). Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. *DNA Research*, *22*(6), 387–401.
- Perea-Resa, C., & Blower, M. D. (2018). Centromere Biology: Transcription Goes on Stage. *Molecular and Cellular Biology*, *38*(18), e00263-18.
- Plohl, M., Meštrović, N., & Mravinac, B. (2014). Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*, *123*(4), 313–325.
- Plohl, M., Lucijanic-Justic, V., Ugarkovic, D., Petitpierre, E., & Juan, C. (1993). Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Genome*, *36*(3), 467–475.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S., Denell, R., Beeman, R. W., Gibbs, R., Bucher, G., Friedrich, M., Grimmelikhuijzen, C. J. P., Klingler, M., Lorenzen, M., Roth, S., Schröder, R., Tautz, D., Zdobnov, E. M., Muzny, D., Attaway, T., Bell, S., ... Grossmann, D. (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, *452*(7190), 949–955.
- Robicheau, B. M., Susko, E., Harrigan, A. M., & Snyder, M. (2017). Ribosomal RNA genes contribute to the formation of pseudogenes and junk DNA in the human genome. *Genome Biology and Evolution*, *9*(2), 380–397.
- Robinson, T., Johnson, N. A., & Wade, M. J. (1994). Postcopulatory, prezygotic isolation: Intraspecific and interspecific sperm precedence in *Tribolium* spp., flour beetles. *Heredity*, *73*(2), 155–159.
- Robledillo, L. Á., Neumann, P., Koblížková, A., Novák, P., Vrbová, I., & Macas, J. (2020). Extraordinary Sequence Diversity and Promiscuity of Centromeric Satellites in the Legume Tribe Fabeae.

Molecular Biology and Evolution.

- Rocchi, M., Archidiacono, N., Schempp, W., Capozzi, O., & Stanyon, R. (2012). Centromere repositioning in mammals. *Heredity*, *108*(1), 59–67.
- Rosin, L. F., & Mellone, B. G. (2017). Centromeres Drive a Hard Bargain. *Trends in Genetics*, *33*(17), 101–117.
- Rudd, M. K., Wray, G. A., & Willard, H. F. (2006). The evolutionary dynamics of α -satellite. *Genome Research*, *16*(1), 88–96.
- Ruiz-Ruano, F. J., López-León, M. D., Cabrero, J., & Camacho, J. P. M. (2016). High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Scientific Reports*, *6*, 28333.
- Sadeghi, L., Lee, S., Svensson, J. P., & Ekwall, K. (2014). Centromeric histone H2B monoubiquitination promotes noncoding transcription and chromatin integrity. *Nature Structural and Molecular Biology*, *21*(3), 236–243.
- Scelfo, A. & Fachinetti, D. (2019). Keeping the Centromere under Control: A Promising Role for DNA Methylation. *Cells*, *8*(8), 912.
- Schalch, T., & Steiner, F. A. (2017). Structure of centromere chromatin: from nucleosome to chromosomal architecture. *Chromosoma*, *126*(4), 443–455.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In *Nature Methods*. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675.
- Schubert, V., Neumann, P., Marques, A., Heckmann, S., Macas, J., Pedrosa-Harand, A., Schubert, I., Jang, T.-S., & Houben, A. (2020). Super-Resolution Microscopy Reveals Diversity of Plant Centromere Architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(10), 3488.
- Schueler, M. G., & Sullivan, B. A. (2006). Structural and Functional Dynamics of Human Centromeric Chromatin. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *7*(1), 301–313.
- Screpanti, E., De Antoni, A., Alushin, G. M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E., & Musacchio, A. (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Current Biology*, *21*(5), 391–398.
- Shen, C.-H. (2019). Molecular Diagnosis of Chromosomal Disorders. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 331–358). Elsevier.
- Sullivan, B. A., & Karpen, G. H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nature Structural and Molecular Biology*, *11*(11), 1076–1083.
- Sullivan, L. L., Boivin, C. D., Mravinac, B., Song, I. Y., & Sullivan, B. A. (2011). Genomic size of CENP-A domain is proportional to total alpha satellite array size at human centromeres and expands in cancer cells. *Chromosome Research*, *19*(4), 457–470.

- Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S. Y., Kimura, H., & Kurumizaka, H. (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature*, *476*(7359), 232–235.
- Takahashi, K., Chen, E. S., & Yanagida, M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science*, *288*(5474), 2215–2219.
- Talbert, P. B., Bryson, T. D., & Henikoff, S. (2004). Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals. *Journal of Biology*, *3*(4), 18.
- Talbert, P. B., Kasinathan, S., & Henikoff, S. (2018). Simple and complex centromeric satellites in *Drosophila* sibling species. *Genetics*, *208*(3), 977–990.
- Talbert, P. B., Masuelli, R., Tyagi, A. P., Comai, L., & Henikoff, S. (2002). Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant. *Plant Cell*, *14*(5), 1053–1066.
- Teixeira, J. R., Dias, G. B., Svartman, M., Ruiz, A., & Kuhn, G. C. S. (2018). Concurrent Duplication of *Drosophila* Cid and Cenp-C Genes Resulted in Accelerated Evolution and Male Germline-Biased Expression of the New Copies. *Journal of Molecular Evolution*, *86*(6), 353–364.
- Tolomeo, D., Capozzi, O., Stanyon, R. R., Archidiacono, N., D'Addabbo, P., Catacchio, C. R., Purgato, S., Perini, G., Schempp, W., Huddleston, J., Malig, M., Eichler, E. E., & Rocchi, M. (2017). Epigenetic origin of evolutionary novel centromeres. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10.
- Tong, P., Pidoux, A. L., Toda, N. R. T., Ard, R., Berger, H., Shukla, M., Torres-Garcia, J., Müller, C. A., Nieduszynski, C. A., & Allshire, R. C. (2019). Interspecies conservation of organisation and function between nonhomologous regional centromeres. *Nature Communications*, *10*(1), 1–13.
- Tsukahara, S., Kawabe, A., Kobayashi, A., Ito, T., Aizu, T., Shin-i, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Tarutani, Y., & Kakutani, T. (2012). Centromere-targeted de novo integrations of an LTR retrotransposon of *Arabidopsis lyrata*. *Genes and Development*, *26*(7), 705–713.
- Ugarković, D., Durajlija, S., & Plohl, M. (1996). Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. *Journal of Molecular Evolution*, *42*(3), 350–358.
- Ugarković, D., Podnar, M., & Plohl, M. (1996). Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum* - Comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. *Molecular Biology and Evolution*, *13*(8), 1059–1066.
- Ventura, M., Antonacci, F., Cardone, M. F., Stanyon, R., D'Addabbo, P., Cellamare, A., Sprague, L. J., Eichler, E. E., Archidiacono, N., & Rocchi, M. (2007). Evolutionary formation of new centromeres in macaque. *Science*, *316*(5822), 243–246.
- Vittorazzi, S. E., Lourenço, L. B., Del-Grande, M. L., & Recco-Pimentel, S. M. (2011). Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). *Cytogenetic and Genome Research*, *134*(2), 101–107.
- Vlahović, I., Glunčić, M., Rosandić, M., Ugarković, D. I., & Paar, V. (2017). Regular higher order repeat structures in beetle *tribolium castaneum* genome. *Genome Biology and Evolution*, *9*(10), 2668–

2680.

- Voullaire, L. E., Slater, H. R., Petrovic, V., & Choo, K. H. A. (1993). 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*(6), 1153–1163.
- Wade, M. J., & Johnson, N. A. (1994). Reproductive isolation between two species of flour beetles, *tribolium castaneum* and *t. Freemani*: Variation within and among geographical populations of *t. castaneum*. *Heredity*, *72*(2), 155–162.
- Wallace, B. M. N., Searle, J. B., & Everett, C. A. (2002). The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytogenetic and Genome Research*, *96*(1–4), 276–286.
- Wang, G., He, Q., Liu, F., Cheng, Z., Talbert, P. B., & Jin, W. (2011). Characterization of CENH3 proteins and centromere-associated DNA sequences in diploid and allotetraploid Brassica species. *Chromosoma*, *120*(4), 353–365.
- Wong, C. Y. Y., Ling, Y. H., Mak, J. K. H., Zhu, J., & Yuen, K. W. Y. (2020). “Lessons from the extremes: Epigenetic and genetic regulation in point monocentromere and holocentromere establishment on artificial chromosomes.” *Experimental Cell Research*, *390*(2), 111974.
- Yang, X., Zhao, H., Zhang, T., Zeng, Z., Zhang, P., Zhu, B., Han, Y., Braz, G. T., Casler, M. D., Schmutz, J., & Jiang, J. (2018). Amplification and adaptation of centromeric repeats in polyploid switchgrass species. *New Phytologist*, *218*(4), 1645–1657.
- Zhang, H., Koblížková, A., Wang, K., Gong, Z., Oliveira, L., Torres, G. A., Wu, Y., Zhang, W., Novák, P., Buell, C. R., Macas, J., & Jiang, J. (2014). Boom-bust turnovers of megabase-sized centromeric DNA in *Solanum* species: Rapid evolution of DNA sequences associated with Centromeres. *Plant Cell*, *26*(4), 1436–1447.
- Zhang, Z. Q. (2011). Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, *3148*(1), 165–191.

8. SAŽETAK

Centromere su kromosomske regije odgovorne za pravilno razdvajanje genetičkog materijala prilikom staničnih dioba. Pogreške u strukturi centromera dovode do ozbiljnih poremećaja kao što su razvoj tumora, neplodnosti i urođene anomalije. Iako se radi o esencijalnim regijama nužnim za normalno funkcioniranje eukariotskih organizama, ove regije su slabo istražene te rijetko rekonstruirane u genomskim projektima. Naime, ponavljajuća priroda sekvenci koje ih grade, satelitnih DNA i mobilnih elemenata, ometa ili čak u potpunosti onemogućuje točno sastavljanje spomenutih regija. Centromerne DNA također su iznimno varijabilne među različitim vrstama, a područja funkcionalnih centromera primarno su epigenetički određena prisutnošću vrsno-specifičnih centromernih histona CenH3.

Kukci roda *Tribolium* su kozmopolitske vrste i štetnici na uskladištenoj hrani što ih čini ekonomski važnim organizmima. Vrsta *Tribolium castaneum* je odličan eksperimentalni modelni organizam zbog jednostavnog laboratorijskog uzgoja, fleksibilnog generacijskog vremena te lakog stvaranja morfoloških, fizioloških i razvojnih mutanata. Iz tog razloga, *T. castaneum* postao je, uz vrstu *Drosophila melanogaster*, najopsežnije izučavani modelni kukac u domenama razvojne biologije, populacijske genetike i komparativne genomike. Vrsta *Tribolium freemani* sestrinska je vrsta kukca *T. castaneum*, a njihova bliska srodnost očituje se kroz mogućnost međusobnog križanja i stvaranja potomstva koje je nezdravo, sterilno i malobrojno.

Vrste *T. castaneum* i *T. freemani* odabrane su za istraživanje strukture i evolucije centromera u ovom radu. Na temelju identificiranih vrsno-specifičnih proteina CenH3 vrsta *T. castaneum* (cCenH3) i *T. freemani* (fCenH3), producirana su specifična protutijela. Lokalizacijom protu-cCenH3 i protu-fCenH3 protutijela na metafaznim kromosomima ovih dviju vrsta, metodom imunofluorescencije utvrđena je meta-policentrična organizacija njihovih centromera. Pomoću protu-cCenH3 protutijela izolirane su centromerne frakcije kromatina dviju spomenutih vrsta metodom kromatinske imunoprecipitacije. NGS sekvenciranje izoliranih centromernih odsječaka DNA omogućilo je bioinformatičku identifikaciju centromerno-kompetentnih DNA sekvenca navedenih vrsta. Utvrđeno je da su glavne komponente centromerne DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* njihove glavne satelitne DNA, TCAST i TFREE, koje međusobno ne dijele sličnost u nukleotidnoj sekvenci. Osim toga, centromere ovih dviju vrsta sadrže i dodatne satelitne DNA te non-LTR retrotranspozone, kao i sekvence slične ribosomalnim DNA.

Opisani sastav centromernih DNA vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* je heterogen i najvećim dijelom vrsno-specifičan, što je sukladno brzom evoluciji centromernih sekvenca. Histoni cCenH3 i fCenH3 također su vrsno-specifični, pokazujući međusobno najveću razliku u regijama N-terminalne domene i petlje 1. Uočena divergencija histona CenH3 i pripadajućih centromernih DNA blisko srodnih vrsta *T. castaneum* i

T. freemani u skladu je s teorijom centromernog paradoksa, koja pretpostavlja brzu koevoluciju histonskih i komponenata DNA centrokromatina. Prema teoriji centromernog paradoksa, brza evolucija centrokromatina rezultira specijacijom odnosno razdvajanjem vrsta. U tom smislu, utvrđene značajne razlike u proteinskim i DNA sastavnicama centrokromatina vrsta *T. castaneum* i *T. freemani* uistinu bi mogle imati ulogu u specijaciji ovih dviju sestinskih vrsta te utjecati na kvalitetu njihovog križanog potomstva.

9. SUMMARY

Centromeres are chromosomal regions responsible for the proper segregation of genetic material during cell divisions. Defects in the centromere structure lead to serious disorders such as tumor development, infertility, and congenital anomalies. Although centromeres are essential for the normal functioning of eukaryotic organisms, these regions are poorly investigated and are rarely reconstructed in genomic projects. Namely, the repetitive nature of centromeric sequences, satellite DNAs, and mobile elements, interferes with or even completely disables the correct assembly of centromeric regions. Centromeric DNAs are also very variable among different species, and the regions of functional centromeres are primarily epigenetically determined by the presence of species-specific centromeric histones CenH3.

Insects of the genus *Tribolium* are a cosmopolitan species and pests of stored food that makes them economically important organisms. The flour beetle *Tribolium castaneum* is an excellent experimental model organism due to its easy laboratory rearing, flexible generation time and easy creation of morphological, physiological, and developmental mutants. For this reason, *T. castaneum* has become, along with the species *Drosophila melanogaster*, the most extensively studied model insect in the fields of developmental biology, population genetics, and comparative genomics. The species *Tribolium freemani* is a sister species of the insect *T. castaneum*, and their close phylogenetic relationship is manifested through the possibility of interbreeding and producing offspring that are unhealthy, sterile, and scarce.

In this work, the species *T. castaneum* and *T. freemani* were selected to investigate the structure and evolution of centromeres. Based on the identified species-specific CenH3 proteins of species *T. castaneum* (cCenH3) and *T. freemani* (fCenH3), specific antibodies were produced. By localizing anti-cCenH3 and anti-fCenH3 antibodies on the metaphase chromosomes of the two species by immunofluorescence, the meta-polycentric organization of their centromeres was determined. Centromeric fractions of chromatin of the two mentioned species were isolated using anti-cCenH3 antibodies in the chromatin immunoprecipitation method. NGS sequencing of isolated centromeric DNA segments allowed bioinformatics identification of centromere-competent DNA sequences of these species. The major components of the centromeric DNA of *T. castaneum* and *T. freemani* were found to be their major satellite DNAs, TCAST and TFREE, which do not share significant sequence similarity. In addition, centromeres of these two species contain additional satellite DNA and non-LTR retrotransposons, as well as sequences similar to ribosomal DNA.

Described compositions of the centromeric DNA species *T. castaneum* and *T. freemani* are heterogeneous and mostly species-specific, which is in accordance with the rapid evolution of centromeric sequences. The cCenH3 and fCenH3 histones are also species-specific, showing the largest differences in N-terminal domains and loop 1 regions. The observed divergence of CenH3 histones and associated centromeric DNAs of closely related species *T. castaneum* and *T. freemani* is consistent with the theory of the centromeric paradox, which assumes rapid coevolution of histone and DNA components of centrochromatin. According to the theory of the centromeric paradox, the rapid evolution of centrochromatin results in speciation or species separation. In this regard, significant differences in protein and DNA components of *T. castaneum* and *T. freemani* centrochromatin could indeed have a role in the speciation of the sister species, and affect the quality of their crossbred offspring.

10. ŽIVOTOPIS

Datum i mjesto rođenja: 10.2.1992., Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje

2016. godine - u tijeku

Doktorand - poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković

2013. - 2016. godine

Magistar Molekularne biologije - diplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2010. - 2013. godine

Prvostupnica Molekularne biologije - preddiplomski studij Molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2006.2010. godine

VII. gimnazija, Zagreb

Radno iskustvo

2016. godine - u tijeku

Suradničko radno mjesto asistenta na HRZZ projektu „Centromerna genomika beskralješnjaka“ u Laboratorij za strukturu i funkciju heterokromatina, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković

2015. - 2016.

Radno iskustvo u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala u sklopu izrade diplomskog rada.

Popis objavljenih znanstvenih radova

Gržan T., Despot-Slade E., Meštović N., Plohl M., Mravinac B. (2020) CenH3 distribution reveals extended centromeres in the model beetle *Tribolium castaneum*. PLOS Genetics, in press

Tunjić Cvitanić M., Vojvoda Zeljko T, Pasantes J. J., García-Souto D., **Gržan T.**, Despot-Slade E., Plohl M., Šatović E. (2020) Sequence Composition Underlying Centromeric and Heterochromatic Genome Compartments of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Genes (Basel), 11(6): 695.

Kralj, J., Bolje, A., Polančec, D. S., Steiner, I., **Gržan, T.**, Tupek, A., Stojanović, N., Hohloch, S., Urankar, D., Osmak, M., Sarkar, B., Brozovic, A., & Košmrlj, J. (2019). Half-Sandwich Ir(III) and Os(II) Complexes of Pyridyl-Mesoionic Carbenes as Potential Anticancer Agents. *Organometallics*, 38(21): 4082-4092.

Popis sudjelovanja na kongresima

Gržan, Tena; Despot Slade, Evelin; Meštrović, Nevenka; Plohl, Miroslav; Mravinac, Brankica
Centromere epigenomics of the three closely related *Tribolium* species // HDBMB 2019 Crossroads in Life Sciences

Lovran, Hrvatska, 2019. str. 86-86 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

-dobitnica nagrade za poster

Gržan, Tena; Meštrović, Nevenka; Plohl, Miroslav; Mravinac, Brankica
CENH3 proteins as epigenetic determinants of *Tribolium* centromeres // Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of Life

Zagreb, Hrvatska, 2019. str. 91-91 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Gržan, Tena; Dombi, Mira; Plohl, Miroslav; Mravinac, Brankica
Low-copy satellite DNAs of the flour beetle *Tribolium castaneum* revealed by next generation sequencing // Zbornik sažetaka 13. Hrvatskog biološkog kongres

Poreč, Hrvatska, 2018. str. 279-280 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Mravinac, Brankica; **Gržan, Tena;** Meštrović, Nevenka; Plohl, Miroslav
Centromere epigenetics of *Tribolium* sibling species // 22nd International Chromosome Conference Abstract Book

Prag, Češka, 2018. str. PS-P-1457-PS-P-1457 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Gržan, Tena; Kralj, Juran; Bolje, Aljoša; Tupek, Ana; Steiner, Ivana; Stojanović, Nikolina; Hochloch, Stephan; Polančec, Denis; Osmak, Maja; Sarkar, Biprajit et al.

Organometallic iridium complexes as potential anticancer drugs // EMBO Abstract Book "Cellular signalling and cancer therapy"

Cavtat, Hrvatska, 2016. 1, 1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)