

Poszukiwanie genetycznych przyczyn plastyczności rozwojowej roślin

Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski, dr Katarzyna Brzeska-Olczak, dr Tomasz Sarnowski, Uniwersytet Warszawski i Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Podstawowe problemy badawcze i ich tło

Dziedziczenie epigenetyczne - znaczenie w ewolucji organizmów na Ziemi i molekularne podłoże

Mój zespół interesuje odpowiedź na pytanie, **jakie szczególne mechanizmy regulacyjne na poziomie genów odpowiadają za sterowanie rozwojem złożonych organizmów tkankowych, a w szczególności, czy wśród tych mechanizmów da się wyróżnić takie, które miały podstawowe znaczenie dla rozdzielania się w odległej przeszłości linii ewolucyjnych, prowadzących do współczesnych zwierząt i roślin?**

Podłoże problemu można przedstawić następująco: Organizm wielokomórkowy stanowi niezwykle skomplikowany, w pełni zintegrowany system współdziałających tkanek i narządów, zbudowany z miliardów komórek, z których każda wyposażona jest w taki sam, kompletny zestaw genów. Ten złożony twór powstaje z pojedynczej komórki - zapłodnionej komórki jajowej - w wyniku procesu zwanego rozwojem. Wszystkie informacje o budowie i funkcjonowaniu przyszłego dojrzałego organizmu, a także kolejnych stadiów na drodze jego powstawania, zawarte są w materiale genetycznym tej pojedynczej, inicjalnej komórki. Dzisiaj wiemy, że jednym z kluczowych „wynałzków” ewolucyjnych, który przyczynił się do powstania organizmów tkankowych, było wykształcenie mechanizmu pamięci komórkowej. Umożliwia on trwałe zróżnicowanie genetycznie identycznych komórek pod względem profilu ekspresji (odczytywania) genów, a co za tym idzie, powstawanie z genetycznie tożsamyh komórek - różniących się budową i funkcją tkanek. Dzięki istnieniu pamięci komórkowej, raz ustanowiony wzór ekspresji genów, charakterystyczny dla konkretnej tkanki, jest zachowywany, mimo że komórki tej tkanki przechodzą kolejne podziały, tj. przekształcają się w komórki potomne. Na przykład, jeżeli w komórce konkretnej tkanki, w trakcie jej rozwoju, ekspresja genu X

została zahamowana, to zmiana ta dziedziczy się we wszystkich pochodzących z niej komórkach potomnych, mimo że sam gen nie został utracony ani zmieniony przez fizyczną zmianę zapisu, tj. mutację. Ten rodzaj dziedziczenia, kluczowy dla funkcjonowania pamięci komórkowej i nie wymagający zmiany w sekwencji DNA, nazywamy epigenetycznym, dla odróżnienia od dziedziczenia efektów wywołanych mutacjami w DNA.

Wiedza nagromadzona w ciągu ostatnich 10 lat wskazuje, że w komórkach mechanizmy regulacji epigenetycznej działają przede wszystkim na poziomie chromatyny, to jest nukleoproteinowego kompleksu między DNA a zasadowymi białkami jądrowymi – histonami. Czym dokładnie jest chromatyna i jaka jest jej ewolucyjna historia? Chromatyna organizmów eukariotycznych (ich komórki posiadają wydzielone jądro komórkowe, należą do nich m. in. współczesne rośliny i zwierzęta) zbudowana jest z regularnych jednostek strukturalnych - nukleosomów, z których każdy składa się z liczącego około 200 par zasad odcinka DNA owiniętego blisko dwukrotnie wokół białkowego rdzenia (oktameru) utworzonego przez osiem cząsteczek histonów. W skład białkowego oktameru wchodzi po dwie cząsteczki każdego z czterech rodzajów histonów: H2A, H2B, H3 i H4, zwanych histonami rdzeniowymi. DNA i histony rdzeniowe tworzą tzw. nukleosomową cząstkę rdzeniową. Kompletny nukleosom zawiera jeszcze jedną cząsteczkę białka zaliczanego do rodziny histonów. Jest to histon H1, zwany też histonem łącznikowym, ponieważ oddziałuje także z DNA łączącym cząstki rdzeniowe sąsiadujących nukleosomów. H1 stabilizuje końce helisy DNA na powierzchni białkowego oktameru i wspomaga tworzenie regularnych struktur wyższego rzędu w chromatynie, w szczególności włókna o średnicy 30 nm, czyli tzw. solenoidu, który jest podstawową formą chromatyny w jądrze. W trakcie ewolucji organizmy eukariotyczne wykształciły szereg oryginalnych mechanizmów regulacji genetycznej, nie występujących u prościej zorganizowanych organizmów prokariotycznych (takich jak bakterie). Jedną z najbardziej istotnych nowości była zmiana podstawowej strategii regulacji genetycznej. Zamiast utrzymywania genów i ich rejonów promotorowych (odcinki DNA sterujące transkrypcją genów) w stanie ciągłej dostępności dla systemu odczytywania informacji (polimerazy RNA), jak to ma miejsce u prokariotów, w komórce eukariotycznej DNA znajduje się w stanie permanentnej represji. Strukturą odpowiedzialną za ten stan jest chromatyna. Nukleosom, podstawowa jednostka budulcowa chromatyny, skutecznie przeciwdziała

inicjacji odczytywania (transkrypcji) informacji zawartej w DNA, najprawdopodobniej na skutek hamującego wpływu tworzenia się nukleosomu na składanie kompleksu inicjacyjnego. Występowania DNA w stanie podstawowej represji blokuje także inne procesy wymagające dostępu do DNA, jak modyfikacja DNA (np. przez metylację), czy integracja obcego DNA do genomu. Niedostępność DNA eukariontów dla czynników związanych z odczytywaniem i przetwarzaniem informacji genetycznej pociągnęła za sobą wykształcenie się w trakcie ewolucji specjalnych mechanizmów, umożliwiających kontrolowany dostęp do DNA. To właśnie te mechanizmy stały się podłożem dziedziczenia epigenetycznego i umożliwiły powstanie systemu pamięci komórkowej. Ich istotą jest samowzmacniająca się sieć interakcji pomiędzy specyficznymi modyfikacjami chemicznymi białkowych składników nukleosomów - histonów (przede wszystkim poprzez acetylację i metylację), modyfikacją poprzez metylację jednej z zasad w DNA - cytozyny i wymagającym energii, tj. zależnym od ATP, przebudowywaniem nukleosomów. We wspomnianej wyżej sieci interakcyjnej uczestniczą też liczne inne białka o wyspecjalizowanych funkcjach. Poprzez determinację dwóch podstawowych typów struktur wyższego rzędu w chromatynie: nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny i aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny, mechanizmy te umożliwiają ustanawianie tkankowo-specyficznych wzorów ekspresji genów. Co najważniejsze jednak, raz ustanowione struktury chromatynowe są wiernie dziedziczone w kolejnych pokoleniach, bez konieczności zmian w sekwencji DNA.

Rośliny a zwierzęta

Zarówno współczesne rośliny, jak i zwierzęta reprezentują złożone organizmy tkankowe, jednak ich strategie życiowe, a co za tym idzie wykształcone przystosowania, zasadniczo się różnią. Pomijając różnice dotyczące sposobu odżywiania, rośliny, w odróżnieniu od większości zwierząt, prowadzą osiadły tryb życia, co uniemożliwia im ucieczkę przed skutkami zmian w środowisku zewnętrznym. Muszą w związku z tym polegać na dostosowywaniu swojej postaci zewnętrznej i sposobu funkcjonowania do panujących na zewnątrz warunków. Chodzi tu o takie elementy środowiska, jak temperatura, naświetlenie, dostępność wody, zasolenie, a także obecność roślinożerców. Jednym z charakterystycznych objawów przystosowań u roślin jest zdolność odtwarzania (regeneracji) całych

organizmów z elementów zróżnicowanych już tkanek, na przykład fragmentów liścia, czy łodygi, a nawet z pojedynczych zróżnicowanych komórek (tzw. komórek somatycznych). Komórki roślin są zatem w stanie przejść proces odróżnicowania do stanu totipotencji rozwojowej, właściwego normalnie tylko dla komórek zarodkowych. Takich właściwości nie wykazują zwierzęta, u których różnicowanie komórek jest w większości nieodwracalne. To z tego powodu jedynym sposobem odtworzenia organizmu zwierzęcego z komórki somatycznej jest skomplikowana i nie zawsze skuteczna technologia klonowania, polegająca na umieszczeniu jądra komórki somatycznej w pozbawionej własnego jądra komórce jajowej. Dostępność kompletnej sekwencji genomu modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik) i szeregu przedstawicieli świata zwierząt, np. *Drosophila melanogaster* (muszka owocowa), *Homo sapiens* (człowiek) - umożliwia analizę porównawczą mechanizmów rozwoju u roślin i zwierząt. Rezultaty takiej analizy wskazują, że w tych dwóch królestwach procesy fundamentalne dla rozwoju (jak tworzenie struktur morfologicznych, czy sygnalizacja międzykomórkowa) są kontrolowane przez niepodobne (niehomologiczne) geny (Meyerowitz, 2002). A zatem, u roślin i u zwierząt procesy te ewoluowały niezależnie. W przeciwieństwie do tego, mechanizmy regulatorowe na poziomie chromatyny są w znacznym stopniu konserwowane ewolucyjnie. Podobieństwo (homologia) dotyczy nie tylko głównych białek strukturalnych – histonów, ale także wielu innych białek, w tym odpowiedzialnych za modyfikacje histonów i remodelowanie nukleosomów (Verbsky i Richards, 2001). Co ciekawe, homologiczne są także ważne strategie kontrolne. Na przykład, zarówno u zwierząt, jak i u roślin białka z grupy Polycomb (Pc-G) są odpowiedzialne za represję najważniejszych genów regulatorowych (tzw. genów homeotycznych) w trakcie rozwoju (Meyerowitz, 2002). Nawet pobieżna analiza przytoczonych wyżej różnic między komórkami zwierzęcymi a roślinnymi wskazuje jednak, że zależne od chromatyny mechanizmy regulatorowe, mimo iż wyewoluowały od wspólnego pnia, nie mogą być dokładnie takie same. W szczególności, unikatowa zdolność somatycznych komórek roślinnych do odróżnicowywania, tj. przeprogramowania genetycznego, wymaga aktywnych mechanizmów zapewniających plastyczność represji kluczowych genów rozwojowych na poziomie chromatyny. Podobne mechanizmy mogą nie występować u zwierząt (Weigel i Jurgens, 2002). Czy zatem można ustalić, jakie elementy konserwowanych

ewolucyjnie, związanych z chromatyną mechanizmów pamięci komórkowej, odpowiadają za charakterystyczną tylko dla roślin plastyczność rozwojową?

OSIĄGNIĘCIA BADAWCZE

Ogólnym celem prowadzonych przez nas badań było poznanie roli biologicznej i molekularnych mechanizmów działania aparatu odpowiedzialnego za przebudowę (remodelowanie) chromatyny oraz roli biologicznej i mechanizmów działania histonów z grupy H1 (łącznikowych) w kluczowych procesach rozwoju u roślin. W szczególności, opierając się na naszych poprzednich wynikach i na częściowo już wypróbowanych w naszym laboratorium nowych podejściach molekularnych i genetycznych, zamierzaliśmy: 1) ustalić skład i właściwości biochemiczne głównego kompleksu remodelującego chromatynę (tzw. kompleksu SWI/SNF) oraz jego rolę w kontroli wczesnej i późnej fazy rozwoju u *Arabidopsis*; 2) odkryć mechanizm działania i ustalić elementy odpowiadające za lokalizację w jądrze komórkowym *Arabidopsis* białka DDM1 (Decrease in DNA Methylation 1), pełniącego podstawową rolę w kontroli stanu metylacji DNA w chromatynie; 3) ustalić funkcję histonów łącznikowych w utrzymywaniu wzoru dziedzicznych modyfikacji DNA i białek w chromatynie.

1) *Remodelowanie chromatyny przez zależne od ATP kompleksy typu SWI/SNF*

Remodelowanie chromatyny, niezbędne w takich procesach jak regulacja transkrypcji, replikacja, składanie nukleosomów czy rekombinacja, wymaga wyspecjalizowanych enzymów, które wykorzystują energię z hydrolizy ATP do zmiany stanu chromatyny. Badania genetyczne i biochemiczne doprowadziły do oczyszczenia i charakterystyki różnych typów enzymów remodelujących z drożdży, *Drosophila* i ssaków. Wszystkie dotąd scharakteryzowane enzymy należą do dużej rodziny ATPaz typu SNF2 i wszystkie okazały się składnikami wielo-białkowych kompleksów, zawierających od 2 do ponad 10 różnych podjednostek. Typ podjednostek zasocjowanych z danym enzymem jest zwykle konserwowany pomiędzy liniami ewolucyjnymi.

Scharakteryzowany u drożdży prototypowy kompleks SWI/SNF (SWI_{Itch}/Sucrose-Non-Fermenting) zbudowany jest wokół ATPazy SWI2/SNF2,

kanonicznej dla całej podrodziny ATPaz remodelujących (Cote et al., 1994). Unikatową cechą podrodziny ATPaz SWI2/SNF2 jest obecność na C-końcu liczącej około 110 aminokwasów bromodomeny, fragmentu zdolnego do rozpoznawania acetylowanych histonów rdzeniowych. Wszystkie scharakteryzowane dotychczas kompleksy typu SWI/SNF zawierają minimalny strukturalny i funkcjonalny rdzeń zbudowany z czterech konserwowanych ewolucyjnie podjednostek. Są to homologi następujących białek drożdżowych: SWI2/SNF2 (ATPaza, główna podjednostka katalityczna), SNF5, SWI3 i SWP73. U drożdży występują dwa blisko spokrewnione kompleksy: SWI/SNF i RSC. Każdy z nich zawiera ATPazę typu SWI2/SNF2 oraz 10 lub więcej podjednostek, z których kilka jest identycznych albo bardzo podobnych. Kompleks SWI/SNF kontroluje zaledwie ok. 6% genów u drożdży i nie jest niezbędny do przeżycia, natomiast kompleks RSC, który kontroluje procesy podziału, jest niezbędny do wzrostu. Odkrycie ludzkich homologów ATPazy SWI2/SNF2 – białek hBrm i BRG1, doprowadziło do oczyszczenia i scharakteryzowania ludzkich kompleksów typu SWI/SNF. Składają się one, z co najmniej 8 podjednostek. Obok ATPazy SWI2/SNF2 zawierają homologi podjednostek SNF5 (INI1) i SWI3 (BAF155 i BAF170). Skład tych kompleksów jest bardziej zróżnicowany niż u drożdży, co wskazuje, że mogą być zaangażowane w kontrolę różnych procesów rozwojowych (Wang et al., 1996). Podobny kompleks, nazwany BRM, wyizolowano z *Drosophila*. Zawiera on homologi białek występujących w kompleksach u drożdży i człowieka (Kal et al., 2000). U *Drosophila* podjednostka odpowiadająca ATPazie (Brahma) oraz homologi SNF (SR1) i SWI3 (Moir) należą do białek z grupy Trithorax, będących regulatorami genów homeotycznych (Crosby, 1999).

Zarówno dane doświadczalne (Brzeski et al., 1999; Sarnowski et al., 2002) jak i bioinformatyczne analizy baz danych (Verbsky i Richards, 2001; Brzeski et al., 2003) wskazują, że występowanie u roślin kompleksów odpowiadających prototypowemu SWI/SNF jest wysoce prawdopodobne. Jednakże do tej pory, mimo wysiłków, w żadnym z licznych pracujących nad tym zagadnieniem laboratoriów nie udało się takich kompleksów wydzielić w całości i scharakteryzować. U *Arabidopsis* zidentyfikowano białko BSH będące homologiem drożdżowej podjednostki SNF5 i wykazano, że kodujący je cDNA komplementuje mutację *snf5* u drożdży (Brzeski et al., 1999). U tej rośliny, obok kodowanego przez pojedynczy gen białka typu SNF5, występują cztery białka o potencjalnej funkcji ATPazy typu SWI2/SNF2, cztery białka - homologi SWI3 i dwa białka – homologi SWP73 (Brzeski et al., 2003). Obecność

konserwowanych ewolucyjnie miejsc wiązania we wszystkich czterech homologach SWI3 i w co najmniej dwóch homologach ATPazy SWI2/SNF2 oraz fakt, że przynajmniej trzy z czterech homologów SWI3 mogą ze sobą oddziaływać i tworzyć heterodimery (Sarnowski et al., 2002) wskazuje, że w *Arabidopsis* mogą występować zróżnicowane kompleksy typu SWI/SNF, charakteryzujące się różnymi kombinacjami podjednostek rdzeniowych. Przypomina to sytuację u człowieka (Sif et al., 2001). Wydaje się prawdopodobne, że odmienne warianty kompleksów typu SWI/SNF działają w różnych warunkach fizjologicznych i/lub różnych fazach rozwoju rośliny. Niedawno wykazano, że gen *SPLAYED* (*SYD*) kodujący jeden z czterech wspomnianych homologów (*At2g28290*) ATPazy typu SWI2/SNF2, jest ważnym ogniwem kontroli czasu przejścia fazy wegetatywnej w generatywną u *Arabidopsis*. *SYD* jest również zaangażowany w kontrolę ekspresji homeotycznych genów kwiatowych, kontrolę merystemów w trakcie rozwoju generatywnego i prawidłową morfogenezę słupków i zalążków (Wagner i Meyerowitz, 2002). Obniżenie za pomocą strategii antysensu poziomu ekspresji unikatowego w genomie *Arabidopsis* genu *BSH* kodującego homolog SNF5, powinno spowodować częściową inaktywację wszystkich rodzajów kompleksów typu SWI/SNF. Rośliny transformowane konstruktem anti-*BSH* wykazywały plejotropowe fenotypy, w tym redukcję dominacji wierzchołkowej i niepłodność (Brzeski et al., 1999). Sugeruje to udział *BSH* w kontroli wielu funkcji fizjologicznych. Wykazane ostatnio oddziaływanie jednego z homologów (*At2G33610*) SWI3 w *Arabidopsis* z białkiem *FCA* regulującym czas kwitnienia (Sarnowski et al., 2002) potwierdza hipotezę, że w roślinie tej może występować rodzina wyspecjalizowanych kompleksów typu SWI/SNF. Niedawno zidentyfikowaliśmy, we współpracy z laboratorium Dra Csaby Koncza z Instytutu Hodowli Roślin Maxa Plancka w Kolonii, linie *Arabidopsis* z mutacjami w każdym z czterech genów (*AtSWI3A*, *AtSWI3B*, *AtSWI3C* i *AtSWI3D*), kodujących odmienne warianty podjednostek rodziny SWI3. Analiza roślin homozygotycznych z mutacjami typu „null” (całkowite wyłączenie funkcji badanego genu) wykazała, że geny *AtSWI3A* i *AtSWI3B* są niezbędne dla przeżycia w stadium wczesnego rozwoju post-zygotycznego. W przeciwieństwie do nich, homozygoty z mutacjami „null” w genach *AtSWI3C* i *AtSWI3D* przeżywają, wykazują jednak bardzo charakterystyczne defekty rozwojowe, zarówno w organach wegetatywnych, jak i w kwiatach. Dodatkowo, mutacja *Atswi3d* powoduje karłowatość. Rośliny *Atswi3d* i *Atswi3c* wykazują zmienioną organizację komórek w liściach, jednak wzdłuż innych osi symetrii, co

sugeruje, że odpowiadające im geny mogą być zaangażowane w koordynację szlaków kontroli morfogenezy tych organów. Zaobserwowaliśmy uderzające podobieństwo szeregu efektów fenotypowych pojawiających się u mutantów *Atswi3c*, *Atswi3d* oraz w mutancie w genie *Atsnf2*, kodującym potencjalną ATPazę SNF2, co może wskazywać na udział tych trzech genów w tym samym szlaku kontrolnym. Co ciekawe jednak, mutacja typu „null” w genie ATPazy AtSNF2 nie jest letalna, co wskazuje, że nie jest to ATPaza oddziałująca z wariantami AtSWI3A i AtSWI3B. Ponieważ AtSNF2 jest jedyną roślinną ATPazą zawierającą bromodomenę, wynik ten dowodzi, że przynajmniej część systemu przebudowy chromatyny u roślin nie wymaga zależnego od obecności bromodomeny rozpoznawania histonów modyfikowanych poprzez acetylację. Podobna cecha przebudowy chromatyny nie występuje u innych organizmów.

2) Rola DDM1 w kontroli metylacji DNA

U ssaków, metylacja cytozyny w DNA do 5-metylo cytozyny oraz układ enzymów i białek strukturalnych odpowiedzialnych za wprowadzanie i utrzymywanie tej modyfikacji, odgrywają krytyczną rolę w rozwoju, a także w powstawaniu chorób genetycznych i nowotworów (Robertson, 2001). Rośliny kwiatowe stanowią cenny model i naturalny układ odnośnikowy w badaniach nad biologicznym znaczeniem metylacji DNA. Z wyjątkiem roślin kwiatowych i ssaków, żaden inny powszechnie stosowany w badaniach eukariotyczny organizm modelowy (np. *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*) nie wykazuje metylacji DNA. U *Arabidopsis*, podobnie jak u ssaków, metylacja DNA jest odpowiedzialna za imprinting ojcowskich i matczyńskich alleli w trakcie gametogenezy i wczesnego rozwoju. Występowanie 5-metylo cytozyny wyróżnia w genomie rejony nieczynnej transkrypcyjnie konstytutywnej heterochromatyny, zlokalizowane przede wszystkim w centromerach, obszarach pericentromerycznych i telomerach, w których występują liczne sekwencje powtarzalne i transpozony. Metylacja DNA może również powodować wyciszenie transkrypcyjne sekwencji jednokopijnych, a także transgenów. Metylacja występuje najczęściej w obrębie symetrycznych miejsc CpG, rzadziej w niesymetrycznych miejscach CpNpNp. W *Arabidopsis*, obok miejsc CpG i CpNpNp, wykryto ją także w symetrycznych miejscach CpNpG. Badania przeprowadzone na różnych organizmach wykazały, że metylacja DNA jest skorelowana z metylacją lizyny

9 histonu H3 (H3K9). Ta ostatnia modyfikacja stwarza miejsce wiązania dla białka HP1 (Heterochromatin Protein1), indukującego heterochromatyzację. Metylację cytozyny w DNA i metylację H3K9 można zatem uznać za epigenetyczne znaczniki sygnalizujące stan nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny i prawdopodobnie kooperujące w jego utrzymywaniu i mitotycznej propagacji. Ostatnio pojawiły się silne przesłanki wskazujące na rolę małych RNA w indukowaniu procesów metylacji histonu H3 i metylacji DNA oraz w ustanawianiu rejonów heterochromatyny w jądrze. W dalszej części, dla uproszczenia, procesy regulatorowe związane z małymi RNA określać będę jako zjawiska RNAi (RNA interference).

Przesiewowe badania mutantów *Arabidopsis* doprowadziły do zidentyfikowania dwóch genów o kluczowym znaczeniu dla utrzymywania globalnego wzoru metylacji DNA. Pierwszy z nich koduje metylotransferazę DNA (MET1) odpowiedzialną za metylację miejsc CpG (Roemus et al., 1996), stanowiących główny cel metylacji w *Arabidopsis*. Drugi ze zidentyfikowanych genów koduje białko nazwane DDM1 (od Decrease in DNA Methylation1), którego homologi występują także u ssaków (Jeddeloh et al., 1999a; Jeddeloh et al., 1999b). Sekwencja DDM1 wykazuje homologię do zależnych od DNA ATPaz z grupy SNF2. Zarówno w mutantach *met1*, jak i *ddm1*, obserwuje się dramatyczny spadek stopnia zmetylowania DNA, czemu towarzyszy uaktywnienie transkrypcji wyciszonych normalnie sekwencji pericentromerycznych, a także retrotranspozonów i szeregu genów kodujących białka. Mimo tych podobieństw, mutanty *met1* i *ddm1* wykazują też uderzające różnice. W mutantach *met1* raptowna demetylacja dotyczy zarówno sekwencji powtarzalnych jak i jednokopijnych. W mutantach *ddm1* raptowna demetylacja obejmuje tylko sekwencje powtarzalne. Sekwencje jednokopijne są natomiast demetylowane stopniowo, w kolejnych pokoleniach otrzymywanych w wyniku wsobnego krzyżowania mutantu. Nasze badania prowadzone na oczyszczonym, rekombinowanym białku DDM1 z *Arabidopsis* wykazały, że jest ono aktywowaną przez DNA i nukleosomy ATPazą, która jest w stanie samodzielnie zmieniać pozycję nukleosomu na DNA (Brzeski i Jerzmanowski, 2003). Jest to zatem klasyczny enzym remodelujący chromatynę. Te dane wskazują na istnienie funkcjonalnego związku między zależnym od ATP remodelowaniem chromatyny a globalnym stanem metylacji DNA. Nie jest jednak jasne, na czym ten związek polega, np. czy DDM1 umożliwia aktywną metylację DNA i H3K9 poprzez rozkręcanie włókna chromatynowego w trakcie replikacji, czy też działa jako czynnik

kondensujący, wspomagając utrzymywanie wprowadzonych już przedtem modyfikacji. Nie wiadomo także, co kieruje DDM1 do poszczególnych obszarów chromatyny.

Nasze badania zmierzały do ustalenia wewnątrzjądrowej lokalizacji DDM1 oraz czynników odpowiedzialnych za kierowanie tego białka do określonych rejonów chromatyny. Za pomocą mikroskopowej analizy immunoznakowania (z przeciwciałem do DDM1) stwierdziliśmy, że w roślinach typu dzikiego (wt) DDM1 jest wykrywany przede wszystkim w heterochromatynie pericentromerycznej. Przeciwciało do DDM1 daje także rozmyty sygnał w rejonach euchromatynowych, ale jest całkowicie niewykrywalne wewnątrz chromocentrów, tj. w obszarach najsilniej skondensowanej heterochromatyny. W celu wykrycia czynników wpływających na lokalizację DDM1 w jądrze, wykonaliśmy analizę immunoznakowania dla szeregu mutantów *Arabidopsis*. Stwierdziliśmy, że silne obniżenie metylacji DNA charakteryzujące mutanty *met1* i *cmt3* (w dwóch różnych metylotransferazach DNA), a także zanik metylacji lizyny 9 w histonie H3 (mutant *kyp*), nie wpływają na wzór lokalizacji DDM1 w jądrze. W związku z tym, rozszerzyliśmy naszą analizę o mutanty w genach kontrolujących procesy związane z RNAi. Stwierdziliśmy, że lokalizacja DDM1 jest silnie zmieniona w mutancie *hua2-1*. Zmiana polega na przemieszczeniu się sygnału pochodzącego z przeciwciała do DDM1 z rejonu pericentromerowego do wnętrza chromocentrów. Według analiz genetycznych wykonanych w innych laboratoriach białko HUA2 jest zaangażowane w regulację wykorzystującą RNAi. Białko to zawiera domenę PWWP, zdolną do rozpoznawania metylowanego DNA i domenę PRP, która wiąże RNA. Co ciekawe, wykonana przez nas dla mutantu *hua2-1*, za pomocą immunofluorescencji z odpowiednimi przeciwciałami, analiza rozmieszczenia wewnątrz jądrowego głównych markerów epigenetycznych: metylowanej lizyny 4 i metylowanej lizyny 9 histonu H3 oraz acetylowanego histonu H4, nie wykazała żadnych zmian. Zaobserwowaliśmy jednakże zmiany poziomu metylacji DNA w wybranych loci centromerowych, pericentromerowych i euchromatynowych. Co więcej, zmiany te były skorelowane ze zmianami aktywności transkrypcyjnej (badanej za pomocą RT-PCR) występujących w tych loci genów. Obecnie analizujemy szczegółowo wzór lokalizacji DDM1 za pomocą metody ChIP (Chromatin Immunoprecipitation). Potwierdzenie związku między lokalizacją DDM1 a procesami związanymi z RNAi stanowiłoby niezwykle istotne uzupełnienie wiedzy

o komórkowych mechanizmach kontrolujących stan metylacji DNA i globalną aktywność transkrypcyjną genomu.

3) Histony H1 (łącznikowe) i ich funkcja w chromatynie

Złożona organizacja strukturalna włókna chromatynowego ma kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji genów u eukariontów. Rola histonów rdzeniowych (H2A, H2B, H3 i H4) w modulowaniu struktury chromatyny i regulacji ekspresji genów jest obecnie stosunkowo dobrze poznana (Jenuwein i Allis, 2002; Kornberg i Lorch, 1999). W przeciwieństwie do tego, niewiele wiadomo o biologicznej funkcji histonów typu H1 (łącznikowych). Pomimo ich konserwatywności ewolucyjnej (Kasinsky et al., 2001; Jerzmanowski, 2004) i wiązania się w krytycznym miejscu na powierzchni nukleosomu, obecność histonów łącznikowych nie jest niezbędna do przeżycia u takich organizmów, jak należąca do protistów *Tetrahymena* czy grzybów (Jerzmanowski, 2004). Badania *in vivo* nad funkcją histonów H1 u roślin i zwierząt są utrudnione ze względu na występowanie u tych organizmów szeregu nie allelicznych wariantów tych białek, które mogą się wzajemnie zastępować (Prymakowska-Bosak et al., 1999; Przewłoka et al. 2002).

Do badań nad funkcją wariantów H1 w rozwoju ssaków wykorzystano na szeroką skalę technologię eliminacji odpowiednich genów u myszy. Wyniki tych badań wykazały, że indywidualne warianty, łącznie z wariantem H1⁰ specyficznym dla tkanek całkowicie zróżnicowanych, a także H1t występującym tylko w gonadach męskich, nie są niezbędne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju. Co więcej, efektów w rozwoju nie obserwowano również w przypadku podwójnych eliminacji obejmujących H1t i poszczególne warianty somatyczne. Wynika to z wydajnej kompensacji eliminowanych wariantów przez pozostałe warianty H1. Fakt ten odzwierciedla istnienie silnej presji na zachowanie fizjologicznej proporcji H1:nukleosomy w chromatynie. Jednakże, myszy pozbawione 3 głównych wariantów somatycznych H1 (otrzymane w wyniku krzyżowania różnych linii), w których poziom ogólnego H1 został obniżony o prawie 50%, umierały w 10 dniu rozwoju zarodka, co dowodzi, że histony łącznikowe są niezbędne dla prawidłowego rozwoju ssaków (Fan et al., 2003). Rośliny, ze względu na odmienną strategię wzrostu i różnicowania, nadają się znacznie lepiej niż ssaki do badania skomplikowanych fenotypów rozwojowych. Z tego powodu wydają się idealnym obiektem do badania

efektów obniżenia ekspresji lub całkowitej eliminacji genów, które – jak histony łącznikowe – mogą się okazać krytyczne dla wczesnych etapów rozwoju.

W wyniku starannej analizy homologii w obrębie całego genomu *Arabidopsis*, uwzględniającej zarówno kompletne, jak i sub-domenowe sekwencje białek, zidentyfikowaliśmy wszystkie występujące w tej roślinie geny kodujące warianty histonu H1. Są to geny kodujące białka: H1-1, H1-2 i H1-3. Zastosowaliśmy następnie strategię RNAi (konstrukt fuzyjny składający się z elementów sekwencji *H1-1*, *H1-2* i *H1-3*, stanowiący matrycę dla dwuniciowego RNA) do zahamowania ekspresji wszystkich trzech wymienionych genów jednocześnie. Rośliny transgeniczne z ponad 90% redukcją ekspresji całkowitego H1 (liczonego jako suma trzech wariantów) wykazywały całe spektrum defektów rozwojowych, z których niektóre przypominały defekty występujące u mutantów z zaburzeniem w metylacji DNA. W kolejnych pokoleniach, defekty te dziedziczyły się niezależnie od konstrukt powodującego wyciszenie transkrypcji genów *H1*. Przeprowadziliśmy analizę metylacji DNA niezależnie w 17 roślinach pochodzących z pokoleń F1, F2 i F3, badając 7 różnych loci i stosując różne techniki analityczne. Stwierdziliśmy, że obniżenie ekspresji genów H1 nie spowodowało wprawdzie zasadniczych zmian w ogólnym poziomie metylacji DNA w genomie, było jednak skorelowane z występowaniem przypadkowych, niewielkich, ale istotnych statystycznie zmian we wzorze metylacji zarówno sekwencji powtarzalnych jak i jednokopijnych (Wierzbicki i Jerzmanowski, 2004). Dane te wskazują na istotną i nierozpoznaną dotąd funkcję histonów typu H1 w utrzymywaniu specyficzności profilu metylacji genomowego DNA.

Konkluzje i znaczenie uzyskanych wyników

Nasze badania doprowadziły do:

- 1. odkrycia unikatowych dla roślin cech systemu pamięci komórkowej związanej z przebudową chromatyny;**
- 2. udokumentowania, że rola białka DDM1 kontrolującego stan kluczowej dla funkcji komórek roślin i ssaków modyfikacji DNA przez metylację, polega na przebudowie struktury chromatyny z udziałem ATP oraz, że mechanizm kierowania DDM1 do konkretnych rejonów w jądrze może być związany z metabolizmem RNA;**

3. wykazania, że histony z klasy H1 są elementami systemu pamięci komórkowej, determinującymi specyficzną specyficznosc procesów metylacji DNA.

Literatura:

Brzeski, J., Podstolski, W., Olczak, K. and Jerzmanowski, A. (1999) Identification and analysis of the Arabidopsis thaliana BSH gene, a member of the SNF5 gene family. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2393-2399.

Fan, Y., T. Nikitina, E. M. Morin-Kensicki, J. Zhao, T. R. Magnuson, C. L. Woodcock and A. I. Skoultchi (2003) H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **13**: 4559-4572.

Jeddeloh, J.A., Stokes, T.L. and Richards, E.J. (1999a) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics* **22**, 94-97.

Jeddeloh, J.A., Bender, J. and Richards, E.J. (1999b) The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes and Development* **12**, 1714-1725. Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2002) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.

Kasinsky, H. E., Lewis, J. D., Dacks, J. B. and Ausio, J. (2001) Origin of H1 linker histones. *FASEB J.* **15**, 34-41.

Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.

Meyerowitz, E.M. (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **22**, 1482-1485.

Prymakowska-Bosak, M., Przewłoka, M.R., Slusarczyk, J., Kuras, M., Lichota, J., Kilianczyk, B., and Jerzmanowski, A. (1999). Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *The Plant Cell* **11**, 2317-2329.

Robertson, K.D (2001) DNA methylation, methyltransferases and cancer. *Oncogene* **20**, 3139-3155.

Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J. and Dellaporta, S.L. (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. *Science* **273**, 654-657.

Sif, S., Saurin, A.J, Imbalzano, A.N. and Kingston, R.E. (2001) Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes and Dev.* **15**, 603-618.
Verbsky, M.L., and Richards, E.J. (2001) Chromatin remodeling in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 494-500.

Wagner, D. and Meyerowitz, E.M. (2002) SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in Arabidopsis. *Current Biology* **12**, 85-94.

Wang, W., Cote, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P.A., Biggar, S.R., Muchardt, C., Kalpana, G.V., Goff, S.P., Yaniv, M., Workman, J.L. and Crabtree, G.R. (1996) Purification and biochemical heterogeneity of mammalian SWI-SNF complex. *EMBO Journal* **15**, 5370-5382.

Weigel, D. and Jürgens, G. (2002) Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-754.

Publikacje naukowe będące wynikiem omawianych badań:

- **Jerzmanowski, A.**, Przewłoka, M., Grasser, K. (2000) Linker Histones and HMG1 Proteins of Higher Plants. *Plant Biology* **2**, 586-597.
- Kaczanowski, S. and **Jerzmanowski, A.** (2001) Evolutionary Correlation Between Linker Histones and Microtubular Structures. *J. Mol. Evol.* **53**, 19-30.

- Przewloka, M.R., Wierzbicki, A.T., Ślusarczyk, J., Kuraś, M., Grasser, K.D., Stemmer, C. and **Jerzmanowski, A.** (2002) The 'drought-inducible' histone H1s of tobacco play no role in male sterility linked to alterations in H1 variants. **Planta** 215, 371-379.
- Sarnowski, T.J., Świeżewski, S., Pawlikowska, K., Kaczanowski, S. and **Jerzmanowski, A.** (2002) AtSWI3B, an Arabidopsis homolog of SWI3, a core subunit of yeast Swi/Snf chromatin remodeling complex, interacts with FCA, a regulator of flowering time. **Nucleic Acids Res.** 30, 3412-3421.
- Brzeski, J. and **Jerzmanowski, A.** (2003) Deficient in DNA Methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin remodeling factors. **J. Biol. Chem.** 278, 823-828.
- Brzeski, J., Dyczkowski, J., Kaczanowski, S., Zielenkiewicz, P. and Jerzmanowski, A. (2003) Plant chromatin - learning from similarities and differences. **Adv. in Botanical Res.** 40, 107-142.
- **Jerzmanowski, A.** (2004) The linker histones. in **Chromatin Structure and Dynamics: State-of-the-Art.** J. Zlatanova and S.H. Leuba (Eds), Elsevier B.V.
- Brzeski, J. and **Jerzmanowski, A.** (2004) Plant chromatin – epigenetics linked to ATP-dependent remodeling and architectural proteins. **FEBS Lett.** 567, 15-19.
- Wierzbicki, A.T. and **Jerzmanowski, A.** (2004) Suppression of histone H1 genes in Arabidopsis thaliana results in heritable developmental defects and stochastic changes in DNA methylation. **Genetics** (in press) published on-line 16 October 2004, DOI: 10.1534/genetics.104.031997