

HETEROCHROMATYNA I „HETEROCHROMATYNIZACJA”*

HETEROCHROMATIN AND „HETEROCHROMATINIZATION”

Maria Joanna OLSZEWSKA

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

Streszczenie: Heterochromatyna zwana „konstytutywną” i euchromatyna różnią się rodzajem DNA (sekwencje niekodujące powtórzone tandemowo oraz kodujące unikatowe) oraz modyfikacjami epigenetycznymi, tj. metylacją DNA, histonów H3 i H4, a także ich acetylacją. Metylacje te powodują trwałą kondensację heterochromatyny. Wyciszenie genów w euchromatynie jest spowodowane przez odwracalną jej kondensację, która zachodzi w wyniku epigenetycznych modyfikacji DNA oraz histonów H3 i H4 charakterystycznych dla heterochromatyny. Dane te wskazują, że termin „heterochromatynizacja” powinien być zastąpiony przez „kondensacja euchromatyny”.

Słowa kluczowe: heterochromatyna, euchromatyna, heterochromatyna fakultatywna, histony H3, H4, metylacja, acetylacja.

Summary: Heterochromatin fraction called „constitutive” and euchromatin differ in respect of DNA types (tandem repeats vs coding/unique sequences) and in epigenetic modifications, i.e. in methylation of DNA, H3 and H4 histones and in acetylation of the latter two. These modifications result in permanent heterochromatin condensation. On the other hand, during the past decade, it has been well documented that gene expression in euchromatin is affected by its reversible condensation resulting from epigenetic modifications of DNA and H3 and H4 histones characteristic of heterochromatin with simultaneous histone modifications specific for euchromatin. These data imply that the term „heterochromatinisation” should be replaced with „euchromatin condensation”.

Key words: heterochromatin, euchromatin, facultative heterochromatin, H3, H4 histones, methylation, acetylation.

*Praca finansowana z badań statutowych Uniwersytetu Łódzkiego nr 505/04996.

1. WSTĘP

Terminy euchromatyna i heterochromatyna zostały wprowadzone przez Heitza w 1929 r. (ref. [38]) i weszły na stałe do nazewnictwa cytologicznego dla oznaczenia, zgodnie z jego koncepcją, chromatyny w stanie luźnym (euchromatyna) i trwale skondensowanym (heterochromatyna). Wprowadzenie przedrostków eu- i hetero- (gr. *eu-* i *hetero-* – odpowiedni, dobry, właściwy oraz odmienny) implikowało, co zostało dowiedzione po wprowadzeniu do cytogenetyki metod molekularnych, że heterochromatyna różni się w sposób zasadniczy od euchromatyny. Obecnie wiadomo, że różnica ta polega na obecności głównie w heterochromatynie krótkich sekwencji DNA (od 59 do 300–400 pz) ułożonych w szyku tandemowym.

W 1966 r. Brown (ref. [38]) wprowadził terminy heterochromatyna konstytutywna, która ma odpowiadać heterochromatynie zdefiniowanej przez Heitza, jest zlokalizowana w obszarze przycentromerowym i telomerowym i stanowi trwałą cechę genomu oraz heterochromatyna fakultatywna, tj. euchromatyna ulegająca kondensacji; zmiany towarzyszące kondensacji zostały nazwane heterochromatynizacją. Te terminy już wkrótce po ich zaproponowaniu zostały skrytykowane i nadal nie są akceptowane przez wszystkich badaczy, czemu dają wyraz ujmując termin „heterochromatynizacja” w cudzysłów (np. [14, 19]).

We współczesnych podręcznikach z wyjątkiem jednego [44] przy definicji heterochromatyny konstytutywnej brak jest informacji o jej DNA. Zwraca się uwagę na taką samą jej lokalizację w chromosomach homologicznych [26, 52], jej kondensację [5, 52], późną replikację w fazie S [26] lub stwierdza się: „Ten rodzaj chromatyny jest prawie zawsze nieaktywny” [52]. Przy charakterystyce heterochromatyny fakultatywnej są podawane takie jej właściwości, jak: obszar kondensacji euchromatyny [26] lub jej zwarta struktura [5], obecność tylko w niektórych komórkach oraz wyciszenie zawartych w niej genów [5, 26] lub jej obecność tylko w jednym z chromosomów siostrzanych [52] (autor miał zapewne na myśli chromosomy homologiczne).

Powszechnie znany jest fakt postępującej – aż do całkowitej – kondensacji chromatyny wiążącej się z wysoce zasadowym białkiem, protaminą, w plemnikach zwierząt i glonów (u tych ostatnich niedawno wykrytym [29, 56]). Analogiczny proces ma miejsce podczas dojrzewania erytrocytów ptaków dzięki obecności specyficznego histonu H5. Trudno nazwać te procesy „heterochromatynizacją”, chociaż ich skutki są analogiczne. W obu przytoczonych przykładach ta superkondensacja chromatyny jest odwracalna: w plemnikach następuje po zapłodnieniu, zaś w erytrocytach ptaków można spowodować dekondensację chromatyny i przywrócić jej aktywność transkrypcyjną w warunkach *in vitro*, dokonując ich fuzji z komórkami aktywnymi transkrypcyjnie.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie aktualnej wiedzy o istocie heterochromatyny oraz o epigenetycznych modyfikacjach uczestniczących w przekształcaniu euchromatyny w nieaktywną transkrypcyjnie skondensowaną strukturę. Wyciszenie genów obecnych w euchromatynie jest bowiem wynikiem szeregu współzależnych jej modyfikacji: metylacji DNA, deacetylacji histonów i metylacji lizyny, głównie w pozycji 9. w histonie H3 [14]. Procesy te są związane z przekształceniem (remodelin-

giem) chromatyny; liczne i złożone mechanizmy, dotyczące m.in. nukleosomów (ref. [6, 49]) nie będą tu omawiane.

2. RODZAJE CHROMATYNY

Przytoczone niżej dane są w większości powszechnie znane; są one przypominane celowo, aby przy omawianiu epigenetycznych modyfikacji histonów H3 i H4 (por. niżej, 3.) łatwiej było je odnieść do poszczególnych typów chromatyny.

Podział chromatyny na strukturalnie i funkcjonalnie odmienne domeny jest doskonale widoczny w chromosomach politenicznych powstających w wyniku tysięcy rund endoreplikacji DNA. Są one interfazową postacią chromatyny. Szczególnie wyraźnie zróżnicowane domeny widoczne są w mikroskopie świetlnym w chromosomach politenicznych znajdujących się w gruczołach ślinowych larw owadów. U muszki owocowej (*Drosophila*) heterochromatyna regionu centromerowego tworzy tzw. chromocentr; jego DNA przechodzi mniej cykli endoreplikacji DNA niż pozostała chromatyna, stanowiąca ramiona chromosomów, zbudowane z euchromatyny. Euchromatyna może być silnie skondensowana i nieaktywna transkrypcyjnie; stanowi więc „heterochromatynę fakultatywną”, widoczną w postaci silnie barwiących się w wyniku kondensacji prążków. Obszar między prążkami zawiera euchromatynę zdekondensowaną, słabo barwiącą się i aktywną transkrypcyjnie. Układ prążków jest zmienny i specyficzny dla określonych stadiów rozwoju larwy. Dzięki takiej strukturze chromosomy politeniczne *Drosophila* stanowią znakomity i przejrzysty model dla charakterystyki poszczególnych rodzajów chromatyny i dlatego w dalszym ciągu tego artykułu często przytaczane są wyniki badań przeprowadzonych na tym obiekcie.

2.1. Euchromatyna

Euchromatyna stanowi dominujący składnik chromatyny, szczególnie w małych genomach roślin (1C rzędu 150–530 Mbp). Jej DNA ulega replikacji we wczesnej i środkowej fazie S cyklu komórkowego i charakteryzuje się brakiem lub niskim poziomem metylacji cytozyny. Cechą euchromatyny jest jej luźna struktura i nadwrażliwość na działanie DNazy I. Jest bogata w GC i geny, które mogą być transkrybowane.

2.2. Heterochromatyna

Heterochromatyna (zwana „konstytutywną”) jest wysoce i trwale skondensowana; jej dekondensacja następuje tylko podczas replikacji DNA (ref. [28]), która ma miejsce w późnej fazie S cyklu komórkowego. DNA heterochromatyny jest zwykle wysoko zmetylowany, ale od tej reguły są wyjątki. Na przykład, u bobu (*Vicia faba*) heterochromatyna prążków interstycjalnych w chromosomach S jest zbudowana z sekwencji FokI 59 pz, w której brak jest dinukleotydów CpG i trinukleotydów CpNpG (N jest dowolnym deoksynukleozydem), w których cytozyna u roślin podlega metylacji (sekwencję tę zbadali w 1987 r. Yakura i wsp., ref. [39]). DNA heterochromatyny jest zbudowany z sekwencji tandemowych o długości monomerów od 59 do kilkuset pz,

bogatych w AT. Struktura nukleotydowa monomerów może być genomowo-, gatunkowo- i rodzajowospecyficzna. Niekiedy wśród tych monomerów znajdują się retroelementy, szczególnie obfite u traw (ref. [43]). Wśród takich sekwencji mogą znajdować się nieliczne geny (por. niżej). Ilość i umiejscowienie heterochromatyny jest cechą gatunkową. W chromosomach mitotycznych położenie heterochromatyny stwierdza się metodą prążków G lub C, a także – ze względu na bogactwo w AT – barwieniem fluorescencyjnym DAPI. Heterochromatyna może być zlokalizowana na końcach chromosomów (obok sekwencji telomerowych), interstycjalnie oraz, zawsze u wyższych Eukaryota, w regionie centromerowym. U tego samego gatunku struktura I-rzędowa DNA poszczególnych prążków bywa odmienna.

Centromery u *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik) wraz z przylegającą do nich heterochromatyną przycentromerową (pericentromerową) są częstym obiektem badań heterochromatyny, ponieważ są one dobrze widoczne w jądrach interfazowych jako silnie barwiące się grudki, zwane chromocentrami. Jest ich ok. 10, tj. w liczbie odpowiadającej liczbie $2n$ chromosomów. Podobnie jak inne rodzaje nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny, DNA centromerów i heterochromatyny przycentromerowej jest wysoko zmetylowany. O znaczeniu metylacji DNA dla skondensowanej struktury chromocentru świadczy ubytek ich heterochromatyny, nawet rzędu 70–75% u mutantów z defektywnym genem metylotransferaz DNA przenoszących grupy metylowe na cytozynę w dinukleotydach CpG (np. *met-1-1* lub *ddm1* [12]). Ubytkowi temu, który jest spowodowany przez przemieszczenie się chromatyny z przycentromerowych części chromocentru, towarzyszy redukcja poziomu metylacji lizyny 9. w histonie H3 (por. 3.1; ref. [24]). W jądrach mutantu *ddm1-5* następuje nie tylko dekontdensacja przycentromerowej heterochromatyny, ale również heterochromatyny właściwego centromeru, zawierającej sekwencje 180 pz. Natomiast rośliny defektywne pod względem CTM3 (metylaza uczestnicząca w metylacji cytozyny w trinukleotydzie CpNpG) wykazują normalną strukturę chromocentru. Z przytoczonych danych wyciągnięto wniosek, że tworzenie chromocentru nie zależy od metylacji cytozyny w trinukleotydzie CpNpG [12]. Należy zaznaczyć, że u mutantów hipometylacyjnych istnieje frakcja jąder z normalną strukturą heterochromatyny [12].

Wszyscy autorzy słusznie za heterochromatynę „konstytutywną” uważają **region przycentromerowy**. Jak wspomniano wyżej, w skład tego regionu wchodzi centromer właściwy i przylegająca do niego z dwóch stron heterochromatyna przycentromerowa. Centromer właściwy stanowi niewielką strukturę w porównaniu z heterochromatyną przycentromerową. W jądrach interfazowych oraz w chromosomach mitotycznych i mejotycznych zwykle oba składniki regionu przycentromerowego są widoczne jako całość i dlatego wielu autorów stosuje termin „region przycentromerowy”. Jednak struktura centromeru różni się od flankującego go regionu heterochromatyny przycentromerowej. Centromery są wyspecjalizowaną domeną chromosomu, na której są montowane kinetochory. W skład obu składników regionu przycentromerowego wchodzi sekwencje DNA w układzie tandemowym. Te obecne w centromerze są specyficzne dla gatunku i unikatowe w jego genomie. Obok tych sekwencji w centromerze właściwym, a przede wszystkim w heterochromatynie przycentromerowej, znajdują się ruchome elementy. W przeciwieństwie do typowej heterochromatyny, replikacja DNA centromerowego odbywa się bądź asynchronicznie w

poszczególnych chromosomach w czasie całej fazy S cyklu komórkowego, bądź ma miejsce na wczesnym jej etapie. We właściwym centromerze histon H3 jest zastąpiony przez jego zmodyfikowaną cząsteczkę, zwaną CENP-A (u człowieka) lub CENH3 (u roślin). Obecność tego białka jest pierwszym i podstawowym warunkiem montowania na centromerze kinetochorów. W przeciwieństwie do chromatyny pozacentromerowej, synteza CENP-A (lub jego homologów) nie jest sprzężona z replikacją DNA. Synteza i połączenie z DNA tego zmodyfikowanego histonu zachodzi dopiero w fazie G2 (ref. [41, 48]). Następną różnicą między typową heterochromatyną a regionem przycentromerowym jest obecność w nim genów ulegających ekspresji. U *Schizosaccharomyces cerevisiae* (drożdże piekarnicze o najprostszej budowie regionu centromerowego, ref. [41]) wśród sekwencji powtarzalnych flankujących centralny rdzeń centromeru znajdują się sekwencje kodujące tRNA (ref. [7]). U wyższych Eukaryota obecność sekwencji kodujących w regionie centromerowym jest zjawiskiem rzadkim. Jak dotąd, wykryto je u *Drosophila*, człowieka i u dwóch gatunków roślin, których genom został zsekwencjonowany, tj. u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) i u ryżu (*Oryza sativa*). U rzodkiewnika w chromosomach 4. i 5., zarówno w wyniku sekwencjonowania genomu jak i pozytywnego sygnału FISH, stwierdzono w regionie centromerowym obecność genu kodującego 5S rRNA, a także geny ulegające ekspresji (EST), zaś centromer w chromosomie 3. zawiera pełną jednostkę 45S rDNA (ref. [40–42]). W centromerze chromosomu 8. u ryżu, poza sekwencjami tandemowymi i retroelementami, w wyniku sekwencjonowania stwierdzono obecność 14 sekwencji o cechach odpowiadających genom, w tym cztery potencjalnie aktywne transkrypcyjnie [36]. Jednak liczba genów znajdujących się w heterochromatynie jest znacznie niższa niż w euchromatynie; ich zagęszczenie w wyłącznie euchromatynowych ramionach chromosomów u *Arabidopsis thaliana* wynosi średnio 25 na 100 kpz, zaś w heterochromatynie przycentromerowej – zaledwie 7–9 na 100 kpz (ref. [7]). Heterochromatyna *per se* jest czynnikiem ograniczającym aktywność transkrypcyjną (ref. [8]).

2.3. Euchromatyna skondensowana („heterochromatyna fakultatywna”)

Heterochromatyna zwana fakultatywną powstaje z euchromatyny, w wyniku procesu zwanego „heterochromatynizacją”, powodującego wyciszenie genów na określonym etapie rozwoju organizmów lub w wyniku zjawiska PEV (ang. *Position Effect Variegation*, por. niżej). Powstanie skondensowanej struktury chromatyny jest inicjowane przez niekodujące, dwuniciowe RNA (dsRNAs) lub krótkie interferencyjne RNA (siRNAs) i obejmuje kolejno pojawiające się aktywności deacetylaz i metylotransferaz histonów oraz DNA, dzięki czemu następuje stopniowo przyłączanie białka HP1 (por. niżej), co powoduje zmiany struktury chromatyny z luźnej w zwartą (skondensowaną) z wysoko zmetylowanym DNA i ostatecznie doprowadza do wyciszenia genów (ref. [30, 48, 54]). Struktura I-rzędowa DNA jest taka sama, jak w euchromatynie, z której powstaje ten rodzaj chromatyny skondensowanej. W przeciwieństwie do heterochromatyny „konstytutywnej”, „fakultatywna” ma charakter przejściowy, na co wskazują chociażby obserwacje mikroskopowe. Można oczekiwać, że powrót do stanu charakterystycznego dla euchromatyny powinien być związany z demetylacją histonów. Jednak, jak dotąd, zidentyfikowano tylko u człowieka enzym specyficznie demetylujący

TABELA 1. Metylacja lizyn w histonach H3 i H4 w nieaktywnych transkrypcyjnie i aktywnych transkrypcyjnie domenach chromatyny (na podstawie wyników uzyskanych przez autorów cytowanych w 3.1)

Rodzaj chromatyny	Metylacja H3 i H4
Heterochromatyna "konstytutywna" Region centromerowy Interstycjalna	mono-, di- i trimetylacja H3K9, H3K27, H4K20 H3K9
Euchromatyna	mono-, di- i trimetylacja H3K4, H3K36 sporadycznie H3K9, H3K27
Euchromatyna skondensowana zwana "heterochromatyną fakultatywną"	mono-, di- i trimetylacja H3K9, trimetylacja H3K27, mono-, di- i trimetylacja H4K20 mono-, di- i trimetylacja H3K4 i H3K36

Poziomy metylacji (mono-, di- i trimetylacja) mogą być odmienne w zależności od obiektu badań

lizynę w pozycji 4. w histonie H3 (ref. [47]), ale paradoksalnie metylacja lizyny w tej pozycji w histonie H3 charakteryzuje właśnie euchromatynę (por. tab. 1).

Często widoczna jest w jądrze tzw. chromatyna przyjąderkowa, zwana także okołojąderkową. Są to odcinki NOR (ang. *Nucleolar ORGANIZER*), pochodzące z jednego lub kilku chromosomów jąderkotwórczych, aktualnie nietranskrybowane. Rozmiary chromatyny przyjąderkowej, zawierającej 45S rDNA, są tym większe, im mniejsza jest aktywność transkrypcyjna odcinków NOR znajdujących się w stanie luźnym w jądrku [50].

Powszechnie známym przykładem wyciszenia genów jest inaktywacja jednego z dwóch chromosomów X u samic ssaków, silnie skondensowanego i późno replikującego. Wyciszenie to jest wynikiem m.in. metylacji DNA oraz metylacji histonu H3 w lizynie 9. (ref. [8]). Mechanizmy powodujące inaktywację chromosomu X, oznaczanego jako Xi (ang. *inactivated*) są szczegółowo zbadane (por. [17, 57]). Jednak w chromosomie Xi nie wszystkie geny ulegają dezaktywacji; u człowieka aktywne geny stanowią 15% całego ich zasobu (ref. [4]). Nie ustalono dotąd reguły, kiedy w rozwoju embrionalnym następuje dezaktywacja chromosomu X oraz czy dotyczy ona wybiórczo X pochodzenia matczynego czy ojcowskiego lub czy jest przypadkowa [10]. Analogiczne zjawisko inaktywacji jednego z dwóch chromosomów X ma miejsce u roślin okrytozalążkowych. Bniec biały (*Melandrium album*, u osobników żeńskich $2n=XX+24A=26$, u męskich $2n=XY+24A=26$) zawiera u osobników żeńskich jeden chromosom X skondensowany, jego DNA jest wysoko zmetylowany i późno replikujący (ref. [27]).

U szczawiu (*Rumex thyrsifolius*, gatunku dwupiennego) u osobników żeńskich zespół chromosomów $2n$ składa się z $XX+13A=14$, u męskich – $XYY+12A=15$. U osobników męskich chromosomy Y są całkowicie skondensowane i widoczne w jądrach interfazowych jako silnie barwiące się grudki chromatynowe; w komórkach macierzystych pyłku oba Y ulegają dekonkondensacji, co zbiega się z intensywną syntezą RNA (Żuk 1986, ref. [38]). U innego gatunku szczawiu (*Rumex acetosa*) ostatnio wykazano

w merystemie korzeniowym dekondensację chromosomów Y pod wpływem czynnika hamującego metylację DNA (5-azacytydyny) oraz stwierdzono obecność zmetylowanej lizyny 9. w histonie H3, ale brak w tym histonie metylacji lizyny 4. [35]; brak metylacji lizyny 4. w histonie H3 jest zjawiskiem wyjątkowym w tzw. heterochromatynie fakultatywnej (por. tab. 1 i 3).

Jednym z przypadków, kiedy następuje wyciszenie genów lub modyfikacja ich struktury, jest zjawisko zwane PEV (ang. *Position Effect Variegation*) – mozaikowatość (różnorodność) zależna od pozycji. Zachodzi ona wskutek rearanżacji chromosomów, w wyniku której odcinek zawierający heterochromatynę (np. centromer) styka się z regionem euchromatynowym chromosomu. W takim układzie następuje rozprzestrzenienie strefy wyciszonych genów, charakterystyczne dla heterochromatyny „fakultatywnej”, na przylegający do heterochromatyny „konstytutywnej” region euchromatynowy (ref. [9, 30]). Taka sytuacja została m.in. opisana w politenicznych chromosomach gruczołów ślinowych u *Drosophila* w liniach z PEV. Cytologicznym, dostrzegalnym w mikroskopie wynikiem PEV jest utrata charakterystycznego układu prążków i pojawienie się stref euchromatyny skondensowanej. Do tych miejsc przyłącza się białko HP1 (por. niżej) oraz następuje dimetylacja lizyny 9. w histonie H3, charakterystyczna dla heterochromatyny „konstytutywnej” (por. tab. 1, ref.[9]). W wyniku PEV, w prawidłowo funkcjonującej luźnej euchromatynie powstaje domena chromatyny skondensowanej. Rearanżacja chromosomów może być dziedziczona i prowadzi do mozaikowatego wzoru ekspresji genów oraz powoduje ich mutacje (ref. [9, 18, 25]).

Białko HP1 (ang. *Heterochromatin Protein 1*), uczestniczące w wygaszaniu aktywności transkrypcyjnej i w kondensacji chromatyny, jest wysoce konserwatywne. Jego obecność stwierdzono u drożdży rozszczepkowych (*Schizosaccharomyces pombe*), nazwano je swi6p, u *Neurospora*, *Drosophila* i u ssaków (ref. [14, 48]). Należy ono do grupy białek zawierających domenę CHROMO (ang. *CHROMatin Organization MOdifier*). W skład HP1 wchodzi dwie domeny w znacznym stopniu konserwatywne: N-terminalna chromodomena i C-terminalna domena zwana „chromoshadow”, które są rozdzielone przez krótki rejon „zawiasowy” (ang. *hinge*). U *Drosophila* i ssaków HP1 współdziała z SU(VAR)3-9 (główną metylazą histonu H3K9, por. niżej, 3.1) poprzez domenę „chromoshadow” i zawiasową oraz z histonem H3K9 poprzez N-terminalną chromodomenę (ref. [18, 21]).

U *Drosophila* istnieją trzy białka typu HP1, nazwane HP1a, HP1b i HP1c. Różnią się one nieco długością oraz sekwencją aminokwasów zarówno w domenie N-terminalnej, jak i w „chromoshadow”, natomiast „zawias” ma charakter konserwatywny w HP1a i HP1b, ale jest odmienny w HP1c. Wyniki badań immunocytochemicznych z zastosowaniem przeciwciał przeciwko każdemu z tych wariantów HP1 wykazały, że w chromosomach politenicznych HP1a jest zlokalizowane w centromerze (heterochromatyna „konstytutywna”), HP1b znajduje się zarówno w euchromatynie, jak i w prążkach (skondensowana euchromatyna zwana „heterochromatyną fakultatywną”), zaś HP1c – tylko w euchromatynie luźnej (obszar między prążkami). Różnice w sekwencji aminokwasów w domenie „chromoshadow” i „zawiasu” zostały uznane za przyczynę odmiennej lokalizacji tych trzech wariantów HP1 u *Drosophila* [53]. O

istotnej roli rejonu zawiasowego w wiązaniu HP1 do chromatyny świadczy również zakłócenie tego procesu przez mutację w tym rejonie [1].

U ssaków również zidentyfikowano kilka białek typu HP1. Ich obecność stwierdzono zarówno w heterochromatynie „konstrytywnej”, jak i „fakultatywnej”, np. w chromosomie Xi u ssaków (ref. [18, 57]).

Jedyny homolog HP1 o nazwie LHP1, istniejący u *Arabidopsis*, nie bierze udziału w tworzeniu skondensowanych form chromatyny (ref. [12]), jest bowiem zlokalizowany wybiórczo w regionach euchromatynowych, ale uczestniczy w specyficznym dla danego etapu rozwoju wyciszaniu genów (ref. [14]). Analogiczna interpretacja obecności HP1 w euchromatynie dotyczy ssaków, u których metylacja histonu H3K9 i wiązanie HP1 były obserwowane w promotorach nieaktywnych genów (ref. [18, 21]), ale również w transkrybowanych regionach aktywnych genów (ref. [21]). Sporadyczna obecność w euchromatynie histonów H3 z lizyną zmetylowaną w pozycji 9 i 27 (por. tab. 1) może być związana z taką sytuacją. Jak się obecnie wydaje, obecność metylotransferazy SU(VAR)3-9 i metylacji lizyny 9. w histonie H3 nie wystarcza dla wiązania HP1 do chromatyny (ref. [8]).

Dotychczasowe wyniki badań mechanizmów uczestniczących w **mitotycznej kondensacji chromatyny** wskazują, że różnią się one całkowicie od przypisywanych kondensacji euchromatyny prowadzącej do wyciszenia genów, czyli tzw. heterochromatyny fakultatywnej. Główną rolę w mitotycznej kondensacji chromatyny wydają się odgrywać topoizomeraza IIa oraz kondensyny, a wśród nich rodzina wysoce konserwatywnych białek SMC (ang. *Structural Maintenance of Chromosomes*) (ref. [2, 33]). Fosforylacja histonu H1, wbrew wcześniejszym poglądom, nie ma bezpośredniego związku z mitotyczną kondensacją chromosomów (ref. [33]). Fosforylacja seryn 10., 28 i 50. w histonie H3, identyfikowana metodą immunocyto-chemiczną, związana z mitozą i mejozą, jest omówiona niżej (por. 3.3).

3. EPIGENETYCZNE MODYFIKACJE HISTONÓW H3 I H4

Specyficzne potranslacyjne modyfikacje histonów: metylacja, acetylacja, fosforylacja, ubikwitynacja i ich kombinacje współdziałające z metylacją DNA stanowią elementy kodu epigenetycznego, który uczestniczy w regulacji stanu funkcjonalnego chromatyny. Świadczy o tym zróżnicowane rozmieszczenie poszczególnych izoform histonów.

Od kilkunastu lat do badania *in situ* epigenetycznych modyfikacji histonów H3 i H4 stosowana jest metoda immunocytochemiczna z użyciem przeciwciał przeciwko ich podstawowym formom. Ponieważ centromery są powszechnie przyjmowane jako struktura będąca heterochromatyną „konstrytywną”, należy przypomnieć, że zawierają one zmodyfikowany histon H3. Jest on obecny w centromerach u wszystkich Eukaryota. Jego homologi są specyficzne gatunkowo [37, 55, 58] i w związku z tym noszą rozmaite nazwy: u *Saccharomyces cerevisiae* – Cse4, u *Schizosaccharomyces pombe* – Cnp1, u *Drosophila* – Cid, u *Caenorhabditis elegans* – HCP-3, u człowieka, myszy i ropuchy afrykańskiej (*Xenopus levis*) – CENP-A, u roślin – CENH3 (ref. [41]). Istotne różnice między histonem H3 podstawowym a jego modyfikacjami obecnymi w centromerach

dotyczą końca N-terminalnego, który jest wysunięty poza nukleosom, natomiast krańce C-terminalne, które znajdują się w obrębie nukleosomów, wykazują znaczną homologię (ref. [58]). Aminokwasy obecne w łańcuchach N-terminalnych i zawierające lizynę (K) i serynę (S), najczęściej ulegają takim epigenetycznym modyfikacjom, jakie mają znaczenie dla struktury i funkcji chromatyny. Ich pozycja w CENP-A i CENH3 i ich homologach znacznie różni się od pozycji, jaką zajmują w histonie H3 podstawowym [37, 55, 58]. W świetle tych danych mogą powstać wątpliwości, czy uzyskiwane wyniki odnoszą się do heterochromatyny centromerowej. Do niedawna w publikacjach dotyczących epigenetycznych modyfikacji histonu H3 w centromerze, brak było wzmianki na ten temat; wyjątek w pracy [14]. Większość badaczy definiowała tę strukturę jako „region pericentryczny” lub „region centromerowy”, co ze względu na niewielkie rozmiary właściwego centromeru odnosiło się do heterochromatyny przycentromerowej, zawierającej histon H3 podstawowy.

U kukurydzy (*Zea mays*) zastosowanie przeciwciał dla różnych epigenetycznych wariantów CENH3 dla tego gatunku pozwoliło na wykazanie, że CENH3 niezmodyfikowane, jak i fosforylowane w serynie w pozycji 50. są zlokalizowane w centromerze, natomiast podstawowy histon H3 znajduje się w heterochromatynie przycentromerowej [58]. U *Arabidopsis thaliana* stwierdzono, że obecność CENH3 jest ograniczona do zewnętrznych części centromeru, tj. tych obszarów, na których jest tworzony kinetochor. Podobnie jest zlokalizowane białko niehistonowe CENP-C, również uczestniczące w montowaniu kinetochoru. Cały centromer daje sygnał hybrydizacyjny w metodzie FISH z sekwencjami tandemowymi 180 pz, specyficznymi dla heterochromatyny centromerowej u tego gatunku [51]. Te wyniki mogą wskazywać, że heterochromatyna w centralnej części centromeru zawiera histon H3 podstawowy.

3.1. Metylacja histonów H3 i H4

Metylacja histonów H3 i H4 jest najbardziej rozpowszechnioną ich epigenetyczną modyfikacją. Metylacji podlegają lizyny (K) zlokalizowane w łańcuchu N-terminalnym. W histonie H3 są to lizyny w pozycjach 4., 9., 10., 18., 27. i 36; w histonie H4 – lizyna 20. W każdej z tych pozycji lizyna może być mono-, di- i trimetylowana. Te procesy metylacji są przeprowadzane przez metylazy histonów (HMTazy) z rodziny białek SU(VAR)3-9, zaś SUV4-20 kontroluje metylację H4K20 u *Drosophila* (ref. [9]). Szereg innych HMTaz uczestniczy w monometylacji H4K20 i H3K4. SU(VAR)3-9 jest białkiem wysoce konserwatywnym; jego homologi zostały wykryte u przeszło 40 gatunków, w tym u grzybów, ssaków i roślin (ref. [9]). Poszczególne białka należące do rodziny SU(VAR)3-9 są specyficzne dla mono-, di- i trimetylacji. Wykazano asocjację z heterochromatyną trzech białek z tej rodziny: SUVH1, SUVH2 i SUVH4 (ref. [9]). Rezultatem metylacji histonu H3K9 jest wyciszenie genów i kondensacja chromatyny [11, 13, 15].

Dotychczasowe wyniki badań przeprowadzonych na grzybach, zwierzętach (głównie na *Drosophila* i ssakach) oraz na roślinach okrytozalążkowych wskazują, że metylacja histonów H3 i H4 jest wstępnym warunkiem dla metylacji DNA, zachodzącej u zwierząt w dinukleotydzie CpG, a u roślin również w trinukleotydzie CpNpG. Szczególną rolę odgrywa metylacja lizyny 9. w histonie H3. U ssaków metylotransferazy

DNA współdziałają ze wspomnianymi wyżej metylotransferazami histonów z grupy SUVH, o czym świadczy m.in. fakt, że u osobników ze znokautowanym genem *Suv39h* następuje obniżenie metylacji DNA [14].

Pozycja i poziom metylacji lizyn są wykrywane *in situ* z zastosowaniem wyznakowanych fluorescencyjnie przeciwciał przeciwko histonom H3 i H4 specyficznych zarówno dla położenia lizyny, jak i poziomu jej metylacji (mono-, di- i trimetylacja).

W badaniach obecności metylowanych histonów H3 i H4 jako **heterochromatynę „konstytutywną”** wybierano najczęściej region centromerowy, niekiedy także heterochromatynę interstycjalną. Z reguły w tych strukturach jest obecny histon H3K9 mono-, di- i trimetylowany, przy czym poziom metylacji różni się u poszczególnych gatunków. Fakt ten stwierdzono u bardzo licznych organizmów: *Schizosaccharomyces pombe* (ref. [14]), u *Drosophila* [9], u ssaków [46], (ref. [11, 15]) i u roślin okrytozalążkowych [14, 19, 24]. Obecność mono-, di- i trimetylowanego histonu H3K27 była badana i stwierdzana u *Drosophila* w centromerze [9], zaś u ssaków jest on tylko monometylowany (ref. [11]), podobnie jak u jęczmienia (*Hordeum vulgare*), dimetylowany u *Arabidopsis thaliana* i bobu (*Vicia faba*) (ref. [14]). Wydaje się, że trimetylowany H3K27 jest obecny tylko u organizmów wielokomórkowych (Metazoa) [14]. Równie powszechna jest obecność w heterochromatynie „konstytutywnej” metylowanego histonu H4K20. Występuje on u *Schizosaccharomyces pombe* (ref. [14]) oraz *Drosophila* [9]; tylko trimetylowany jest u ssaków (ref. [11]) i tylko monometylowany u roślin wyższych (ref. [14]).

Dla **euchromatyny** charakterystyczne jest występowanie mono-, di- i trimetylowanego histonu H3K4. Jego obecność stwierdzono u *Drosophila* i ssaków (ref. [9]) oraz u roślin okrytozalążkowych [14, 19, 24]. W euchromatynie u *Drosophila* i *Arabidopsis* znajdują się mono-, di- i trimetylowane histony H3K36 (ref. [9]).

Przez **heterochromatynę „fakultatywną”** autorzy, badający występowanie w niej metylowanych histonów H3 i H4, rozumieją te domeny euchromatyny, które okresowo lub trwale ulegają kondensacji z wyłączeniem aktywności transkrypcyjnej (por. wyżej, 2.3). Mono-, di- i trimetylowane H3K9, H3K27 i H4K20 znajdują się w prążkach chromosomów politenicznych u *Drosophila* [9], w nieaktywnych chromosomach Xi u samic ssaków [8], w których ma miejsce dimetylacja H3K9 [34], przejściowo u ssaków [46] i trwale u roślin okrytozalążkowych o dużym genomie, tj. 1C powyżej 500 Mbp [19], zawierających znaczne ilości chromatyny skondensowanej, zbudowanej z różnego rodzaju długich sekwencji powtarzalnych, głównie retroelementów (ref. [45]), a więc o strukturze DNA odmiennej od heterochromatyny. Wskutek metylacji DNA retroelementów, zawierająca je chromatyna jest skondensowana i wyłączona z transkrypcji. W tego typu chromatynie są obecne również trimetylowane H3K27 oraz H4K20, charakterystyczne dla heterochromatyny „konstytutywnej” [9, 19]. Obok wymienionych, w prążkach chromosomów politenicznych u *Drosophila* znajdują się mono-, di- i trimetylowane histony H3K4 i H3K36 [9], specyficzne dla euchromatyny.

Charakterystyczna dla heterochromatyny „konstytutywnej” obecność i poziom metylacji histonów H3K9, H3K27 i H4K20 oraz rola metylowanego H3K9 w kondensacji chromatyny wydaje się wyjaśniać ich występowanie także w skondensowanej euchromatynie („heterochromatynie fakultatywnej”). U *Arabidopsis* wykazano, że u

mutantów, u których brak jest metylotransferaz uczestniczących w metylacji lizyny 9. w histonie H3, następuje redukcja takiego histonu do poziomu charakterystycznego dla euchromatyny [23]. Wśród czterech metylaz histonów z rodziny SUV(VAR)3-9, tylko mutacja *suvh2* powoduje znaczny ubytek heterochromatyny, oceniany na podstawie barwienia DAPI oraz redukcję sygnałów po immunobarwieniu dla dimetylowanego H3K9, monometylowanego H4K20 oraz dla 5-metylocytozyny obecnej tylko w metylovanym DNA [11]. Wyniki te sugerują, że w regulacji stanu skupienia chromatyny, zarówno w heterochromatynie „konstytutywnej”, jak i „fakultatywnej”, tj. ich kondensacji, uczestniczy nie tylko metylacja DNA, ale i metylacja histonów charakterystyczna dla heterochromatyny „konstytutywnej”.

Jak wynika z przytoczonych danych, zestawionych w tabeli 1, metylowane H3K9, H3K27 i H4K20 są konserwatywnymi wyznacznikami heterochromatyny zwanej konstytutywną, ale są obecne również w wyciszonej transkrypcyjnie euchromatynie w wyniku złożonego procesu zwanego „heterochromatynizacją”. Charakterystyczna dla euchromatyny metylacja H3K4 i H3K36 jest zachowana po jej kondensacji i wyciszeniu aktywności transkrypcyjnej.

3.2. Acetylacja histonów H3 i H4

Ten rodzaj epigenetycznej modyfikacji powoduje rozluźnienie chromatyny, co jest jednym z czynników prowadzących do jej aktywacji transkrypcyjnej. Niski poziom acetylacji histonu H4 lub jej brak był od dawna stwierdzany w heterochromatynie centromerów u drożdży rozszczepkowych (ref. [48]) oraz chromosomów człowieka i roślin (ref. [3, 15]).

W histonie H3 acetylacji podlegają lizyny w pozycjach 9., 14. i 18., zaś w histonie H4 – lizyny w pozycjach 5., 8., 12. i 16. Obecnie acetylacja histonów *in situ* jest badana metodą immunocytochemiczną, z zastosowaniem przeciwciał przeciwko histonom z lizyną acetylowaną w określonej pozycji. Obiektem badań są różne typy chromatyny, chromosomy mitotyczne oraz chromatyna podczas kolejnych faz cyklu komórkowego.

W **chromosomach mitotycznych** bobu **heterochromatyna** interstycjalna, zbudowana z tandemowych powtórzeń sekwencji FokI 59 pz, nie zawiera w histonie H4 acetylowanej lizyny w pozycjach 5., 8. i 12.; podobnie brak jest acetylowanych lizyn w pozycjach 9/18 i 14. w histonie H3. W niektórych prążkach heterochromatynowych u tego gatunku, niezawierających sekwencji FokI, nie wykryto acetylacji lizyn 5., 8. i 12. w histonie H4, natomiast w histonie H3 acetylowane są lizyny w pozycjach 9/18 i 14. [3, 22]. U jęczmienia heterochromatyna centromerów i regionu przycentromerowego charakteryzuje się niskim poziomem acetylacji lizyn 9/18 i 14. w histonie H3. W tym samym chromosomie metafazowym wzór znakowania tego regionu przeciwciałem przeciwko acetylowanemu H4K5 bywa rozmaity: centromer i heterochromatyna przycentromerowa są wyznakowane silniej niż ramiona chromosomów, tak samo lub zupełnie nie dają sygnałów [23]. W centromerach myszy histony H3 i H4 wykazują bardzo niski poziom acetylacji [8]. Centromery w chromosomach politenicznych *Drosophila* są pozbawione acetylowanych H3K9 i H3K14 [9]. W

chromocentrach *Arabidopsis* (interfazowa forma regionu centromerowego, por. 2.2) brak jest acetylacji histonów H4, z wyjątkiem H4K16, który jest acetylowany w związku z replikacją ich DNA [22].

U ssaków intensywna acetylacja lizyn w histonach H3 i H4 ma miejsce w tzw. prążkach R w chromosomach mitotycznych. W prążkach tych znajduje się wcześniej replikująca w fazie S i potencjalnie aktywna transkrypcyjnie **euchromatyna**. Heterochromatyna jest słabiej wyznakowana (ref. [14]). W chromosomach politenicznych *Drosophila* acetylacja H4K5, H4K8 i H3K14 ma miejsce wybiórczo w euchromatynie (ref. [9, 14]). U roślin w regionie NOR jest wysoki poziom acetylacji H4K5 [22].

W heterochromatynie „fakultatywnej”, w prążkach chromosomów politenicznych u *Drosophila*, ma miejsce acetylacja H3K9 i H3K14 [9]. Chromatyna prążków, w odpowiednich stadiach rozwoju larw, ulega dekondensacji, wskutek czego następuje przywrócenie cech euchromatyny, tj. stają się aktywne transkrypcyjnie. Natomiast w chromosomie Xi u samic ssaków hipoacetylacja histonu H4 wraz z metylacją DNA powoduje dezaktywację transkrypcyjną (ref. [8]).

W jądrach interfazowych bobu i jęczmienia najwyższy poziom acetylacji H4K5 przypada na fazę S. Należy przypomnieć, że replikacja DNA odbywa się podczas rozmaitych etapów fazy S w poszczególnych typach chromatyny. To stwierdzenie skłania niektórych autorów do wniosku, że – przynajmniej u roślin – acetylacja histonów H3 i H4 jest związana raczej z procesem replikacji DNA niż transkrypcją [3, 23].

Z przytoczonych danych zestawionych w tabeli 2 wynika, że w heterochromatynie „konstytutywnej” nie zachodzi acetylacja histonów H3 i H4, z wyjątkiem okresu replikacji DNA heterochromatyny u roślin. Euchromatynę charakteryzuje wysoki poziom acetylacji

TABELA 2. Acetylacja histonów H3 i H4 w nieaktywnych i aktywnych transkrypcyjnie domenach chromatyny (na podstawie danych autorów cytowanych w 3.2)

Rodzaj chromatyny	Rodzaj histonu i położenie acetylowanej lizyny						
	H3K9	H3K14	H3K9/18	H4K5	H4K8	H4K12	H4K16
Heterochromatyna "konstytutywna" region centromerowy* interstycjalna*	±	–	–	–	–	–	±
	NB	–	–	–	–	–	–
Euchromatyna	+	+	NB	+	+	NB	NB
Euchromatyna skondensowana zwana "heterochromatyną fakultatywną"	+	+	NB	+	NB	NB	NB

obecna (+) lub brak (–) w zależności od składu nukleotydowego heterochromatyny interstycjalnej lub fazy cyklu komórkowego (u roślin acetylacja następuje w fazie S); NB – nie badano

histonów H3 i H4, podobnie jak heterochromatynę „fakultatywną”, zawierającą euchromatynę skondensowaną, co jest jedną z przyczyn wyciszenia obecnych w niej genów.

3.3. FOSFORYLACJA HISTONU H3 I JEGO WARIANTU CENTROMEROWEGO

Powszechnie znany jest fakt, że fosforylacja histonu H3 zachodzi w dwóch przeciwstawnych funkcjonalnie stanach chromatyny: w skondensowanej, nieaktywnej transkrypcyjnie oraz w luźnej, z aktywnymi genami (ref. [25]).

Epigenetyczna modyfikacja histonu H3 polega na fosforylacji seryny (S), głównie 10., ale także 28. i 50. oraz treoniny (T) w pozycji 11. W badaniach *in situ* stosowane są przeciwciała przeciw histonowi H3 lub jego wariantowi centromerowemu, specyficzne dla pozycji ufosforylowanego aminokwasu.

Jedynym rodzajem **heterochromatyny** „konstytutywnej”, w jakim stwierdzono fosforylację histonu H3, jest heterochromatyna centromeru i przycentromerowa zarówno u roślin okrytozalążkowych [14, 16, 20, 32] (Polit, inf. ustna), jak i zwierząt. U ssaków fosforylacja H3T11 jest ograniczona podczas mitozy tylko do centromerów (ref. [14]). U roślin słaby sygnał obejmuje także ramiona chromosomów [14], z wyjątkiem heterochromatyny interstycjalnej, w której histon H3 nie jest ufosforylowany w S w pozycji 10. [20].

Fosforylacja H3S10 i H3S28 z reguły zachodzi w związku z mitozą i rozpoczyna się od regionu centromerowego [9, 14, 16, 20, 25, 58]. U pierwotniaków, nicieni, owadów i ssaków histon H3 z ufosforylowaną S10 jest rozmieszczony homogennie w obrębie chromosomów zarówno podczas mitozy, jak i mejozy (ref. [16]). U ssaków fosforylacja H3S10, rozpoczęta w heterochromatynie przycentromerowej w późnej fazie G2, rozprzestrzenia się na ulegające kondensacji ramiona chromosomów i istnieje aż do zakończenia mitozy (ref. [20]). Natomiast u roślin okrytozalążkowych podczas mitozy poziom fosforylacji histonu H3 jest wysoki tylko w centromerze i w heterochromatynie przycentromerowej, zaś niski wzdłuż ramion chromosomów. Histon centromerowy CENH3 jest szybko defosforylowany podczas przejścia od metafazy do anafazy, a proces defosforylacji wiąże się z kontrolą inicjacji anafazy [58]. Fosforylacja w trakcie dekondensacji chromosomów podstawowego histonu H3 utrzymuje się aż do późnej telofazy, poczem zachodzi jego defosforylacja [14, 16, 20, 32].

Podczas mejozy u roślin okrytozalążkowych fosforylacja histonu H3S10 i H3S28 rozpoczyna się we wczesnej profazie I podziału, w regionie centromerowym, po czym rozprzestrzenia się na ramiona chromosomów [14, 16, 32, 58]. Po zakończeniu I podziału mejozy, następuje defosforylacja [16, 32]. W okresie od metafazy do telofazy II podziału fosforylacja histonu H3 ma miejsce tylko w regionie centromerowym [16, 32]. U zwierząt (na przykładzie konika polnego *Eyprepocnensis plorans*) początek fosforylacji H3S10 zachodzi dopiero w diplotenie, ale w następnych stadiach podziału I mejozy przebiega ona podobnie jak u roślin. Istotna różnica dotyczy II podziału mejozy: fosforylacja H3S10 odbywa się nie tylko w regionie centromerowym, ale i wzdłuż ramion chromosomów [32].

Zastosowanie przeciwciał specyficznych dla centromerowego CENH3 u kukurydzy pozwoliło na stwierdzenie, że fosforylacja S50 w tym histonie rozpoczyna się w późnej profazie I podziału mejozy, następnie zachodzi w heterochromatynie przycentromerowej w histonie H3 podstawowym w S10 i S28 [58].

W policentrycznych (holokinetycznych) chromosomach, w których histon H3 centromerowy, tj. CENP-A rozmieszczony jest wzdłuż zewnętrznej powierzchni chromatyd siostrzanych (tj. od strony biegunów wrzeciona), co stwierdzono u nicienia *Caenorhabditis elegans* [31]. U kosmatki (roślina okrytozalążkowa, *Luzula luzoides* z policentrycznymi chromosomami), wykazano podobną lokalizację histonów H3 z fosforylowaną S w pozycji 10. i 28. [14, 16]. Natomiast u *Arabidopsis thaliana* lokalizacja przeciwciał przeciwko ufosforylowanemu H3S10 nie pokrywa się z umiejscowieniem specyficznego gatunkowo CENH3 (homologu CENP-A) w chromosomach mitotycznych. Wyniki immunobarwienia wykazały obecność CENH3 w zewnętrznej części centromeru (por. wyżej, 2.2), zaś ufosforylowany histon H3S10 znajdował się w centralnej części centromeru [51].

W interfazowych chromosomach politenicznych u *Drosophila* H3S10 dominuje w obszarze międzyprażkowym, tj. w aktywnej transkrypcyjnie euchromatynie [9]. Wyniki licznych badań wskazują, że fosforylacja histonu H3S10 jest wczesną odpowiedzią na indukcję transkrypcji (ref. [25]).

Rezultaty wielu (nieomawianych tu) badań sugerują, że powszechnie występująca fosforylacja histonu H3 w centromerach i w regionie przycentromerowym jest związana z regulacją przebiegu mitozy i mejozy, ponieważ ma ona charakter przejściowy – początek w późnej fazie G2 lub w profazie, defosforylacja – podczas startu anafazy, w którym uczestniczą procesy regulujące punkt kontrolny wrzeciona. Uzyskane dotąd wyniki wskazują, że fosforylacja H3 nie ma związku z epigenetyczną regulacją stanów chromatyny podczas interfazy.

4. WNIOSKI

Przedstawione dane dotyczące charakterystycznych cech heterochromatyny zwanej „konstytutywną” i euchromatyny wskazują, że oba te typy chromatyny różnią się nie tylko rodzajem sekwencji DNA, jego metylacją, kondensacją i wyposażeniem w transkrybowane geny, ale również epigenetycznymi potranslacyjnymi modyfikacjami nukleosomowych histonów H3 i H4. Natomiast właściwością przekształconej strukturalnie i funkcjonalnie euchromatyny jest metylacja DNA i wysoki stopień jej kondensacji, wyciszenie aktywności transkrypcyjnej oraz pojawienie się modyfikacji epigenetycznych histonów H3 i H4, przy zachowaniu takich modyfikacji tych histonów, które są typowe dla euchromatyny. Te różnice i podobieństwa zostały zestawione w tabeli 3, w której dla uproszczenia pominięto takie modyfikacje, które były stwierdzone tylko sporadycznie (por. tab. 1), zaś w odniesieniu do acetylacji były kojarzone z replikacją DNA.

Skondensowany stan skupienia zmodyfikowanej strukturalnie i funkcjonalnie euchromatyny, spowodowany przez charakterystyczne dla heterochromatyny mechaniz-

TABELA 3. Charakterystyczne cechy heterochromatyny "konstytutywnej", euchromatyny i euchromatyny skondensowanej ("heterochromatyny fakultatywnej")

Rodzaj chromatyny	DNA	Stan skupienia chroma- tyny	Modyfikacje epigenetyczne					Białka HP1
			metylacja			acetylacja		
			DNA	H3	H4	H3	H4	
Heterochromatyna "konstytutywna"	sekwencje tandemowe przewaga AT nieliczne geny	skonden- sowany trwale	+	K9 K27	K20	–	–	obecne
Euchromatyna	przewaga GC liczne geny	luźny	–	K4 K36	–	K9 K14	K5 K8	warianty euchro- matynowe
Euchromatyna skondensowana zwana "heterochromatyną fakultatywną"	taki, jak w euchroma- tynie	skonden- sowany przej- ściowo	+	K9 K27 K4 K36	K20	K9 K14	K5	obecne

my, jest jedyną jej właściwością przypominającą heterochromatynę. W przeciwieństwie do heterochromatyny, kondensacja tak zmodyfikowanej euchromatyny jest odwracalna.

W świetle przedstawionych danych termin „heterochromatyna fakultatywna” powinien być zastąpiony przez „euchromatyna skondensowana”, a „heterochromatynizacja” przez „kondensację euchromatyny”, w odróżnieniu od mitotycznej kondensacji chromatyny, której mechanizmy są całkowicie odmienne.

LITERATURA

- [1] BADUGU RK, YOO Y, SINGH PB, KELLUM R. Mutations in the heterochromatin protein (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* 2005; **113**: 370–384.
- [2] BELMONT AS. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**: 632–638.
- [3] BELYAEV ND, HOUBEN A, BARANCZEWSKI P, SCHUBERT I. The acetylation patterns of histones H3 and H4 along *Vicia faba* chromosomes are different. *Chrom Res* 1998; **6**: 59–63.
- [4] BROWN CJ, GREALLY JM. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends Genet* 2003; **19**: 432–438.
- [5] BROWN TA. Genomy. Przekład pod red. P. Węgleńskiego. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001: s. 431 i 433.
- [6] CAIRNS BR. Chromatin remodelling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 185–190.
- [7] COPENHAVER GP i 13 wsp. Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres. *Science* 1999; **286**: 2468–2473.
- [8] COWELL IG i 15 wsp. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* 2002; **111**: 22–36.

- [9] EBERT A, LEIN S, SCHOTTA G, REUTER G. Histone modification and control of heterochromatin gene silencing in *Drosophila*. *Chrom Res* 2006; **14**: 337–392.
- [10] FERGUSON-SMITH A. X inactivation: pre- or postfertilization turn off? *Curr Biol* 2004; **14**: P323–P325.
- [11] FISHER A, HOFFMANN I, NAUMANN K, REUTER K. Heterochromatin proteins and the control of heterochromatic gene silencing in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 2006; **163**: 358–368.
- [12] FRANSZ P, ten HOOPEN R, TESSADORI F. Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chrom Res* 2006; **14**: 71–82.
- [13] FREITAG M, SELKER E. Controlling DNA methylation: many roads to one modification. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 191–199.
- [14] FUCHS J, DEMIDOV D, HOUBEN A, SCHUBERT I. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 199–208.
- [15] FUKS F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 490–495.
- [16] GERNAND D, DEMIDOV D, HOUBEN A. The temporal and spatial patterns of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. *Cytogen Genome Res* 2003; **101**: 172–175.
- [17] HEARD E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**: 247–255.
- [18] HEDIGER F, GASSER SM. Heterochromatin proteins I: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Develop* 2006; **16**: 143–150.
- [19] HOUBEN A, DEMIDOV D, GERNAND D, MEISTER A, LEACH CR, SCHUBERT I. Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* 2003; **33**: 967–973.
- [20] HOUBEN A, WAKO T, FURUSHIMA-SHIMOGAWARA R, PRESTING G, KUNZEL G, SHUBERT I, FUKUI K. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J* 1999; **18**: 675–679.
- [21] HUISINGA KL, BROWER-TOLAND B, ELGIN SCR. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 2006; **115**: 110–122.
- [22] JASENCAKOVA Z, MEISTER A, WALTER J, TURNER BM, SCHUBERT I. Histone H4 acetylation is cell cycle dependent and correlated with replication rather than transcription. *Plant Cell* 2000; **12**: 2087–2100.
- [23] JASNECAKOVA Z, MEISTER A, SCHUBERT I. Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* 2001; **110**: 83–92.
- [24] JASENCAKOVA Z, SOPPE WJJ, MEISTER A, GERNAND D, TURNER BM, SCHUBERT I. Histone modifications in *Arabidopsis* – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* 2003; **33**: 471–480.
- [25] JOHANSEN KM, JOHANSEN J. Regulation of chromatin structure by histone H3 phosphorylation. *Chrom Res* 2006; **14**: 393–404.
- [26] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Cytobiochemia. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2002: 414–415.
- [27] KUNACHOWICZ A, SAKOWICZ T. Mechanizmy determinacji płci u roślin. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 83–99.
- [28] KWIATKOWSKA M. Zmiany struktury jądra a jego aktywność replikacyjna i transkrypcyjna w przebiegu cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1982; **9**: 199–234.
- [29] KWIATKOWSKA M, KAŻMIERCZAK A, POPŁOŃSKA K. RER and protamine – type proteins during *Chara tomentosa* spermiogenesis. *Acta Soc Bot Pol* 2002; **72**: 5–9.
- [30] LAM AL, PAZIN DE, SULLIVAN BA. Control of gene expression and assembly of chromosomal subdomains by chromatin regulators with antagonistic functions. *Chromosoma* 2005; **114**: 242–251.
- [31] MADDOX PS, OEGEMA K, DESAI A, CHEESEMAN JM. “Holo” er than thou: chromosome segregation and kinetochore function in *C. elegans*. *Chrom Res* 2004; **12**: 641–653.
- [32] MANZANERO S, ARANA P, PUERTAS MJ, HOUBEN A. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* 2000; **109**: 308–317.
- [33] MASZEWSKI J, RYBACZEK D. Mechanizmy kondensacji chromosomów. *Post Biol Kom* 2004; **31**, Supl. 22: 145–156.
- [34] MERMOUD JE, POPOVA B, PETERS AHFM, JENUWEIN T, BROCKDORF N. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* 2002; **12**: 247–251.
- [35] MOSIOŁEK M, PASIERBEK P, MALARZ J, MOŚ M, JOACHIMIĄK A. *Rumex acetosa* Y chromosome: constitutive or facultative heterochromatin? *Folia Histochem Cytobiol* 2005; **43**: 161–167.

- [36] NAGAKI K, CHENG Z, OUYANG S, TALBERT PB, KIM M, JONES K, HENIKOFF S, BUELL CR, JIANG J. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nature Genet* 2004; **36**: 138–145.
- [37] NAGAKI K, MURATA M. Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequence in sugarcane. *Chrom Res* 2005; **13**: 195–203.
- [38] OLSZEWSKA MJ. Heterochromatyna w genomie roślin. *Post Biol Kom* 1982; **9**: 243–258.
- [39] OLSZEWSKA MJ. *In situ* DNA targeting by restriction: a critical evaluation. W: Maluszyńska J [red] Plant Cytogenetics. Wyd. Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 1998: 31–38.
- [40] OLSZEWSKA MJ. DNA i białka centromerowe. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 167–185.
- [41] OLSZEWSKA MJ. Struktura i ewolucja kompleksu centromer/kinetochor. *Post Biol Kom* 2004; **31**, Supl. 22: 5–19.
- [42] OLSZEWSKA MJ. Struktura i mechanizmy uczestniczące w prawidłowej segregacji siostrzanych chromatyd. W: Krajewski P, Zwierzykowski Z, Kachlicki P [red.] Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. Rozprawy i monografie nr 11, Instytut Genetyki Roślin, 2004: 25–37.
- [43] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Cytogenetyka molekularna w ustalaniu cech gatunkowych oraz ich zmienności w analizie pokrewieństwa roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 197–218.
- [44] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Budowa genomu jądrowego. W: Olszewska MJ [red] Podstawy cytogenetyki roślin. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2005: 13–55.
- [45] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Ewolucja rozmiarów genomów u roślin okrytozalążkowych. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 737–751.
- [46] PETERS AHFM i 11 wsp. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cells* 2003; **12**: 1577–1589.
- [47] PETERS AHFM, SCHÜBELER D. Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 230–238.
- [48] PIDOUX AL, ALLSHIRE RC. The role of heterochromatin in centromere function. *Phil Trans R Soc B* 2005; **360**: 569–579.
- [49] RANDO OJ. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet* 2007; **23**: 67–73.
- [50] SAKOWICZ T, OLSZEWSKA MJ. DNA content, interphase AgNOR-area, number of 3HrDNA hybridization signals and the methylation level in coding rDNA sequences in different organs of *Lupinus luteus* L. *Genetica* 1997; **99**: 67–72.
- [51] SHIBATA F, MURATA M. Differential localization of the centromere-specific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2963–2970.
- [52] SŁOWNIK BIOLOGII KOMÓRKI [red] Kawiak J, Płytycz B, Zabel M. Polska Akademia Umiejętności, Kraków 2005.
- [53] SMOTHERS JF, HENIKOFF S. The hinge and chromoshadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2555–2569.
- [54] STAWSKI K, DĄBROWSKA G, GOC A. Współzależność pomiędzy metylacją cytozyny i modyfikacjami chromatyny. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 679–696.
- [55] TALBERT PB, BRYSON TD, HENIKOFF S. Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals. *J Biol* 2004; **3**: 18.1–18.17.
- [56] WOJTCZAK A. Rola wybiórczej proteolizy z udziałem proteasomów i ubikwityny w przebiegu procesu spermatogenezy u *Chara vulgaris* L. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Łódzki, 2006.
- [57] VALLEY CM, WILLARD HF. Genomic and epigenomic approaches to the study of X chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Develop* 2006; **16**: 240–245.
- [58] ZHANG X, LI X, MARSHALL JB, ZHONG CX, DAWE RK. Phosphoserines on maize CENTROMERIC HISTONE H3 and histone H3 demarcate the centromere and pericentromere during chromosome segregation. *Plant Cell* 2005; **17**: 572–583.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 29.03. 2007 r.

Przyjęto: 28.05. 2007 r.

Banacha 12/16, 90-237 Łódź

e-mail: olszewsk@biol.uni.lodz.pl