

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija S. Rajčić

Molekularna struktura, poreklo i funkcija
B hromozoma kod žutogrlog šumskog miša
Apodemus flavicollis (Mammalia, Rodentia)

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija S. Rajčić

Molecular structure, origin and function of
B chromosomes in yellow-necked wood mouse
Apodemus flavicollis (Mammalia, Rodentia)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

MENTORI

dr Tanja Adnađević, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”

dr Jelena Blagojević, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”

KOMISIJA

dr Tanja Adnađević, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”

dr Jelena Blagojević, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”

dr Mihailo Jelić, docent
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta "Genetička i fenetička raznovrsnost u prirodnim populacijama u različitim sredinama - doprinos polimorfizma B hromozoma" kojim je rukovodio dr Mladen Vujošević. Projekt, u okviru osnovnih istraživanja u biologiji, finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Na ovom putovanju nisam bila sama. Puno ljudi je doprinelo tome da stignem na odredište, ali i da shvatim da sam stigla. Bilo da su utabali put, bilo da su davali smernice, bilo da su me bodrili kad zastanem, bilo da su radili sve to zajedno – učinili su da ova knjiga, ugleda svetlost dana.

Zbog svega toga sam zahvalna:

Dr Mladenu Vujoševiću, čije znanje, iskustvo i rezultati uspešne, višedecenijske karijere čine temelj ovog rada. Hvala pre svega na ukazanom poverenju, na podršci i na dragocenim savetima u radu. Još veće hvala, na toplim, roditeljskim savetima i razumevanju na koje sam uvek nailazila.

Mojim divnim mentorkama dr Jeleni Blagojević i dr Tanji Adnađević, na entuzijazmu i posvećenosti koje su uložile u rad sa mnom, na brzini kojom su reagovale kad mi je trebala pomoć, na savetima, na ohrabrenju i na celokupnoj pozitivnoj atmosferi koju su stvarale oko mene. Jeleni sam posebno zahvalna na pažnji koju mi je poklanjala u „kriznim situacijama“.

Dr Vladimiru Trifonovu, dr Svetlani Romanenko i dr Alekseju Makuninu, na svemu što sam naučila od njih, na posvećenom vremenu, na uspešnoj saradnji i na divnom prijateljstvu koje smo ostvarili.

Dragim kolegamicama dr Gorani Stamenković, dr Vanji Bugarski-Stanojević i dr Vidi Jojić, na rezultatima koje su ostvarile a koji su mi bili bitne smernice u istraživanju, na rečima podrške i na tome što sa njima nikad nije dosadno.

Prof. dr Marini Stamenković Radak na tome što je sve formalnosti koje prate studije na modulu Genetika činila jednostavnim, na podršci i pohvalama koje je imala za mene.

Dr Mihailu Jeliću na dragocenim sugestijama i na tome što je divan.

Ivani, Branki i Vladici na tome što su pre svega prijatelji pa onda kolege, na tome što sam uz njih postala terenac i naučila mnogo toga.

Kolegama sa drugih odeljenja koje sam često presretala sa pitanjima i sa kojima sam provodila pauze, na tome što IBISS čine prijatnim mestom za rad.

Mojim roditeljima, mojoj braći Miši i Vladi i njihovim porodicama, mojoj kumi i svim prijateljima... na svemu što jesu, na ljubavi koju primam od njih, na podršci, na sigurnosti i snazi koju mi daju.

Posvećeno mom dedu Ranku. On bi danas bio najponosniji ded na svetu.

Molekularna struktura, poreklo i funkcija B hromozoma kod žutogrlog šumskog miša *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)

Sažetak

B hromozomi predstavljaju prekobrojne hromozome koji nisu neophodni za normalan rast i razviće. Ovi prekobrojni hromozomi se javljaju kod svih višecelijskih eukariotskih grupa, osim kod ptica, i različiti su po poreklu, morfologiji, veličini, broju, genetičkoj strukturi i efektima na fenotip. Njihova prisutnost u živom svetu procenjuje se na 3% kariotipski analiziranih vrsta. Karakteriše ih nasleđivanje koje ne prati Mendelova pravila, kao i izostanak rekombinacije sa hromozomima osnovnog A seta. Glavna pitanja koja se postavljaju u savremenim istraživanjima B hromozoma se odnose na njihovo poreklo, mehanizme nastanka i održavanja. Poznavanje genetičkog sadržaja, transkripcionog statusa i efekata prekobrojnih hromozoma, omogućuje rasvetljavanje njihovog biološkog značaja.

Glodari su najbrojniji nosioci B hromozoma među sisarima. Rod *Apodemus* broji ukupno 20 vrsta, od kojih je kod šest zabeleženo prisustvo B hromozoma. U ovoj studiji izučavani su B hromozomi na jedinkama vrste žutogrli miš, *Apodemus flavicollis*. Nosioci imaju najčešće jedan ili dva B, dok je maksimalan zabeležen broj osam B hromozoma. Prekobrojni hromozomi se kod ove vrste javljaju u svim do sada proučavanim populacijama na teritoriji Republike Srbije, sa različitom učestalošću. Brojne populacione studije na ovoj vrsti pokazuju da jedinke sa B hromozomima imaju višu adaptivnu vrednost u poređenju sa jedinkama bez prekobrojnih hromozoma.

Cilj ove studije bio je utvrđivanje sekvence, proučavanje porekla, kao i analiza transkripcione aktivnosti pojedinih sekvenci B hromozoma vrste *A. flavicollis*. U istraživanje su uključene životinje sa lokaliteta u Republici Srbiji, Ruskoj federaciji i Republici Belorusiji. Metodom mikrodisekcije iz kariotipa tri jedinke su izolovani B hromozomi koji su potom umnoženi u lančanoj reakciji polimeraze (PCR). Proizvedene su fluorescentne B-specifične probe. Procena homologije između B-specifičnih proba i hromozoma osnovnog kariotipa iste vrste izvršena je putem fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Utvrđena je homologija između sekvence B hromozoma i:

- a) pericentromernog regiona (PR) polnih hromozoma,
- b) subtelomernih regiona dva para malih autozoma, kao i

c) slabija homologija sa distalnim regionom Y hromozoma.

Homologija između sekvenci različitih B hromozoma je potvrđena bez obzira na geografsku udaljenost populacija iz kojih uzorci vode poreklo i nezavisno od broja B hromozoma u kariotipu. Ovo ukazuje na isto poreklo i/ili strukturu svih B hromozoma kod vrste *A. flavicollis*.

U ovoj studiji je takođe pokazano da i pored česte zastupljenosti *C-kit* gena na B hromozomima različitih vrsta sisara, ovaj gen nije pronađen na B hromozomima vrste *A. flavicollis*.

Poređenjem sekvenci B hromozoma sa referentnim genomom vrste *Mus musculus*, identifikovano je 39 gena sa 22 hromozomska regiona koja vode poreklo sa 16 hromozoma referentnog genoma. Sa izuzetkom B hromozoma poreklom iz Ruske federacije, koji u sekvenci sadrži jedan dodatni hromozomski region koji nije nađen kod populacija iz Republike Srbije, rezultati pokazuju da su svi analizirani B hromozomi izgrađeni od istih regiona hromozoma A seta. Sekvenca B hromozoma je u najvećoj meri sadrži gene koji kodiraju proteine mikrotubula i ćelijskog ciklusa. Takođe su prisutni i geni koji kodiraju nukleotid-vezujuće, metal-vezujuće proteine kao i proteine membrane, identifikovan je i veliki broj repetitivnih sekvenci, među kojima su transpozoni u nekim slučajevima bili tandemski organizovani. Utvrđeno je i da se geni smešteni na B hromozomima nalaze u različitim stadijumima degradacije.

Nasuprot višedecenijskom uverenju da su B hromozomi genetički inertni, u ovom istraživanju je pokazano da se pseudogeni poreklom sa B hromozoma transkribuju. Pored toga, neizmenjeni geni sa B hromozoma, ili sa osnovnog genoma, u prisustvu B hromozoma, pokazuju viši nivo transkripcije kod ženki u mlađem životnom dobu. Transkripcija gena *Cenpe* je povezana i sa brojem B hromozoma, tako da je nivo transkripcije najviši kod jedinki koje imaju jedan B hromozom.

B hromozomi vrste *A. flavicollis*, najverovatnije vode poreklo od pericentromernog regiona X hromozoma koji se nalazi neposredno uz pseudoautozomalni region, odlikuju se stabilnom genetičkom strukturom na širokom arealu vrste, transkripciono su aktivni na način koji je povezan sa polom, starošću i brojem B hromozoma u kariotipu.

Ključne reči: B hromozomi, genetika, FISH, mikrodisekcija, sekvenciranje, RT-PCR, *Apodemus flavicollis*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK: 575:599.323.4(043.3)

Molecular structure, origin and function of B chromosomes in yellow-necked wood mouse *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)

Summary

B chromosomes (Bs) are supernumerary chromosomes in a standard karyotype, unnecessary for normal growth and development. Bs are present in all main groups of multicellular eukaryotes, except birds, and extremely variable considering origin, morphology, size, number, molecular structure, and phenotypic effects. 3% of all analyzed species have B chromosomes. The Bs do not follow rules of Mendelian segregation law and do not recombine with members of the basic A chromosome complement. The main questions considered in contemporary studies of Bs are surrounding their origin, mechanisms of formation and maintenance. Knowledge of their molecular structure, transcriptional activity, and phenotypic effects, will allow a deeper understanding of their biological importance.

Within mammals, the most frequent carriers of Bs are rodents. The genus *Apodemus* includes 20 species, six of which carry Bs, in addition to A chromosome set. In this study, B chromosomes were analyzed in specimens of the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. Carriers usually have one or two Bs, and the highest recorded number in this species is eight B chromosomes. In different frequencies, supernumeraries are present in all studied populations of *A. flavicollis* in the territory of the Republic of Serbia. Numerous population studies of this species are indicating that B carriers have a higher fitness compared to individuals without B chromosomes.

The aim of this study was to define sequence, origin and transcriptional activity of selected B regions in species *A. flavicollis*. Specimens were collected from different localities in the Republic of Serbia, Russian Federation and the Republic of Belarus. B chromosomes have been isolated by microdissection from the karyotype of three individuals and amplified in the polymerase chain reaction (PCR). B-specific fluorescent probes were synthesized. Estimation of homology between B-specific probes and chromosomes of A set had been obtained by fluorescent in situ hybridization (FISH). Homology was shown between the B chromosome and:

- a) pericentromeric region (PR) of sex chromosomes
- b) subtelomeric region of the two pairs of small chromosomes and

c) lower homology with the distal region of the Y chromosome.

Despite the distinct geographical origin of samples and different number of Bs in karyotypes, hybridized probes showed the same affinity to Bs. This indicates the same origin and/or structure of all Bs in *A. flavicollis*.

This study has demonstrated that *C-kit* gene does not contribute to the composition of supernumeraries in *A. flavicollis*, contrary to the studies of Bs in numerous mammalian species.

Comparing sequences of Bs and referent genome of the species *Mus musculus*, 39 genes in 22 chromosomal regions that originate from 16 chromosomes of the referent genome have been identified. With the exception of one region present on B chromosome from Russian Federation, that contained one additional chromosomal region not present on the samples from Serbian populations, results demonstrate that all analyzed Bs are composed of the same A-chromosomes' regions. B chromosomes are rich in microtubule and cell cycle protein-coding genes. Other present categories include genes that are coding nucleotide-binding, membrane, and metal-binding proteins, as well as a high amount of repetitive elements. Transposable elements were tandemly arranged in some cases. Genes present on B chromosomes are at different stages of degradation.

In contrast to the view accepted for many decades that Bs are genetically inert elements, this study demonstrates that pseudogenes on Bs are transcribed. The study also demonstrates that Bs-genes, or standard-genome genes in the presence of Bs, show higher transcriptional levels in young females. Furthermore, transcription of *Cenpe* gene is linked with the number of Bs, in the manner that samples with one B show the highest transcription level.

B chromosomes in *A. flavicollis* probably originate from the pericentromeric region of the X chromosome which is positioned near pseudoautosomal region, they are featured with stable genetic structure throughout the whole areal of the species and are transcriptionally active depending on the sex, age and number of Bs.

Key words: B chromosomes, genetics FISH, microdissection, sequencing, RT-PCR, *Apodemus flavicollis*.

Research area: Biology

Area of special interest: Genetics

UDK: 575:599.323.4(043.3)

Sadržaj

Uvod	1
B hromozomi, opšte karakteristike	1
Poreklo i nastanak B hromozoma	2
Modeli održavanja	4
Efekti B hromozoma	6
Geni na B hromozomima	7
Transkripciona aktivnost sekvenci na B hromozomima	10
B hromozomi kod roda <i>Apodemus</i>	13
B hromozomi kod vrste <i>A. flavicollis</i>	13
Ciljevi	16
Materijal i metode	17
Prikupljanje i priprema biološkog materijala za eksperimente	17
Hromozomski preparati	17
Izolovanje RNK	18
Izolovanje DNK	19
DNAzni tretman	20
Određivanje koncentracije DNK i RNK	20
Određivanje starosti	20
Istraživanje porekla B hromozoma	21
Ćelijska kultura	22
Tehnika G-traka	22
Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	22
Skrining B hromozoma na <i>C-kit</i> gen i gen za 18S rRNK	23
Agarozna gel-elektroforeza	25
Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu RT-PCR (engl. Real Time-PCR), DNK matrica	25
Relativna kvantifikacija je $RQ=2^{-ddCt}$	25
Sekvenciranje mikrodisekovanih B hromozoma	26
Identifikacija ciljanih regiona	27
Analize varijacija sekvence	27

Analize repetitivnih elemenata	27
Dostupnost podataka.....	28
Transkripciona aktivnost i B hromozomi	28
Odabir prajmera	30
Lančana reakcija polimeraze PCR.....	30
Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu RT-PCR (engl. Real Time-PCR), RNK matrica	31
Relativna kvantifikacija je $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$	31
Rezultati.....	33
Poreklo B hromozoma	33
Genetički sadržaj B hromozoma.....	38
Proveravanje prisustva <i>C-kit</i> gen i gen za 18S rRNK na B hromozomima	38
Sekvenca B hromozoma vrste <i>A. flavicollis</i>	40
Transkripciona aktivnost pseudogena poreklom sa B hromozoma i gena sa, ili u prisustvu B hromozoma	44
Diskusija	54
Poreklo B hromozoma	54
Genetički sadržaj B hromozoma.....	58
Transkripciona aktivnost pseudogena i gena poreklom sa B hromozoma.....	63
Evolucioni put B hromozoma	68
Literatura	74

Uvod

B hromozomi, opšte karakteristike

Uz osnovni kariotip kod nekih vrsta mogu se naći i hromozomi koji nisu neophodni za preživljavanje, normalan rast i razviće, ali se isto tako ne dovode u vezu sa nekim štetnim promenama na fenotipskom nivou, kao što je to slučaj kod aneuploidija. Ovi dodatni hromozomi otkriveni su početkom prošlog veka kod jedne vrste insekata roda *Anisoscelis* (Wilson 1906). Nazvani su B hromozomima kako bi se naznačila razlika između njih i hromozoma osnovnog seta (A seta) (Randolph 1928).

Termin B hromozomi obuhvata izuzetno heterogenu grupu prekobrojnih hromozoma raznovrsnih po pitanju porekla, morfologije, veličine, broja, strukture i efekata na fenotip. Ono što bi jedino, bez izuzetaka, moglo da se izdvoji kao zajednička osobina B hromozoma jeste da nisu neophodni za preživljavanje. I pored toga što nisu neophodni za normalno razviće i rast organizma, začuđujuća je njihova značajna zastupljenost u živom svetu. Pronađeni su među vrstama svih višecelijskih eukariotskih grupa (Kimura i Kayano 1961; Jones i Rees 1982; Jones 1991) sem ptica (Blagojević i Vujošević 2004). Ranije je bilo procenjeno da oko 15% eukariotskih vrsta ima B hromozome (Jones i Rees 1982; Beukeboom 1994) ali najnovija studija (D'Ambrosio i sar. 2017) je pokazala da su prisutni kod oko 3% kariotipski ispitanih vrsta. Među njima je i oko 2% vrsta sisara čiji su hromozomi izučeni (Vujošević i sar. 2018).

B hromozomi su veoma raznovrsni po veličini, kako između vrsta, tako i među jedinkama iste vrste. U odnosu na kariotip nosilaca, veličina im varira u opsegu od mikrohromozoma do dimenzija koje premašuju najveće hromozome osnovnog seta. Morfološki, na osnovu položaja centromere B hromozomi mogu biti akrocentrični, metacentrični i submetacentrični (Jones i Rees 1982; Houben i sar. 2014). Mogu se javljati pojedinačno u kariotipu, ili po broju prevazilaziti broj hromozoma osnovnog seta. Na primer, kukuruz koji ima diploidni broj od 20 hromozoma, može u svom genomu da ima čak 34 B hromozoma (Jones i Rees 1982; Burt i Trivers 2006). Do sada je najveći broj od 50 B hromozoma nađen kod biljke *Pachyphytum fittkai* (Uhl i Moran 1973), a rekorder među sisarima je korejski poljski miš, *Apodemus peninsulae*, koji može imati i do 30 B hromozoma (Borisov i sar. 2010).

Učestalost B hromozoma u živom svetu je veoma varijabilna, kako među vrstama, tako i među populacijama iste vrste, ali i među tkivima samih jedinki koje su nosioci. B hromozomi mogu da se javljaju u svim ili samo nekim populacijama jedne vrste. Među populacijama može postojati različita učestalost B hromozoma (Vujošević i sar. 1991; Vujošević i Blagojević 1995), čak i ćelije različitog tkiva jedne jedinke se mogu razlikovati po prisustvu i broju B hromozoma usled hromozomskog mozaicizma (Roslik i Kartavtseva 2010; Bugarski-Stanojević i sar. 2016).

Dok je prisustvo A hromozoma u nebalansiranom broju praćeno poremećajima u fenotipu (Siegel i Amon 2012), prisustvo B hromozoma se kod mnogih vrsta najčešće ne može povezati sa promenama u fenotipu.

Pored numeričke i morfološke varijabilnosti, B hromozome karakteriše i strukturna varijabilnost. Naime, razlikuju se po načinu pakovanja hromatina - češće su zapažani heterohromatični nego euhromatični B hromozomi (Jones i Rees 1982). Te karakteristike su dovele do zaključka da su B hromozomi siromašni funkcionalnim genima, da su transkripciono utišani te generalno predstavljaju inertne elemente genoma. Ipak, zabeleženi su raznovrsni efekti B hromozoma na fenotip nosilaca. Kod nekih vrsta je primećeno da kad su prisutni u velikom broju mogu ispoljavati neke štetne fenotipske efekte kao što je opadanje fertiliteta (Jones i Rees 1982). Nasuprot tome, kod drugih vrsta su primećeni i pozitivni efekti B hromozoma na adaptivnu vrednost nosilaca (Holmes i Bougourd 1989; Plowman i Bougourd 1994).

S obzirom na to da su B hromozomi značajno različiti po genetičkoj strukturi od pojedinačnih hromozoma A seta, smatra se da se oni ne sparuju niti rekombinuju sa hromozomima iz osnovnog kariotipa (Jones i Houben 2003). Ipak, i tu ima izuzetaka. Ovakve interakcije između hromozoma A i B seta zabeležene su kod lisice *Vulpes vulpes* (Basheva i sar. 2010), što može ukazivati na postojanje većih, neizmenjenih regiona poreklom sa A hromozoma na B hromozomima nekih vrsta.

Poreklo i nastanak B hromozoma

Postoji nekoliko pretpostavki o poreklu B hromozoma. Smatra se da su nastali ili od hromozoma osnovnog seta nosilaca ili u procesu hibridizacije između sestrinskih vrsta. Eksperimentalne potvrde postoje i za jednu i za drugu pretpostavku (Camacho i

sar. 2000; Jones i Houben 2003; Houben i sar. 2014; Valente i sar. 2017; Dhar i sar. 2019). B hromozomi nastali u procesu hibridizacije javljaju se kod biljaka roda *Coix* (Sapre i Deshpie 1987), ribe *Poecilia formosa* (Schartl i sar. 1995), parazitske ose *Nasonia vitripennis* (McAllister i Werren 1997).

Brojni su i primeri B hromozoma koji vode poreklo od hromozoma A seta iste vrste, bilo da su u pitanju autozomi ili polni hromozomi. B hromozomi kukuruza, na primer, u DNK sekvenci sadrže ponovke specifične za centromere hromozoma broj četiri iz A seta, što ukazuje da je hromozom četiri verovatni donator centromere B hromozoma (Page i sar. 2001). Sekvenciranjem B hromozoma raži pokazano je da su oni nastali od dva hromozoma iz A seta. Njima su pridodate i sekvence organela, koje kasnije nakupljaju velike količine specifičnih repetitivnih elemenata i insercija tokom nezavisne evolucije B hromozoma od ostatka genoma (Martis i sar. 2012). Evoluciono mlad B hromozom, koji je najverovatnije nastao od hromozoma broj četiri, pronađen je kod vinske mušice, *Drosophila melanogaster* (Bauerly i sar. 2014). Kod voćne mušice, *Drosophila albomicans*, B hromozomi takođe nastaju spajanjem segmenata različitih hromozoma A seta (Zhou i sar. 2012). U nekim slučajevima klasteri segmentne duplikacije kod skakavca, *Podisma sapporensis*, mogu biti povezani sa formiranjem neo-B hromozoma (Bugrov i sar. 2004). Dalje, upotrebom metoda NGS (*engl. Next Generation Sequencing*) otkriveno je i da su B hromozomi riba, *Astatotilapia latifasciata* i *Astyanax paranae* nastali od više hromozoma A seta (Silva i sar. 2014; Valente i sar. 2014). B hromozomi u južnoameričkom tribusu glodara *Oryzomyini* nastali su od pericentromernog heterohromatinskog regiona polnih hromozoma (Ventura i sar. 2015). Za B hromozome vrste *Apodemus peninsulae*, pokazano je da nastaju od heterohromatina sa autozoma i polnih hromozoma (Rubtzov i sar. 2009).

Kada je reč o B hromozomima koji nastaju od hromozoma A seta iste vrste, postavlja se pitanje koji su mehanizmi nastanka ovih dodatnih elemenata? Postoji nekoliko pretpostavki koje se međusobno ne isključuju.

Pored mogućnosti da B hromozomi nastaju dupliranjem segmenata hromozoma A seta, moguće je i da nastaju kao sporedni proizvod Robertsonove translokacije između dva nehomologa, akrocentrična hromozoma sa tačkama prekida blizu centromera. U prilog tome govore podaci da je analizom sisarskih B hromozoma pokazano da su oni češći kod vrsta sa akrocentričnim hromozomima (Patton 1977;

Palestis i sar. 2004). Takođe je očekivano da se B hromozomi javljaju u taksonima sa većim brojem hromozomskih rearanžmana i nestabilnim brojem hromozoma. To i jeste slučaj kod glodara za koje su karakteristični hromozomski rearanžmani (Graphodatsky 2007), a koji su među do sada istraženim sisarim najzastupljeniji nosioci B hromozoma (Vujošević i sar. 2018). U skladu sa ovom pretpostavkom, zanimljivo je i viđenje B hromozoma kao sporednih proizvoda evolucije A hromozoma (Jones i Houben 2003). Dobar primer za to je raž, *Secale cereale*, gde je zbog iste procenjene starosti roda *Secale* i B hromozoma ove vrste, pretpostavljeno da je B hromozom u ovom slučaju nastao kao sporedni proizvod hromozomskih rearanžmana prilikom odvajanja od pšenice (Martis i sar. 2012).

Evolucija B hromozoma mnogih vrsta je dostigla stadijum u kom su oni izgrađeni od brojnih kopija malih regiona različitih hromozoma A seta (Yoshida i sar. 2011; Martis i sar. 2012; Valente i sar. 2014; Makunin i sar. 2016), što bi moglo da bude posledica postepenog dodavanja sekvenci na mladi B hromozom (Houben i sar. 2014) i/ili jednog, katastrofičnog hromozomskog rearanžmenta, kao što je hromotripsis (Stephens i sar. 2011).

Modeli održavanja

Primećeno je da su B hromozomi u populacijama nekih vrsta prisutni sa istom učestalošću dugi niz godina. Zanimljivo je pitanje kako se B hromozomi održavaju u populacijama, s obzirom na to da nisu neophodni za normalno razviće svojih nosilaca?

Karakteristika ovih elemenata jeste često odstupanje od Mendelovih pravila nasleđivanja (Jones 1991). Mali je broj istraživanja koja to potvrđuju, ili opovrgavaju, ali se ipak smatra da je odstupanje od standardnih pravila nasleđivanja česta karakteristika B hromozoma.

Postoje dva osnovna modela koja opisuju održavanje B hromozoma u populacijama.

Prvi, parazitski model (Östergren 1947) predlaže da B hromozomi ostaju u populacijama zahvaljujući ravnoteži koja je produkt akumulacije B hromozoma putem mejotičkog drajva i eliminacije nosioca B hromozoma iz populacije zbog njihovih štetnih efekata (Jones 1991). Parazitski model je zasnovan na pretpostavci da B

hromozomi ne obezbeđuju nikakvu adaptivnu prednost svojim nosiocima, i da su zapravo genomske paraziti koji koriste ćelijske resurse za održavanje, provlačeći se uz hromozome iz A seta. U tom slučaju, kada su u manjem broju ovi hromozomi „ne smetaju“ svojim nosiocima, međutim kada se njihov broj poveća to dovodi do efekata poput smanjene fertilitnosti i oni bivaju eliminisani iz populacije (Bougourd i Jones 1997; Jones i Houben 2003; Camacho 2005; Houben i sar. 2013). Visoka učestalost B hromozoma bez jasnog pozitivnog efekta kod domaćina teorijski se može povezati sa višom stopom prenosa iz jedne u drugu generaciju, korišćenjem mehanizma drajva koji dovodi do ne-Mendelovske segregacije u mejozi (Jones 1991). Ovaj mehanizam povećava verovatnoću da će B hromozomi biti zadržani u genomu domaćina (Camacho 2005). Pretpostavlja se da taj mehanizam omogućava brz porast učestalosti B hromozoma u populacijama. Mejozički drajv može biti zastupljen kod oba ili samo kod jednog pola (Jones 1991). Mehanizam kojim bi B hromozomi mogli da utiču na mejozički drajv je potpuno nepoznat. U prilog ovakvom načinu održavanja B hromozoma kroz generacije potencijalno govore i nalazi da kod nekih vrsta, poput raži i kukuruza gde B hromozomi, pored ponovaka karakterističnih za centromere A hromozoma, imaju i B specifične centromerne ponovke (Jin i sar. 2005; Banaei-Moghaddam i sar. 2012). Akumulacija B specifičnih ponovaka u pericentromernom regionu verovatno ima značajnu ulogu u segregaciji hromozoma (Yamagishi i sar. 2008).

Drugi model je heterotični (White 1973) i on predlaže da B hromozomi bivaju zadržani u populacijama zahvaljujući ravnoteži koja nastaje između korisnih efekata koje ovi elementi ispoljavaju kada su prisutni u malom broju, i eliminacije nosilaca velikog broja B hromozoma kao posledice ispoljavanja njihovih štetnih efekata. Pretpostavlja se da su u ovom slučaju prednosti u adaptivnoj vrednosti koju imaju nosioci B hromozoma preduslov za održavanje B hromozoma. U prilog tome govori i činjenica da kod jednog broja vrsta nije potvrđena akumulacija B hromozomima u gametima, te mejozički drajv nije uočen kod svih vrsta koje imaju B hromozome (Vujošević i sar. 1990). Kod ovih vrsta se pretpostavlja da su upravo prednosti koje B hromozomi daju svom nosiocu, presudne za održavanje ovih genetičkih elemenata u populacijama (White 1973).

Danas je parazitski model u održavanju B hromozoma dominantan iako je postojanje mejotičkog drajva, koji je uslov za ovu teoriju, potvrđeno kod malog broja vrsta. Isti je slučaj i za odsustvo drajva, pa je očigledno da obe teorije zahtevaju dodatna istraživanja i modifikacije.

Postoji i treći model koji je dao (Camacho i sar. 1997). Ovaj model kombinuje prethodna dva, ali se i dalje razmatra kao proširenje parazitskog modela. Po njemu su B hromozomi u momentu nastanka parazitski i poseduju mehanizam akumulacije. Kroz paralelnu evoluciju genom sve bolje prihvata B hromozome, a oni postaju sve manje parazitski tako da stižu do gotovo adaptivno neutralnog stanja. U tom stupnju mogu biti eliminisani, ili se javlja novi oblik B koji je ponovo parazitski. Dokazi za cikličnu promenu održavanja B hromozoma ne postoje, a bazirani su na isključivom stavu da svojim nosiocima nikada ne obezbeđuju povećanje adaptivne vrednosti.

Efekti B hromozoma

Mada generalno vlada mišljenje da B hromozomi ne utiču na fenotip, zapaženi su i pozitivni i negativni fenotipski efekti kod nosilaca B hromozoma. Direktno dokaze da B hromozomi mogu delovati na porast adaptivne vrednosti svojih nosilaca predstavljaju slučajevi ovsa, *Avena sativa* i patogenih gljiva *Nectria haematococca* i *Alternaria alternata*. Naime, utvrđeno je prisustvo gena na B hromozomima koji kod ovsa obezbeđuju rezistenciju na žitnu rđu, a kod navedenih gljiva povećavaju sposobnost infekcije i otpornost na antibiotike (Han i sar. 2001; Harimoto i sar. 2007; Coleman i sar. 2009). Adaptivna prednost nosilaca B hromozoma pokazana je kod vrste luka *Allium schoenoprasum*, gde prisustvo B hromozoma ubrzava germinaciju semena posebno u uslovima suše (Plowman i Bougourd 1994) i povećava preživljavanje tokom ranih stupnjeva ćelijskog razvića (Holmes i Bougourd 1989). Kod riba iz porodice ciklida B hromozomi imaju ulogu u determinaciji pola (Yoshida i sar. 2011). Kada je reč o negativnim efektima na adaptivnu vrednost u slučaju parazitskog modela održavanja, jedan od najštetnijih efekata koji se pripisuje B hromozomima bi bila energija koja se troši na održavanje ovih elemenata tokom mejoze kao i na hijazme i rekombinaciju čija se učestalost u njihovom prisustvu povećava (Jones i Rees 1982; Jones 1995; Camacho 2005; Burt i Trivers 2006). Štetni efekti B hromozoma su

najčešće povezani sa fertilnošću nosioca (Camacho i sar. 2000). Povećanje broja B hromozoma, na primer, dovodi do steriliteta kod kukuruza *Zea mays* (Masonbrink i Birchler 2012). Pokazano je i da prisustvo B hromozoma smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima u kalusima biljke *Acanthophyllum laxiusculum* pod stresnim uslovima saliniteta (Meratan i sar. 2013).

Geni na B hromozomima

Na osnovu izučavanja B hromozoma upotrebom metoda citogenetike, a zatim i molekularne citogenetike, ovi dodatni elementi genoma su uglavnom opisivani kao heterohromatični, bogati repetitivnim DNK elementima, uključujući mobilne i satelitske DNK elemente (Camacho 2005; Burt i Trivers 2006). B-specifična akumulacija *Gypsy* retrotranspozona i drugih ponovaka je registrovana kod uklije *Alburnus alburnus* (Ziegler i sar. 2003), kukuruza (Lamb i sar. 2007), raži (Sandery i sar. 1990) i gljive *Nectria hematococca* (Coleman i sar. 2009). Identifikacija sekvenci na B hromozomima je započeta upotrebom dostupnih proba za FISH (*engl. Fluorescent In Situ Hybridization*) za sekvence koje se inače nalaze u osnovnom genomu. Pre svega su tako pretraživane i nalažene repetitivne sekvence LINE (*engl. Long Interspersed Nuclear Elements*), SINE (*engl. Short Interspersed Nuclear Elements*) (Peppers i sar. 1997), intersticijalne telomerne sekvence (Wurster-Hill i sar. 1988; Szczerbal i Switonski 2003), geni za ribozomalnu RNK (rRNK) (López-León i sar. 1994; Donald i sar. 1995; Stitou i sar. 2000; Szczerbal i Switonski 2003; Bidau i sar. 2004; Silva i Yonenaga-Yassuda 2004; Van Vugt i sar. 2005; Sabrina i sar. 2009) i histonski geni (Teruel i sar. 2010; Serrano i sar. 2016). Sa takvim saznanjima koja su delimično pružala uvid u genetičku strukturu B hromozoma, a usled izostanka lako uočljivih, ili prisustva diskretnih fenotipskih efekata, zajedno sa nedostatkom dokaza o prisustvu protein kodirajućih gena, B hromozomi su u većini slučajeva smatrani transkripciono utišanim delom genoma.

Miao i saradnici (1991) su prvi pronašli gen na B hromozomima koji kodira protein, kod gljive *Nectria hematococca*. Protein-kodirajući geni su kasnije pronađeni i na B hromozomima kod sisara (Graphodatsky i sar. 2005). Kod tri vrste iz familije Canidae je potom na B hromozomima locirano nekoliko hromozomskih regiona sa

višestruko umnoženim sekvencama poreklom od domaćeg psa na kojima su bili i protein-kodirajući geni (Becker i sar. 2011).

Savremeni metodološki pristupi (Ahmad i Martins 2019), koji podrazumevaju izolaciju B hromozoma metodama protočne citometrije (Martis i sar. 2012) ili mikrodisekcije (Silva i sar. 2014; Valente i sar. 2014) i određivanje kompletne sekvence B hromozoma, omogućuju precizan uvid u genetičku strukturu B hromozoma (Trifonov i sar. 2002). Uz to, i poređenje sekvenci celokupnog genoma jedinki sa i bez B hromozoma omogućava informaciju o genetičkom sadržaju dodatnih hromozoma (Ruban i sar. 2017). Brzim razvojem tehnologija sekvenciranja i brzim nakupljanjem podataka o sekvencama B hromozoma raznih vrsta, predloženi su i precizniji scenariji o postanku, održavanju i evoluciji ovih dodatnih elemenata genoma. NGS (*engl. Next Generation Sequencing*) tehnologija omogućava veliki opseg analiza genomske sadržaja, što nije bilo moguće u klasičnoj i molekularnoj citogenetici, i samim tim identifikaciju velikog broja gena i sekvenci koji su povezani sa izučavanom varijacijom kariotipa. Upotreba ovih metoda omogućila je identifikovanje hiljada genskih sekvenci lokalizovanih na B hromozomima različitih vrsta. Ono što je u dosadašnjim istraživanjima uočeno za sekvence B hromozoma, jeste da bez obzira na to kako su nastali, gotovo uvek predstavljaju mešavinu sekvenci sa različitih hromozoma A seta (Martis i sar. 2012; Silva i sar. 2014; Valente i sar. 2014). Analize sekvenci B hromozoma pokazuju da većina njih vodi poreklo sa više A hromozoma. Pored toga, poređenjem roditeljskih gena lociranih na A i njima odgovarajućih gena lociranih na B hromozomima, uočeno je da su geni smešteni na B hromozomima podložniji mutacijama, i da stopa mutacija između različitih gena nije ista. Identičnost sekvenci paralogih gena na A i B hromozomima može da ukazuje na to da su geni na B hromozomima na početku svoje evolucije (Ma i sar. 2017), ili je pak reč o „esencijalnim“ genima koji su ključni za opstanak B hromozoma u genomu (Ahmad i Martins 2019). Neke od genskih sekvenci na B hromozomu raži imaju malu sličnost sa svojim roditeljskim sekvencama na A hromozomima, što ukazuje, ili na bržu degradaciju, ili na davnu inserciju na B hromozom (Valente i sar. 2014; Banaei-Moghaddam i sar. 2015). Valente i saradnici (Valente i sar. 2014) su pokazali da B hromozomi kod ribe *Astatotilapia latifasciata* sadrže hiljade sekvenci dupliranih sa gotovo svih hromozoma A seta, uključujući i transpozone i gene. Kod ovih ciklida

najveći deo gena identifikovanih na B hromozomima je fragmentisan. Takođe, sve je više otkrivenih intaktnih, neizmenjenih gena na B hromozomima, za koje se smatra da su „esencijalni“ za B hromosome (Ma i sar. 2017; Navarro-Domínguez i sar. 2017; Makunin i sar. 2018; Clark i sar. 2018; Kichigin i sar. 2019). Kod *A. latifasciata* je za tri takva gena potvrđena i ekspresija *in silico*, a pored toga identifikovani su i hnRNP Q-like (*engl. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q-like*) geni koji su jedinstveni za nosioce B hromozoma (Valente i sar. 2014). Veći stepen pseudogenizacije je nađen kod rRNK gena lociranih na B hromozomima skakavca *Eyprepocnemis plorans*, gde ovi geni praktično služe kao „hvatači“ R2 neLTR retrotranspozona i na taj način značajno smanjuju mogućnost njihove insercija na A hromosome (Montiel i sar. 2014). WGS (*engl. Whole Genome Shotgun*) sekvenciranje genoma patogene gljivice *Mycosphaerella graminicola*, (Goodwin i sar. 2011) pokazalo je da B hromozomi poseduju repetitivne sekvence i genske sekvence sa većine ili svih hromozoma glavnog seta, sa dodatnim jedinstvenim genima nepoznatog porekla. Sekvence B hromozoma zapravo najčešće izgledaju kao kolekcije repetitivnih elemenata koje su isprekidane neizmenjenim, ili u manjoj, ili većoj meri, mutiranim genskim fragmentima, pseudogenima, koji vode poreklo sa velikog broja hromozoma A seta (Martis i sar. 2012; Makunin i sar. 2014).

Kada govorimo o genima otkrivenim na B hromozomima, primećena je i tendencija da ovi hromozomi različitih vrsta na sebi imaju gene koji pripadaju regulatorima ćelijskog ciklusa koji su uključeni u organizaciju mikrotubula i kinetohora (Becker i sar. 2011; Makunin i sar. 2014; Valente i sar. 2014). Za neke od njih potvrđena je i transkripciona aktivnost (Banaei-Moghaddam i sar. 2012; Trifonov i sar. 2013; Makunin i sar. 2014). Tako je zapaženo da protoonkogen *C-kit* postoji na B hromozomima lisice, *Vulpes vulpes* (Graphodatsky i sar. 2005), rakun psa, *Nyctereutes procynoides* (Yudkin i sar. 2007) i južnoameričkog jelena, *Mazama gouazoubira* (Makunin i sar. 2016). B hromozomi su kod dve vrste jelena, *Capreolus pygargus* i *Mazama gouazoubira*, izgrađeni od više autozomnih regiona na kojima su između ostalog smešteni protoonkogeni ili tumor-supresor geni (Makunin i sar. 2016). Nekoliko gena uključenih u organizaciju mikrotubula, strukturu kinetohora, rekombinaciju i progresiju ćelijskog ciklusa je pronađeno na B hromozomima ribe *A. latifasciata* (Valente i sar. 2014). Geni koji su uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa su pronađeni i

kod skakavca *E. plorans* (Navarro-Domínguez i sar. 2017). *Vrk1* (*Vaccinia Related Kinase 1*) gen, takođe uključen u kontrolu ćelijskog ciklusa, pronađen je na B hromozomima žutogrlog miša, *A. flavicollis* (Bugarski-Stanojević i sar. 2016).

Transkripciona aktivnost sekvenci na B hromozomima

Pored identifikovanja sekvenci na B hromozomima, mogućnost provere njihove transkripcione aktivnosti, kao i poređenja kompletnog transkriptoma između genoma sa B i bez B hromozoma, ukazuju na značaj i potencijalne funkcije B hromozoma u genomima domaćina. Tako da istraživanja koja uključuju DNK i RNK analize značajno povećavaju razumevanje biologije B hromozoma iznad do sada korišćenih klasičnih i molekularno-citogenetičkih metoda.

Kako B hromozomi nisu neophodni za normalno razviće, očekivano je da budu podložni mutacijama i pseudogenizaciji (Makunin i sar. 2014). Ono što je pre razumevanja uloge pseudogena bila misterija jeste, kako jedan ovakav dodatni element, koji je praktično skladište pseudogena, može da doprinese genomu? Čak i pre direktnih dokaza o transkripciji sekvenci sa B hromozoma postojali su indirektni dokazi o njihovoj aktivnosti. Na ovaj način, kroz identifikaciju nukleolarnih fenotipova povezanih sa ekspresijom rRNK gena, B hromozomi su prvobitno opisani kod vrsta *Dichroplus pratensis* (Bidau 1986) i *Simulium juxtacrenobium* (Brockhouse i sar. 1989).

Zahvaljujući mogućnosti da se ispita transkripciona aktivnost sekvenci koje vode poreklo sa B hromozoma, kao i transkripciona aktivnost celog genoma u prisustvu B hromozoma u odnosu na genome iste vrste koji ne sadrže ove dodatne elemente, dobijene su potvrde kako o transkripciji repetitivnih, protein-kodirajućih sekvenci, pseudogena, tako i o globalnom uticaju B hromozoma na aktivnost ostatka genoma. Neki od prvih dokaza o transkripcionoj aktivnosti B hromozoma pronađeni su u vidu transkripcije rRNK gena u biljci, *Crepis capillaris* (Leach 2005), zatim kod parazitskih crva, *Trichogramma kaykai* (van Vugt i sar. 2005). Kod žutogrlog miša, *A. flavicollis*, je takođe pokazana razlika u transkripcionoj aktivnosti tri gena između jedinki sa i bez B hromozoma (Tanić i sar. 2005). Transkripciono aktivni rRNK geni su kasnije identifikovani kod skakavaca *E. plorans* (Ruiz-Estévez i sar. 2012). Pored gena, na B

hromozomima su transkripciono aktivni i derivati retrotranspozona i repetitivnih elemenata kod kukuruza i raži (Lamb i sar. 2007; Carchilan i sar. 2007). Tačna funkcija transkripata ovih ponovaka sa B hromozoma nije poznata. Kod kukuruza i raži je za delove pseudogenskih sekvenci potvrđena transkripciona aktivnost, a neke od njih imaju mogućnost da u tkivima na genotip-zavisan način utiču na ekspresiju gena sa A hromozoma od kojih vode poreklo (Banaei-Moghaddam i sar. 2015; Huang i sar. 2016; Valente i sar. 2017). Identifikovan je i prvi gen koji kodira funkcionalni protein na B hromozomima. U poređnom analizom transkriptoma raži potvrđeno je da ukupnom transkriptomu doprinose i sekvence sa B hromozoma. *In vitro* analiza protein-kodirajućeg gena koji se nalazi i na A i na B hromozomu pokazivala je slično, RNK posredovano, utišavanje aktivnosti obe varijante. To ukazuje da B hromozomi raži nose funkcionalne protein kodirajuće gene, i da proteini kodirani sa B hromozoma mogu da deluju kao utišivači hromatin/DNK elemenata (Ma i sar. 2017). Analize transkriptoma kod kukuruza sa različitim kopijama B hromozoma obezbeđuju dokaze da na ekspresiju gena na A hromozomima utiče prisustvo B hromozoma i da veći broj B hromozoma daje mnogo očiglednije fenotipske efekte (Huang i sar. 2016). Pokazano je i da su neki ponovci karakteristični za B hromozome kod raži diferencijalno transkribovani u zavisnosti od tkiva (Klemme i sar. 2013). Da B hromozomi regulišu ekspresiju nekodirajućeg RNK, i na taj način utiču na ekspresiju A genoma potvrđeno je do sada u brojnim istraživanjima (Carchilan i sar. 2009; Banaei-Moghaddam i sar. 2012, 2015; Akbari i sar. 2013; Huang i sar. 2016; Ramos i sar. 2017).

Međutim nije za sve istraživane B hromozome pokazana aktivnost, pa su tako kod vrste vinske mušice *Drosophila melanogaster* vršene genetičke analize i merenja nivoa ekspresije gena sa hromozoma broj četiri, od kog se smatra da je nastao B hromozom. Rezultati pokazuju da B hromozom ne doprinosi transkriptomu genima hromozoma od kog je nastao. Za razliku od toga, kod druge vrste voćne mušice (*Drosophila albomicans*) B hromozomi kodiraju transkripciono aktivne gene (Zhou i sar. 2012). Profilisanje transkriptoma kod mužjaka sa i bez B hromozom-sličnih PSR (*engl. Paternal Sex Ratio*) hromozoma, urađeno na parazitskoj osi, *Nasonia vitripennis*, otkriveno je devet PSR specifičnih transkripata, četiri od njih kodiraju proteine, a za ostale je verovatno da daju nekodirajuću RNK (Akbari i sar. 2013). Sem toga, B hromozomi usled heterohromatične strukture mogu značajno uticati na efekat promene

pozicije gena u odnosu na predački hromozom, pa mogu funkcionisati kao pojačivači, ili utišivači, u zavisnosti od pozicije gena (Bauerly i sar. 2014).

Iako su geni na B hromozomima kod ribe *Astatotilapia latifasciata* većim delom fragmentisani, nekoliko gena je ostalo intaktno, a za tri takva gena je potvrđena i ekspresija *in silico* (Valente i sar. 2014). Rezultati RT-qPCR su pokazali da postoje varijacije u ekspresiji hnRNP Q-like sekvenci u zavisnosti od egzona, tkiva, pola, prisustva i odsustva B hromozoma. Ove sekvence su prisutne samo na B hromozomima. Egzoni B retrokopija ovog gena su prekomerno ekspimirani, naročito kod ženki sa B hromozomima. Rezultati ukazuju da su retroinsercije jedan dodatni i važan mehanizam koji doprinosi formiranju B hromozoma. Rezultati ovog rada takođe pokazuju da kod ženskog pola postoji diferencijalna ekspresija sekvenci sa B hromozoma, što govori u prilog tome da su ekspresija B hromozoma i determinacija pola kod ciklida na neki način povezane (Valente i sar. 2014). B hromozomi kod *A. latifasciatae* su i u drugim istraživanjima povezivani sa determinacijom pola, slično kao što je to kod drugih ciklida (Yoshida i sar. 2011; Clark i sar. 2018). Veza između ekspresije B hromozoma i ženskog pola takođe može da ukazuje na mehanizam drajva koji je aktivan u toku mejoze kod ženki, ali i na to da B hromozom doprinosi višoj adaptivnoj vrednosti ženki (Clark i sar. 2017). Kod sisara su takođe identifikovane transkribovane sekvence sa dodatnih hromozoma, konkretno u kulturi fibroblasta, B-specifične, protein-kodirajuće sekvence kod sibirskog jelena, *Capreolus pygargus* (Trifonov i sar. 2013).

U razumevanju aktivnosti B hromozoma korak dalje vodi metodološki pristup poređenja ukupnog transkriptoma jedinki sa i bez B hromozoma. Naime, istraživanja koja uključuju genomiku, transkriptomiku, epigenomiku, proteomiku, mogu sistematičnije da sagledaju efekte B hromozoma. Neka od tih istraživanja, pokazuju da B hromozomi utiču na biologiju ćelije na vrlo kompleksan način, koji najverovatnije favorizuje njihovo održavanje (Valente i sar. 2017). Prisustvo gena i funkcionalnih sekvenci na B hromozomima kao i njihov uticaj na ekspresiju celog genoma menja prvobitnu sliku o B hromozomima kao nefunkcionalnim elementima i usmerava nas ka stavu da B hromozomi mogu da izazovu velike promene na transkripcionom profilu ćelije i tako značajno utiču na biologiju ćelije. Analiza mikroRNK (miRNK) rađena je na celom mikroRN-omu između uzoraka sa B i bez B, vrste *A. latifasciata* (Valente i sar. 2017). Podaci dobijeni ovim istraživanjem govore da su miRNK, između ostalog,

uključene u ćelijsko razviće, kontrolu ćelijskog ciklusa i ćelijske deobe. Bazirajući se na ovakvim integrativnim metodama jasno je da su efekti B hromozoma na osnovni genom nosilaca izuzetno varijabilni i zavise od analiziranog tkiva, što znači da su B hromozomi aktivni na tkivno-specifičan način. Sve navedeno dovodi do zaključka da B hromozomi utiču na biologiju ćelije tako što menjaju ekspresiju gena osnovnog genoma i/ili doprinose transkriptomu ekspresijom svojih gena.

B hromozomi kod roda *Apodemus*

Rod *Apodemus* je specifičan među sisarima jer čak šest vrsta od 20 imaju B hromozome: *A. flavicollis* (Soldatović i sar. 1972), *A. peninsulae* (Hayata 1973), *A. sylvaticus* (Vujošević and Živković 1987), *A. mystacinus* (Belcheva i sar. 1988), *A. agrarius* (Kartavtseva 1994) i *A. argenteus* (Obara i sar. 1997). Postoji velika razlika u broju i učestalosti B hromozoma među vrstama roda *Apodemus* (Vujošević i sar. 2007). B hromozomi su prisutni u gotovo svim populacijama kod žutogrlog miša, *A. flavicollis*, i korejskog poljskog miša, *A. peninsulae*. Kod poslednje vrste B hromozomi su u mnogim populacijama prisutni kod svih jedinki (Kartavtseva i Roslik 2004), a najveći zabeležen broj B hromozoma je 30 (Borisov i sar. 2010). Poreklo i molekularna struktura B hromozoma je najviše izučavana kod *A. peninsulae* (Karamysheva i sar. 2002; Trifonov i sar. 2002; Rubtsov i sar. 2004; Matsubara i sar. 2004, 2008). Kod ove vrste je pokazano da postoji više tipova B hromozoma koji imaju različito poreklo (Trifonov i sar. 2002; Matsubara i sar. 2004). U populacijama *A. sylvaticus*, *A. agrarius* i *A. mystacinus*, jedinke sa B hromozomima se retko pojavljuju (Vujošević i Živković 1987; Belcheva i sar. 1988; Kartavtseva 1994). Ovakva niska učestalost B hromozoma u populacijama neke vrste može biti odraz njihovog skorijeg nastanka (Jones i Rees 1982).

B hromozomi kod vrste *A. flavicollis*

U populacijama vrste *A. flavicollis* B hromozomi su široko rasprostranjeni (Zima i Macholán 1995; Kartavtseva 2002). Na teritoriji Srbije B hromozomi su pronađeni u

svim istraživanim populacijama ove vrste, u opsegu učestalosti koji između populacija varira od 7% do 64% (Vujošević i sar. 1991; Vujošević i Blagojević 1995, 2000). Maksimalan broj B hromozoma do sada zabeležen je osam (Zima i Macholán 1995), dok je u Srbiji najveći zabeležen broj pet (Blagojević i Vujošević 1991), ali se najčešće sreću jedinke sa jedan i dva B hromozoma (Vujošević i sar. 1991; Wójcik i sar. 2004). Razlika u učestalosti jedinki sa B hromozomima između ženki i mužjaka ove vrste nije pronađena (Vujošević 1992; Vujošević i Blagojević 2000; Blagojević i Vujošević 2004). Dodatni hromozomi kod vrste *A. flavicollis* su akrocentrični kao i svi ostali hromozomi A seta, a po veličini se ne razlikuju od grupe pet najmanjih hromozoma u kariotipu (Vujošević i sar. 1991). U toku dijakineze, B hromozomi se pojavljuju u formi univalenata ili bivalenata, ne sparuju se sa hromozomima A seta i ne prave multivalentne konfiguracije (Vujošević i sar. 1990; Banaszek i Jadwiszczak 2006).

Odsustvo akumulacije B hromozoma u mejozi mužjaka (Vujošević i sar. 1990), kao i izostanak značajne razlike u fertilitetu između ženki sa B i bez B hromozoma kod ove vrste (Blagojević i sar. 2006), govore o izostanku mejotičkog drajva i podržavaju heterotični model održavanja B hromozoma u populacijama. Praćenjem istih populacija kroz različite sezone uočene su promene u učestalosti nosilaca B hromozoma (Blagojević i Vujošević 1995), i to na način da su povišene učestalosti uočene neposredno pre i posle zime, s tim da je učestalost stabilna kroz uzastopne godine (Vujošević 1992). Različita učestalost B hromozoma je takođe povezana i sa prilagođavanjem na različita staništa, posredstvom promenljivih sredinskih faktora koji direktno i/ili indirektno utiču na populacionu dinamiku vrste *A. flavicollis* (Vujošević i sar. 2007). Promene u učestalosti nosilaca B hromozoma prati porast u gustini populacije u uslovima u kojima nema kompeticije za hranu i prostor (Vujošević i Blagojević 1995). Primećena je pozitivna korelacija između učestalosti jedinki sa B hromozoma i srednjeg broja dana kada je temperatura bila ispod nule, kao i sa povećanjem nadmorske visine (Vujošević i Blagojević 2000). Korelacija između učestalosti B hromozoma i kvaliteta životne sredine koji je određivan na osnovi indeksa telesne mase tela ukazuje na to da kod ove vrste postoji negativna korelacija između učestalosti nosioca B hromozoma i indeksa veličine tela, što takođe govori u prilog heterotičnog modela održavanja ovih hromozoma (Vujošević i sar. 2007). Uopšteno govoreći, u različitim istraživanjima zabeležen je povišen procenat nosilaca B

hromozoma u sredinskim uslovima koji nisu optimalni za ovu vrstu u poređenju sa populacijama koje žive u optimalnijim životnim uslovima. To bi moglo da znači da jedinke koje su nosioci B hromozoma imaju veću adaptivnu vrednost u određenim sredinskim uslovima. Iako na prvi pogled nema očiglednih fenotipskih razlika između jedinki koje u svom genomu sadrže dodatne elemente i jedinki bez njih, različitim eksperimentalnim pristupima do sada su zabeleženi brojni fenotipski efekti B hromozoma kod ove vrste. Viši nivo integracije donje vilice (mandibule) je zabeležen kod životinja koje su imale B hromozome, što ukazuje na to da prisustvo B hromozoma na neki način utiče na fenotip mandibule (iako je mehanizam nepoznat), što povećava variabilnost u populaciji i može voditi ka selektivnoj prednosti (Jojić i sar. 2007). Istraživanje efekata B hromozoma na kvalitativne osobine lobanje (Blagojević i Vujošević 2004), kao i na tri komponente varijabilnosti lobanje (Jojić i sar. 2011), potvrđuju da B hromozomi ne narušavaju razvojnu homeostazu svojih nosilaca. Šta više, B hromozomi igraju značajnu ulogu u strukturiranju morfološkog variranja lobanje. Generalno, nosioci B hromozoma imaju viši nivo fenotipske varijabilnosti (Blagojević i Vujošević 2004) što se dovodi u vezu sa B hromozomima, koji se mogu smatrati proširenom genetičkom varijabilnošću. Pokazana je i negativna korelacija između ekspresije Tgf- β gena i prisustva B hromozoma. Kako Tgf- β gen kroz regulaciju ćelijskog ciklusa utiče na razviće i homeostazu, mogao bi da bude od velikog značaja za nosioce B hromozoma, koji moraju da prođu kroz različite mitotičke i mejotičke tačke provere (Adnađević i sar. 2014). Postojanje specifičnih DNK profila (Tanić i sar. 2000) i diferencijalna ekspresija tri DNK sekvence u prisustvu B hromozoma (Tanić i sar. 2005), svedoči o interakciji B hromozoma sa ostatkom genoma.

Do sada sakupljeni podaci o povezanosti učestalosti B hromozoma i sredinskih uslova kod vrste *A. flavicollis*, kao i fenotipskih varijacija, ukazuju na to da B hromozomi kod ove vrste ispoljavaju svoje efekte na nivou populacije (Vujošević i Blagojević 2000), i pretpostavlja se da u određenim sredinskim okolnostima, prisustvo B hromozoma može biti od koristi njihovim nosiocima (Zima i sar. 2003).

Ciljevi

Na osnovu iznetih teorijskih saznanja u ovoj disertaciji postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Izolacija B hromozoma, putem mikrodisekcije, iz kariotipa vrste *A. flavicollis*;
2. Istraživanje porekla B hromozoma na osnovu homologije B sekvence i osnovnog kariotipa analizirane vrste putem fluorescentne *in situ* hibridizacije;
3. Sekvenciranje i analiza sekvence B hromozoma;
4. Provera transkripcione aktivnosti izabranih sekvenci sa B hromozoma;
5. Predlaganje mogućeg modela nastanka i evolucije B hromozoma u svetlu dobijenih rezultata.

Materijal i metode

Prikupljanje i priprema biološkog materijala za eksperimente

U ovu studiju su uključene ukupno 53 jedinke žutogrlog miša, *Apodemus flavicollis* koje su prikupljene sa ukupno 16 lokaliteta, od kojih je 14 na teritoriji Republike Srbije i po 1 lokalitet na teritoriji Republike Belorusije i Ruske Federacije (Tabela 1.; 2.; 3. i 6.). Jedinke su iz prirodnih populacija sakupljane živolovkama (Longworth klopke), i tretirane u skladu sa Direktivom Evropskog Parlamenta o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe (*engl. Directive 2010/63/EU European parliament i the Council of 22nd September 2010*) koja se sprovodi u Republici Srbiji.

Istraživanja su vršena u tri faze koje su u zavisnosti od starosti, odnosa polova, broja jedinki sa B i bez B hromozoma, uključivale različite kombinacije jedinki.

Faze su:

- analiza porekla B hromozoma;
- analiza strukture B hromozoma i
- provera transkripcione aktivnosti sekvenci B hromozoma.

Eksperimenti su rađeni na hromozomskim preparatima i ekstrahovanim DNK i RNK molekulima odabranih jedinki vrste *A. flavicollis*.

Hromozomski preparati

Preparacija hromozoma urađena je direktno iz ćelija koštane srži, polnih ćelija i iz ćelijske kulture fibroblasta. Određivanje broja B hromozoma kod jedinki vrste *A. flavicollis* vršeno je prebrojavanjem hromozoma na konvencionalno obojenim hromozomskim preparatima. Hromozomski preparati iz ćelija koštane srži i polnih ćelija su pravljani modifikovanom standardnom metodom (Hsu i Patton 1969). Pre preparacije hromozoma, životinjama je intraperitonealno ubrizgavan citostatik kolhicin (20 µg po gramu telesne težine), koji je ostavljen da deluje jedan sat. Nakon žrtvovanja, ćelije koštane srži kostiju zadnjih ekstremiteta (*os femur* i *os tibia*), ili polne ćelije

mužjaka su inkubirane u hipotoničnom rastvoru kalijum hlorida (0,56 M) u trajanju od 25 minuta, u vodenom kupatilu na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije i centrifugiranja (7 min na 1500 obrtaja po minutu) dobijeni talog je tretiran fiksativom (sirćetna kiselina i metanol u razmeri 1:3) na temperaturi od 4 °C u trajanju od 15 min. Proces fiksacije je ponovljen još jednom, a potom su pravljene mikroskopski preparati i bojeni 10% Gimsa bojom. Broj hromozoma za svaku jedinku je utvrđen analizom 20 metafaza pod mikroskopom. Hromozomi su brojani na snimljenim fotografijama pomoću programa Analyst (Malkov i sar. 1997).

Hromozomski preparati ćelija iz kulture fibroblasta su dobijeni upotrebom sledećeg protokola. Nakon dodavanja kolcemida (0,04 µg/ml) u medijum, ćelije su preko noći ostavljene u CO₂ inkubatoru na 37 °C, nakon čega je dodat etidijum bromid (EtBr) (1,5 µg/ml) tri sata pre fiksacije ćelija. Nakon toga je dodat hipotonični rastvor (33,5 mM KCl, 7,75 mM Na-citrat) i ćelije su inkubirane 55 minuta na 37 °C. Prefiksacija i fiksacija hromozoma je vršena prema standardnom protokolu sveže pripremljenim hladnim fiksativom (metanol i sirćetna kiselina u odnosu 3:1). Radi boljeg širenja materijala predmetne pločice su dobro oprane i čuvane u destilovanoj vodi na 4 °C. Kap hromozomske suspenzije je nanošena na hladno, mokro mikroskopsko staklo i ostavljena da se suši na sobnoj temperaturi. Hromozomski preparati su blago obojeni kratkotrajnim bojenjem sa rastvorom Gimze i analizirani pod mikroskopom.

Izolovanje RNK

Ukupna RNK je izolovana iz tkiva slezine upotrebom reagensa TRIzol, prema sledećem protokolu. Oko 20 mg tkiva je homogenizovano uz korišćenje tečnog azota, nakon čega je dodavan 1 ml reagensa TRIzol i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dodato je 200 µl hloroforma po mililitru TRIzol-a nakon čega je smeša vorteksovana 15 sekundi. Usledila je inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta uz povremeno vorteksovanje, pa zatim centrifugiranje (12 000 g, 4 °C, 15 minuta). Izdvajana je površinska vodena faza koja je sadržala RNK, dok su donje faze sačuvane na -20 °C radi izolovanja DNK molekula iz istog uzorka.

U RNK- vodenu fazu je dodavano po 500 µl izopropil alkohola, i nakon nežnog mešanja i 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, usledilo je centrifugiranje (12 000 g, 4 °C, 10 minuta), a RNK je postajala vidljiva kao beli talog forme gela. Supernatant je odličen a talog pažljivo ispran ledenim 75% etanolom. Nakon centrifugiranja (12 000 g, 4 °C, 15 minuta), supernatant je odličen a talog je ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi. Nakon toga RNK talog je rastvoren sa 50 µl dietil piro karbonat (DEPC)-tretirane vode.

Izolovanje DNK

Genomska DNK (gDNK) je ekstrahovana iz tkiva jetre, kože (komadića uveta) i slezine u zavisnosti od potreba eksperimenta. DNK dobijena iz tkiva jetre korišćena je za proveru prisustva gena u većem broju kopija kod jedinki sa B hromozomima, DNK iz komadića uveta je korišćena za proveru prisustva marker gena za B hromosome, a da pri tom žrtvovanje jedinki bude izbegnuto, dok je DNK iz slezine izolovana nakon izolacije RNK iz istog komadića tkiva u cilju provere postojanja određenih sekvenci najpre na DNK nivou da bi zatim transkripciona aktivnost tih sekvenci bila proverena na nivou RNK. Izolacija DNK iz tkiva jetre i uveta je rađena komercijalnim setom hemikalija za izolaciju Dneasy Blood i Tissue Kit (Qiagen, Germany) prema uputstvu proizvođača, a TRIzol® reagensom iz tkiva slezine prema sledećem protokolu.

TRIzol reagens je korišćen za ekstrakciju RNK, ali je tokom procedure ekstrahovanja sačuvana i faza koja sadrži DNK i proteine (DNK/protein faza) da bi se potom ekstrahovala i DNK iz istog tkiva svake životinje. Najpre je pažljivo DNK/protein faza očišćena od eventualnih ostataka RNK faze, zatim je dodato po 300 µl 100% etanola po mililitru korišćenog TRIzola u prethodnoj fazi. Nakon laganog mešanja, smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 2 do 3 minuta. Usledilo je centrifugiranje (12 000 g, na sobnoj temperaturi, 5 minuta). Otklonjen je zatim supernatant, a DNK talog je dva puta ispran 0,1 M natrijum citratom u kom je ostajao 30 minuta na sobnoj temperaturi, uz povremeno lagano mešanje. Nakon svakog ispiranja je usledila centrifuga (12 000 g, na sobnoj temperaturi, 5 minuta) i odlivanje supernatanta. DNK talog je potom resuspendovan 75% etanolom koji je nakon inkubacije (20 min na sobnoj temperaturi) i centrifugiranja (12 000 g, na sobnoj

temperaturi, 5 minuta) odlivan, a talog ostavljen da se dobro isuši. Suv talog je rastvaran sa 8 mM NaOH i nakon mućkanja i centrifugiranja (12 000 g, na sobnoj temperaturi, 10 minuta), supernatant koji sadrži rastvorenu DNK je čuvan na -20 °C do korišćenja.

DNAzni tretman

Moguće prisustvo molekula DNK u RNK izolatima je eliminisano tretmanom enzimom DNasa I (Thermo Fisher Scientific) koji degraduje molekul DNK. Enzim je dodat u uzorke RNK i inkubiran na 37 °C, 30 minuta, nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem etilen diamin tetrasirćetne kiseline (EDTA) i zagrevanjem na 65 °C. Tako pripremljena RNK čuvana je na -80 °C do upotrebe.

Određivanje koncentracije DNK i RNK

Koncentracija DNK i RNK je određivana merenjem absorbance uzoraka na talasnoj dužini od 260 nm spektrofotometrom BioPhotometer (Eppendorf, Nemačka). Za proveru čistoće DNK i RNK uziman je odnos apsorbance na 260, 280 i 230 nm. Apsorpcija na 280 nm ukazuje na prisustvo proteina u uzorku, dok apsorpcija na 230 nm ukazuje na kontaminaciju uzorka ugljenim hidratima, peptidima, fenolima i aromatičnim jedinjenjima. Odnosi $A_{260}/A_{280} > 1,8$ i $A_{260}/A_{230} > 1,8$ smatrani su znakom zadovoljavajućeg kvaliteta.

Određivanje starosti

Jedinke koje su uključene u istraživanje birane su na osnovu prisustva/odsustva i broja B hromozoma, vodeći računa o odnosu polova, starosti jedinki i uključivanju jedinki iz različitih populacija, kako bi se proverila varijabilnost u okviru areala vrste. Starost je kao masa sušenih očnih sočiva (Lord 1959). Pokazano je da je porast mase očnih sočiva visoko korelisan sa starenjem jedinki, pošto se njihova masa linearno povećava usled taloženja nerastvorljive frakcije tirozina.

Istraživanje porekla B hromozoma

U ovo istraživanje uključene su tri jedinke iz geografski udaljenih populacija, jedan mužjak i dve ženke sa različitim brojem B hromozoma, čije su metafaze korišćene za mikrodisekciju i sekvenciranje B hromozoma (Tabela 1.), kao i dodatnih pet jedinki iz različitih, geografski udaljenih populacija, na čijim preparacijama metafaza je takođe proveravana specifičnost rezultata mikrodisekcije (Tabela 2.). Među njima dve jedinke nisu imale B hromosome u kariotipu, dok su ostale u kariotipovima imale jedan, dva ili tri B hromozoma.

Tabela 1. Lista uzoraka iz čijih kariotipova su mikrodisekcijom izdvojeni potencijalni B hromozomi.

Uzorak	Obeležene B-specifične probe	Kariotip	Hromozomski preparati	Lokalitet
3727	3727WCPB	48,XY,+1B	Polne ćelije	Milošev Do, Republika Srbija
3980	3980WCPB	48,XX,+1B	Ćelijska kultura fibroblasta	Orašac, Republika Srbija
24985	24985aWCPB 24985bWCPB	48,XX,+3B	Ćelije koštane srži	Rostov-na-Donu, Ruska federacija

Tabela 2. Lista uzoraka čiji su hromozomski preparati korišćeni za hibridizaciju fluorescentnih B-specifičnih proba dobijenih umnožavanjem mikrodisekovanog materijala.

Uzorak	Kariotip	Hromozomski preparat	Lokalitet
3980	48,XX,+1B	Ćelijska kultura fibroblasta	Orašac, Republika Srbija
3977	48,XX,+1B	Ćelijska kultura fibroblasta	Petnica, Republika Srbija
3978	48,XY	Ćelijska kultura fibroblasta	Orašac, Republika Srbija
3979	48,XY	Ćelijska kultura fibroblasta	Orašac, Republika Srbija
3656	48,XX,+2B	Ćelije koštane srži	Milošev Do, Republika Srbija
3854	48,XX,+3B	Ćelije koštane srži	Misača, Republika Srbija
24985	48,XX,+3B	Ćelije koštane srži	Region Rostov-na- Donu, Ruska federacija
24943	48,XY,+1B	Ćelije koštane srži	Region Minsk, Republika Belorusija

Ćelijska kultura

Primarna kultura fibroblasta je uspostavljena od uzoraka tkiva repa četiri životinje iz centralne Srbije. Odabir životinja za zasnivanje ćelijske kulture je vršen na osnovu marker trake za B hromozom, dobijene u lančanoj reakciji ISSR-PCR (*eng. Inter Smal Simple Repeats*) izvedene po protokolu Bugarski-Stanojević i saradnika (2016). Rep svake jedinice je najpre bio ispran 70% etanolom, a nakon biopsije, tkivo je ispirano više puta u fiziološkom rastvoru sa antibioticima (penicilin 500000 U/l i kanamicin 500 U/l) i antimikoticima (amfotericin B 12,5 mg/l). Po odstranjivanju kože, tkivo je isprano u tri nove porcije fiziološkog rastvora sa antibioticima i antimikotikom.

Primarna kultura fibroblasta je izvođena prema protokolu Stanyon i Galleni (1991) koji je modifikovan (Romanenko i sar. 2015). Ćelije su uzgajane na 37 °C i 5% CO₂. U zavisnosti od toga kojom brzinom su ćelije rasle, hranljivi medijum koji je sadržao antibiotik/antimikotik miks, menjan je svakih nekoliko dana. Ćelije su presađivane kada bi u potpunosti prekrile površinu flaska. Ćelije su odlepljivane sa površine flaska 0,25% tripsinom u 0,2% EDTA. Nakon nekoliko pasaža, količina ćelija je bila dovoljna za preparaciju hromozoma.

Tehnika G-traka

Tehnika G-traka je rađena prema standardnom protokolu Graphodatsky i Radjabli (1988). Hromozomski preparati, pripremljeni na prethodno opisan način, su dehidrirani na temperaturi od 60 °C, tokom 60 minuta, a nakon 12 sati provedenih na sobnoj temperaturi tretirani su rastvorom 0,125% tripsina u 1x PBS u trajanju od 15 do 60 sekundi u zavisnosti od toga kako su hromozomi izgledali nakon tretmana.

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

FISH je urađen prema protokolu Trifonov i saradnici (2009). Hromozomi su kontrastirani 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrohloridom, (DAPI), i analizirani pod fluorescentnim mikroskopom Olympus BX53 i Axioskop 2 plus (Zeiss). FISH je urađen

na hromozomima na kojima su prethodno urađene G-trake. Metafaze su najpre fotografisane samo sa G-trakama, a koordinate svake metafaze su zapisane radi kasnijeg poređenja sa FISH signalom. Pokrovno staklo je otklanjano ksilolom, a pločice sa preparatima su sušene pa čišćene fiksativom. FISH je nakon toga izvođen standardnom procedurom. FISH sa komercijalnom probom za X hromozom kućnog miša, *Mus musculus* WCPX (engl. *Whole Chromosome Painting X*) je izvedena po uputstvima proizvođača (CytoCell Ltd., UK).

Pravljenje DNK biblioteka i obojenih proba od mikrodisekovanih B hromozoma

Mikrodisekcija B hromozoma je urađena po protokolu Yang i saradnici (2009). Izolovani materijal umnožen je kitom za umnožavanje celog genoma (WGA Sigma-Aldrich, USA), prema protokolu proizvođača, koji podržava umnožavanje fragmenata dužine od 300 do 3000 bp. U ponovljenoj reakciji sa dodatkom fluorescentno obeleženih nukleotida, Tetrametil-rodamin-5dUTP, dobijeni PCR produkti su bili fluorescentno obeleženi. Fluorescentno obeležene probe odgovarajućih hromozoma su imenovane tako što je na broj jedinke dodata skraćena WCPB (engl. *Whole Chromosome Paint for the B*). Boje koje su korišćene za obeležavanje su biotin-16-dUTP i tetrametil-rodamin-5-dUTP. Dve probe dobijene obeležavanjem različitih B hromozoma jedinke 24985 su imenovane 24985aWCPB i 24985bWCPB (Tabela 1.). Specifičnost produkta dobijenog mikrodisekcijom, umnožavanjem i obeležavanjem fluorescentnom bojom je proveravana FISH-om na metafazama istih jedinki od kojih mikrodisekovani materijali vode poreklo.

Skrining B hromozoma na *C-kit* gen i gen za 18S rRNK

Provera prisustva dodatnih kopija dva gena, *C-kit* i gena za 18S rRNK kod jedinki sa B hromozomima izvršena je na deset uzoraka, poreklom od četiri ženke i šest mužjaka, sa tri lokaliteta (planina Tara, Avala i Cer). Tri jedinke nisu imale B hromozome, dok su ostale imale jedan, dva ili tri B hromozoma kao dodatak osnovnom kariotipu (Tabela 3.).

Tabela 3. Lista jedinki čija DNK je korišćena za kvantifikaciju broja kopija *C-kit* gena i gena za 18S rRNK.

Uzorak	kariotip	lokalitet	analiza
3120	48,XX	Tara, Republika Srbija	agarozni gel, RT
3123	48,XY	Avala, Republika Srbija	agarozni gel
3102	48,XX	Cer, Republika Srbija	RT
3073	48,XY,+1B	Cer, Republika Srbija	RT
3111	48,XY,+1B	Cer, Republika Srbija	RT
3108	48,XY,+2B	Cer, Republika Srbija	agarozni gel
3109	48,XX,+2B	Cer, Republika Srbija	RT
3110	48,XY,+2B	Cer, Republika Srbija	RT
3107	48,XY,+3B	Cer, Republika Srbija	agarozni gel, RT
3112	48,XX,+3B	Cer, Republika Srbija	agarozni gel, RT

Za proveru prisustva većeg broja gena kod jedinki sa B hromozomima, metodom multipleks-PCR i RT-PCR korišćeni su prajmeri za ciljane i kontrolne gene (Tabela 4.).

Tabela 4. Lista prajmera korišćenih u multipleks PCR i RT-PCR.

<i>C-kit</i>	F	5'CCTGGTCTTAGAGGGCACAG3'
	R	5'AAAGCATCACCAAACCTCGCC3'
<i>Sprn</i>	F	5'GATGGAGTTTAGCCTGGTCT3'
	R	5'CAATTCTGCCCAGTAGGATG3'
18S rRNK	F	5'AGTTCAGCACATTTTGCAG3'
	R	5'TCATCCTCCGTGAGTTCTCCA3'
Mhc II DRB	F	5'GAGTGTCATTTCTACAACGGGACG3'
	R	5'GATCCCGTAGTTGTGTCTGCA3'

Multipleks lančana reakcija polimeraze PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PCR je reakcija u kojoj se *in vitro* sintetišu i umnožavaju željeni fragmenti DNK molekula. Posredstvom oligonukleotida (prajmera) koji hibridizuju na krajeve ciljane sekvence, enzim polimeraza ugrađuje nukleotide između njih i tako sintetiše sekvencu od interesa. Multipleks PCR je rađen u cilju provere prisustva više od jedne kopije *C-kit* gena kod jedinki sa i bez B hromozoma, reakcija u kojoj je moguće umnožiti više od jedne ciljane sekvence DNK. U istoj lančanoj reakciji su korišćeni prajmeri za ciljnu (*C-kit*) sekvencu i za kontrolnu sekvencu (engl. *shadow protein gene Sprn*), za koju je

pretpostavljeno da se nalazi u jednoj kopiji. Lančana reakcija je izvedena u 1 x PCR Dream Taq puferu, 10 mM dNTPs, 20 μ M svakog prajmera i 1 U Dream Taq polimeraze (Thermo Scientific Inc.). Temperaturni profil u kom je reakcija izvedena je bio 95 °C, 2 minuta, 34 ciklusa denaturacije na 95 °C, 30 sekundi, anilinga 60 °C, 30 sekundi i ekstenzije 72 °C, 1 minut, i krajnje ekstenzije od 72 °C u trajanju od 5 minuta. Rezultati reakcije su analizirani elektroforezom na 1,2% agaroznom gelu. U elektroforezi je korišćen i molekularni marker radi precizne procene dužine DNK fragmenata dobijenih u reakciji (GeneRuler 100 bp DNA Ladder). Debljine traka ciljnog i kontrolnog gena na agaroznom gelu poređene su vizuelno kako u okviru jednog uzorka tako i između uzoraka sa i bez B hromozoma.

Agarozna gel-elektroforeza

Agarozni gel (1,2%), za elektroforezu je pravljen u zapremini od 100 ml, sa dodatkom 0,05 mg etidijum bromida (EtBr) radi vizuelizacije dvolančanih DNK molekula pod UV svetlom. Elektroforeza je urađena na aparatu za horizontalnu elektroforezu (Sigma Aldrich) pomoću transformatora struje Electrophoresis Power Supply- EPS601 (Amersham Biosciences), na voltaži od 120 V. Nakon 45 minuta gel je fotografisan na aparatu Gel Doc™ EZ system (BIO RAD, Nemačka).

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu RT-PCR (engl. Real Time-PCR), DNK matrica

Na DNK matrici urađen je i RT-PCR da bi se preciznije odredilo potencijalno postojanje većeg broja kopija određenog gena kod jedinki sa B hromozomima u poređenju sa brojem kopija kontrolnog gena i u poređenju sa jedinkama bez B hromozoma. Komparativna Ct metoda je korišćena za kvantifikaciju rezultata, korišćenjem Ct vrednosti dobijenih u toku PCR-a.

Relativna kvantifikacija je $RQ=2^{-ddCt}$

dCt je izračunata normalizovanjem Ct vrednosti target sekvence sa Ct-om endogene kontrole (Ct target – Ct endogena kontrola). Vrednost ddCt je onda izračunata

oduzimanjem srednje dCt vrednosti kalibraturnog uzorka (jedinke bez B hromozoma) od odgovarajuće srednje dCt vrednosti target uzorka (jedinke sa B hromozomima). Relativni nivo umnožavanja target gena je izražen kao stopa promene u odnosu na kalibrator. Kvantitativni RT-PCR je izvođen na aparatu AB Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems). KAPA tm SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kit je korišćen za RT-PCR. Reakcije su rađene u zapremini od 10 µl koja je sadržala KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (1x), prajmere, dUTP (10 mM), ROX High, Kapa RT Mix (1x) i DNK kao matricu. Prvi korak koji uključuje reverznu transkripciju je bio isključen, a temperaturni profil reakcije je bio sledeći: 40 ciklusa denaturacije na 95 °C, 15 sekundi, 1 minut anilinga i ekstenzije na 60 °C. Kriva topljenja je imala automatski podešen profil 95 °C, 15 sekundi; 60 °C, 15 sekundi, 95 °C, 15 sekundi.

Sekvenciranje mikrodisekovanih B hromozoma

DNK biblioteke su napravljene korišćenjem kitova Illumina TruSeq Library Prep Kit v.2 za Afl_B i Illumina TruSeq v.3 Library Prep Kit za AflB1, AflB5, AflB6, AflB7 i Afl23 hromozome (Tabela 5.). Sekvenca B hromozoma je određivana na aparatu Illumina MiSeq.

Tabela 5. Lista uzoraka čiji su B hromozomi uspešno mikrodisekovani i umnoženi u odgovarajuće DNK biblioteke.

uzorak	kariotip	DNK biblioteka	Hromozomski preparati	Lokalitet
3727	48,XY,+1B	AflB1	Polne ćelije	Milošev Do, Republika Srbija
3980	48,XX,+1B	AflB5, AflB6, AflB7, Afl23	Ćelijska kultura fibroblasta	Orašac, Republika Srbija
24985	48,XX,+3B	AflB	Ćelije koštane srži	Region Rostov- na-Donu, Ruska federacija

Identifikacija ciljanih regiona

Radi identifikacije genskih sekvenci koje se nalaze na B hromozomima, DNK biblioteke su poređene sa referentnim genomima softverskom alatkom DOPseq_analyser, u okviru seta Galaxy. Slaganje nepoznate sekvence sa ciljnim (mišji mm10), i kontaminirajućim (ljudski hg19) genomima vršena je programom Bowtie2 (s prethodno podešenim „vrlo osetljivim“ opcijama u lokalnom poravnanju). Kontaminacije i nizak kvalitet slaganja su smanjeni pomoću contam_filter alatki. Ciljani regioni na hromozomima su bili identifikovani na osnovu promena u srednjoj gustini spojenih očitanih pozicija pomoću region_dnacopy. U obzir su uzimani samo regioni koji su uključivali preko pet pozicija.

Analize varijacija sekvence

Za pronalaženje različitih varijanti sekvenci u okviru identifikovanih regiona su korišćeni softveri GATK HaplotypeCaller (McKenna i sar. 2010) i snpEff (Cingolani i sar. 2012). Traženje varijanti i preračunavanje gustine je automatizovano vca_reg alatkom programa DOPseq_analyzer-a.

Analize repetitivnih elemenata

Sekvence koje su prošle proveru kvaliteta, iz kojih su isečeni delovi adaptera i koje su zadovoljile uslov određene dužine (>19 bp) analizirane su softverskom protočnom linijom *RepeatExplorer clustering i annotation pipeline* (Novák i sar. 2010; 2013) na IMCB serveru baziranom na Galaxy platformi. Očitane sekvence koje su imale preko 55% sličnosti u okviru dužine jedne sekvence bile su identifikovane kao margine koje povezuju slične očitane sekvence. Klasteri, grupacije povezanih čitanja (svaki sadrži >0,1% početnih čitanja) bili su obeleženi sa mammalian RepeatMasker bazom podataka. Povezane kontige (*engl. contigs*) poravnate su naspram NCBI baze podataka sekvenci nukleotida (nt, pristupljeno 8.8.2016.) programom BLAST. Klasteri sa najboljim podudaranjem sa sekvencama poreklom iz porodice Muridae i klasteri

jedinstvene sekvence (bez i jednog pogotka u BLAST) su smatrani za deo sekvence uzorkovanog hromozoma.

Dostupnost podataka

Podaci dobijeni sekvenciranjem u ovoj studiji su deponovani u bazu podataka NCBI SRA pod brojem PRJNA419100 i PRJNA420911. Softverska protočna linija za poziv operacija s UNIX komine linije dostupna je na GitHub platformi (https://github.com/ilyakichigin/DOPseq_analyzer). Galaxy alatke su dostupne na GitHub platformi (https://github.com/drevoz/galaxy_dopseq) kao i na Galaxy Test Tool Shed.

Transkripciona aktivnost i B hromozomi

Grupa jedinki čija RNK je korišćena za proveru transkripcione aktivnosti tri sekvence koje su prethodno potvrđene na DNK sekvencama B hromozomima, uključivala je 34 jedinke od kojih 14 bez B hromozoma a 20 sa jednim, dva ili tri B hromozoma. Za ovaj deo eksperimenta birane su pretežno mlade jedinke (težina sočiva manja od 22 mg) i to tako da među polovima budu ravnomerno zastupljene jedinke sa B i jedinke bez B hromozoma (Tabela 6.).

Tabela 6. Lista jedinki uključenih u analizu transkripcione aktivnosti sekvenci nađenih na B hromozoma.

uzorak	kariotip	Telesna masa (g)	Masa očnih sočiva (mg)	Lokalitet
4063	48,XX	10	9,2	kavez, Republika Srbija
4095	48,XX	10	8,2	Petnica, Republika Srbija
4060	48,XX	10	9,4	kavez, Republika Srbija
3694	48,XX	8	12,0	kavez, Republika Srbija
4172	48,XX	21	17,7	kavez, Republika Srbija
4216	48,XX	15	18,9	Vlasina, Republika Srbija
4218	48,XX	15	11,8	Vlasina, Republika Srbija
4134	48,XY	15	10,2	Babin zub, Republika Srbija
3698	48,XY	10	11,7	kavez, Republika Srbija

3699	48,XY	10	12,2	kavez, Republika Srbija
4061	48,XY	9	8,9	kavez, Republika Srbija
4062	48,XY	10	9,0	kavez, Republika Srbija
4195	48,XY	18	16,2	Goč, Republika Srbija
4209	48,XY	9	7,9	Vlasina, Republika Srbija
4099	48,XX,+1B	10	8,2	kavez, Republika Srbija
4133	48,XX,+1B	12	7,5	Babin zub, Republika Srbija
3695	48,XX,+1B	8	11,3	kavez, Republika Srbija
4056	48,XX,+1B	18	9,9	kavez, Republika Srbija
3860	48,XX,+1B	21	17,6	Misača, Republika Srbija
4174	48,XX,+1B	21	18,0	kavez, Republika Srbija
4148	48,XX,+1B	32	29,9	Petnica, Republika Srbija
4157	48,XX,+2B	28	30,2	Petnica, Republika Srbija
4183	48,XX,+2B	32	31,1	Maljen, Republika Srbija
4224	48,XX,+2B	18	20,8	Vlasina, Republika Srbija
4227	48,XX,+3B	17	18,8	Vlasina, Republika Srbija
3796	48,XY,+1B	20	13,8	Bosilegrad, Republika Srbija
4112	48,XY,+1B	12	8,7	Vlasina, Republika Srbija
3696	48,XY,+1B	9	11,4	kavez, Republika Srbija
3913	48,XY,+1B	21	15,9	Ruski Krstur, Republika Srbija
3907	48,XY,+1B	21	15,2	Ruski Krstur, Republika Srbija
4150	48,XY,+1B	40	31,9	Petnica, Republika Srbija
4230	48,XY,+1B	18	27,2	Vlasina, Republika Srbija
4115	48,XY,+2B	11	10,0	Vlasina, Republika Srbija
4229	48,XY,+2B	24	20,8	Vlasina, Republika Srbija

Odabir prajmera

Prajmeri za RT-PCR za sekvence specifične za B hromozom (*Rraga*, *Cenpe* i *Haus6*), su odabrani u *on line* dostupnom programu Primer3Plus (Koressaar i Remm 2007), u okviru sekvenci koje su pokazale najveću akumulaciju mutacija, odnosno najznačajnije razlike u odnosu na originalnu sekvencu gena. Pored prajmera za ciljane sekvence korišćeni su i kontrolni prajmeri (*Calnexin*, *Pgk* i β -*aktin*) (Tabela 7.). Softver OligoAnalyser 3.1 je korišćen za procenu efikasnosti prajmera.

Tabela 7. Lista prajmera korišćenih za PCR i RT-PCR.

<i>Rraga</i>	F	5'GCGGGACAACATCTTCTGTA3'
	R	5'ATCTTTTTCCAGTTCGCGG3'
<i>Cenpe</i>	F	5'GAGCCAAGGACTGGCATTAGA3'
	R	5'TGCAGCTTCGATTTGCCTTG3'
<i>Haus6</i>	F	5'TTGGCTACAGGGCTCAGTTC3'
	R	5'CTCCAGAAGAAGTTGGCGA3'
<i>Calnexin</i>	F	5'ATGGAAGGGAAGTGGTACTGT3'
	R	5'GCTTTGTAGGTGACCTTTGGAG3'
<i>Pgk</i> (fosfoglicerat kinaza 1)	F	5'ATGTCGCTTCCAACAAGCTG3'
	R	5'GCTCCATTGTCCAAGCAGAAT3'
β - <i>aktin</i>	F	5'TGGACATCCGCAAAGACCTGTAC3'
	R	5'TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA3'

Lančana reakcija polimeraze PCR

Korišćeni su prajmeri za sekvence gena koji se nalaze na B hromozomima (*Rraga*, *Haus6* i *Cenpe* geni), radi provere prisustva ovih DNK sekvenci u uzorcima, za koje su kasnije urađene i provere transkripcione aktivnosti. Lančana reakcija je izvedena u 1x PCR Gold Taq puferu, 10 mM dNTPs, 20 μ M svakog prajmera i 1 U Gold Taq polimeraze (Promega). Temperaturni profil u kom je reakcija izvedena je bio 95 °C, 2 minuta, 28 ciklusa denaturacije na 95 °C, 30 sekundi, anilinga 58 °C, 30 sekundi i ekstenzije 72 °C, 45 sekundi, i krajnje ekstenzije od 72 °C u trajanju od 10 minuta. Rezultati reakcije su analizirani elektroforezom na 1% agaroznom gelu. U elektroforezi

je korišćen i molekularni marker radi precizne procene dužine DNK fragmenata dobijenih u reakciji (GeneRuler 100 bp DNA Ladder).

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu RT-PCR (engl. Real Time-PCR), RNK matrica

Na RNK nivou je urađen RT-PCR. Određen je nivo transkripcije sekvenci prisutnih na B hromozomima u poređenju sa kontrolnim (*engl. housekeeping*) genima i u poređenju sa jedinkama koje nemaju B hromozome.

Relativna kvantifikacija je $RQ=2^{-ddCt}$

Komparativna Ct metoda je korišćena za kvantifikaciju rezultata, korišćenjem Ct vrednosti dobijenih u toku PCR-a.

Vrednost dCt je izračunata normalizovanjem Ct vrednosti target sekvence sa Ct-om endogene kontrole (Ct target – Ct endogena kontrola). Korišćeno je više od jedne endogene kontrole, pa je izračunata srednja vrednost MCt endogene kontrole (Ct target-MCt endogena kontrola). Vrednost ddCt je zatim izračunata oduzimanjem srednje dCt vrednosti kalibratornog uzorka (jedinke bez B hromozoma) od odgovarajuće srednje dCt vrednosti target uzorka (jedinke sa B hromozomima). Relativni nivo umnožavanja target gena je izražen kao stopa promene u odnosu na kalibrator.

Temperatura topljenja je korišćena za ispitivanje specifičnosti proizvoda reakcije. Odabrani prajmeri za ovu analizu su obuhvatali sekvencu koja se razlikuje po sadržaju nukleotida na B hromozomima u poređenju sa originalnom sekvencom u standardnom genomu, pa je u skladu sa tim očekivano da postoji razlika između temperatura topljenja proizvoda koji su transkribovani sa B hromozoma i onih koji su nastali sa originalne sekvence.

Lančana reakcija polimeraze (*eng. Polymerase chain reaction; PCR*) u realnom vremenu (RT-PCR) je izvođena na aparatu AB Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems). KAPA tm SYBR FAST One-Step qRT-PCR Kit je korišćen za RT-PCR. Reakcije su urađene u zapremini od 10 µl koja je sadržala KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (1x), prajmere, dUTP (10 mM), ROX High, Kapa RT Mix (1x) i RNK kao matricu. Temperaturni profil reakcije je bio po preporuci proizvođača, a uključivao je sintezu cDNK 42 °C, 5 min, inaktivaciju (reverzne transkriptaze) RT 95

°C, 5 min, denaturaciju 95 °C, 30 sekundi i aniling i ekstenziju 58 °C ili 60 °C u zavisnosti od prajmera i 1 min. Kriva topljenja je imala automatski podešen profil 95 °C, 15 sekundi; 60 °C, 15 sekundi, 95 °C, 15 sekundi.

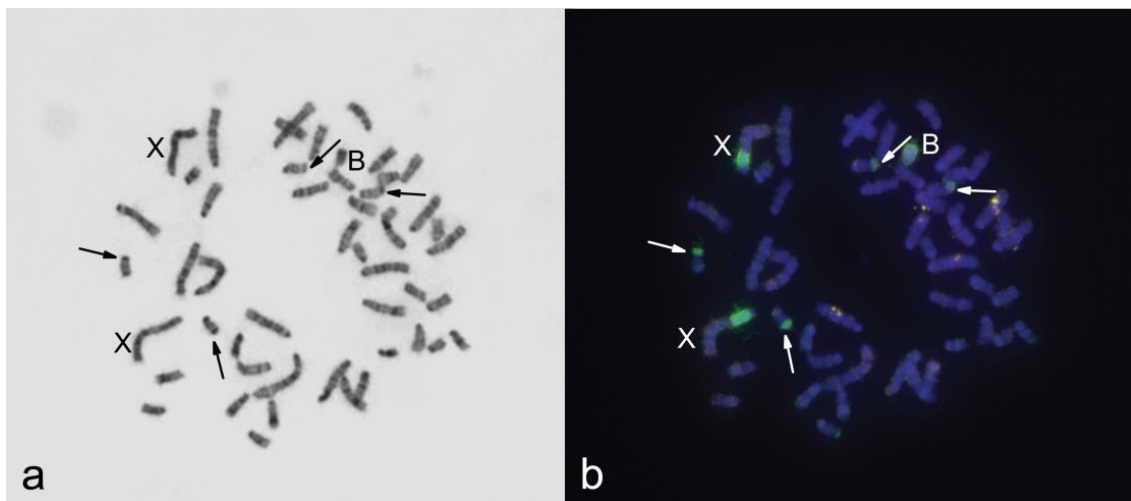
Dobijene vrednosti ekspresije (relativne koncentracije iRNK - RQ), za analizirane gene među grupama jedinki sa i bez B hromozoma, kao i među grupama jedinki bez B i sa jednim B hromozomom testirane su neparametarskim Mann-Whitney U testom upotrebom softvera Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004). U istom softverskom paketu analizirana je korelacija između mase očnih sočiva (mg), kao parametra starosti jedinki i relativne koncentracije iRNK (RQ), kao mere ekspresije analiziranih gena.

Rezultati

Poreklo B hromozoma

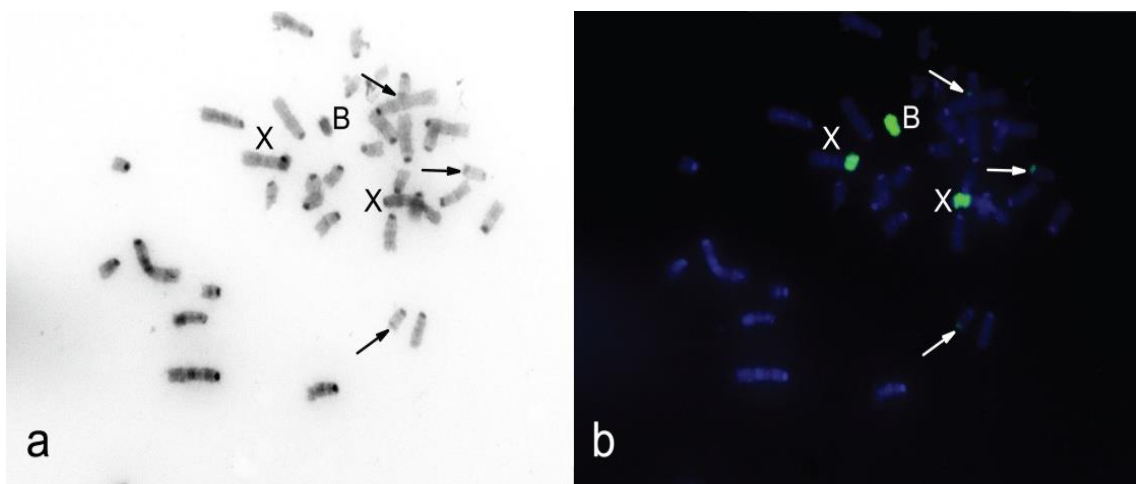
Za analizu kariotipa jedinki uključenih u ovu studiju korišćeni su hromozomski preparati dobijeni iz primarne kulture fibroblasta i direktno iz ćelija koštane srži. Među jedinkama odabranim za ovu analizu, sedam njih su imale od jedan do tri B hromozoma, dok su dve jedinke bile bez B hromozoma. Kod hromozomskih preparata dobijenih iz fibroblasta, identifikacija B hromozoma je bila moguća primenom tehnike G-traka i bojenja DAPI-jem, koje odgovara tehnici C-traka, na metafaznim hromozomima (Slika 1a; 2a). Obe tehnike su hromatin B hromozoma istakle kao heterohromatičan (Slika 1a; 2a).

Provera specifičnosti mikrodisekovanog materijala vršena je hibridizacijom fluorescentnih proba, koje su dobijene umnožavanjem i fluorescentnim obeležavanjem mikrodisekovanih hromozoma, na mikroskopske preparate mitotskih hromozoma. Ovako napravljene fluorescentne probe su u potpunosti hibridizovale na celu površinu B hromozoma kao i na određene regione hromozoma osnovnog kariotipa (Slika 1a ; 1b).



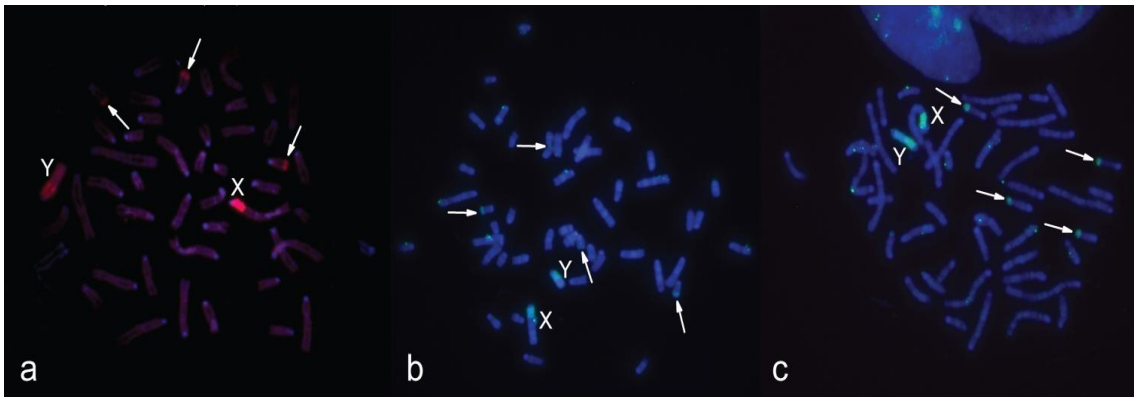
Slika 1. Kariotip ženke sa B hromozomom (3980) dobijen preparacijom iz kulture fibroblasta **a)** G-trake; **b)** hibridizacija probe 3727WCPB (zeleni signal). B hromozom i X hromozomi su označeni slovima, strelice pokazuju heterohromatične blokove na dva para malih autozoma. DAPI je plave boje.

Hibridizacija B-specifičnih proba (3980WCPB i 3727WCPB) je potvrdila da je mikrodisekcija bila uspešna i da su mali heterohromatični hromozomi primećeni u metafazama zapravo B hromozomi (Slika 1b; 2b). B-specifične probe su pored cele površine B hromozoma, hibridizovale i na pericentromerni region (PR) dva velika hromozoma, koji odgovaraju X hromozomima, kao i na subtelomerne regione dva para malih hromozoma A seta (Slika 1b; 2b).



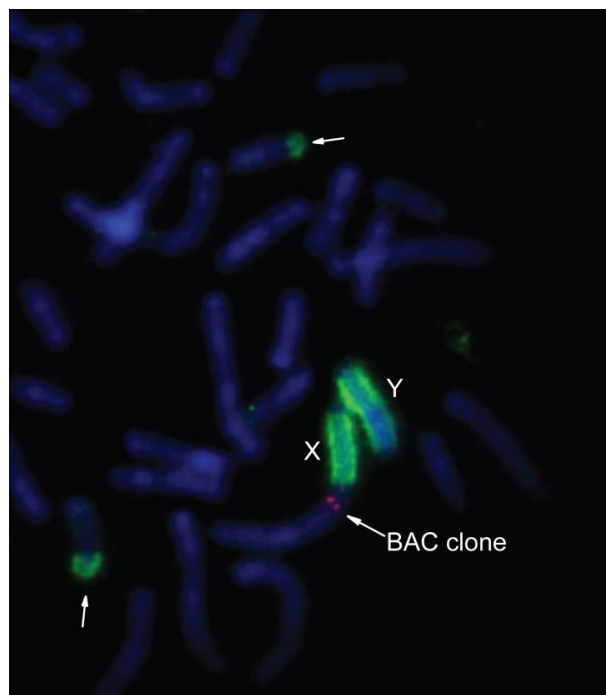
Slika 2. Nepotpun kariotip uzorka 3980. **a)** softverski invertovano DAPI bojenje; **b)** hibridizacija probe 3980WCPB (zeleni signal). B hromozom i X hromozomi su označeni, strelice pokazuju heterohromatične blokove na dva para malih autozoma. DAPI je plave boje.

Način na koji su sve tri sintetisane probe (24985WCPB, 3980WCPB i 3727WCPB) hibridizovale na različite metafaze kod mušjaka koji nisu imali B hromosome, potvrđuje da su sve probe homologe sa PR polnih hromozoma, i da nešto slabiju homologiju pokazuju sa ostatkom Y hromozoma. Takođe, u svim kombinacijama hibridizacija, B-specifične probe su pokazale i afinitet za subtelomerne regione dva para malih autozoma (Slika 3a; 3b; 3c).



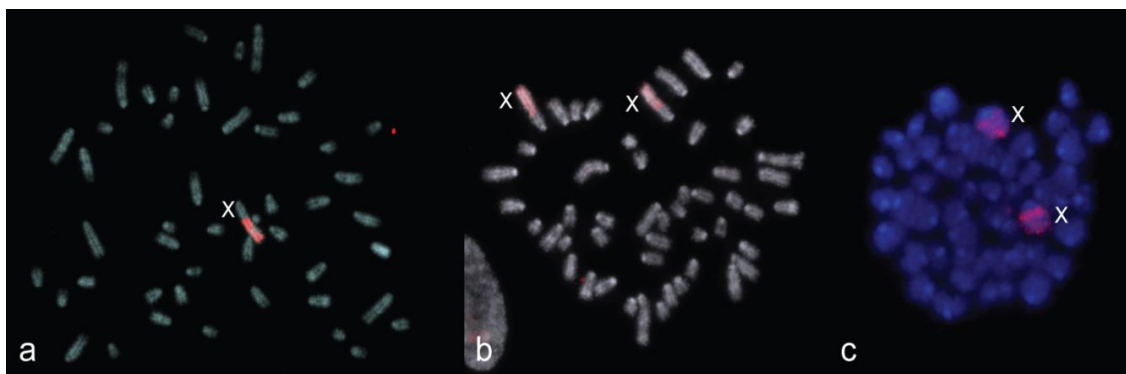
Slika 3. Hibridizacija različitih B-specifičnih proba na metafaze mužjaka bez B hromozoma iz iste populacije. **a)** 24985aWCPB (crveni signal); **b)** 3980WCPB (zeleni signal); **c)** 3727WCPB (zeleni signal). Y i X hromozomi su označeni, strelice pokazuju heterohromatične blokove na dva para malih autozoma. DAPI je plave boje.

Konačna potvrda homologije između PR polnih hromozoma i B-specifične probe, dobijena je istovremenom hibridizacijom X-specifične probe (BAC clone) i 24985bWCPB na metafaze bez B hromozoma kod mužjaka (Slika 4).



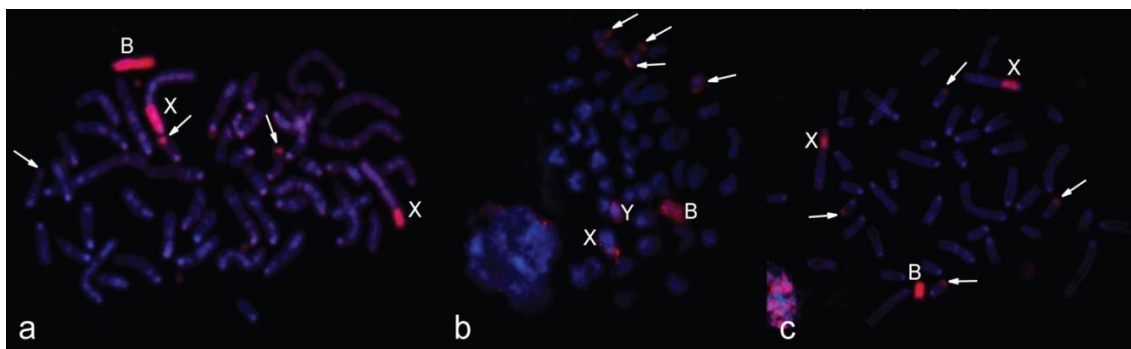
Slika 4. Deo kariotipa uzorka 3978 na koji je hibridizovana proba 24985WCPB (zeleni signal) i X-specifična BAC clone proba (crveni signal). Y hromozom, X hromozom i BAC clone su označeni, strelice pokazuju heterohromatične blokove na dva para malih autozoma. DAPI je plave boje.

Sa druge strane, upotreba komercijalne probe za ceo X hromozom miša, *Mus musculus*, dala je signal na većem delu X hromozoma sa izuzetkom upravo PR (Slika 5a; 5b; 5c). Takođe izostao je i signal na B hromozomima kako kod metafaza sa jednim B hromozomom (Slika 5b) tako i kod onih sa tri B hromozoma (Slika 5c). Komercijalna proba za ceo X hromozom ne sadrži repetitivne sekvence.



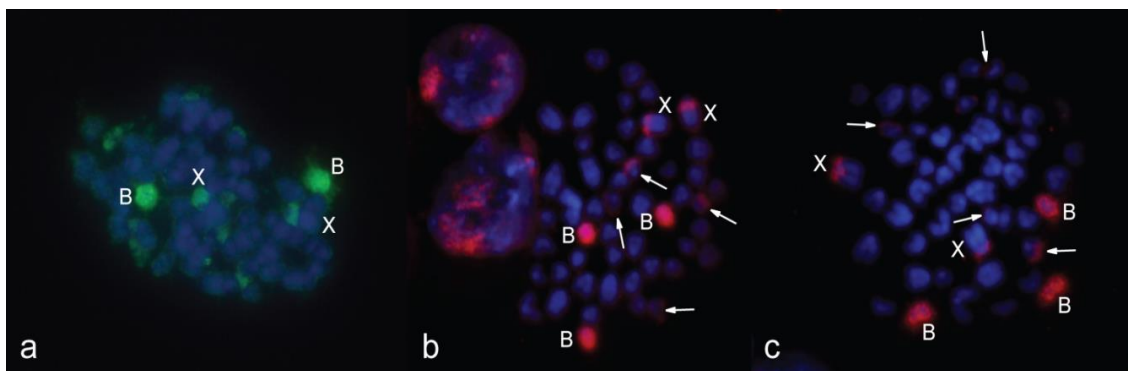
Slika 5. Hibridizacija probe za ceo X hromozom vrste *Mus musculus* (crveni signal) na metafaze jedinki vrste *A. flavicollis*. **a)** metafaza mužjaka bez B hromozoma (3978); **b)** metafaze ženke sa jednim B hromozomom (3980); **c)** metafaza ženke sa tri B hromozoma (3854); X hromozom je označen. DAPI je siv (**a, b**) i plav (**c**).

U cilju da se proverí potencijalno odstupanje u homologiji i postojanje strukturno različitih B hromozoma, urađeno je više kombinacija hibridizacije B-specifičnih proba i metafaza poreklom iz geografski udaljenih populacija. Pa su tako probe 24985aWCPB i 24985bWCPB (iz populacije Rostov-na Donu, Ruska federacija) hibridizovane na preparate sa jednim B hromozomom, populacija iz Republike Srbije (Slika 6a; 6c) i Minsk regiona iz Republike Belorusije (Slika 6b). Fluorescentne probe su na svim hromozomskim preparatima pokazale isti hibridizacioni afinitet za B hromozome, PR polnih hromozoma i subtelomerni region dva para malih autozoma, bez obzira na geografsku udaljenost populacija iz kojih uzorci potiču.



Slika 6. Hibridizacija B-specifičnih proba na metafaze sa B hromozomom poreklom iz različitih populacija vrste *A. flavicollis*. **a)** 24985aWCPB (region Rostova-na-Donu, Ruska federacija) (crveni signal) hibridizovana na preparat 3980 (Orašac, Republika Srbija); **b)** 24985bWCPB (region Rostova-na-Donu, Ruska federacija) (crveni signal) hibridizovana na preparat 24943 (region Minsk, Republika Belorusija); **c)** 24985bWCPB (region Rostova-na-Donu, Ruska federacija) hibridizovana na preparat 3977 (Petnica, Republika Srbija); B hromozom i X hromozomi su označeni, strelice pokazuju heterohromatične blokove na dva para malih autozoma. DAPI je plave boje.

U cilju provere odstupanja od strukturne ujednačenosti između B hromozoma, probe su takođe hibridizovane i na metafaze koje sadrže dva ili tri B hromozoma. U slučaju hromozomskih preparacija iz ćelija koštane srži, usled lošijeg kvaliteta preparata i nedovoljne raspršenosti hromozoma, signali nisu bili informativni kao kod preparata iz ćelijske kulture. Signali na malim hromozomima A seta su slabije vidljivi, dok su signali jasno vidljivi na svim B hromozomima prisutnim u metafazama kao i na X hromozomima (Slika 7a; 7b; 7c).

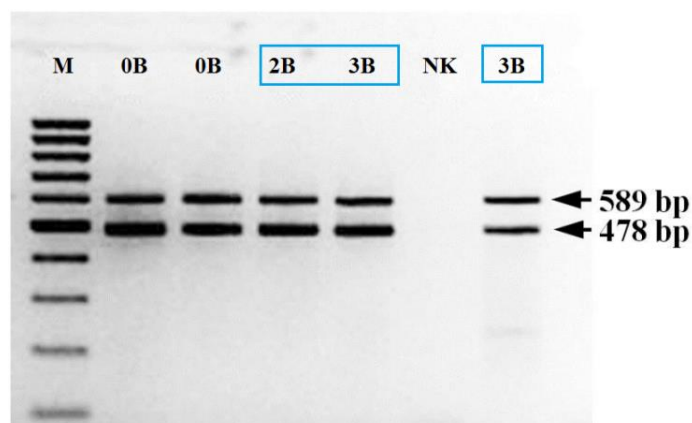


Slika 7. Hibridizacija B-specifičnih proba na metafaze koje sadrže više od jednog B hromozoma. **a)** 3980WCPB (zeleni signal) hibridizovana na preparat 3656 (dva B hromozoma); **b)** 24985aWCPB (crveni signal) hibridizovana na preparat 3854 (tri B hromozoma); **c)** 24985bWCPB (crveni signal) hibridizovana na preparat 24985 (tri B hromozoma); B hromozom i X hromozomi su označeni, strelice pokazuju heterohromatične blokove na dva para malih autozoma. DAPI je plave boje.

Genetički sadržaj B hromozoma

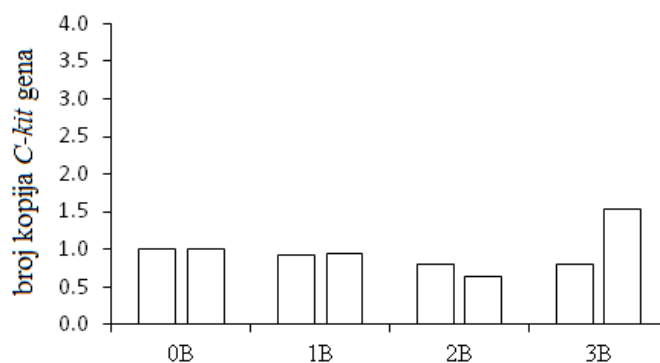
Proveravanje prisustva *C-kit* gena i gena za 18S rRNK na B hromozomima

U delu studije koji se odnosi na istraživanje sekvenci B hromozoma, vršena je procena broja kopija dva gena, *C-kit* i 18S rRNK, kod jedinki vrste *A. flavicollis* sa različitim brojem B hromozoma, upotrebom multipleks PCR i RT-PCR analiza. U cilju procene odnosa broja B hromozoma i broja kopija *C-kit* gena najpre je urađen multipleks PCR. Kao matrica za reakciju je korišćena DNK jedinki bez B i sa različitim brojem B hromozoma (dva i tri). Poređenjem debljine traka dobijenih na agaroznom gelu kontrolnog *Sprn* i ciljnog *C-kit* gena dobijenih u istoj reakciji, kao i poređenjem traka između različitih reakcija, nisu uočene razlike između debljina traka za kontrolni i ciljani gen kod jedinki sa B, kao ni razlika u debljini traka između uzoraka sa B i uzoraka bez B hromozoma (Slika 8).



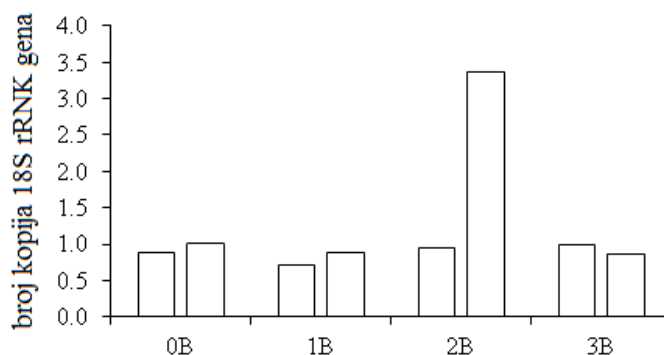
Slika 8. Produkti PCR umnožavanja *C-kit* i *Sprn* gena sa DNK molekula kod jedinki bez, sa dva i tri B hromozoma. Strelicama su označeni produkti reakcije i to: gornji, dužine 589 bp koji odgovara ciljnoj *C-kit* sekvenci i donji, dužine 478 bp koji odgovara kontrolnoj sekvenci *Sprn* gena. Iznad svake kolone je označen broj B hromozoma u uzorku. M - DNK leđer 100-1000 bp. NK - negativna kontrola.

Radi preciznije provere postojanja različitog broja kopija *C-kit* gena na DNK urađen je i RT-PCR. Na ovaj način je analizirano osam jedinki sa različitim brojem B hromozoma. Poređenje je vršeno u odnosu na kontrolni gen i kalibratornu jedinku bez B hromozoma. Rezultati multipleks PCRa, kao i RT-PCRa pokazuju da se egzon jedan, *C-kit* gena, kod jedinki vrste *A. flavicollis* ne nalazi u većem broju kopija kod jedinki sa B hromozomima nego što je to slučaj kod jedinki bez dodatnih B hromozoma. Na ovaj način nije potvrđeno postojanje dodatnih kopija *C-kit* gena ni u jednom analiziranom genomu jedinki sa B (Slika 9).



Slika 9. Relativna kvantifikacija DNK sekvenci *C-kit* gena kod jedinki sa različitim brojem B hromozoma.

U analizi broja kopija drugog, gena za 18S rRNK, RT-PCR je pokazao da je kod jedne jedinke sa dva B oko tri puta povećan broj kopija gena za 18S rRNK u odnosu na kalibratorski uzorak, dok ostali uzorci nisu pokazivali razlike u broju kopija 18S rRNK gena (Slika 10).



Slika 10. Relativna kvantifikacija DNK sekvenci gena za 18S rRNK kod jedinki sa različitim brojem B hromozoma.

Sekvenca B hromozoma vrste *A. flavicollis*

Nakon što je FISH-om potvrđeno da su B hromozomi uspešno mikrodisekovani, umnožene su DNK biblioteke a potom su i određene njihove sekvence. Pored pet B hromozoma izolovanih sa metafaza tri različite jedinke, izolovan je i jedan kontrolni autozom od kog je takođe umnožena DNK biblioteka. Nakon uklanjanja kontaminacije humanom DNK, sekvence su spojene u 1000 do 6000 pozicija koje za svaki uzorak pokrivaju između 83-585 Kbp na genomu miša (Tabela 8.).

Tabela 8. Lista sekvenciranih DNK biblioteka.

uzorak	umnožavanje	ukupna čitanja	poravnana čitanja (%)	pokrivenost, bp	pokrivenost u regionima, bp (%)	pokriveni regioni %
AfIB1	WGA	532352	21814 (4,10)	308629	179407 (58,1)	5,24
AfIB5	WGA	157044	3087 (1,97)	82710	34731 (42,0)	1,02
AfIB6	WGA	555946	20042 (3,61)	168140	91281 (54,3)	2,67

AflB7	WGA	335380	14224 (4,24)	244839	157340 (64,3)	4,60
Afl23	WGA	228064	8728 (3,83)	289408	218573 (75,5)	0,39
Afl_B	WGA	542358	31195 (5,75)	585181	380759 (65,1)	10,24

U skladu sa rezultatima dobijenim u istraživanju Matsubara i saradnici (2004), sekvenca izolovanog kontrolnog autozoma AFL23, odgovara regionima MMU10: 34-78 Mbp i MMU17: 27-38 Mbp kod miša (Tabela 9.). Na ovaj način je prvi put dobijena informacija o tački prekida između hromozoma vrsta *A. flavicollis* i *Mus musculus*.

Tabela 9. Hromozomski regioni vrste *Mus musculus* otkriveni na kontrolnom autozomu AFL23 vrste *A. flavicollis*.

pozicija	opseg, raspon	komentari
MMU10:33909246-78477687	44568441	
MMU11:72622033-72674262	52229	Ube2 familija, takođe na MMU10:77 Mbp
MMU17:26943243-38306309	1136066	
MMU5:109174914-10921881	43901	Vmn2 familija, takođe na MMU10:79/130 Mbp, MMU17:19-23 Mbp
MMU5:116419664-11645422	34557	Hspb8, Srrm4 fragmenti gena
MMU8:97394174-98042784	648610	intergenski
Ukupno	56710804	

Identifikovani su ciljni (target) regioni za svaku DNK biblioteku B hromozoma. AflB1, AflB7 i A_flb su imale rezultate visokog kvaliteta, dok su rezultati mapiranja za AflB5 i AflB6 dali neke kraće regione uz to da su neki mali regioni izostali. Postoji značajna podudarnost između sekvenci bioloških ponovaka (AflB5-7), kao i uzoraka iz različitih populacija (AflB1 i AflB5-7 iz Republike Srbije, kao i Afl_B iz Ruske federacije). Uočeno je i veliko preklapanje između sekvenci uzoraka iz udaljenih populacija, a jedini region koji je populaciono specifičan jeste MMU9: 72 Mbp koji je pronađen u uzorku iz Ruske federacije (Tabela 10.). Ukupno 22 zajednička regiona su povezana sa 3,5 Mbp mišijeg genoma (Tabela 10.).

Tabela 10. Hromozomski regioni vrste *M. musculus* otkriveni na B hromozomima vrste *A. flavicollis*. Pop.-populaciono specifični regioni, prisutni samo na B hromozomima jedinke iz Ruske federacije. A.pe.B- regioni prisutni i na B hromozomima vrste *A. peninsulae*.

koordinate regiona	dužina, bp	del, bp	geni	Pop.	A.pe. B
MMU1:43278320-43534221	255901	97811	<i>Nck2</i>		
MMU2:71111765-71264578	152813	50247	<i>Cybrd1, Dync1i2</i>		
MMU2:153694504-153766975	72471		<i>Maprel</i>		
MMU3:135135507-135251552	116045	89482	<i>Cenpe</i>		
MMU4:86486570-87262216	775646	472423	<i>Saxo1, Saxo1os, Rraga, Haus6, Scarna8, Acer, Slc24a</i>		
MMU6:128081800-128103877	22077		<i>Tspan9</i>		
MMU8:129218084-129234882	16798		<i>2610044O15Rik8</i>		
MMU9:72375234-72672575	297341		<i>Mns1, 4930509E16Rik, Nedd4</i>	<i>Tex9, Rfx7,</i>	+
MMU9:114604362-114660534	56172		<i>Cnot10</i>		
MMU10:18688905-18771842	82937	46227	<i>Arfgef3</i>		
MMU10:20263319-20310752	47433		<i>Map7</i>		
MMU10:110209894-110590468	380574				
MMU11:112954654-112967089	12435				
MMU12:105832875-106077210	244335	88409	<i>Papola, Vrk1</i>		+
MMU13:65226655-65267978	41323				+
MMU13:74395420-74618414	222994		<i>Zfp825, Mir 692</i>		+
MMU13:119823094-120319834	496740	165865	<i>Tcstv1, LOC106029237, Gm20767, AF067061, BC147527, Tcstv3</i>		
MMU14:12585304-12605070	19766		<i>Cadps</i>		
MMU15:16190645-16276524	85879				

MMU17:94818796-94875639	56843	38507	<i>Gm1976, Gn20939</i>	
MMU19:3453180-3541805	88625		<i>Ppp6r3</i>	
MMU19:37920146-37987977	67831	29395	<i>Myof</i>	
MMUX:18236354-18342298	105944		<i>Kdm6a</i>	
Ukupno:	3718923	1078366	38	3

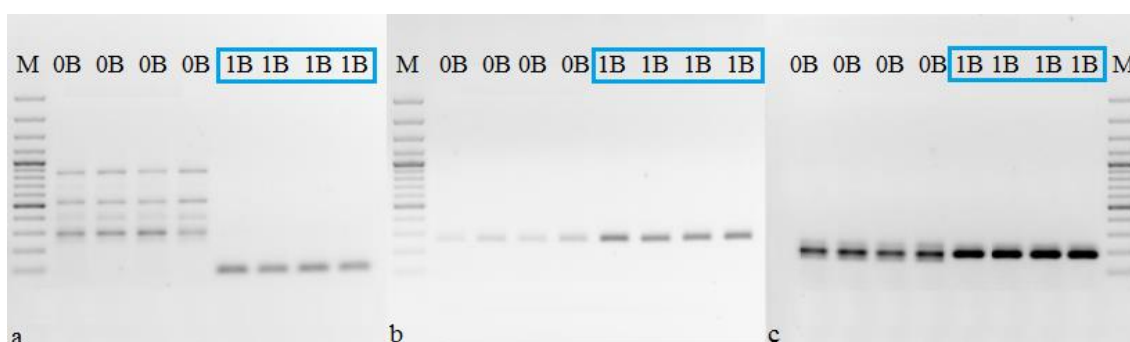
Funkcionalno klasterovanje je bilo moguće za 29 od 38 gena lokalizovanih u regionima prisutnim na B hromozomima. Sekvence B hromozoma su u najvećoj meri obogaćene genima koji kodiraju proteine mikrotubula i ćelijskog ciklusa: *Cenpe* (engl. *centromere prtein E*), *Dync 1 i 2* (engl. *dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2*), *Mns 1* (engl. *microtubule-associated protein, RP/EB family, memeber 1*), i *Mapre 1* (engl. *microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1*). Takođe su u manjoj meri prisutni i geni koji mapiraju nukleotid-vezujuće, metal-vezujuće proteine kao i proteine membrane.

U poređenju sa autozomima referentnog genoma miša, B hromozomi su podložniji nakupljanju mutacija, zamena, insercija i delecija u sekvencama (1 pozicija na 28-31 bp u odnosu na 1 poziciju na 44 bp kod miša), što je u skladu sa pretpostavkom o degradaciji dodatnih hromozoma. U skladu sa tom pretpostavkom je i povišen broj nesinonimskih mutacija primećenih u protein-kodirajućim genima. Višestuke supstitucije (*missense*) uočene su kod gena *Cenpe*, *Rraga* (engl. *Ras-related GTP-binding protein A*) i *Kdm6a* (engl. *Lysine demethylase 6a*).

U sekvenci Afl23 najveći klasteri ponovaka su bili pretežno izgrađeni od B2 SINE i L1 LINE familija. Dok su u slučaju B hromozoma takođe prisutni i satelitski ponovci (uključujući MurSatRep 1) zajedno sa ERVL (MaLR) (*retro virus related*) i ERVK LTR-ovima. A u nekim slučajevima transpozoni su bili tandemski organizovani.

Transkripciona aktivnost pseudogena poreklom sa B hromozoma i gena sa, ili u prisustvu B hromozoma

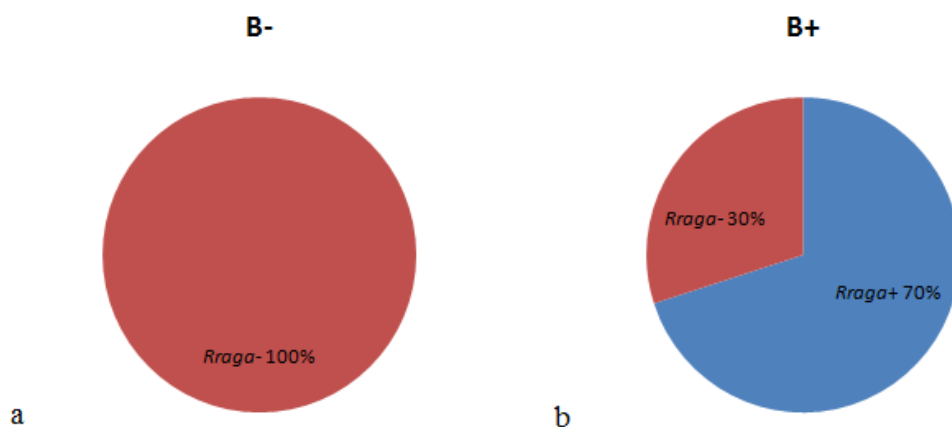
Na B hromozomima su identifikovani geni koji su imali značajno izmenjene sekvence u poređenju sa referentnim genima, geni kod kojih je u velikoj meri nastupila pseudogenizacija. Na osnovu razlike u sekvenci u poređenju sa genima sa kojih vode poreklo, ovi izmenjeni geni su birani za proveru transkripcione aktivnosti metodom RT-PCRa. Cilj je bio da se prajmerima obuhvate regioni koji su karakteristični isključivo za B hromosome, pa bi na taj način samo prisustvo specifičnog produkta reakcije značilo da iRNK vodi poreklo sa B hromozoma. Od osam pari prajmera koji su odabrani za izmenjene sekvence B hromozoma, proverom na DNK kod jedinki sa i bez B, tri para prajmera su dala PCR- produkte povezane sa prisustvom B hromozoma (Slika 11). Jedan prajmerski par, za gen *Rraga*, je kvalitativno pravio razliku između uzoraka sa B i bez B, odnosno izostajao je specifičan produkt reakcije kod jedinki bez B (Slika 11a). Druga dva para prajmera, za gene *Haus6* (engl. *human augumin-like complex, subunit6*) (Slika 11b) i *Cenpe* (Slika 11c), davala su kvantitativnu razliku između jedinki bez B i sa B hromozomima. Naime, trake kod jedinki koje su imale B su bile značajno deblje u poređenju sa jedinkama bez B hromozoma. Kako bismo izbegli lažno negativne rezultate qPCR-a, za svaki uzork je najpre na ovaj način, običnim PCR-om, vršena provera prisustva ciljane sekvence na DNK.



Slika 11. Produkti PCR umnožavanja gena: **a)** *Rraga*; **b)** *Haus6*; **c)** *Cenpe*; sa DNK molekula jedinki bez B i sa jednim B hromozomom. Iznad svake kolone je označen broj B hromozoma uzorka. M - DNK leder 100-3000 bp.

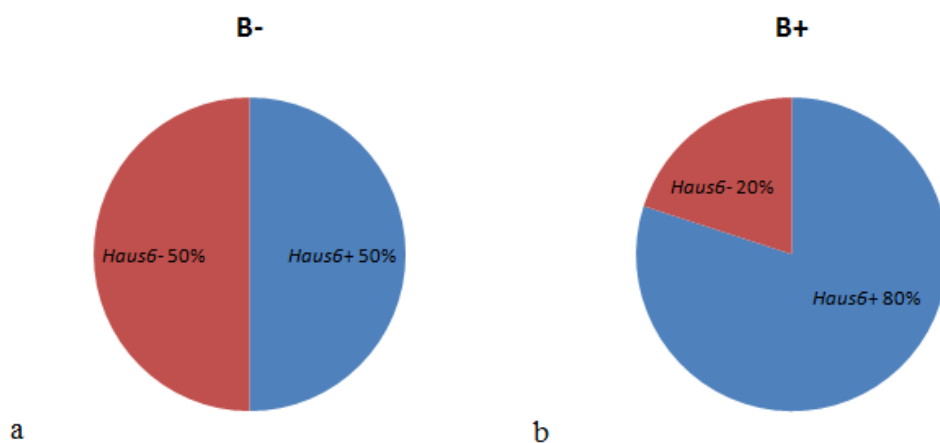
Provera prisustva specifičnog transkripta poreklom sa B hromozoma izvršena je analizom temperature topljenja proizvoda qPCR-a. Temperatura topljenja je direktno zavisna od nukleotidnog sastava sekvence, i značajan je parametar kod provere specifičnosti produkta reakcije.

Na ovaj način je primećeno da prajmeri za izmenjenu sekvencu *Rraga* gena, kod uzoraka bez B daju produkte koji su nespecifični i imaju različite temperature topljenja dok kod uzoraka sa B hromozomima dominira produkt čija je temperatura topljenja 79 °C. Naime, 70% analiziranih uzoraka sa B pokazuje transkripcionu aktivnost ove sekvence poreklom sa B hromozoma (Slika 12).



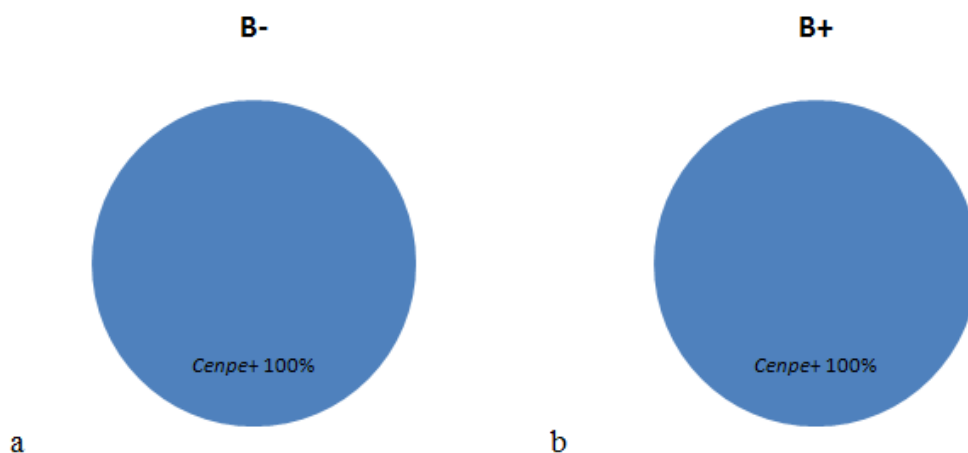
Slika 12. Procenat jedinki među grupama **a)** bez B hromozoma; **b)** sa B hromozomima, u zavisnosti od prisustva transkripta sa izmenjene *Rraga* sekvence. Crvena boja - izostaje transkript; plava boja - transkript prisutan.

Prajmeri za sekvencu *Haus6* gena su i kod jedinki sa B i kod jedinki bez B davali produkt koji se topio na istoj temperaturi odnosno imali su isti nukleotidni sastav. Ovaj podatak pokazuje da prajmerima nije obuhvaćena izmenjena sekvencu. Nakon poređenja broja jedinki kod kojih je ovaj gen transkribovan, primećeno je da je iRNK sa ovog gena kod grupe jedinki bez B hromozoma prisutna u 50% slučajeva. Kod nosilaca B hromozoma sa druge strane ovaj gen je transkribovan kod 80% jedinki (Slika 13).



Slika 13. Procenat jedinki **a)** bez B hromozoma; **b)** sa B hromozomima, u zavisnosti od prisustva transkripta sa *Haus6* gena. Crvena boja - izostaje transkript. Plava boja - transkript prisutan.

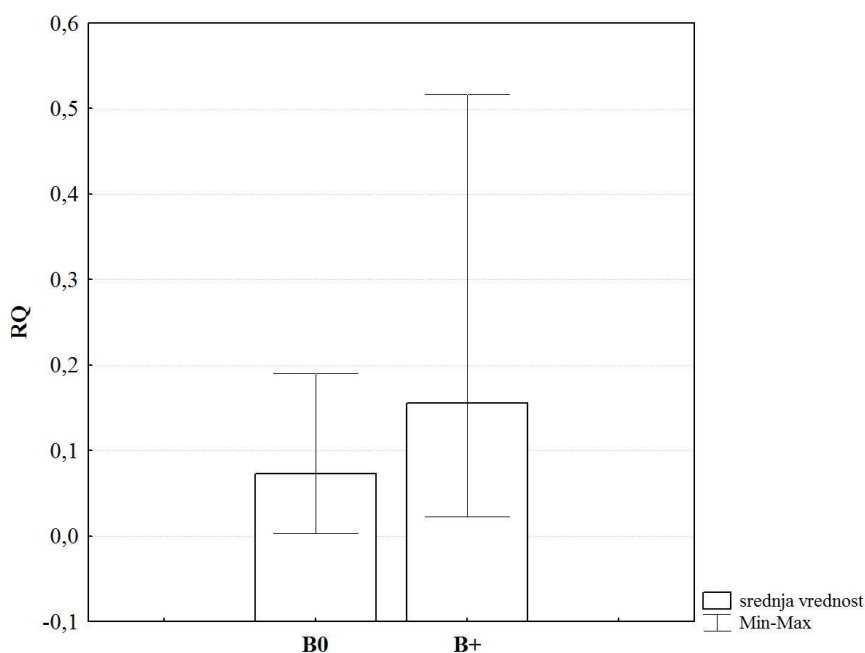
Na isti način, temperatura topljenja, pokazala je da je neizmenjen *Cenpe* gen prepisan u iRNK kod svih uzoraka, kako kod onih sa B, tako i kod uzoraka bez B hromozoma (Slika 14).



Slika 14. Procenat jedinki **a)** bez B hromozoma; **b)** sa B hromozomima, u zavisnosti od prisustva transkripta sa *Cenpe* gena. Plava boja - transkript prisutan.

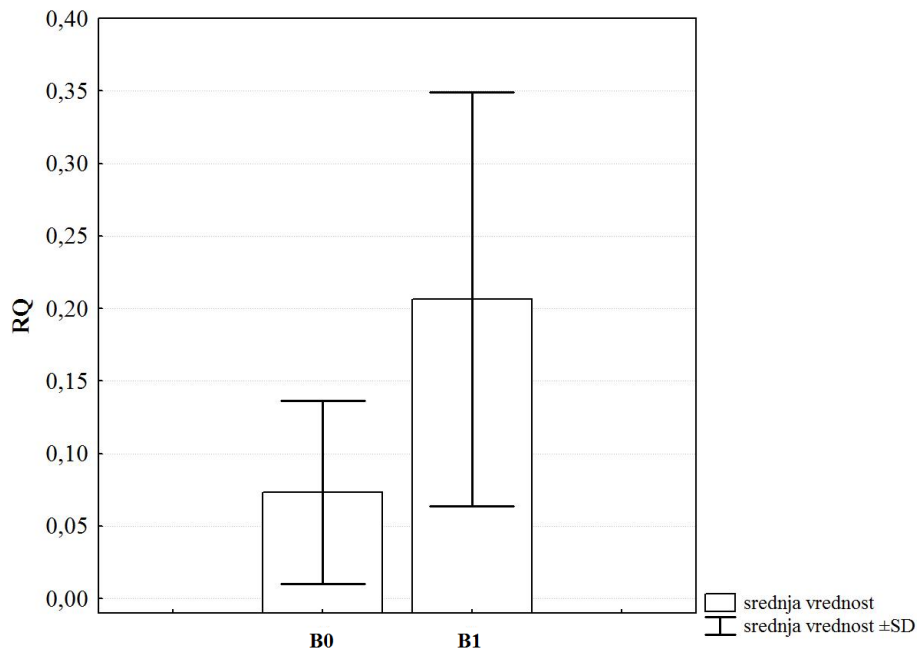
Iako nije bilo razlike u prisustvu produkta, primećena je razlika u Ct vrednostima između uzoraka. Transkripciona aktivnost ovog gena je dalje analizirana metodom relativne kvantifikacije. Poređenjem Ct vrednosti transkripcije *Cenpe* gena sa kontrolnim genima i jedinkama koje nisu imale B hromozome, kao kalibratorima, uočen

je statistički značajno povišen nivo transkripcije ovog gena ($Z=-2.149$, $p=0.032$) kod nosilaca B hromozoma (Slika 15).



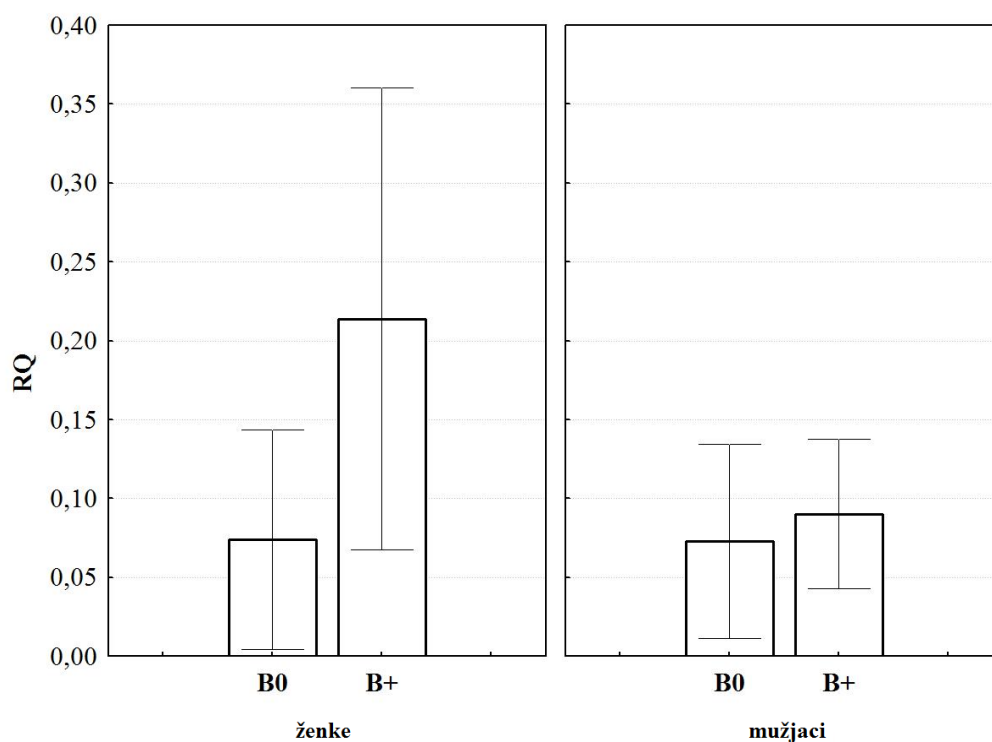
Slika 15. Relativna kvantifikacija iRNA (RQ) za *Cenpe* gen u slezini mladih jedinki u grupi bez B hromozoma (B0) i grupi sa B hromozomima (B+). Prikazane su srednje, minimalne i maksimalne vrednosti za obe grupe.

Kada se iz analize isključe jedinke sa brojem B hromozoma većim od jedan ta razlika u nivou transkripcije postaje izraženija (Slika 16) i dalje statistički značajna ($Z=-2.205$, $p=0.027$).



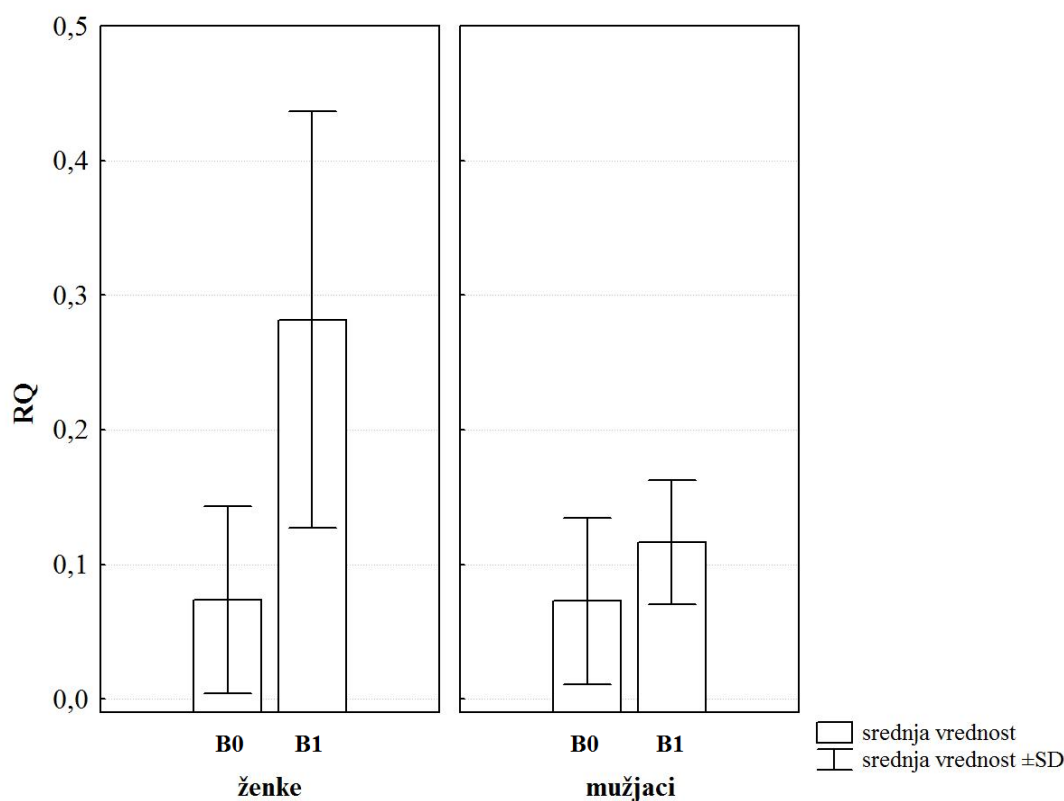
Slika 16. Relativna kvantifikacija iRNA (RQ) za *Cenpe* gen u slezini mladih jedinki u grupi bez B hromozoma (B0) i grupi sa jednim B hromozomom (B1). Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije (SD) za obe grupe.

Posmatrano po polovima, mužjaci nisu pokazivali statistički značajnu razliku ($Z = -0.688$, $p = 0.491$) u prisustvu iRNA za *Cenpe* gen između nosilaca B hromozoma i jedinki bez B hromozoma (Slika 17). Kod ženki je sa druge strane, ova razlika bila statistički značajna $Z = -2.147$, $p = 0.032$ (Slika 17).



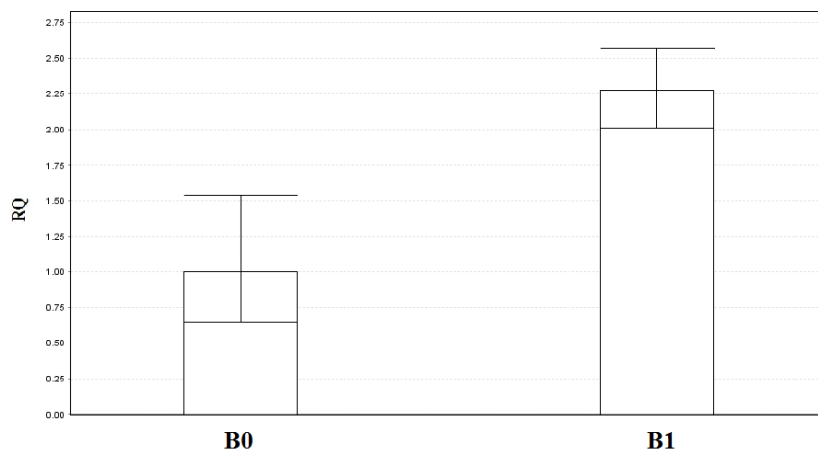
Slika 17. Relativna kvantifikacija iRNA (RQ) za *Cenpe* gen u slezini mladih jedinki odvojeno po polovima u grupi bez B hromozoma (B0) i grupi sa B hromozomima (B+). Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije (SD) za sve četiri grupe.

Opet, ako se u analizu uvrste samo ženke koje imaju jedan B hromozom i uporede sa ženkama bez B hromozoma, ova razlika u transkripciji je izraženija $Z=-2.364$, $p=0.018$ (Slika 18), dok kod mužjaka nema statističke značajnosti ni u ovom slučaju $Z=-0.703$, $p=0.482$ (Slika 18).



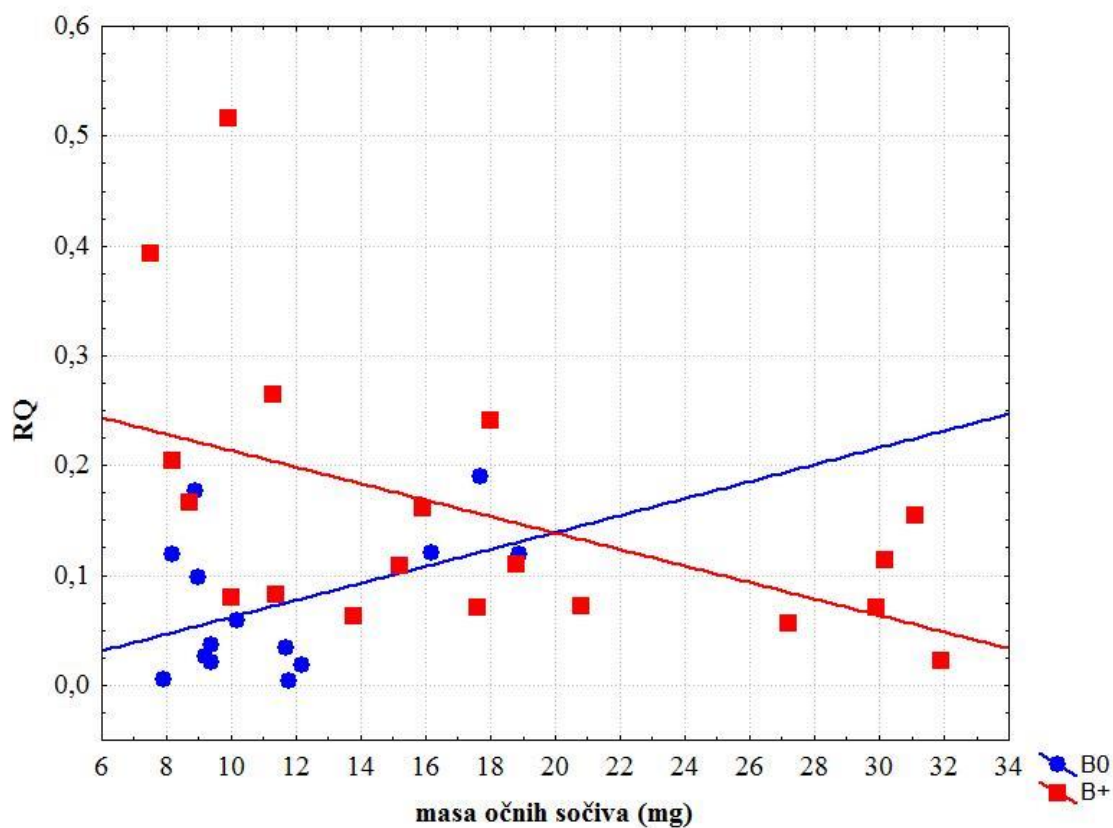
Slika 18. Relativna kvantifikacija iRNK (RQ) za *Cenpe* gen u slezini mladih jedinki odvojeno po polovima u grupi bez B hromozoma (B0) i grupi sa jednim B hromozomom (B1). Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije (SD) za sve četiri grupe.

Sa obzirom da je relativna kvantifikacija iRNK (RQ) urađena između jedinki koje vode poreklo iz različitih prirodnih populacija, uslovi u kojima su ove jedinke odrastale nisu kontrolisani niti poznati. Posledica toga je i veliko variranje u nivou ekspresije u okviru testiranih grupa uzoraka. Iz tog razloga je zanimljivo istaći slučaj u kom je poređenje transkripcione aktivnosti *Cenpe* gena urađeno između dve juvenilne ženke, od kojih je jedna imala jedan B hromozom dok je druga bila bez B hromozoma. Ove ženke su rođene u zatočeništvu (laboratorijskim uslovima) u istom leglu, odgajane u istim uslovima i istovremeno žrtvovane. Dakle, eliminacijom efekata sredine, različite starosti i pola jedinka sa B hromozomom je, u ovom slučaju, pokazala dva puta viši nivo iRNK za *Cenpe* gen u poređenju sa sestrom koja nije imala B hromozom (Slika 19). Pored toga, bitno je naglasiti da je jedinka, nosilac B hromozoma, imala i produkte *Rraga* pseudogena i *Haus6* gena dok su oni kod životinje bez B hromozoma izostajali.



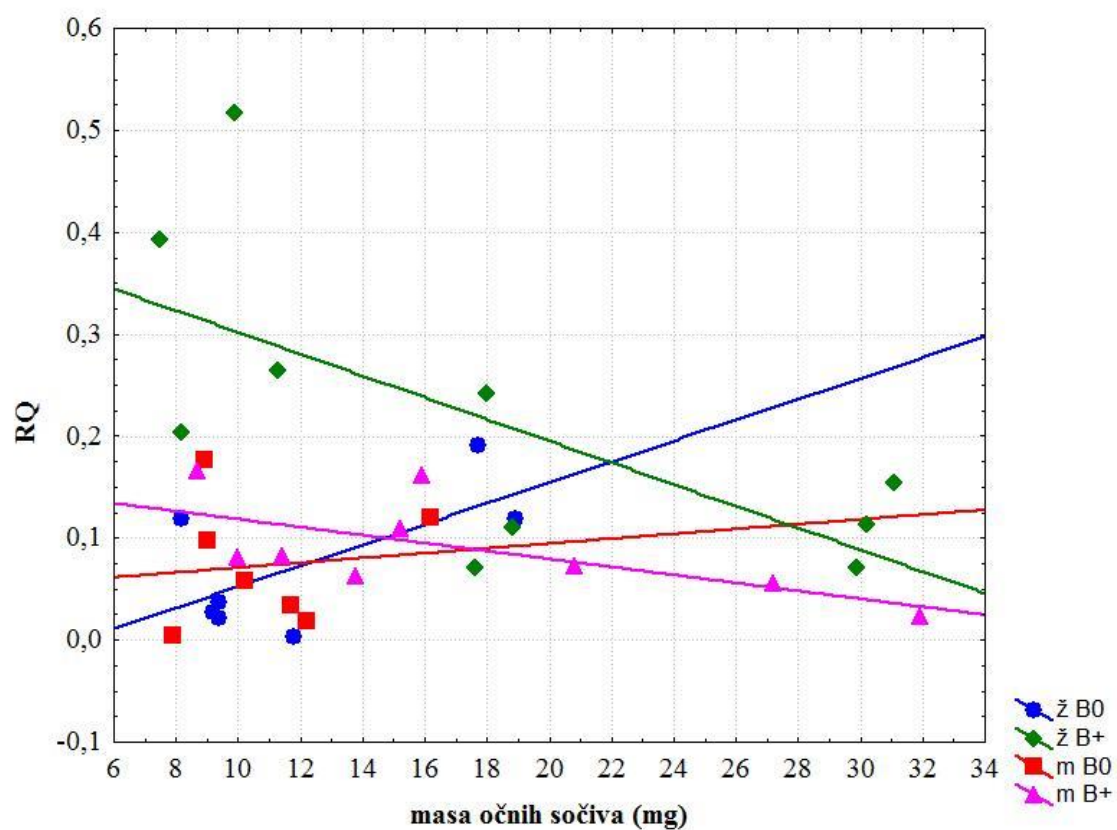
Slika 19. Srednje vrednosti i standardne devijacije za relativnu kvantifikaciju iRNK (RQ) za *Cenpe* gen u slezini mladih ženki iz istog legla, bez B (B0) i sa jedan B (B1).

Sa dodatkom parametra težine očnog sočiva, koji je direktno proporcionalan starosti jedinki, primećujemo da ekspresija gena *Cenpe* sa starošću opada kod jedinki sa B (Slika 20), i ova negativna korelacija, je statistički značajna ($r = -0,506$, $p = 0,027$). Jedinke bez B hromozoma, sa druge strane, pokazuju suprotnosmeran trend ekspresije koji nema statističku značajnost ($r = 0,440$, $p = 0,116$) (Slika 20). Ovakav rezultat kod jedinki bez B hromozoma treba prihvatiti sa rezervom jer u tu grupu nisu uključene starije jedinke, kao što je to slučaj u grupi jedinki sa B hromozomima. Imajući u vidu starosno neravnomerne grupe, ovu suprotnosmernost u trendovima transkripcione aktivnosti sa starošću između jedinki sa B i bez B hromozoma bi trebalo dodatno istražiti.



Slika 20. Korelacija relativne koncentracije iRNK (RQ) za *Cenpe* gen i starosti između jedinki bez B hromozoma (B0) i jedinki sa B hromozomima (B+).

Nakon što smo grupe jedinki sa B i bez B hromozoma razdvojili po polovima, možemo primetiti da je ovaj trend opadanja ekspresije sa starošću kod jedinki sa B hromozomima vezan za ženski pol, gde je statistički značajan ($r = -0,678$, $p = 0,031$) (Slika 21). Kod mužjaka sa B hromozomima takođe postoji suprotnosmernost u transkripcionoj aktivnosti u odnosu na starost jedinki ali ona nije značajna (Slika 21).



Slika 21. Korelacija relativne koncentracije iRNK (RQ) za *Cenpe* gen i starosti po polovima između grupa jedinki bez B hromozoma (B0) i jedinki sa B hromozomima (B+).

Diskusija

Kombinovanje metoda molekularne biologije i citogenetike, od 80ih godina XX veka do danas, je dovelo do značajnog napretka u razumevanju genoma putem istraživanja hromozoma. Skorašnja ekspanzija genomskih analiza i njihova kombinacija sa metodama citogenetike je značajno povećala rezoluciju u proučavanju hromozoma, a samim tim i B hromozoma. Novi metodološki pristupi u problematici staroj više od jednog veka, zajedno sa savremenim otkrićima vezanim za organizaciju i funkcionisanje genoma, daju prostor za postavljanje preciznijih hipoteza o nastanku, evoluciji i značaju ovih dodatnih elemenata u genomu.

Poreklo B hromozoma

Jedan od pristupa koji omogućava precizan uvid u genetički sadržaj i poreklo B hromozoma, zasnovan je na analizama sekvenci ovog hromozoma nakon njegovog izdvajanja od ostatka genoma. Metodom mikrodisekcije uspešno je izdvojeno pet B hromozoma iz hromozomskih preparata tri jedinke vrste *A. flavicollis* od kojih smo umnožili DNK biblioteke. DNK biblioteke su nam dalje poslužile za pravljenje fluorescentno obeleženih proba i sekvenciranje. Tako dobijene B-specifične fluorescentno obeležene probe smo potom koristili za FISH.

Korišćenjem ovako dobijenih proba, FISH, omogućava pre svega da proverimo uspešnost mikrodisekcije, kvalitet i količinu umnožene DNK biblioteke i homologiju koju B hromozom deli sa hromozomima osnovnog, A seta. Rezultati ovakvog FISH-a, dobijenog hibridizacijom B-specifičnih proba na metafaze različitih jedinki ove vrste, nedvosmisleno ukazuju na homologiju između sekvence B hromozoma i:

- a) pericentromernog regiona (PR) polnih hromozoma,
- b) subtelomernih regiona dva para malih autozoma i
- c) slabiju homologiju sa distalnim regionom Y hromozoma.

Homologija B hromozoma sa regionom polnih hromozoma koji sadrži centromeru, ukazuje ne samo na podudarnost u sekvenci već i na moguće poreklo B hromozoma. Poreklo B hromozoma od polnih hromozoma je do sada potvrđeno kod

različitih vrsta (Sharbel i sar. 1998; Cabrero i sar. 2003; Ventura i sar. 2015). Pericentromerni region X i Y hromozoma, koji pokazuje homologiju sa sekvencom B hromozoma, kod vrste *A. flavicollis* do sada je u literaturi opisivani kao heterohromatični odnosno C-pozitivni u slučaju X hromozoma (Rovatsos i sar. 2008). DAPI bojenje, koje je analogno C trakama, je pokazalo da su pericentromerni region X hromozoma, kao i sam B hromozom, C-pozitivni (Slika 2a). Ovaj region polnih hromozoma je opisan i na osnovu prisustva repetitivnih sekvenci kao i položaja koje zauzimaju u mejozi. Rubtsov i saradnici (2011) su opisali homologiju ovog regiona sa mikrodisekovanim pericentromernim repetitivnim sekvencama koje su prisutne i na svim autozomima. B specifične probe u ovoj studiji nisu hibridizovale na PR autozoma. Razlog tome može da bude postojanje kombinacije različitih repetitivnih sekvenci na PR polnih hromozoma, koje su homologe PR u autozoma sa jedne strane i B hromozoma sa druge.

Hibridizacijom komercijalne fluorescentne probe za ceo X hromozom vrste *Mus musculus*, na metafaze vrste *A. flavicollis*, nije dobijen signal na PR X hromozoma kao ni na B hromozomima. Izostanak homologije između X hromozoma vrste *Mus musculus* i PR X hromozoma kod 5 vrsta roda *Apodemus*, je već zabeležen (Matsubara i sar. 2004), ali vrsta *A. flavicollis* nije bila obuhvaćena tim istraživanjem. Kako je komercijalna proba oslobođena repetitivnih sekvenci, ovakav rezultat može da ukaže na to da je region X hromozoma na kom izostaje hibridizacija kod vrste *A. flavicollis* izgrađen upravo od repetitivnih sekvenci. Takođe izostaje i signal na B hromozomima, pa možemo da zaključimo da protein kodirajuće sekvence sa X hromozoma ne ulaze u sastav B hromozoma, barem ne u meri koju je na ovaj način moguće detektovati FISH-om. Druga mogućnost bi bila da region koji je zajednički za polne i B hromozome žutogrllog miša, ne postoji na X hromozomu *Mus musculus*.

Analizom mejotičkih hromozoma kod mužjaka *A. flavicollis*, pokazano je da se regioni mejotičke rekombinacije između X i Y hromozoma, odnosno pseudoautozomalni regioni (PAR), nalaze na krajevima polnih hromozoma (Safronova i Cherepanova 2007). Mada ne postoji direktan dokaz o položaju PAR-a kod vrste *A. flavicollis*, zabeleženo je da se regioni homologije između X i Y hromozoma nalaze upravo u blizini centromera (Rovatsos i sar. 2008). Rezultati ovog istraživanja takođe pokazuju i da je region X hromozoma koji se nalazi neposredno uz centromeru C-pozitivan (Slika 2a), odnosno heterohromatičan. Dok PAR, sa druge strane, predstavlja

mali euhromatični region homologije između X i Y hromozoma u okviru kog je moguća rekombinacija. Rekombinacija u ovom regionu polnih hromozoma je čak deset puta češća nego na autozomima (Flaquer i sar. 2009; Raudsepp i sar. 2012; Baudat i sar. 2013). Ovi podaci navode na pretpostavku da se PAR nalazi u blizini PR polnih hromozoma. Ovakav heterohromatični PR (Rubtsov i sar. 2011), koji sa jedne strane sadrži centromeru, a sa druge se nalazi u blizini ili se graniči sa PAR, u kom su dvolančani prekidi češći nego u ostatku genoma, predstavlja dobrog kandidata za neo-B. Zbog osobine heterohromatina da utištava sekvence koje se nalaze u njegovoj neposrednoj blizini (Grewal i Jia 2007; Wang i sar. 2016; Vanrobays i sar. 2017), manja je verovatnoća da je PAR umetnut u PR. Na ovaj način i nije potvrđeno da region polnih hromozoma koji je homolog sa B sekvencom sadrži gene karakteristične za PAR. Međutim, pozicioniranje X i Y hromozoma u mejozi mužjaka (Vujošević i sar. 1990) ukazuje da se PAR zaista nalazi u ovom regionu polnih hromozoma vrste *A. flavicollis*, bilo da se nalazi u blizini ili se graniči sa heterohromatičnim pericentromernim regionom. Dalje, sudeći po rezultatima FISH-a, PR polnih hromozoma je najverovatnije predak B hromozoma kod vrste *A. flavicollis*.

Teorijski, B hromozom bi mogao da nastane od neo-B koji je euhromatičan. Vremenom bi takav neo-B nakupljao repetitivne elemente i postajao heterohromatičan (Karamysheva i sar. 2002; Rubtzov i sar. 2009; Rubtsov i Borisov 2018; Jetybayev i sar. 2018). Na primeru malih marker hromozoma kod ljudi, koji se smatraju B hromozomima u nastajanju, može se pronaći varijabilna količina euhromatina (Liehr i sar. 2008). Iako kod 70% nosilaca ovih dodatnih hromozoma sa malim euhromatičnim regionom nema fenotipskih efekata, povećanje i variranje u kontinuitetu euhromatičnih regiona ima negativne efekte na kliničku sliku nosioca (Liehr i Weise 2007; Armanet i sar. 2015; Hashemzadeh-Chaleshtori i sar. 2015; Hamid Al-Rikabi i sar. 2018). Pretpostavka je da bi euhromatični kandidat za B hromozom zahtevao brzo i efikasno utišavanje, nakon čega bi mogao da otpočne nakupljanje promena karakterističnih za B hromozome (Hewitt 1974). U tom kontekstu bi nastanak B hromozoma od regiona X hromozoma bio značajno olakšan usled već postojećih mehanizama utišavanja X hromozoma koji se nalaze u višku (Lyon 1961; Brown i sar. 1991; Chow i sar. 2005). Sa druge strane heterohromatični hromozomski region, kao kandidat za neo-B, bi usled svojih dokazanih epigenetičkih svojstava imao sposobnost da utištava ugrađene gene na

način nezavisan od njihove sekvence (Grewal i Jia 2007; Wang i sar. 2016; Vanrobays i sar. 2017). Jedan scenario nastanka ne isključuje drugi tako da je verovatno da B hromozomi različitih vrsta nastaju različitim mehanizmima, kako od heterohromatičnih tako i od euhromatičnih segmenata A hromozoma.

Izuzev snažnog hibridizacionog signala na PR polnih hromozoma i subtelomernom regionu dva para malih autozoma, nešto slabiji hibridizacioni signal se javlja na ostatku Y hromozoma. Slab hibridizacioni signal na ostatku Y hromozoma je verovatno posledica heterohromatične prirode celog Y hromozoma, odnosno prisustva repetitivnih sekvenci (Rovatsos i sar. 2008; Gornung i sar. 2009).

Pored homologije sa PR polnih hromozoma, sekvence B hromozoma pokazuju homologiju sa subtelomernim regionima dva para malih autozoma. Sudeći po rezultatima G-traka (Slika 1a) i DAPI bojenju (Slika 2a), ovi subtelomerni regioni su takođe heterohromatični blokovi (Slika 1b; 2b). C-pozitivni regioni su do sada opisani u subtelomernom regionu četiri mala autozoma kod šumskog miša *A. sylvaticus*, ali ne i kod žutogrllog miša, *A. flavicollis* (Rovatsos i sar. 2008; Gornung i sar. 2009). Na subtelomernim regionima autozoma kod vrste *A. flavicollis* jesu smešteni rDNK klasteri (nukleolusni organizatori, NOR). Ti klasteri se nalaze na varijabilnom broju hromozoma, koji najčešće ide do osam parova autozoma (Kartavtseva 2002; Gornung i sar. 2009), iako kod vrste *A. sylvaticus*, geni za rRNK postoje i na polnim hromozomima, ovi klasteri ipak nisu locirani na polnim hromozomima vrste *A. flavicollis*. Primenjenim metodološkim pristupom, nije bilo moguće dobiti preciznije informacije o molekularnoj strukturi subtelomernih regiona dva mala para autozoma koji pokazuju afinitet prema B-specifičnoj probi. Pretpostavka je da su u pitanju neke repetitivne sekvence koje ili pripadaju istom tipu sekvenci sa PR polnih hromozoma, ili se na B hromozomima nalazi kombinacija ponovaka sa PR polnih hromozoma i subtelomernih regiona malih autozoma koji su translokacijom dospeli na B hromozom.

Postoje dokazi i da se B hromozomi unutar jedne vrste mogu razlikovati po poreklu i strukturi. Kod korejskog poljskog miša, *A. peninsulae*, u populacijama zapadnog Sibira, B hromozomi vode poreklo pretežno od autozoma, dok populacije Dalekog istoka imaju B hromozome poreklom sa polnih hromozoma (Rubtzov i sar. 2009). Sem toga, studije molekularne strukture B hromozoma *A. peninsulae*, pokazuju varijabilnost u genetičkom sadržaju B hromozoma između različitih populacija

(Rubtsov i sar. 2015). Na osnovu rezultata FISH-a, kod žutogrllog šumskog miša nismo uočili razlike u hibridizacionom signalu između geografski udaljenih populacija (Slika 6). Takođe, u slučajevima prisustva više od jednog B hromozoma u kariotipu jedinke, sve korišćene B specifične probe su pokazivale jednak afinitet prema svim B hromozomima prisutnim u mitozu (Slika 7). U situacijama kada se u FISH-u koriste probe za ceo hromozom, hibridizacioni signal može da zamaskira manje nehibridizovane zone usled čega nije moguće da se otkriju diskretne razlike u sekvencama ispitivanih hromozoma. Uprkos ograničenjima u rezoluciji metode, rezultat ukazuje na zajedničko poreklo i/ili strukturu B hromozoma u svim ispitivanim populacijama ove vrste. Ovo je u skladu sa dosadašnjim zapažanjima da B hromozomi ove vrste formiraju bivalente u mejozi kod mužjaka, odnosno da pokazuju homologiju u sekvencama (Vujošević i sar. 1989). U istom istraživanju uočeno je da se B hromozomi ne uparaju sa polnim hromozomima, što bi značilo da su uprkos homologiji potvrđenoj FISH-om (Slika 4), B hromozomi nakupili dovoljno promena u sekvenci da su sparivanje i rekombinacija između njih i predačkog hromozoma onemogućeni.

Genetički sadržaj B hromozoma

Zbog široke rasprostranjenosti u genomu i komercijalno dostupnih proba za FISH, prvenstveno su različite repetitivne sekvence opisane na B hromozomima raznih vrsta, od telomernih (Wurster-Hill i sar. 1988; Karamysheva i sar. 2002; Szczerbal i Switonski 2003; Soares i sar. 2018), ribozomalnih DNK klastera (Stitou i sar. 2000; Szczerbal i Switonski 2003; Rubtsov i sar. 2004; Silva i Yonenaga-Yassuda 2004), LINE, SINE (Peppers i sar. 1997) do histonskih gena (Teruel i sar. 2010).

Geni za rRNK vrste *A. flavicollis* su organizovani u klastere i široko su rasprostranjeni u genomu (Boeskorov i sar. 1995; Matsubara i sar. 2004). Kod ove vrste definisana su dva citotipa u zavisnosti od broja i lokalizacije aktivnih rRNK gena (NOR-ova) (Kartavtseva i sar. 2000). Obrazac distribucije gena za 18S-28S rRNK je analiziran kod sedam vrsta roda *Apodemus* (Matsubara i sar. 2004), i potvrđena je pozitivna korelacija distribucije ovih gena sa filogenetskim odnosima određenim mitohondrijskim *cyt b* genom i jedarnim IRBP genima (Serizawa i sar. 2000). Iako su

rRNK geni do sada pronađeni na B hromozomima različitih vrsta, njihovo prisustvo na B hromozomima kod vrste *A. flavicollis* do sada nije proveravano.

Rezultati dobijeni RT-PCR metodom (Slika 10) pokazuju da je broj kopija gena za 18S rRNK ujednačen kod svih uzoraka bez obzira na prisustvo, odsustvo i broj B hromozoma, sa izuzetkom jednog uzorka. Naime, uzorak poreklom od jedinke sa dva B hromozoma, pokazuje povećan broj kopija gena za 18S rRNK u odnosu na kalibratornu jedinku bez B hromozoma. Ovakav rezultat bi potencijalno mogao da ukazuje na to da se B hromozomi kod ove vrste međusobno razlikuju po genetičkom sadržaju i da na nekima od njih postoje rRNK geni. Međutim, ovom metodom nije moguće dati precizniji zaključak osim pretpostavke da zabeležena razlika u broju gena za 18S rRNK može da bude povezana sa prisustvom B hromozoma. U tom slučaju bi neki od B hromozoma vrste *A. flavicollis*, bili nosioci gena za 18S rRNK. Takođe, bitno je naglasiti mogućnost da je u pitanju interindividualna varijabilnost u broju rRNK gena, koja nije povezana sa B hromozomima (Gibbons i sar. 2014; Parks i sar. 2018).

Zbog svoje najčešće izražene heterohromatičnosti i izostanka efekata na fenotip nosilaca, B hromozomi su dugo opisivani kao genetički inertni elementi, bez protein-kodirajućih gena. Slučajno otkrivanje jednog protein kodirajućeg gena na B hromozomima kod dve vrste zveri *Vulpes vulpes* i *Nyctereutes procynoides* (Graphodatsky i sar. 2005; Yudkin i sar. 2007; Becker i sar. 2011), privuklo je pažnju istraživača. Naime, tokom komparativnih citogenetičkih analiza, na B hromozomima kod dve pomenute vrste je lociran *C-kit* protoonkogen. Isti protoonkogen je zatim pronađen na B hromozomima kod još jedne podvrste *Nyctereutes procynoides* (Graphodatsky i sar. 2005), kao i kod jelena *Mazama gouazoubira* (Makunin i sar. 2016). Važno je napomenuti da *C-kit* gen kodira receptor tirozin kinazu koji ima ulogu u proliferaciji i diferencijaciji ćelija (Ashman 1999) kao i da je njegova sekvenca visoko evoluciono očuvana kod sisara (Ma i sar. 1999). Mutacije i umnožavanje broja kopija ovog gena kod ljudi pokreću kancerogenezu (Sihto i sar. 2005). Prisustvo ovakvog gena na B hromozomima tri vrste filogenetski udaljenih sisara, kao i uloga koju ovaj gen ima u bazičnim ćelijskim procesima, su bili podsticaj da istražimo da li ovaj gen postoji i na B hromozomima vrste *A. flavicollis*.

Procenjeno je da je zajednički predak porodica Murinae i Canidae živeo pre između 83,3 i 91,8 miliona godina (Meredith i sar. 2011). Imajući u vidu tako dug

period od razdvajanja, kao i činjenicu da su genomi u obe porodice Canidae i Muridae značajno reorganizovani od tada (Graphodatsky 2007), mala je verovatnoća da B hromozomi ovih familija imaju zajedničko poreklo. Međutim, prisustvo *C-kit* gena i na B hromozomima jednog papkara, *Mazama gouazoubira*, navodi na pretpostavku da je postojanje ovog gena na B hromozomima sisara od šireg značaja, i da njegovo prisustvo ne mora biti povezano sa zajedničkom poreklom B hromozoma kod različitih vrsta, već možda sa nekim univerzalnim mehanizmom nastanka, evolucije ili njihovom funkcijom. Poređenjem broja kopija prvog egzona *C-kit* gena, između jedinki sa B i bez B hromozoma kod vrste *A. flavicollis*, nisu detektovane značajne razlike između testiranih uzoraka. Imajući u vidu ograničenja metode kojom smo uporedili broj kopija samo jednog egzona a ne i celog gena, ono što može sa sigurnošću da se zaključi jeste da se na B hromozomima vrste *A. flavicollis* ne nalazi kompletan *C-kit* gen. Postojanje drugih delova sekvence ovog gena ovako nije isključeno.

Najefikasniji način da se odredi genetički sadržaj B hromozoma jeste sekvenciranje, bilo izdvojenog B hromozoma, bilo kompletnih genoma i njihovo poređenje među jedinkama sa B i bez B hromozoma. Sekvence nastale očitavanjem DNK biblioteka dobijenih umnožavanjem mikrodisekovanih B hromozoma, poređene su sa genomom vrste *Mus musculus* kao najsirođnijim među do sada sekvenciranim i mapiranim genomima. Mapiranje, odnosno određivanje položaja očitanih sekvenci uzorka na osnovu referentnog genoma, dozvoljava identifikaciju dupliranih genomskih, odnosno hromozomskih regiona. Ovaj pristup je posebno značajan u istraživanju polimorfizama velikih hromozoma, kao što su B hromozomi. Na ovaj način regioni genoma mogu biti identifikovani, zabeleženi i podvrgnuti daljim analizama upotrebom qPCRa ili mapiranja FISH-om.

Analiza dobijenih sekvenci naspram referentnog genoma pokazuje da su ispitivani B hromozomi žutogrlog miša, izgrađeni od višestruko ponovljenih sekvenci poreklom sa većine hromozoma osnovnog seta. Ovakva slika karakteriše B hromosome mnogih vrsta (Becker i sar. 2011; Yoshida i sar. 2011; Valente i sar. 2014; Makunin i sar. 2016). Kombinacija različitih hromozomskih regiona bi mogla da bude posledica postepenog dodavanja segmenata sa hromozoma A seta tokom evolucije B hromozoma (Houben i sar. 2014), i/ili jednog katastrofičnog rearanžmanskog događaja kao što je hromotripsis (Stephens i sar. 2011). U sastav B hromozoma žutogrlog šumskog miša

ulaze 22 regiona koji u referentnom genomu vrste *Mus musculus* vode poreklo sa 16 hromozoma, i na njima je identifikovano 38 protein-kodirajućih gena. Na osnovu rada Matsubara i saradnika (2004) možemo da zaključimo da bi identifikovanim hromozomima vrste *Mus musculus*, čiji regioni učestvuju u građenju B hromozoma, moglo da odgovara do 18 hromozoma roda *Apodemus*. Drugim rečima, maksimalno 18 hromozoma A seta žutogrlog miša, potencijalno može doprineti sekvenci B hromozoma. Uloge roditeljskih gena, čiji su paralogi locirani na sekvenci B hromozoma, su uglavnom vezane za ćelijski ciklus i mašineriju ćelijske deobe. Već je pokazano da su geni kojima je obogaćena sekvenca B hromozoma povezani sa ćelijskim ciklusom kod nekoliko vrsta sisara *Mazama gouazoubira* (Makunin i sar. 2016), *Vulpes vulpes* i *Nyctereutes procynoides* (Graphodatsky i sar. 2005, p. 2; Yudkin i sar. 2007; Becker i sar. 2011), a to je potvrđeno i kod skakavca *Eyprepocnemis plorans* (Navarro-Domínguez i sar. 2017). Sekvenciranjem je potvrđeno da se *C-kit* gen ne nalazi na B hromozomima vrste *A. flavicollis*, međutim jednako značajan *Vrk1* gen je pronađen na B hromozomima vrsta *A. peninsulae* i *A. flavicollis*. B hromozomi ovih vrsta imaju tri zajednička regiona (Tabela 10.). Granice ovih zajedničkih regiona nisu iste, na osnovu čega je moguće pretpostaviti da prisustvo *Vrk1* gena kod dve vrste nije povezano sa zajedničkim poreklom B hromozoma. Makunin i saradnici (2016) takođe objašnjavaju da prisustvo ovako specifičnih gena na B hromozomima različitih vrsta ukazuje na to da sadržaj sekvenci na B hromozomima definitivno nije slučajan i da je povezan sa mestima genomske nestabilnosti.

Rezultati dobijeni FISH-om svedoče o homologiji B i PR polnih hromozoma vrste *A. flavicollis*, međutim sekvenciranje B hromozoma pokazuje da ova homologija nije na račun protein-kodirajućih sekvenci. Naime, samo jedan od gena identifikovanih na B hromozomu vodi poreklo sa X hromozoma, i to *Kdm6a* gen koji je lociran u blizini pseudoautozmalnog regiona kod pretka placentarnih sisara (Raudsepp i Chowdhary 2016). Blizina *Kdm6a* gena PAR-u, govori u prilog nastanka B hromozoma od X hromozoma kod vrste *A. flavicollis*. Ovo je još jedan dokaz koji podržava pretpostavku o poreklu i eventualnoj funkcionalnoj vezi između B hromozoma i polnih hromozoma.

Izostanak rekombinacije između B hromozoma i glavnog genoma *A. flavicollis* (Vujošević i sar. 1990; Banaszek i Jadwiszczak 2006), i redukovan selekциони pritisak doveli su do nakupljanja mutacija i pseudogenizacije protein-kodirajućih gena.

Sekvence prisutne na B hromozomima su najčešće višestruko umnožene (Becker i sar. 2011; Yoshida i sar. 2011; Trifonov i sar. 2013), što je slučaj i kod hromozoma analiziranih u ovoj studiji. Kako B hromozomi nisu neophodni za normalno razviće svojih nosilaca, očekivano je da podležu nakupljanju mutacija i pseudogenizaciji. U zavisnosti od vrste, vreme potrebno da jedan aktivan dupliran gen postane pseudogenizovan, ili izgubljen, je između dva i sedam miliona godina (Lynch 2000). Pored izmenjenih i višestruko umnoženih gena, potvrđeno je mnoštvo repetitivnih sekvenci, transpozona, satelita kao i endogenih retroelemenata na B hromozomima žutoglog miša. Može se pretpostaviti da nakupljanje aktivnih mobilnih elemenata ima udela u postizanju relaksiranog selekcionog pritiska usled smanjenja stepena homologije i krosing-overa sa predačkim hromozomom. Redukovani krosing-over dodatno olakšava akumulaciju retroelemenata, kao što je to slučaj sa Y hromozomom (Charlesworth 2008).

Analizom sekvenci je moguće utvrditi kolika je sličnost u sekvencama različitih B hromozoma jedne vrste. Iako uzorak sekvenciranih B hromozoma (po jedan hromozom iz populacije) nije dovoljno veliki za preciznije poređenje između populacija, uočava se da su i pored malih razlika u sekvencama na svim proučavanim B hromozomima prisutni određeni regioni hromozoma A seta. Jednostavan eksperiment gde je PCR-om, na uzorku od 387 jedinki iz 20 populacija na teritoriji Srbije, u 96,5% pokazano prisustvo višestruko umnoženog *Vrk1* gena na B hromozomima (Bugarski-Stanojević i sar. 2016), govori u prilog ovde pokazanim rezultatima sekvenciranja. Poređenjem sekvenci tri jedinke iz udaljenih populacija, identifikovan je svega jedan region koji je prisutan na B hromozomu jedinke iz Rusije dok u sekvencama poreklom iz Srbije ovog regiona nema. Smatra se da su u toku evolucije B hromozoma mogući događaji i gubljenja i dobijanja genetičkog materijala (Houben i sar. 2014), mada neki autori tvrde da su degradacije nekih sekvenci i njihov gubitak češća pojava (Utsunomia i sar. 2016).

Raspoloživa količina i kvalitet podataka za različite varijante B hromozoma nisu bili dovoljni za ispitivanje relativne stope degradacije u odnosu na evoluciono očuvane regione i eventualne procene starosti.

Transkripciona aktivnost pseudogena i gena poreklom sa B hromozoma

Zbog svoje pretežno heterohromatične strukture (Jones i Rees 1982), generalno stanovište je bilo da su B hromozomi transkripciono neaktivni elementi. Termini kojima su ovi hromozomi opisivani (Camacho i sar. 2000; Burt i Trivers 2006), su do nedavno korišćeni i da bi se opisale nekodirajuće sekvence koje čine najveći deo standardnog genoma – „junk DNA“. Sa boljim upoznavanjem genoma uopšte, postalo je jasno da funkcionalna i fenotipska složenost nekog organizma nije uslovljena protein-kodirajućim genima već upravo nekodirajućim sekvencama. Ovaj fenomen se zove paradoks broja gena (Hahn i Wray 2002). Poslednjih godina, funkcionalne studije su fokusirane na sekvence DNK koje su smatrane nekodirajućim i nefunkcionalnim, a koje čine najveći procenat genoma eukariota (Ahnert i sar. 2008). Za nekodirajuće sekvence se sada zna da igraju ulogu u regulaciji gena i organizacionoj dinamici genoma (Balakirev i Ayala 2003; Sandelin i sar. 2004; Pink i sar. 2011; Pennisi 2012). Na ovaj način je centralna dogma molekularne biologije, „DNK-RNK-protein“ koja je podrazumevala da se nasledna informacija realizuje najvećim delom preko proteina, proširena i na RNK jer je potvrđeno da se značajan deo genetičke informacije realizuje upravo preko nje (Mattick 2011). Paralelno sa proširivanjem znanja o strukturi i funkciji osnovnog genoma, događaju se i promene u shvatanju značaja B hromozoma u genomu (Valente i sar. 2014).

Za analizu transkripcione aktivnosti sekvenci sa B hromozoma korišćene su jedinke iz različitih populacija. Najpre je potvrđeno prisutvo gena (čija je transkripciona aktivnost analizirana) u DNK sekvencama svih nosioca B hromozoma koje smo testirali, 34 jedinke iz osam prirodnih populacija na teritorije Republike Srbije, i 13 potomaka ciljanog ukrštanja životinja koje su izlovljavane u različitim prirodnim populacijama na teritoriji Republike Srbije (Slika 11). Ovaj rezultat na većem broju uzoraka upotpunjuje sliku dobijenu FISH-om i sekvenciranjem i rezultatima prethodnih istraživanja kod ove vrste, vezane za detekciju *Vrk1* gena (Bugarski-Stanojević i sar. 2016), i ukazuje da su dodatni hromozomi kod vrste *A. flavicollis* na neki način dosledni u očuvanju genskog sadržaja.

Zahvaljujući nakupljenim razlikama u sekvenci između gena na B hromozomima i odgovarajućih gena na A setu, moguće je pouzdano utvrditi da li postoji transkripcija sekvenci direktno sa B hromozoma (Trifonov i sar. 2013). Na ovaj način je kod 70% nosilaca B hromozoma uključenih u eksperiment, detektovano prisustvo transkripta sa izmenjene sekvence egzona jedan *Rraga* gena, identifikovane na B hromozomima (Slika 12a). Dok je transkript kod jedinki bez B hromozoma izostao (Slika 12b). Originalno, *Rraga* gen sa hromozoma A seta daje guanin nukleotid-vezujući protein koji igra ključnu ulogu u TNF-alfa (*engl. Tumor Necrosis Factor*) signalnom putu koji vodi do indukcije ćelijske smrti dok mutacije u ovom genu vode do kancerogeneze (Li i sar. 1997). Kada je reč o transkripciji pseudogena uopšte, poznato je da se oko 20% pseudogena poreklom sa osnovnog genoma transkribuje (Zheng i sar. 2007). Rezultati ENCODE (*engl. ENCyclopedia Of DNA Elements*) projekta pokazali su takođe da pseudogeni i dalje mogu da imaju funkciju, na primer, u regulaciji ekspresije gena sa kojih vode poreklo (Pennisi 2012). Sve je više istraživanja koja pokazuju da je prisustvo mnogih pseudogena u genomima, rezultat adaptivne evolucije genoma usled važnih regulatornih funkcija pseudogena na nivou transkriptoma. Transkripti pseudogena bi mogli da funkcionišu kao indirektni post-transkripcioni regulatori. Pseudogeni mogu da se transkribuju u nekodirajuću RNK (ncRNK) i preko njih regulišu ekspresiju gena sa kojih vode poreklo (Johnsson i sar. 2014). Takođe mogu da funkcionišu kao sunđer (upijači) za miRNK. Imajući u vidu sličnost sa sekvencama od kojih vode poreklo, transkripti jednih i drugih bi mogli da budu u kompeticiji za miRNK i da transkripti pseudogena na taj način vode do degradacije transkripta sa originalnog gena (Muro i sar. 2011). Pokazano je i da pseudogeni imaju potencijal da postanu geni sa novom funkcijom (Balakirev i Ayala 2003; Pink i sar. 2011). Takođe je utvrđeno da se neki transkripti sa pseudogena prevode u kratke peptide, ili skraćene proteine, sa funkcionalnim značajem (Johnsson i sar. 2014). Transkripciona aktivnost sekvenci sa B do sada je pronađena kod različitih vrsta (Banaei-Moghaddam i sar. 2015). Takođe postoje dokazi i o pseudogenizaciji i funkcionalnoj aktivnosti gena lociranih na B hromozomima (Ma i sar. 2017). Koliko ove regulatorne funkcije pseudogena u evolucionom kontekstu moraju biti značajne govore podaci o evolucionoj očuvanosti mnogih pseudogena, kao i tkivnoj specifičnosti njihove transkripcije (Pink i sar. 2011). Logično je pretpostaviti da će prisustvo pseudogena biti evoluciono očuvano

ako postoji značajan pozitivan efekat na dinamiku celog genoma i ispoljavanje nasledne informacije.

Danas je opšte prihvaćeno da se najveći deo genoma transkribuje u ncRNK. Procenjuje se da se 93% genoma čoveka tako transkribuje, a da mnogi od tih transkripata imaju različite regulatorne uloge (Carninci 2010; Mattick 2011). Regulacija ekspresije gena i organizacije genoma posredstvom malih RNK molekula objedinjena je imenom „RNK utišavanje“ (*engl. RNA silencing*). Mehanizmi ovog utišavanja zastupljeni su na svakom nivou organizacije i funkcionisanja genoma: organizaciji hromatina, segregaciji hromozoma u ćelijskim deobama, na nivou transkripcije, obrade, stabilnosti i translacije RNK. Upravo jedna od najintrigantnijih klasa ncRNK je duga nekodirajuća RNK (lncRNK), koja je konvencionalno opisana kao grupa sekvenci koje transkribuju ncRNK dužu od 200 bp (Wang i Chang 2011). Mnoge studije ukazuju na ulogu lncRNK u procesima kao što su metastaze kancera (Gupta i sar. 2010), utišavanje X hromozoma (McHugh i sar. 2015) i razviće (Standaert i sar. 2014). Prisustvo sisarskih homologa lncRNK kod riba, ukazuje na potencijalnu evolucionu očuvanost ovih elemenata kod različitih grupa (Basu i sar. 2013).

Nekodirajuća DNK na B hromozomima je transkripciono aktivan element kod ribe, *Astatotilapia latifasciata*, ali je takođe prisutna i u genomima i transkriptomima drugih ciklida. B hromozomi, ovako „obogaćeni“ nekodirajućim DNK sekvencama, dovode do promene transkripcionog nivoa ovih elemenata. Nekodirajuća DNK prisutna na B hromozomima transkribuje se u lncRNK, što verovatno ima značajan efekat na funkcionisanje ćelije i favorizovanje zadržavanja B hromozoma u ćelijskoj deobi (Ramos i sar. 2017). Postoji mogućnost da transkripti sa B hromozoma učestvuju u regulaciji ostatka genoma i preko dvolančanog stadijuma RNK (dsRNK). B-specifični transkripti mogu služiti kao „supstrat“ za proizvodnju dsRNK. Ove male dsRNK dalje mogu da budu procesuirane u male regulatorne RNK (siRNK). Komparativno profilisanje malih RNK, kod jedinki sa i bez B hromozoma, bi moglo da da odgovor na pitanje da li prisustvo ovih molekula može da se dovede u vezu sa B hromozoma.

U slučaju *Haus6* gena, razlike u sekvenci transkripta između jedinki sa B i bez B nisu pronađene, ali transkript ovog gena je prisutan kod 50% jedinki bez B, dok je među jedinkama sa B transkript detektovan u 85% uzoraka (Slika 13). *Haus6* gen kodira subjedinicu augmin proteinskog kompleksa, koji ima ulogu u povezivanju mikrotubula i

kinetohora i formiranju centralnog deobnog vretena. Ovaj protein ima ulogu u efikasnoj segregaciji i povlačenju hromozoma prema polovima (Lawo i sar. 2009). S obzirom na to da je funkcija ovog gena direktno vezana za raspodelu hromozoma u ćelijskoj deobi, moguće je da češća ekspresija kod nosilaca B hromozoma ima upravo veze sa mehanizmom održavanja B hromozoma.

Kada je reč o *Cenpe* genu, iako nije uočena razlika između sekvenci kod uzoraka sa B i bez B, i mada je transkript prisutan u svim analiziranim uzorcima (Slika 14), značajno se razlikuje nivo transkripcije ovog gena u zavisnosti od prisustva B hromozoma. *Cenpe* gen kodira protein koji čini jezgro kinetohore i funkcioniše pre svega kao posrednik u spajanju nepravilnih hromozoma a zatim i u kačenju mikrotubula deobnog vretena tokom mitoze (Mirzaa i sar. 2014). Povećan nivo transkripcije se zapaža kod uzoraka sa B hromozomima (Slika 15). Ova razlika je izraženija kada se uporede samo jedinke koje imaju jedan B sa jedinkama bez B hromozoma (Slika 16). Kada se uzorci razdvoje po polovima, jasno je da su ove razlike vezane za B hromozome kod ženskog pola, a da kod mužjaka razlika u transkripciji između jedinki bez B i nosioca B hromozoma nema statističku značajnost (Slika 17). Dalje, transkripcija testiranog gena u prisustvu B hromozoma je još izraženija ako se uporede ženke koje imaju jedan B sa ženkama koje nemaju B hromozome (Slika 18). Ovakva slika gde je nivo transkripcione aktivnosti gena najviši kod jedinki sa jednim B hromozomom, i ne raste proporcionalno broju B hromozoma može da ukazuje na nekakav mehanizam utišavanja B hromozoma kada se u genomu ove vrste nađu u broju većem od jedan. Slične situacije su zabeležene i kod nekih ciklida. Naime, transkripciona varijacija povezana sa B hromozomima i polno specifičnim fenotipom je prethodno pokazana za nekodirajuće DNK repetitivne elemente poreklom sa B hromozoma kod *A. latifasciata* (Ramos i sar. 2017). Nivo transkripcije ovih elemenata varira u zavisnosti od tkiva, i pod uticajem je prisustva B hromozoma i polno specifičnog fenotipa vrste *A. latifasciata* (Ramos i sar. 2017). Ovo nije prvi zabeleženi slučaj da je transkripcija sa B hromozoma na neki način isključena kod muškog pola ove vrste. U istraživanju koje su sprovedeli Carmello i saradnici (2017), poređenjem genske ekspresije u svim tkivima između jedinki sa B i bez B hromozomima iste vrste riba, prisustvo B hromozoma jedino nije uticalo na ekspresiju gena kod mužjaka. Iako je veza između B i polnih hromozoma opisana kod različitih vrsta ona se i dalje slabo

razume. Diferencijalna ekspresija sekvenci sa B, ili gena sa osnovnog seta hromozoma u prisustvu B hromozoma, kao i povećana ekspresija kod ženki sa B hromozomima, vodi do pretpostavke da su B hromozomi mogli da imaju mnoge funkcije tokom svoje evolucione istorije. Ovo takođe govori u prilog tome da B hromozomi nisu genomski paraziti i ukazuje na njihov još uvek nerazjašnjen biološki značaj.

Pored protein kodirajućih sekvenci, transkripciona aktivnost na B hromozomima nekih vrsta je pokazana i za derivate retrotranspozona i repetitivne elemente kod kukuruza i raži (Lamb i sar. 2007; Carchilan i sar. 2007), kao i neke familije satelitskih ponovaka kod raži (Wicker i sar. 2011). Dodatno je pokazano da su različite repetitivne DNK sekvence transkripciono modulirane upravo aktivnošću B hromozoma (Lamb i sar. 2007; Carchilan i sar. 2007, 2009; Banaei-Moghaddam i sar. 2012; Ramos i sar. 2017). Takođe, analiza diferencijalne ekspresije ukupne tkivne iRNK kod jedinki sa i bez B hromozoma kod vrste *A. latifasciata* pokazala je da prisustvo B hromozoma nije vezano samo za ekspresiju gena lociranih na B hromozomima, već i za modifikovanu ekspresiju gena sa A hromozoma (Ma i sar. 2017).

Iako se smatralo da su B hromozomi neaktivan deo genoma, sve je više dokaza koji pokazuju suprotno. Heterohromatin može da utiče na prostornu organizaciju u nukleusu i verovatno uspešan prolazak kroz određene stadijume mejoze (Rubtsov i sar. 2015). Aktivan heterohromatin je pronađen na B hromozomima raži (Carchilan i sar. 2007). Iako su pretežno heterohromatični, na B hromozomima mnogih vrsta je potvrđeno prisustvo i transkripciona aktivnost različitih genskih sekvenci, bilo da su kompletne ili u nekom stadijumu degradacije (Banaei-Moghaddam i sar. 2012; Makunin i sar. 2014; Ramos i sar. 2017). Svi dokazi ukazuju na to da prisustvo B hromozoma može da obezbedi veliki evolucionari potencijal za njihove nosioce. Kao dodatak tome, mnoge populacione studije primenjene na vrsti *A. flavicollis* potvrđuju da B hromozomi imaju fenotipski efekat na različitim nivoima (Blagojević i Vujošević 1995; Zima i sar. 2003; Jojić i sar. 2007, 2011; Adnađević i sar. 2014). Štaviše, B nosioci su se pokazali kao bolje adaptirani na lošije sredinske uslove (Vujošević i Blagojević 1995, 2000; Zima i sar. 2003; Blagojević i sar. 2009). Zapaženi fenotipski efekti, u odsustvu mehanizma akumulacije (Vujošević i Živković 1987; Martis i sar. 2012), verovatno omogućavaju održavanje B hromozoma kroz generacije. U pozadini ovih efekata može biti i potencijalno poreklo ovih B hromozoma sa polnih hromozoma.

Evolucioni put B hromozoma

Većina istraživača se slaže da inicijalno B hromozom (neo-B) može nastati na dva načina, hibridizacionim događajem između vrsta ili segmentalnom duplikacijom nekog hromozoma iz osnovnog seta. Sve više poznatih sekvenci B hromozoma različitih vrsta dozvoljava pretpostavku da u osnovnom genomu postoje regioni DNK koji su podložni za nastajanje B hromozoma, „B-prekursor DNK“ (Ahmad i Martins 2019). To je region čija je sekvenca izložena transpozicijama, čestim duplikacijama i velikim genomskim rearanžmanima. B-prekursor DNK bi morala da bude obogaćena transpozonima, drugim ponovcima, pseudogenim fragmentima kao i intaktnim genima, esencijalnim za opstanak B hromozoma (Ahmad i Martins 2019). Nastanak B hromozoma bi bio praćen nebalansiranom segregacijom neo-B hromozoma kao i inicijalnim utišavanjem ovog novog hromozoma, da bi kasnije, u toku evolucije, dolazilo do insercije sekvenci iz osnovnog genoma (Martis i sar. 2012).

Kada je reč o vrsti *A. flavicollis*, naši rezultati ukazuju da su polni hromozomi „donori“ segmenta od kog je nastao B hromozom. Heterohromatični region polnih hromozoma, ne samo da sadrži centromeru i da je obogaćen repetitivnim elementima, već u svojoj blizini ima i PAR, što ga teorijski čini vrlo pogodnim kandidatom za neo-B hromozom. Naime, PAR na polnim hromozomima je najizloženiji dvolančanim prekidima u genomu (Flaquer i sar. 2009; Raudsepp i sar. 2012), dok su aneuploidije, a samim tim i duplirani delovi X hromozoma podložni efikasnom mehanizmu utišavanju (Brown i sar. 1991).

Nakon nastanka neo-B hromozoma verovatno sledi postepena integracija dupliranih gena koja može da objasni postojanje fragmenata poreklom sa različitih hromozoma A seta, koji imaju manju ili veću očuvanost sekvence u poređenju sa roditeljskim genima. Geni locirani na B hromozomima bi mogli da nastanu prebacivanjem genomskih fragmenata sa A posredstvom transpozabilnih elemenata, kao što je opisano za gene ili regione DNK sa više gena kod kalsastih trava, Triticeae (Wicker i sar. 2010, 2011). Poređenjem paralogih gena lociranih na A i na B hromozomima uočeno je da između njih postoji razlika u stopi mutacija (Ma i sar. 2017). Visoka podudarnost u sekvencama na A i B hromozomima može da ukazuje na to da su ti genski fragmenati na B hromozoma na početku svoje evolucije. Alternativno,

sudeći po hipotezi balansa gena (Birchler i Veitia 2014), aktivnost takvih gena može da bude usmerena ka paralogim genima na A hromozoma. Kao rezultat toga može da usledi i brza inaktivacija gena nakon duplikacije i insercije na B hromozomu. Tom logikom, skorije nastali B hromozomi bi trebalo da imaju više intaktnih gena nego evoluciono stariji. Analizom sekvenci B hromozoma kod dve vrste jelena utvrđeno je da se ovi hromozomi nalaze u različitim stadijumima evolucije (Makunin i sar. 2016). Naime, visoka sličnost sekvence B hromozoma sa sekvencama hromozoma A seta kod vrste *Mazama gouazoubira*, ukazuje na to da su oni evoluciono mlađi, nasuprot B hromozoma kod vrste *Capreolus pygargus* čija je sekvenca značajno izmenjena u poređenju sa predačkim sekvencama sa A hromozoma, i koji se smatraju starijim. Za neke gene se smatra da je barem za početak evolucije B hromozoma neophodno da budu strukturno i funkcionalno očuvani (Ahmad i Martins 2019). Alternativa postepenoj integraciji delova sekvenci na B hromozom bi bio hromotripsis, jedan katastrofični rearanžmanski događaj (Stephens i sar. 2011).

Na B hromozomima vrste *A. flavicollis* su određeni geni značajno izmenjeni u odnosu na „roditeljske“ gene, što bi ukazivalo da su se njihove insercije dogodile ranije u poređenju sa ostalim genima. To govori u prilog postepenoj inserciji sekvenci na B hromozom pre nego hromotripsisu kao mehanizmu nakupljanja sekvenci poreklom sa hromozoma A seta. Međutim, nije bilo moguće odrediti njihovu starost poređenjem stepena mutacija između paralogih gena na B i na hromozomima A seta. Kod populacija koje su geografski bliže identifikovani su isti regioni na B hromozomima, dok B hromozom jedinke iz geografski udaljene populacije sadrži još jedan dodatni region.

Da li može bilo koji gen da bude dupliran na B hromozomu?

Duplirani geni su često povezani sa štetnim efektima i kao takvi bivaju otklonjeni putem prirodne selekcije. Kako su mnoge mutacije degenerativne, veća je verovatnoća da će duplirani geni podleći inaktivaciji i tako izgubiti primarnu funkciju nego što će mutirati u pravcu sticanja nove funkcije. Ipak, postoje dokazi o korisnim ulogama dupliranih gena, posebno u uslovima stresa (Tang i Amon 2013). Selektivno zadržavanje dupliranih gena može da usledi pod određenim okolnostima, na primer, kad geni u višku štite odgovarajuće roditeljske gene od neposrednih štetnih mutacija. Takođe, duplirani geni mogu da se konvertuju u nove gene putem korisnih mutacija

(Katju i Bergthorsson 2013). Redon i saradnici (2006) su definisali CNV (*engl. Copy Number Variation*) kao tip individualne varijabilnosti kada se segmenti DNK na A setu hromozoma, javljaju u različitom broju kopija. CNV zapravo predstavlja novootkriveni nivo strukturne varijabilnosti genoma. Neki CNV imaju uticaj na fenotip i povezani su sa nekim bolestima dok drugi nemaju nikakvu fenotipsku manifestaciju. Pronađeni su kod različitih vrsta sisara (Freeman i sar. 2006), i nalaze se izvan sekvenci koje kodiraju proteine i visoko evoluciono očuvane regulatorne elemente (Redon i sar. 2006).

U ovom kontekstu B hromozomi predstavljaju skladište dupliranih sekvenci genoma, višestruko umnoženih repetitivnih sekvenci, fragmenata gena, pseudogena, pa čak i neizmenjenih gena. Za razliku od sekvenci koje ulaze u CNV, na B hromozomima se najčešće nalaze geni vezani za ćelijsku deobu i ćelijski skelet (Makunin i sar. 2016; Vujošević i sar. 2018; Ahmad i Martins 2019). Pošto duplikacija nekog „B-donor“ fragmenta, koji poseduje dozno osetljive gene, može uzrokovati štetne fenotipske efekte, verovatno je da neo-B, barem u početku, ne sadrži takve gene ili ima efikasan mehanizam utišavanja. Dozno osetljivi geni bi teorijski mogli da budu bezbedno udomljeni na heterohromatičnim neo-B hromozomima koji imaju sposobnost utišavanja, gde bi vremenom mogli da podlegnu pseudogenizaciji, sticanju novih funkcija, ili da budu izgubljeni. Ovakvi geni locirani na B hromozomima mogu da ubrzaju evoluciju B hromozoma. Pretpostavlja se da B locirani (pseudo)geni mogu da obezbeđuju dodatni nivo kontrole i kompleksnosti u kooperaciji sa genima lociranim na A hromozomima od kojih vode poreklo (Ma i sar. 2017). Visok stepen pseudogenizacije je nađen kod rRNK gena lociranih na B hromozomima skakavca *E. plorans* (Montiel i sar. 2014).

Kod nekih vrsta su identifikovani i geni jedinstveni za B hromosome, odnosno pseudogeni koji su verovatno evoluciono očuvani usled obavljanja neke stečene važne uloge u genomu (Valente i sar. 2014). Pronađeni su i B specifični pericentromerni ponovci. Naime, poređenjem sekvenci između centromera A i B hromozoma kod raži zaključeno je da postoji razlika u sastavu pericentromernih ponovaka (Banaei-Moghaddam i sar. 2012). B centromere imaju neke iste ponovke kao i centromere A hromozoma, ali pored toga postoje i B specifični ponovci kao i derivati mitohondrijske DNK. Slična situacija je zabeležena i kod centromera B hromozoma kukuruza, gde su

takođe, nađene sekvence koje su karakteristične samo za B hromozome (Page i sar. 2001).

Kao posledica ovih pseudogenizacija, mnogih rearanžmana, rekombinacija i insercija sekvenci na B hromozomima, sve više biva redukovano sparivanje sa prethodno homologim, roditeljskim hromozomskim regionima. Samim tim i rekombinacija između roditeljskog A hromozoma i neo-B postaje smanjena. Trenutak kad rekombinacija između neo-B i predačkog hromozoma izostane smatra se početnom tačkom u nezavisnoj evoluciji B hromozoma. Gubitak rekombinacione sposobnosti sa hromozomom od kog vode poreklo, zajedno sa smanjenim selekcionim pritiskom na B hromozome, dozvoljava dalju inserciju, širenje i akumulaciju mobilnih elemenata i drugih DNK segmenata (Martis i sar. 2012; Houben i sar. 2013). Istovremeno, bilo mejotički drajv, bilo povećani fitnes nosilaca B hromozoma, postaju preduslov za održavanje B hromozoma u populacijama (Camacho i sar. 1997; Vujošević i Blagojević 2000; Vujošević i sar. 2007).

Potvrđeni su primeri gde su B hromozomi u populacijama divlje i kultivisane raži različitog geografskog porekla strukturno visoko evoluciono očuvani. Ovo zapažanje ukazuje na to da uprkos brznoj inicijalnoj evoluciji kod B hromozoma, jednom kada dostignu određenu strukturu, akumulacija repetitivnih sekvenci postaje značajno otežana, čime je stopa daljih strukturnih promena smanjena. Pretpostavlja se da B hromozomi kod nekih vrsta mogu da imaju barem u nekom stadijumu sličnu strategiju evolucije kao i Y hromozomi (Charlesworth 2008), kod kojih je akumulacija ponovaka i retrotranspozona olakšana redukovanim krosing-overom, što posledično olakšava dalju akumulaciju mobilnih elemenata. Međutim, kod vinske mušice je pokazana obrnuta situacija, naime Y hromozom je nastao od B hromozoma koji je „udomljavao“ gene (Bernardo i sar. 2009). To pokazuje da postoji i mogućnost konzervacije odnosno značajnog usporavanja mutacija na B hromozomima kada dostignu neku formu koja je u datim okolnostima najpovoljnija za nosioca, kao i da B hromozom može postati deo osnovnog hromozomskog seta.

Pokazano je da B hromozomi vrste *A. flavicollis* mogu da formiraju bivalente između sebe u mejotičkim deobama (Vujošević i sar. 1990; Banaszek i Jadwiszczak 2006), dok njihova mejotička rekombinacija sa ostatkom genoma nije zabeležena (Vujošević i sar. 1990), te možemo da kažemo da oni vode nezavisnu evoluciju u

odnosu na predački hromozom. Istovremeno, imajući u vidu rezultate sekvenciranja, PCR analiza, kao i formiranje bivalenata u mejozi između B hromozoma, možemo reći da su ovi hromozomi kod vrste *A. flavicollis* postigli i uspešno održavaju određenu strukturu. Mogući krosing-over između B hromozoma, pokazuje da pored zajedničkog porekla i genetičkog sadržaja, B hromozomi ove vrste dele i zajednički evolucioni obrazac. Izostanak mejotičkog drajva, potvrđene transkripcione aktivnosti i zabeleženi pozitivni fenotipski efekti na nosioce, još jednom ukazuju da je model održavanja ovih hromozoma najverovatnije heterotični.

Tokom evolucije postojali su trendovi povećanja veličine genoma preko broja gena koji kodiraju proteine, broja mobilnih genetičkih elemenata, broja i veličine introna i veličine intergenske DNK. B hromozomi nisu ništa drugo do značajno povećanje genoma, koje obezbeđuje veliki asortiman malih RNK preko kojih je moguć uticaj na osnovni genom. Konačan rezultat te interakcije u zavisnosti od trenutnih sredinskih uslova, može varirati, te u zavisnosti od toga, ovi elementi bivaju selekciono neutralni, favorizovani ili eliminisani iz populacija.

Zaključci

1. DAPI- bojenjem B hromozomi vrste *A. flavicollis* se ističu kao heterohromatični.
2. Hibridizacija B-specifičnih proba na metafaze različitih jedinki ove vrste, nedvosmisleno ukazuje da sekvencu B hromozoma karakterše:
 - d) homologija sa pericentromernim regionom (PR) polnih hromozoma,
 - e) homologija sa subtelomernim regionima dva para malih autozoma i
 - f) slabija homologija sa distalnim regionom Y hromozoma.
3. Homologija između sekvenci različitih B hromozoma, kao i B hromozoma i regiona A hromozoma je identična bez obzira na geografsku udaljenost populacija iz kojih uzorci vode poreklo.
4. Bez obzira na generalnu zastupljenost na B hromozomima različitih vrsta, *C-kit* gen i gen za 18S rRNK nisu pronađeni na B hromozomima vrste *A. flavicollis*.
5. Poređenjem sekvenci B hromozoma i referentnog genoma vrste *Mus musculus*, identifikovano je 39 gena sa 22 hromozomska regiona poreklom sa 16 hromozoma referentnog genoma.
6. Sa izuzetkom B hromozoma poreklom iz Rusije, koji sadrži jedan dodatni hromozomski region koji nije pronađen kod ostalih, svi B hromozomi su izgrađeni od istih hromozomskih regiona.
7. Sekvenca B hromozoma je u najvećoj meri obogaćena genima koji kodiraju proteine mikrotubula i ćelijskog ciklusa. Prisutni su i geni koji mapiraju nukleotid-vezujuće, metal-vezujuće proteine kao i proteine membrane, kao i velikim brojem repetitivnih sekvenci. Geni smešteni na B hromozomima se nalaze u različitim stadijumima degradacije.
8. Pseudogeni poreklom sa B hromozoma se transkribuju.
9. Neizmenjeni geni sa B hromozoma, ili sa osnovnog genoma u prisustvu B hromozoma, pokazuju viši nivo ekspresije kod ženki u mlađoj životnoj dobi. Nivo ekspresije je povezan i sa brojem B hromozoma na način da je najviši nivo ekspresije kod nosilaca jednog B hromozoma, dok sa porastom broja B hromozoma nivo ekspresije opada.
10. B hromozomi vrste *A. flavicollis*, najverovatnije vode poreklo od PR heterohromatina X hromozoma koji se nalazi neposredno uz PAR. Evolucijom, ovaj dodatni hromozom, je obogaćen sekvencama sa gotovo svih hromozoma osnovnog seta.

Literatura

- Adnađević T, Jovanović VM, Blagojević J, i sar. (2014) Possible influence of B chromosomes on genes included in immune response and parasite burden in *Apodemus flavicollis*. PLoS ONE 9:e112260. doi: 10.1371/journal.pone.0112260
- Ahmad S, Martins C (2019) The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. Cells 8:156. doi: 10.3390/cells8020156
- Ahnert SE, Fink TMA, Zinovyev A (2008) How much non-coding DNA do eukaryotes require? J Theor Biol 252:587–592. doi: 10.1016/j.jtbi.2008.02.005
- Akbari OS, Antoshechkin I, Hay BA, Ferree PM (2013) Transcriptome profiling of *Nasonia vitripennis* testis reveals novel transcripts expressed from the selfish B chromosome, paternal sex ratio. G3 Bethesda Md 3:1597–1605. doi: 10.1534/g3.113.007583
- Armanet N, Tosca L, Brisset S, i sar. (2015) Small supernumerary marker chromosomes in human infertility. Cytogenet Genome Res 146:100–108. doi: 10.1159/000438718
- Ashman LK (1999) The biology of stem cell factor and its receptor *C-kit*. Int J Biochem Cell Biol 31:1037–1051
- Balakirev ES, Ayala FJ (2003) Pseudogenes: Are they “junk” or functional DNA? Annu Rev Genet 37:123–151. doi: 10.1146/annurev.genet.37.040103.103949
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, i sar. (2015) Genes on B chromosomes: Old questions revisited with new tools. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech 1849:64–70. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.11.007
- Banaei-Moghaddam AM, Schubert V, Kumke K, i sar. (2012) Nondisjunction in favor of a chromosome: The mechanism of rye B chromosome drive during pollen mitosis. Plant Cell 24:4124–4134. doi: 10.1105/tpc.112.105270
- Banaszek A, Jadwiszczak KA (2006) Bchromosomes behaviour during meiosis of yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. Folia Zool 55:113–122
- Basheva EA, Torgasheva AA, Sakaeva GR, i sar. (2010) A- and B-chromosome pairing and recombination in male meiosis of the silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). Chromosome Res 18:689–696. doi: 10.1007/s10577-010-9149-4
- Basu S, Müller F, Sanges R (2013) Examples of sequence conservation analyses capture a subset of mouse long non-coding RNAs sharing homology with fish conserved genomic elements. BMC Bioinformatics 14:S14. doi: 10.1186/1471-2105-14-S7-S14

- Baudat F, Imai Y, de Massy B (2013) Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* 14:794–806. doi: 10.1038/nrg3573
- Bauerly E, Hughes SE, Vietti DR, i sar. (2014) Discovery of supernumerary B chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 196:1007–1016. doi: 10.1534/genetics.113.160556
- Becker SED, Thomas R, Trifonov VA, i sar. (2011) Anchoring the dog to its relatives reveals new evolutionary breakpoints across 11 species of the Canidae and provides new clues for the role of B chromosomes. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* 19:685–708. doi: 10.1007/s10577-011-9233-4
- Belcheva RG, Topashka-Ancheva MN, Atanassov N (1988) Karyological studies of five species of mammals from Bulgarian fauna. *Comptes Rendus Académie Bulg Sci* 42:125–128
- Bernardo CA, Koerich LB, Clark AG (2009) Origin and evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. *Trends Genet TIG* 25:270–277. doi: 10.1016/j.tig.2009.04.002
- Beukeboom LW (1994) Phenotypic fitness effects of the selfish B-chromosome, paternal sex ration (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Evol Ecol* 8:1–24
- Bidau CJ (1986) A nucleolar-organizing B chromosome showing segregation–distortion in the grasshopper *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). *Can J Genet Cytol* 28:138–148. doi: 10.1139/g86-018
- Bidau CJ, Rosato M, Martí DA (2004) FISH detection of ribosomal cistrons and assortment-distortion for X and B chromosomes in *Dichroplus pratensis* (Acrididae). *Cytogenet Genome Res* 106:295–301. doi: 10.1159/000079302
- Birchler JA, Veitia RA (2014) The Gene Balance Hypothesis: dosage effects in plants. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1112:25–32. doi: 10.1007/978-1-62703-773-0_2
- Blagojević J, Jojić V, Bugarski-Stanojević V, i sar. (2006) Do B chromosomes affect fecundity in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia)? *Arch Biol Sci* 58:221–223
- Blagojević J, Stamenković G, Jojić Šipetić V, i sar. (2009) B chromosomes in populations of yellow-necked mice – stowaways or contributing genetic elements? *Ital J Zool* 76:250–257. doi: 10.1080/11250000802647044
- Blagojević J, Vujošević M (1991) Supernumerary chromosomes of *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). The highest number of B-chromosomes. *Arh Biol Nauka Beogr* 43:31–32
- Blagojević J, Vujošević M (2004) B chromosomes and developmental homeostasis in the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia): Effects on nonmetric traits. *Heredity* 93:249–254. doi: 10.1038/sj.hdy.6800460

- Blagojević J, Vujošević M (1995) The role of B chromosomes in the population dynamics of yellow-necked wood mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome* 38:472–478
- Boeskorov GG, Kartavseva IV, Zagorodnyuk IV, i sar. (1995) Nukleolus organizer region and B-chromosomes of wood mice (Mammalia, Rodentia, Apodemus). *Genetika* 31:18–192
- Borisov IM, Afanas'ev AG, Lebedev TT, Bochkarev MN (2010) Multiplicity of B microchromosomes in a Siberian population of mice *Apodemus peninsulae* (2n = 48 + 4-30 B chromosomes). *Genetika* 46:798–804
- Bougourd SM, Jones RN (1997) B chromosomes: a physiological enigma. *New Phytol* 137:43–54. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00823.x
- Brockhouse C, Bass JAB, Feraday RM, Straus NA (1989) Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32:516–521. doi: 10.1139/g89-477
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, i sar. (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349:38–44. doi: 10.1038/349038a0
- Bugarški-Stanojević V, Stamenković G, Blagojević J, i sar. (2016) Exploring supernumeraries - A new marker for screening of B-chromosomes presence in the yellow necked mouse *Apodemus flavicollis*. *PLOS ONE* 11:e0160946. doi: 10.1371/journal.pone.0160946
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Rubtsov DN, i sar. (2004) Comparative FISH analysis of distribution of B chromosome repetitive DNA in A and B chromosomes in two subspecies of *Podisma sapporensis* (Orthoptera, Acrididae). *Cytogenet Genome Res* 106:284–288. doi: 10.1159/000079300
- Burt A, Trivers R (2006) *Genes in conflict: The biology of selfish genetic elements*. Harvard University press, Cambridge, MA and London, England
- Cabrero J, Bakkali M, Bugrov A, i sar. (2003) Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 112:207–211. doi: 10.1007/s00412-003-0264-2
- Camacho JPM (2005) B chromosomes. In: *The evolution of the genome*. Elsevier, pp 223–286
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 355:163–178. doi: 10.1098/rstb.2000.0556
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD, i sar. (1997) Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am Nat* 149:1030–1050

- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, i sar. (2007) Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *Plant Cell* 19:1738–1749. doi: 10.1105/tpc.106.046946
- Carchilan M, Kumke K, Mikolajewski S, Houben A (2009) Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma* 118:607–616. doi: 10.1007/s00412-009-0222-8
- Carmello BO, Coan RLB, Cardoso AL, i sar. (2017) The hnRNP Q-like gene is retroinserted into the B chromosomes of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Chromosome Res* 25:277–290. doi: 10.1007/s10577-017-9561-0
- Carninci P (2010) RNA dust: Where are the genes? *DNA Res* 17:51–59. doi: 10.1093/dnares/dsq006
- Charlesworth D (2008) Plant sex chromosomes. *Genome Dyn* 4:83–94. doi: 10.1159/000126008
- Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ (2005) Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:69–92. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162350
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, i sar. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6:80–92. doi: 10.4161/fly.19695
- Clark FE, Conte MA, Ferreira-Bravo IA, i sar. (2017) Dynamic sequence evolution of a sex-associated B chromosome in Lake Malawi cichlid fish. *J Hered* 108:53–62. doi: 10.1093/jhered/esw059
- Clark FE, Conte MA, Kocher TD (2018) Genomic characterization of a B chromosome in Lake Malawi cichlid fishes. *Genes* 9: doi: 10.3390/genes9120610
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, i sar. (2009) The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genet* 5:e1000618. doi: 10.1371/journal.pgen.1000618
- D'Ambrosio U, Alonso-Lifante MP, Barros K, i sar. (2017) B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytol* 216:635–642. doi: 10.1111/nph.14723
- Dhar MK, Kour J, Kaul S (2019) Origin, behaviour, and transmission of B chromosome with special reference to *Plantago lagopus*. *Genes* 10:152. doi: 10.3390/genes10020152
- Donald TM, Leach CR, Clough A, Timmis JN (1995) Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. *Heredity* 74 (Pt 5):556–561

- Flaquer A, Fischer C, Wienker TF (2009) A new sex-specific genetic map of the human pseudoautosomal regions (PAR1 and PAR2). *Hum Hered* 68:192–200. doi: 10.1159/000224639
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, i sar. (2006) Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 16:949–961. doi: 10.1101/gr.3677206
- Gibbons JG, Branco AT, Yu S, Lemos B (2014) Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat Commun* 5: doi: 10.1038/ncomms5850
- Goodwin SB, M’barek SB, Dhillon B, i sar. (2011) Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet* 7:e1002070. doi: 10.1371/journal.pgen.1002070
- Gornung E, Cristaldi M, Castiglia R (2009) Comparative cytogenetic analysis of the “Sylvaemus” group of *Apodemus* (Rodentia, Muridae): *A. sylvaticus* from Sicily and *A. flavicollis* from the central Apennines. *Acta Theriol (Warsz)* 54:267–275. doi: 10.4098/j.at.0001-7051.081.2008
- Graphodatsky AS (2007) Comparative chromosomics. *Mol Biol* 41:361–375. doi: 10.1134/S002689330703003X
- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, i sar. (2005) The proto-oncogene *C-KIT* maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Res* 13:113–122. doi: 10.1007/s10577-005-7474-9
- Graphodatsky AS, Radjabli SI (1988) Chromosomes of agricultural and laboratory mammals. Nauka
- Grewal SIS, Jia S (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8:35–46. doi: 10.1038/nrg2008
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, i sar. (2010) Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464:1071–1076. doi: 10.1038/nature08975
- Hahn MW, Wray GA (2002) The g-value paradox. *Evol Dev* 4:73–75
- Hamid Al-Rikabi AB, Pekova S, Fan X, i sar. (2018) Small supernumerary marker chromosome may provide information on dosage-insensitive pericentric regions in human. *Curr Genomics* 19:192–199. doi: 10.2174/1389202918666170717163830
- Han Y, Liu X, Benny U, i sar. (2001) Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant J Cell Mol Biol* 25:305–314

- Harimoto Y, Hatta R, Kodama M, i sar. (2007) Expression profiles of genes encoded by the supernumerary chromosome controlling AM-toxin biosynthesis and pathogenicity in the apple pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1463–1476. doi: 10.1094/MPMI-20-12-1463
- Hashemzadeh-Chaleshtori M, Teimori H, Ghasemi-Dehkordi P, i sar. (2015) Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes. *Adv Biomed Res* 4:140. doi: 10.4103/2277-9175.161542
- Hayata I (1973) Chromosomal polymorphism caused by supernumerary chromosomes in the field mouse, *Apodemus giliacus*. *Chromosoma* 42:403–414. doi: 10.1007/BF00399408
- Hewitt GM (1974) The integration of supernumerary chromosomes into the orthopteran genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 38:183–194
- Holmes DS, Bougourd SM (1989) B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. I. Natural populations. *Heredity* 63:83–87. doi: 10.1038/hdy.1989.78
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2013) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell Mol Life Sci* 71:467–478. doi: 10.1007/s00018-013-1437-7 ista referenca sa dve različite godine, ispod
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell Mol Life Sci* 71:467–478. doi: 10.1007/s00018-013-1437-7
- Hsu TC, Patton JL (1969) Bone marrow preparations for chromosome studies. In: Benirschke K (ed) *Comparative mammalian cytogenetics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 454–460
- Huang W, Du Y, Zhao X, Jin W (2016) B chromosome contains active genes and impacts the transcription of A chromosomes in maize (*Zea mays L.*). *BMC Plant Biol* 16: doi: 10.1186/s12870-016-0775-7
- Jetybayev I, Bugrov A, Dzuybenko V, Rubtsov N (2018) B Chromosomes in grasshoppers: Different origins and pathways to the modern Bs. *Genes* 9:509. doi: 10.3390/genes9100509
- Jin W, Lamb JC, Vega JM, i sar. (2005) Molecular and functional dissection of the maize B chromosome centromere. *Plant Cell* 17:1412–1423. doi: 10.1105/tpc.104.030643
- Johnsson P, Morris KV, Grandér D (2014) Pseudogenes: A novel source of trans-acting antisense RNAs. In: Poliseno L (ed) *Pseudogenes*. Springer New York, New York, NY, pp 213–226
- Jojić V, Blagojević J, Ivanović A, i sar. (2007) Morphological integration of the mandible in yellow-necked field mice: the effects of B chromosomes. *J Mammal* 88:689–695

- Jojić V, Blagojević J, Vujošević M (2011) B chromosomes and cranial variability in yellow-necked field mice (*Apodemus flavicollis*). *J Mammal* 92:396–406. doi: 10.1644/10-MAMM-A-158.1
- Jones N, Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci* 8:417–423. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00187-0
- Jones RN (1991) B-chromosome drive. *Am Nat* 137:
- Jones RN (1995) B chromosomes in plants. *New Phytol* 131:411–434. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03079.x
- Jones RN, Rees H (1982) B chromosomes. Acad Press
- Karamysheva TV, Andreenkova OV, Bochkaerev MN, i sar. (2002) B chromosomes of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. *Cytogenet Genome Res* 96:154–160. doi: 10.1159/000063027
- Kartavtseva IV (1994) A description of the B chromosomes in the karyotype of the field mouse *Apodemus agrarius*. *Tsitol Genet* 28:96
- Kartavtseva IV (2002) Karyosystematics of wood and field mice (Rodentia, Muridae). Dalnauka, Vladivostok
- Kartavtseva IV, Roslik GV (2004) A complex B chromosome system in the Korean field mouse, *Apodemus peninsulae*. *Cytogenet Genome Res* 106:271–278. doi: 10.1159/000079298
- Kartavtseva IV, Roslik GV, Pavlenko MV, i sar. (2000) The B-chromosome system of the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* in the Russian Far East. *Chromosome Sci* 4:21–29
- Katju V, Bergthorsson U (2013) Copy-number changes in evolution: rates, fitness effects and adaptive significance. *Front Genet* 4: doi: 10.3389/fgene.2013.00273
- Kichigin IG, Lisachov AP, Giovannotti M, i sar. (2019) First report on B chromosome content in a reptilian species: the case of *Anolis carolinensis*. *Mol Genet Genomics MGG* 294:13–21. doi: 10.1007/s00438-018-1483-9
- Kimura M, Kayano H (1961) The maintenance of super-numerary chromosomes in wild populations of *Lilium callosum* by preferential segregation. *Genetics* 46:1699–1712
- Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, i sar. (2013) High-copy sequences reveal distinct evolution of the rye B chromosome. *New Phytol* 199:550–558. doi: 10.1111/nph.12289

- Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinforma Oxf Engl* 23:1289–1291. doi: 10.1093/bioinformatics/btm091
- Lamb JC, Riddle NC, Cheng Y-M, i sar. (2007) Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* 15:383–398. doi: 10.1007/s10577-007-1135-0
- Lawo S, Bashkurov M, Mullin M, i sar. (2009) HAUS, the 8-Subunit human augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr Biol* 19:816–826. doi: 10.1016/j.cub.2009.04.033
- Leach CR (2005) Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics* 171:269–278. doi: 10.1534/genetics.105.043273
- Liehr T, Mrasek K, Kosyakova N, i sar. (2008) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans; are there B chromosomes hidden among them. *Mol Cytogenet* 1:12. doi: 10.1186/1755-8166-1-12
- Liehr T, Weise A (2007) Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med* 19:719–731
- Li Y, Kang J, Horwitz MS (1997) Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *J Virol* 71:1576–1582
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T, i sar. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* 2:87–92. doi: 10.1007/BF01553487
- Lord RDJ (1959) The lens as an indicator of age in cotton-tail rabbits. *J Wildl Manag* 23:358–360
- Lynch M (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290:1151–1155. doi: 10.1126/science.290.5494.1151
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). *Nature* 190:372–373
- Makunin AI, Dementyeva PV, Graphodatsky AS, i sar. (2014) Genes on B chromosomes of vertebrates. *Mol Cytogenet* 7:99. doi: 10.1186/s13039-014-0099-y
- Makunin AI, Kichigin IG, Larkin DM, i sar. (2016) Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. *BMC Genomics* 17:618. doi: 10.1186/s12864-016-2933-6

- Makunin AI, Rajičić M, Karamysheva TV, i sar. (2018) Low-pass single-chromosome sequencing of human small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) and *Apodemus* B chromosomes. *Chromosoma*. doi: 10.1007/s00412-018-0662-0
- Malkov S, Jovanović A, Vujošević M (1997) A method for automatic comparison of G-banded chromosomes. 1st Eur Cytogenet Conf Athens Greece Cytogenet Cell Genet 77:61
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, i sar. (2012) Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci* 109:13343–13346. doi: 10.1073/pnas.1204237109
- Masonbrink RE, Birchler JA (2012) Accumulation of multiple copies of maize minichromosomes. *Cytogenet Genome Res* 137:50–59. doi: 10.1159/000339615
- Matsubara K, Nishida-Umehara C, Tsuchiya K, i sar. (2004) Karyotypic evolution of *Apodemus* (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. *Chromosome Res* 12:383–395. doi: 10.1023/B:CHRO.0000034103.05528.83
- Matsubara K, Yamada K, Umemoto S, i sar. (2008) Molecular cloning and characterization of the repetitive DNA sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). *Chromosome Res* 16:1013–1026. doi: 10.1007/s10577-008-1259-x
- Mattick JS (2011) The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS Lett* 585:1600–1616. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.001
- Ma W, Gabriel TS, Martis MM, i sar. (2017) Rye B chromosomes encode a functional Argonaute-like protein with *in vitro* slicer activities similar to its A chromosome paralog. *New Phytol* 213:916–928. doi: 10.1111/nph.14110
- Ma Y, Jack Longley B, Wang X, i sar. (1999) Clustering of activating mutations in *C-KIT*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 112:165–170. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00488.x
- McAllister BF, Werren JH (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106:243–253
- McHugh CA, Chen C-K, Chow A, i sar. (2015) The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* 521:232–236. doi: 10.1038/nature14443
- McKenna A, Hanna M, Banks E, i sar. (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110

- Meratan AA, Ghaffari SM, Niknam V, Salami M (2013) Antioxidative responses in calli of two populations of *Acanthophyllum laxiusculum* with and without B-chromosomes under salt stress. *Pak J Biol Sci PJBS* 16:1–11
- Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, i sar. (2011) Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* 334:521–524. doi: 10.1126/science.1211028
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome. *Science* 254:1773–1776
- Mirzaa GM, Vitre B, Carpenter G, i sar. (2014) Mutations in CENPE define a novel kinetochore-centromeric mechanism for microcephalic primordial dwarfism. *Hum Genet* 133:1023–1039. doi: 10.1007/s00439-014-1443-3
- Montiel EE, Cabrero J, Ruiz-Estévez M, i sar. (2014) Preferential occupancy of R2 retroelements on the B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PloS One* 9:e91820. doi: 10.1371/journal.pone.0091820
- Muro EM, Mah N, Andrade-Navarro MA (2011) Functional evidence of post-transcriptional regulation by pseudogenes. *Biochimie* 93:1916–1921. doi: 10.1016/j.biochi.2011.07.024
- Navarro-Domínguez B, Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, i sar. (2017) Protein-coding genes in B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Sci Rep* 7:45200. doi: 10.1038/srep45200
- Novák P, Neumann P, Macas J (2010) Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 11:378. doi: 10.1186/1471-2105-11-378
- Novák P, Neumann P, Pech J, i sar. (2013) RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792–793. doi: 10.1093/bioinformatics/btt054
- Obara Y, Sasaki S, Igarashi Y (1997) Delayed response of QM- and DA/DAPI-fluorescence in C-heterochromatin of the small Japanese field mouse, *Apodemus argenteus*. *Zoolog Sci* 14:57–64. doi: 10.2108/zsj.14.57
- Östergren G (1947) Heterochromatic B-chromosomes in *Anthoxanthum*. *Hereditas* 33:261–296. doi: 10.1111/j.1601-5223.1947.tb02804.x
- Page BT, Wanous MK, Birchler JA (2001) Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. *Genetics* 159:291–302
- Palestis BG, Burt A, Jones RN, Trivers R (2004) B chromosomes are more frequent in mammals with acrocentric karyotypes: support for the theory of centromeric drive. *Proc R Soc B Biol Sci* 271:S22–S24. doi: 10.1098/rsbl.2003.0084

- Parks MM, Kurylo CM, Dass RA, i sar. (2018) Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Sci Adv* 4:eaa0665. doi: 10.1126/sciadv.aao0665
- Patton JL (1977) B-chromosome systems in the pocket mouse, *Perognathus baileyi*: meiosis and C-band studies. *Chromosoma* 60:1–14
- Pennisi E (2012) ENCODE Project writes eulogy for junk DNA. *Science* 337:1159–1161. doi: 10.1126/science.337.6099.1159
- Peppers JA, Wiggins LE, Baker RJ (1997) Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Chromosome Res* 5:475–479. doi: 10.1023/A:1018421114607
- Pink RC, Wicks K, Caley DP, i sar. (2011) Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA* 17:792–798. doi: 10.1261/rna.2658311
- Plowman AB, Bougourd SM (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* 72:587–593
- Ramos É, Cardoso AL, Brown J, i sar. (2017) The repetitive DNA element BncDNA, enriched in the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*, transcribes a potentially noncoding RNA. *Chromosoma* 126:313–323. doi: 10.1007/s00412-016-0601-x
- Randolph LF (1928) Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat Rec* 41:102
- Raudsepp T, Chowdhary BP (2016) The eutherian pseudoautosomal region. *Cytogenet Genome Res* 147:81–94. doi: 10.1159/000443157
- Raudsepp T, Das PJ, Avila F, Chowdhary BP (2012) The pseudoautosomal region and sex chromosome aneuploidies in domestic species. *Sex Dev* 6:72–83. doi: 10.1159/000330627
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, i sar. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444–454. doi: 10.1038/nature05329
- Romanenko SA, Biltueva LS, Serdyukova NA, i sar. (2015) Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Mol Cytogenet* 8: doi: 10.1186/s13039-015-0194-8
- Roslik GV, Kartavtseva IV (2010) Polymorphism and mosaicism of B chromosome number in Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia) in the Russian Far East. *Cell Tissue Biol* 4:77–89. doi: 10.1134/S1990519X10010086
- Rovatsos MT, Mitsainas GP, Tryfonopoulos GA, i sar. (2008) A chromosomal study on Greek populations of the genus *Apodemus* (Rodentia, Murinae) reveals new data on B chromosome distribution. *Acta Theriol (Warsz)* 53:157–167. doi: 10.1007/BF03194248

- Ruban A, Schmutzer T, Scholz U, Houben A (2017) How next-generation sequencing has aided our understanding of the sequence composition and origin of B chromosomes. *Genes* 8: doi: 10.3390/genes8110294
- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Andreenkova OV, i sar. (2004) Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae*; (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogenet Genome Res* 106:289–294. doi: 10.1159/000079301
- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Bogdanov AS, i sar. (2011) Comparative FISH analysis of C-positive regions of chromosomes of wood mice (Rodentia, Muridae, *Sylvaemus*). *Russ J Genet* 47:1096–1110. doi: 10.1134/S1022795411090158
- Rubtsov NB, Karamysheva TV, Bogdanov AS, i sar. (2015) Comparative analysis of DNA homology in pericentric regions of chromosomes of wood mice from genera *Apodemus* and *Sylvaemus*. *Russ J Genet* 51:1233–1242. doi: 10.1134/S1022795415120091
- Rubtsov N, Borisov Y (2018) Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes. *Genes* 9:490. doi: 10.3390/genes9100490
- Rubtsov NB, Borissov YM, Karamysheva TV, Bochkarev MN (2009) The mechanisms of formation and evolution of B chromosomes in Korean field mice *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia). *Russ J Genet* 45:389–396. doi: 10.1134/S1022795409040024
- Ruiz-Estévez M, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM (2012) B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *PLOS ONE* 7:e36600. doi: 10.1371/journal.pone.0036600
- Sabrina B, Lopes CE, de Almeida-Toledo LF (2009) Cytogenetic characterization of *Metynnis maculatus* (Teleostei; Characiformes): the description in Serrasalminae of a small B chromosome bearing inactive NOR-like sequences. *Caryologia* 62:95–101. doi: 10.1080/00087114.2004.10589674
- Safronova LD, Cherepanova EV (2007) Behavior of sex chromosomes at early meiosis stages in three wood mice species of the genus *Apodemus* (Rodentia, Muridae). *Russ J Genet* 43:658–664. doi: 10.1134/S1022795407060099
- Sandelin A, Bailey P, Bruce S, i sar. (2004) Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. *BMC Genomics* 5:99. doi: 10.1186/1471-2164-5-99
- Sandery MJ, Forster JW, Blunden R, Jones RN (1990) Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome* 33:908–913. doi: 10.1139/g90-137
- Sapre AB, Deshpande DS (1987) Origin of B chromosomes in *Coix L.* through spontaneous interspecific hybridization. *J Hered* 78:191–196. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110355

- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, i sar. (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 373:68–71. doi: 10.1038/373068a0
- Serizawa K, Suzuki H, Tsuchiya K (2000) A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochem Genet* 38:27–40
- Serrano ÉA, Araya-Jaime C, Suárez-Villota EY, i sar. (2016) Meiotic behavior and H3K4m distribution in B chromosomes of *Characidium gomesi* (Characiformes, Crenuchidae). *Comp Cytogenet* 10:255–268. doi: 10.3897/CompCytogen.v10i2.7939
- Sharbel TF, Green DM, Houben A (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41:14–22
- Siegel JJ, Amon A (2012) New insights into the troubles of aneuploidy. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:189–214. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155807
- Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, i sar. (2005) *KIT* and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and *KIT* amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 23:49–57. doi: 10.1200/JCO.2005.02.093
- Silva DMZ de A, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, i sar. (2014) Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS ONE* 9:e94896. doi: 10.1371/journal.pone.0094896
- Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (2004) B chromosomes in Brazilian rodents. *Cytogenet Genome Res* 106:257–263. doi: 10.1159/000079296
- Soares AA, Castro JP, Balieiro P, i sar. (2018) B chromosome diversity and repetitive sequence distribution in an isolated population of *Akdodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae). *Cytogenet Genome Res.* doi: 10.1159/000487471
- Soldatović B, Savić I, Dulić B, i sar. (1972) Study of the karyotype of the genus *Apodemus* Kaup, 1829 (Mammalia, Rodentia). *Arch Biol Sci* 24:125–130
- Standaert L, Adriaens C, Radaelli E, i sar. (2014) The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation. *RNA N Y N* 20:1844–1849. doi: 10.1261/rna.047332.114
- Stanyon R, Galleni L (1991) A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes. *Bolletino Zool* 58:81–83. doi: 10.1080/11250009109355732
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, i sar. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144:27–40. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055

- Stitou S, Díaz de La Guardia R, Jiménez R, Burgos M (2000) Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* 8:305–311
- Szczerbal I, Switonski M (2003) B chromosomes of the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences. *Caryologia* 56:213–216. doi: 10.1080/00087114.2003.10589327
- Tang Y-C, Amon A (2013) Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. *Cell* 152:394–405. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.043
- Tanić N, Dedović N, Vujošević M, Dimitrijević B (2000) DNA profiling of B chromosomes from the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome Res* 10:55–61
- Tanić N, Vujošević M, Dedović-Tanić N, Dimitrijević B (2005) Differential gene expression in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) with and without B chromosomes. *Chromosoma* 113:418–427. doi: 10.1007/s00412-004-0327-z
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM (2010) B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma* 119:217–225. doi: 10.1007/s00412-009-0251-3
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Larkin DM, i sar. (2013) Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*). *BMC Biol* 11:90
- Trifonov VA, Perelman PL, Kawada S-I, i sar. (2002) Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). *Chromosome Res* 10:109–116. doi: 10.1023/A:1014940800901
- Trifonov VA, Vorobieva NN, Rens W (2009) FISH with and without COT1 DNA. In: Liehr T (ed) *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide*. Springer-Verl Berl Heidelb
- Uhl CH, Moran R (1973) The chromosomes of *Pachyphytum* (Crassulaceae). *Am J Bot* 60:648–656. doi: 10.1002/j.1537-2197.1973.tb05969.x
- Utsunomia R, Silva DMZ de A, Ruiz-Ruano FJ, i sar. (2016) Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLOS ONE* 11:e0150573. doi: 10.1371/journal.pone.0150573
- Valente GT, Conte MA, Fantinatti BEA, i sar. (2014) Origin and evolution of B chromosomes in the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata* based on integrated genomic analyses. *Mol Biol Evol* 31:2061–2072. doi: 10.1093/molbev/msu148

- Valente GT, Nakajima RT, Fantinatti BEA, i sar. (2017) B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma* 126:73–81. doi: 10.1007/s00412-016-0613-6
- Vanrobays E, Thomas M, Tatout C (2017) Heterochromatin positioning and nuclear architecture. In: Roberts JA (ed) *Annual Plant Reviews online*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 157–190
- Van Vugt JJFA, de Nooijer S, Stouthamer R, de Jong H (2005) NOR activity and repeat sequences of the paternal sex ratio chromosome of the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. *Chromosoma* 114:410–419. doi: 10.1007/s00412-005-0026-4
- Ventura K, O'Brien PCM, do Nascimento Moreira C, i sar. (2015) On the origin and evolution of the extant system of B chromosomes in *Oryzomyini* radiation (Rodentia, Sigmodontinae). *PloS One* 10:e0136663. doi: 10.1371/journal.pone.0136663
- Vujošević M (1992) B-chromosome polymorphism in *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) during five years. *Caryologia* 45:347–352. doi: 10.1080/00087114.1992.10797237
- Vujošević M, Blagojević J (1995) Seasonal changes of B-chromosome frequencies within the population of *Apodemus flavicollis* (Rodentia) on Cer mountain in Yugoslavia. *Acta Theriol (Warsz)* 40:131–137
- Vujošević M, Blagojević J (2000) Does environment affect polymorphism of B chromosomes in the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Z Säugetierkunde* 65:313–317
- Vujošević M, Blagojević J, Radosavljević J, Bejaković D (1991) B chromosome polymorphism in populations of *Apodemus flavicollis* in Yugoslavia. *Genetica* 83:167–170
- Vujošević M, Jojić V, Bugarski-Stanojević V, Blagojević J (2007) Habitat quality and B chromosomes in the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Ital J Zool* 74:313–316. doi: 10.1080/11250000701508578
- Vujošević M, Radosavljević J, Živković S (1990) Meiotic behavior of B chromosomes in yellow necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Arch Biol Sci* 42:39–42
- Vujošević M, Rajičić M, Blagojević J (2018) B chromosomes in populations of mammals revisited. *Genes* 9:487. doi: 10.3390/genes9100487
- Vujošević M, Živković S (1987) Numerical chromosome polymorphism in *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus* (Mammalia: Rodentia) caused by supernumerary chromosomes. *Časopis??* 37:81–92
- Wang J, Jia ST, Jia S (2016) New insights into the regulation of heterochromatin. *Trends Genet* 32:284–294. doi: 10.1016/j.tig.2016.02.005

- Wang KC, Chang HY (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 43:904–914. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.018
- White MJD (1973) *Animal cytology and evolution*. 3rd Edn Lond Camb Univ Press
- Wicker T, Buchmann JP, Keller B (2010) Patching gaps in plant genomes results in gene movement and erosion of colinearity. *Genome Res* 20:1229–1237. doi: 10.1101/gr.107284.110
- Wicker T, Mayer KFX, Gundlach H, i sar. (2011) Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *Plant Cell* 23:1706–1718. doi: 10.1105/tpc.111.086629
- Wilson EB (1906) *Studies on chromosomes*. V. The chromosomes of *Metapodius*. A contribution to the hypothesis of the genetic continuity of chromosomes. *J Exp Zool* 6:147–205
- Wójcik JM, Wójcik AM, Macholán M, i sar. (2004) The mammalian model for population studies of B chromosomes: the wood mouse (*Apodemus*). *Cytogenet Genome Res* 106:264–270. doi: 10.1159/000079297
- Wurster-Hill DH, Ward OG, Davis BH, i sar. (1988) Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccoon. *Cytogenet Cell Genet* 49:278–281. doi: 10.1159/000132677
- Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M, Watanabe Y (2008) Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455:251–255. doi: 10.1038/nature07217
- Yang F, Trifonov V, Ng BL, i sar. (2009) Generation of paint probes by flow-sorted and microdissected chromosomes In: Liehr T (ed) *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application guide*. Springer-Verl Berl Heidelb 35–52
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, i sar. (2011) B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLOS Genet* 7:e1002203. doi: 10.1371/journal.pgen.1002203
- Yudkin DV, Trifonov VA, Kukekova AV, i sar. (2007) Mapping of KIT adjacent sequences on canid autosomes and B chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 116:100–103. doi: 10.1159/000097424
- Zheng D, Frankish A, Baertsch R, i sar. (2007) Pseudogenes in the ENCODE regions: Consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Res* 17:839–851. doi: 10.1101/gr.5586307
- Zhou Q, Zhu H, Huang Q, i sar. (2012) Deciphering neo-sex and B chromosome evolution by the draft genome of *Drosophila albomicans*. *BMC Genomics* 13:109. doi: 10.1186/1471-2164-13-109

- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, i sar. (2003) The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol* 11:23–35
- Zima J, Macholán M (1995) B chromosomes in the wood mice (genus *Apodemus*). *Acta Theriol (Warsz)* 40:75–86. doi: 10.4098/AT.arch.95-47
- Zima J, Piálek J, Macholán M (2003) Possible heterotic effects of B chromosomes on body mass in a population of *Apodemus flavicollis*. *Can J Zool* 81:1312–1317. doi: 10.1139/z03-128

Biografija

Marija Rajičić je rođena 03. februara 1985. godine u Arandelovcu. Osnovnu školu je završila u Orašcu kao nosilac Vukove diplome. Srednju medicinsku školu je završila u Beogradu kao đak generacije smera ginekološko-akušerska sestra-tehničar. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija i fiziologija, završila je 2012. godine. Iste godine je upisala doktorske studije na modulu Genetika Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Od 2012. godine je zaposlena na Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Angažovana je na projektu „Genetička i fenetička raznovrsnost u prirodnim populacijama u različitim sredinama - doprinos polimorfizma B hromozoma“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru kog je uradila doktorsku disertaciju. Zvanje istraživač saradnik je stekla 2015. godine.

Od 2013. godine je učestvovala u promociji nauke kroz projekte Evropske komisije (SCIMFONICOM, EU projekt FR7-609724; SCIMFONICOM 2014-15, EU projekt H2020-MSCA-NIGHT-633376). Od 2016. učestvuje kao organizator beogradske Noći istraživača u okviru projekata ReFocuS i ReFocuS 2.0, čiji je nosilac Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Projekte finansira Evropska komisija, Horizon 2020 - Program za istraživanje i inovacione delatnosti, Marija Sklodovska Kiri akcija (H2020-MSCA-NIGHT-2016-2017-ReFocuS-722341; H2020-MSCA-NIGHT-2018-2019-ReFocuS 2.0-818325). Pored učešća na evropskim projektima koji se bave promovisanjem nauke, Marija Rajičić je bila angažovana kao predavač u Istraživačkoj stanici Petnica i u radu sa talentovanim učenicima.

Autor i koautor je šest radova, od kojih je tri objavljeno u vrhunskim međunarodnim časopisima. Svoja dosadašnja istraživanja predstavila je na međunarodnim i nacionalnim skupovima putem sedam kongresnih saopštenja. Član je Društva genetičara Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија С. Рајичић

број индекса Б3032/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Молекуларна структура, порекло и функција Б хромозома код жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија С. Рајичић

Број индекса Б3032/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Молекуларна структура, порекло и функција Б хромозома код жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)“

Ментори: др Тања Аднађевић, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Потписани/а

др Јелена Благојевић, научни саветник Универзитета у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Молекуларна структура, порекло и функција Б хромозома код жутогрлог шумског миша, *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia)“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.