

**AKADEMIA ŚWIĘTOKRZYSKA**

**im. Jana Kochanowskiego**

**w Kielcach**

**Wydział Matematyczno – Przyrodniczy**

**INSTYTUT BIOLOGII**

Nr albumu MP–7352

**Łukasz Kozłowski**

**Zróżnicowanie histonu H1 u kręgowców**

Przyjąłem pod względem  
merytorycznym i formalnym

Praca licencjacka  
wykonana w Zakładzie Genetyki  
pod kierunkiem  
dr Jana Pałygi

Kielce 2004

Zgodnie z Ustawą z dnia 4 lutego 1994 r.  
o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dziennik Ustaw nr. 24, poz. 84)  
wyrażam zgodę na udostępnianie mojej pracy.

Łukasz Kozłowski

*Składam serdeczne podziękowania  
Panu dr Janowi Pałydze  
za cenne wskazówki i uwagi w trakcie  
pisania niniejszej pracy.*

## SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów i symboli stosowanych w tekście.....	6
1. WSTĘP.....	12
1.1. BIAŁKA HISTONOWE I NUKLEOSOM.....	12
1.2. HISTONY RDZENIOWE.....	13
1.3. HISTONY ŁACZNIKOWE – STRUKTURA.....	15
1.4. ROLA HISTONU H1.....	18
1.5. ZRÓŻNICOWANIE HISTONU H1.....	23
1.5.1. HISTONY OKRESU BRUZDKOWANIA.....	24
1.5.2. SOMATYCZNE HISTONY ŁACZNIKOWE.....	26
1.1.3. HISTON H1t.....	28
1.1.4. HISTONY ZWIĄZANE Z PROCESEM RÓŻNICOWANIA....	32
1.6. EWOLUCJA BIAŁEK HISTONOWYCH.....	37
2. BADANIE FUNKCJI HISTONU H1 ORAZ JEGO RÓŻNORODNOŚCI.....	40
2.1. REKOMBINACJA HOMOLOGICZNA.....	44
2.2. TECHNIKI WYKORZYSTYWANE W GENETYCZNYM MODYFIKOWANIU ZWIERZĄT.....	51
2.2.1. MIKROINIEKCJA DO PRZEDJĄDRZY ZYGOTY.....	52
2.2.2. INTEGRACJA TRANSGENU METODĄ REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ.....	52
2.2.3. KLONOWANIE SOMATYCZNE.....	65
3. BADANIA NAD HISTONEM H1 MYSZY.....	67
3.1. NADPRODUKCJA HISTONU H1.....	69
3.1. KNOCK OUT HISTONU H1 U MYSZY.....	79
4. HISTONY ŁACZNIKOWE KURY.....	94
4.1. HOMOLOGICZNA WYMIANA GENÓW HISTONOWYCH W KURZYCH LIMFOCYTACH B LINII DT40.....	97

<b>5.</b>	<b>ZAKOŃCZENIE.....</b>	<b>102</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>107</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W TEKŚCIE

2D-PAGE	(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis) dwuwymiarowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
A24	kompleks histonu H2A i ubikwityny
AFP	$\alpha$ -fetoproteina
amp	gen kodujący $\beta$ -laktamazę nadającą odporność na ampicylinę
B4 (H1M)	histon <i>Xenopus laevis</i> charakterystyczny dla okresu bruzdkowania
BAC	(bacterial artificial chromosome) sztuczny chromosom bakteryjny
bsr	gen niosący odporność na blastycydynę S
CAP	(catabolite activator protein) białko aktywatora katabolicznego
CAT	(chloramphenicol acetyltransferase) acetylotransferaza chloramfenikolu
cdc2	(cell-division cycle) gen kodujący białko p34 (CDK1) wchodzące w skład czynnika MPF
cDNA	jednoniciowy, komplementarny DNA powstały <i>in vitro</i> na matrycy mRNA w procesie odwrotnej transkrypcji
c-fos	gen onkogenny
CIBR	(chicken initiation binding represor) kurzy represor transkrypcji
c-myc	onkogenny gen, którego aktywacja wywołuje chłoniaka Burkittata
CTB	(C-tract-binding protein) białko wiążące się z sekwencją bogatą w cytozynę
CTD	karboksyterminalna domena histonu

cyklina D	białko charakterystyczne dla fazy G1, niezbędne do wejścia w fazę S, tworzy kompleksy z kinazami Cdk4 i Cdk6
dsDNA	(double-stranded DNA) dwuniciowy DNA
DT40	linia kurzych limfocytów B białaczki wirusowo indukowanej
ECM	(electron cryomicroscopy) kriogeniczny mikroskop elektronowy
ES komórki	(embryonic stem cells) pierwotne komórki zarodkowe
FACS	(fluorescence-activated cell sorting) cytofluorometria przepływowa
FISH	(fluorescence in situ hybridization) hybrydyzacja fluorescencyjna in situ
G418	analog neomycyny hamujący translację u ssaków
GAPDH	(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) dehydrogenaza 3-fosfoglicerynianu
GD	domena globularna histonu
GFP	(green fluorescent protein) białko fluorescencyjne z meduzy emitujące zielone światło
GH	domena globularna histonu
gpt	gen odporności na kwas mykofenikolowy
GTF	(general transcription factor) główny czynnik transkrypcyjny
H1	klasa histonów silnie lizynowych
H1°	histon H1 charakterystyczny dla komórek zróżnicowanych
H1a-e	histony H1 charakterystyczne dla komórek somatycznych
H1oo	(oocyte-specific linker histone) histon łącznikowy specyficzny dla oocytów
H1t	(testis-specific histone H1) histon H1 specyficzny dla jąder

H1X	histon <i>Bufo japonicus</i> homologiczny do B4
H2A	klasa histonów umiarkowanie lizynowych budująca rdzeń nukleosomu
H2B	klasa histonów umiarkowanie lizynowych budująca rdzeń nukleosomu
H3	klasa histonów arginowych budująca rdzeń nukleosomu
H4	histon arginowy wchodzący w skład rdzenia nukleosomu
H5	histon silnie lizynowy charakterystyczny dla jądrzastych erytrocytów
HAT pożywka	medium zawierające hypoksantynę, aminopterynę i tyminę
HAT	(histone acetyltransferase) acetylaza histonowa
HDAC	(histone deacetylase) deacetylaza histonowa
hGR	(human glucocorticoid receptor) ludzki receptor glukokortykoidów
histD	gen odporności na histydinol
HMG	(high mobility group proteins) grupa białek o niskiej masie cząsteczkowej cechująca się polarnością rozmieszczenia aminokwasów kwaśnych i zasadowych, składnik strukturalny chromatyny
HPLC	(high-pressure or high-performance liquid chromatography) wysokociśnieniowa lub wysokosprawna chromatografia cieczowa
HTH	(helix-turn-helix) motyw helisa-skręt-helisa
IRES	(internal ribosome entry sites) wewnętrzna sekwencja przyłączania rybosomów
kpz	kilo par zasad
LIF	(leukemia inhibitory factor) czynnik przeciwbiałaczkowy
Me	grupa metylowa



MeCP	(methyl-CpG binding protein) białko wiążące się z metylowanymi wyspami CpG
MEL	(murine erythroleukemia) mysia białaczka erytroidalna
miRNA	(microRNA) mikro RNA, klasa RNA o długości 21-21 par zasad
MMTV	(mouuse mammary tumor virus) wirus guza sutka myszy należący do retrowirusów
MN-aza	(micrococcal nuclease) nukleaza z mikrokoków
Mre11	nukleaza biorąca udział w rekombinacji homologicznej
MT promotor	(metallothionein promoter) promotor indukowany metalami ciężkimi
neo	bakteryjny gen odporności na noemycynę
NRL	(nucleosome repeat length) powtarzalna długość DNA nukleosomu, około 200 par zasad
NTD	aminoterminalna domena histonu
ODN	(oligodeoxyribonucleic acids) dwuniciowy kwas oligodeoksyrybonukleinowy długości około 20 par zasad
PAGE-AU	(polyacrylamide gel electrophoresis-acid/urea) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z kwasem i moczniakiem
PCR	(polymerase chain reaction) reakcja łańcuchowa polimerazy
PGK	kinaza glicerofosforanowa
pz	par zasad
R2D2	białko wiążące się z dsRNA
Rad 50-57	białka ssaków zaangażowane w rekombinację homologiczną, proteiny homologiczne do białek Rec
RecA	bakteryjne białko uczestniczące w rekombinacji homologicznej wiążące się z ssDNA

RecABC	kompleks enzymatyczny uczestniczący w rekombinacji homologicznej
RISC	(RNA-induced silencing complex) kompleks wyciszający indukowany przez RNA
RNAi	(RNA interference) interferencyjny RNA, długa dwuniciowa cząsteczka RNA
RN-aza H	rybonukleaza rozkładająca dupleks RNA-DNA
RP-HLPC	(reverse phase - high-pressure or high-performance liquid chromatography) chromatografia fazy odwróconej
RuvA i RuvB	białka odpowiedzialne za migrację pól chiazm w czasie rekombinacji
sc-H1	(cleavage stage histone H1) histon H1 charakterystyczny dla komórek jajowych jeżowców
SDS-PAGE	(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS
SFM	(scanning force microscope) mikroskop skaningowy
siRNA	(small interfering RNA) mały interferujący RNA, klasa RNA o długości 21-28 par zasad
Sp1	pozytywny czynnik transkrypcyjny, enhancer wiążący się z sekwencjami bogatymi w GC
Sp2	czynnik transkrypcyjny wykazujący powinowactwo do sekwencji bogatych w GT
SSB	(single-strand binding protein) białko stabilizujące jednoniciowy DNA
ssDNA	(single-stranded DNA) jednoniciowy DNA
SWI/SNF	kompleks transkrypcyjny zależny od ATP
TBP	(TATA-box binding protein) białko wiążące się z kasetą TATA

TE	element regulatorowy histonu H1t wzbogacony w tyminę
TFE	trifluoroetanol
TFO	(triplex-forming oligonucleotide) oligonukleotydy tworzące trójniciowe DNA
tk	kinaza tymidynowa wirusa opryszczki (selekcja pozytywna i negatywna)
TOF-MS	(time-of-flight mass spectrometry) spektrometria masowa
TP białka	(transition proteins) białka przejściowe zastępujące histony podczas spermatogenezy szybko ustępujące protaminom
UCE	(upstream conserved element) konserwatywny element leżący powyżej startu transkrypcji
Ugl1	(human ubiquitin-like protein) ludzkie białko ubikwitynopodobne
UPE	(upstream positive element) enhancer zlokalizowany powyżej startu transkrypcji
UTR	(untranslated region) sekwencja RNA nie ulegająca transkrypcji
Xrs2	nukleaza biorąca udział w rekombinacji homologicznej
YAC	(yeast artificial chromosome) sztuczny chromosom drożdżowy
$\beta$ -aktyna	jedna z aktyn G, białko budujące mikrofilamenty

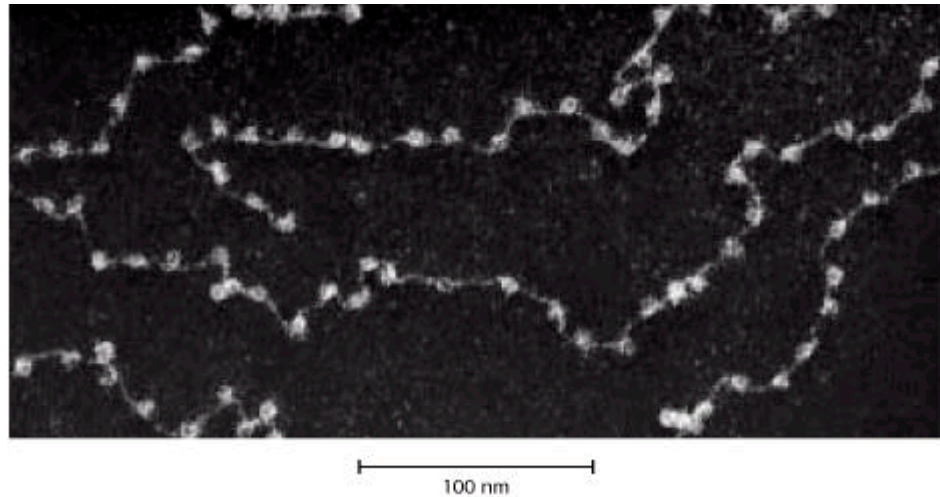
## 1. WSTĘP

Informacja genetyczna zapisana jest na DNA, który jest długą, liniową makrocząsteczką. Ze względu na wielkość genomu nawet u tak prostych organizmów jak *Procaryota* można zaobserwować różne sposoby upakowania DNA w komórce tak, aby z jednej strony zajmował jak najmniejszą przestrzeń, a z drugiej zapewniał pełną dostępność do zapisanej na nim informacji. Sytuacja ta komplikuje się dodatkowo, gdy porównamy genom przeciętnej komórki eukariotycznej, który jest co najmniej o jeden rząd wielkości większy od genomu bakterii i najczęściej występuje w dwóch kopiach. Z tej przyczyny komórki eukariotyczne wykształciły cały szereg mechanizmów pozwalających na bardzo silne skondensowanie DNA, które w skrajnej postaci przyjmuje postać chromosomów, struktur dobrze widocznych w zwykłym mikroskopie optycznym. U *Eukaryota* większość DNA zgromadzona jest na terenie jądra w formie chromatyny. Chromatyna jest kompleksem DNA i białek histonowych, które odgrywają główną rolę w organizacji DNA.

### 1.1. BIAŁKA HISTONOWE I NUKLEOSOM

Na początku lat siedemdziesiątych przeprowadzono obserwacje za pomocą mikroskopu elektronowego, które ujawniły podstawową formę upakowania DNA w komórce eukariotycznej. Obraz DNA jaki ukazał się przypominał „koraliki nanizane na sznurek” (ang. beads on a string) (Rys. 1). Jak wykazały późniejsze badania „sznurem” było DNA, natomiast „koralik” to w rzeczywistości kompleks białek histonowych oraz owinięty wokół niego DNA. Całość nazywana jest nukleosomem.

W skład nukleosomu wchodzi rdzeń zbudowany z ośmiu cząsteczek histonów oraz niemal dwukrotnie owiniętym wokół niego odcinkiem DNA o długości  $\approx$  146 pz. Pomiedzy rdzeniami nukleosomów znajduje się różny pod względem

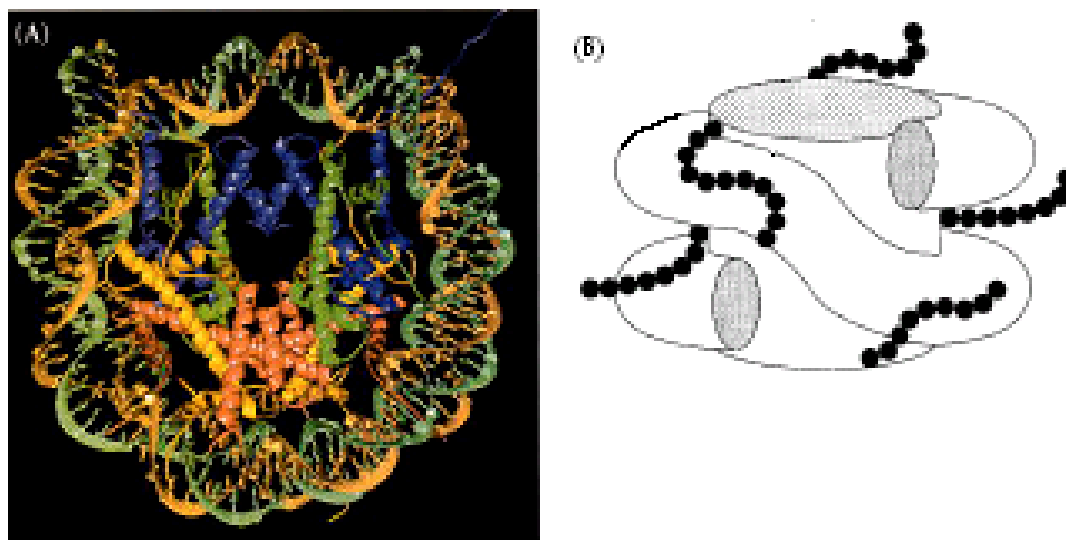


Rys. 1. Mikrofotografia elektronowa chromatyny ukazująca strukturę „koralików na sznurku” (Fot. A. Olins i D. Olins).

długości łącznikowy DNA. Rdzeń nukleosomu tworzą tetramer histonów arginowych (H3-H4)<sub>2</sub> oraz dwa dimery histonów umiarkowanie lizynowych H2A–H2B (Rys. 2) (Kłyszajko – Stefanowicz, 2002). W miejscu w którym DNA wchodzi i schodzi z rdzenia nukleosomu znajduje się histon H1 zwany łącznikowym, w erytrocytach ptaków zamiast niego występuje histon H5 różniący się od histonu H1 większą ilością argininy, która zastępuje lizynę obecną w H1.

## 1.2. HISTONY RDZENIOWE

Histony to zasadowe białka o niskiej masie cząsteczkowej zbudowane według stałego schematu. Wyróżniamy część centralną (globularną) oraz domeny N-kończową i C-kończową. Histony H2A i H2B to białka zbudowane z odpowiednio 129 i 125 aminokwasów, z czego na ogon N-kończowy przypada około 30 aminokwasów, a C-kończowy odcinek tworzy 10–15 aminokwasów. Histon H3 zbudowany z 135 aminokwasów jako jedyny zawiera cysteinę (pozycja 96 i 110), zaś histon H4 najmniejszy z wszystkich (102 aminokwasy) charakteryzuje się dwudomenową budową, gdzie część



Rys. 2. Rdzeń nukleosomu – (A) Model oparty na podstawie krystalografii rentgenowskiej o rozdzielczości 2,8Å. Histony H3 (zaznaczony kolorem niebieskim) i H4 (zielony) tworzą centralnie umieszczony tetramer, natomiast histony H2A (żółty) i H2B (czerwony) tworzą dwa dimery. (B) Schemat rdzenia nukleosomu z wyraźnie wystającymi N- terminalnymi domenami histonów rdzeniowych; (A) na podstawie Luger i wsp. 1997, (B) według Patterton i Wolffe 1996.

C-końcowa pełni funkcję globularną (Kłyszajko-Stefanowicz, 2002). Należy podkreślić, że rdzeń nukleosomu zbudowany jest tylko z części centralnych i C-terminalnych. Ogony N- końcowe wystają swobodnie poza rdzeń kontaktując się z sąsiednimi nukleosomami, DNA i histonami łącznikowymi. Podejrzewa się, że modyfikacje domen N- końcowych takie jak metylacja, acetylacja, fosforylacja i ubikwitinizacja są kluczem do regulacji transkrypcji oraz zmian konformacji chromatyny (Patterton i Wolffe, 1996). Przykładowo fosforylacja seryny w 10 pozycji histonu H3 jest tak wysoce skorelowana z mitotyczną kondensacją chromosomów, że przeciwciała przeciw tak zmodyfikowanym nukleosom są wykorzystywane w wykrywaniu komórek, które wyszły w stan mitozy. Obraz komplikuje fakt, że różne modyfikacje oddziałują na siebie wzajemnie np. metylacja lizyny 9 przebiega

równoległe z fosforylacją wcześniej wspomnianej seryny 10 histonu H3 (Wu i Grunstein, 2000). Niestety w większości przypadków nie znamy funkcji owych posttranslacyjnych przemian białkowych. Jedną z częstszych modyfikacji białek histonowych jest ubikwitynizacja. Ubikwityna jest małym peptydem zbudowanym z 76 aminokwasów służącym do wyznakowania wadliwych lub zbędnych białek przeznaczonych do rozkładu proteolitycznego na terenie cytoplazmy. W jądrze komórkowym ubikwityna łączy się z histonami H2A, H2B i H1. W roku 1973 wykryto białko jądrowe oznaczone symbolem A24, które jak się później okazało stanowi kompleks złożony z histonu H2A i ubikwityny. Badania ujawniły, że ubikwitynizacja jest procesem wybiórczym (obejmuje około 10% cząsteczek histonu H2A i 1-2% cząsteczek H2B), a jego regulacja jest precyzyjna w czasie i przestrzeni. Rozmieszczenie białka A24 jest skorelowane z aktywnością chromatyny, utracie ubikwityny w czasie erytropoezy towarzyszy spadek transkrypcji komórek erytropoidalnych (Goldknopf i wsp., 1980).

### **1.3. HISTONY ŁĄCZNIKOWE – STRUKTURA**

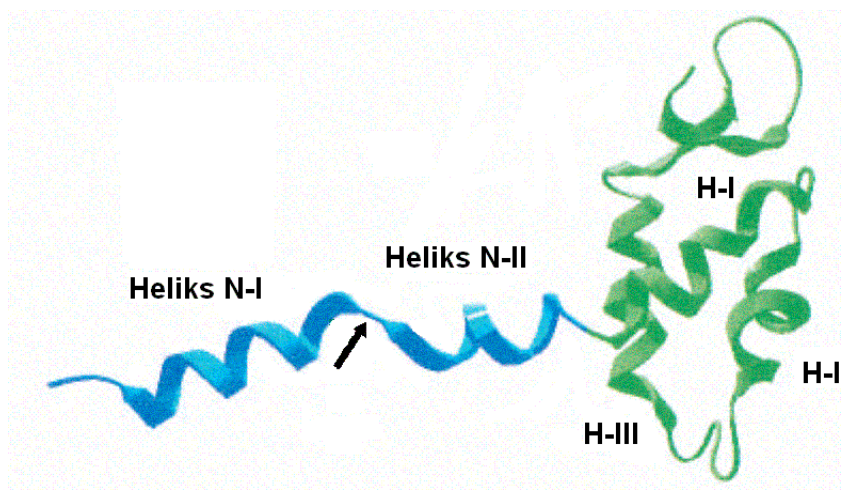
Histony H1 i H5 to białka o masie cząsteczkowej około 21 tys. Da. Cechą wyróżniającą histony spośród innych białek jest ich duża zasadowość oraz specyficzna budowa. W histonach tych możemy wyodrębnić trzy wyraźne części. Część centralna (zwana globularną, GH lub GD) otoczona jest przez dwie domeny, krótszą N-terminalną i dłuższą C-terminalną. Opisana budowa histonów łącznikowych jest tak powszechna, że stała się kryterium przynależności do tej rodziny białek. Jedyne nieliczne organizmy posiadają histony o odmiennej strukturze. Przykładowo u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) histon H1 posiada dwie domeny centralne, zaś pierwotniak *Tetrahymena thermophila* nie posiada jej wcale. Również proporcje poszczególnych domen są względnie stałe, jedynie u *Ensis minor*

część N-terminalna wykazuje nie normalną długość przypominając pod tym względem domenę C-terminalną (Ponte i wsp., 2003).

Domena globularna (GH) zbudowana z około 80 aminokwasów jest regionem o najwyższym stopniu konserwatywności w obrębie całej struktury histonów łącznikowych (Kasinsky i wsp., 2001). Jak wykazały badania za pomocą krystalografii rentgenowskiej GH5 składa się z wiązki trzech  $\alpha$ -helis oraz struktury nazywanej  $\beta$ -harmonijką lub skrzydłem znajdującej się od strony C-terminalnej. Białka o takiej budowie zaliczane są do licznej rodziny białek HTH. GH5 różni się jednak od typowych białek HTH takich jak CAP (białko aktywatora katabolicznego) u których pomiędzy drugą a trzecią helisą znajduje się skręt zbudowany z czterech aminokwasów. W tym miejscu w GH5 zamiast skrętu obecna jest siedmio aminokwasowa pętla (Ramakrishnan, 1997). Cechą charakterystyczną białek wykazujących strukturę uskrzydłonej helisy jest możliwość wiązania się z DNA (Gajiwala i Burley, 2000), dlatego domeny GH1 i GH5 uważa się za miejsce połączenia histonów łącznikowych z DNA. Budowa GH1 jest bardzo podobna do zaprezentowanej powyżej z tą różnicą, że w pętli zamiast obecnej w GH5 w pozycji 62 histydydy znajduje się ujemnie naładowany aminokwas. W skutek tej zmiany DNA jest odpychane w tym miejscu co skutkuje słabszym powinowactwem histonu H1 do DNA w porównaniu z H5.

Część N-terminalna (NTD) zbudowana jest z 35-40 aminokwasów z przewagą proliny, alaniny i aminokwasów zasadowych. Domenę tą możemy podzielić na dwa regiony. Pierwszy bogaty w prolinę i alaninę jest silnie hydrofobowy, drugi sąsiadujący z domeną globularną wykazuje wybitną zasadowość. W roztworze wodnym ( $D_2O$ ) ogon aminoterminalny nie wykazuje żadnej specyficznej konformacji, jednak w obecności stabilizatorów drugorzędowej struktury białek takich jak trifluoroetanol (TFE) i  $NaClO_4$





Rys. 3. Model strukturalny domeny globularnej (zaznaczona kolorem zielonym) i N-terminalnej (kolor niebieski) histonu H1. Strzałką zaznaczono motyw Gly-Gly oddzielający obie helisy ogona N-terminalnego (oznaczone N-I i N-II). H-I, H-II i H-III oznaczają odpowiednie helisy domeny centralnej (według Vila i wsp., 2002).

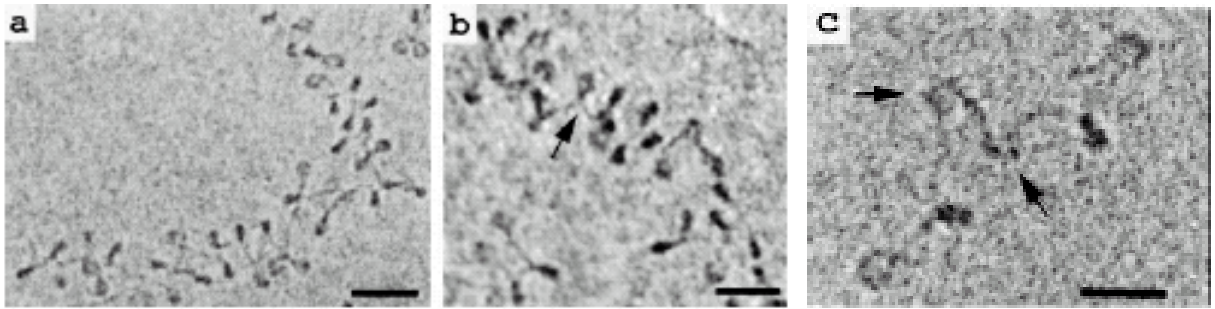
możemy w jego obrębie wyróżnić dwie  $\alpha$ -helisy oddzielone od siebie dwoma glicynami. Całość określana mianem motywu helisa-Gly-Gly-helisa odpowiada mniej więcej zasadowej części domeny N-końcowej. W obu helisach zaobserwowano dużą alifatyczność polegającą na tym, że aminokwasy zasadowe położone są po jednej stronie helisy, a aminokwasy kwaśne po drugiej. Część łącząca obie helisy dzięki obecności glicyny wykazuje dużą elastyczność umożliwiając zmianę położenia helis (Rys. 3). Prawdopodobnie ma to duże znaczenie w wiązaniu DNA łącznikowego przez N-terminalną część histonu H1. Obie helisy zawierają potrójne miejsca zasadowe (trzy kolejne aminokwasy o właściwościach zasadowych), które są charakterystyczne dla białek wiążących DNA takich jak protaminy (Vila i wsp., 2002). Brak TFE *in vivo* nie stanowi przeszkody w tworzeniu motywu helisa-Gly-Gly-helisa, ponieważ obecność DNA stabilizuje drugorzędową strukturę domeny  $\text{NH}_2$ -terminalnej (Vila i wsp., 2001a).

Domena COOH-terminalna (CTD) histonu H1 zbudowana z 90-160 aminokwasów z dużą ilością lizyny i argininy wykazuje wybitną zasadowość (15-krotna przewaga aminokwasów zasadowych nad kwasowymi). Suma

wszystkich lizyn, alanin i prolin w tej części wynosi ponad 85% obecnych w histonie H1 (Kłyszejko-Stefanowicz, 2002). Analiza sekwencji wykazała, że obok proliny (P) często występują seryna (S) lub treonina (T), będące miejscem fosforylacji, a za nimi aminokwasy zasadowe. Sekwencje SPKK lub (S/T)PXX, gdzie X to lizyna lub arginina tworzą motyw wiążący DNA w mniejszym rowku (Ramakrishnan, 1997). Podobnie jak domena N-końcowa karboksylowy ogon histonu H1 nie wykazuje w roztworze wodnym ustrukturyzowanej formy, ale w obecności TFE przybiera strukturę drugorzędową charakteryzującą się obecnością kilku alifatycznych  $\alpha$ -helis oddzielonych od siebie konformacją  $\beta$ -skrętu lub  $\sigma$ -skrętu (różniący się od poprzedniego dodatkowym wiązaniem wodorowym między grupami NH pierwszego i drugiego aminokwasu). Obecność obu struktur sugeruje możliwość wiązania C-terminalnej domeny zarówno z mniejszym rowkiem DNA ( $\alpha$ -helisa) jak i z większym ( $\beta$ - lub  $\sigma$ -skręt) (Vila i wsp., 2000). Również w tym przypadku obecność dsDNA ułatwia formowanie drugorzędowej struktury COOH-terminalnego ogona H1 (Vila i wsp., 2001b).

#### **1.4 ROLA HISTONU H1**

Podstawową funkcją histonów łącznikowych jest stabilizacja nukleosomu i tworzenie struktur wyższego rzędu. Jest to oczywiste jeśli spojrzeć na lokalizację histonu H1. Położenie H1 w miejscu, gdzie DNA wchodzi i schodzi z nukleosomu (ang. entry-exit point) wydaje się krytyczne dla stabilizacji całego nukleosomu (Travers, 1999; Pruss i wsp., 1996). Czasem mówi się, że histon H1 spina nukleosom niczym klamra. Dodatkową rolą histonów łącznikowych jest kondensacja chromatyny ze stanu 11 nm (nukleosomy) w strukturę 30 nm. Istnienie „30 nanometrowego włókna” jest dobrze udokumentowane jednak jego konformacja przestrzenna budzi wiele kontrowersji. Najbardziej popularnym modelem wyjaśniającym strukturę



Rys. 4. Chromatyna w buforze o niskiej sile jonowej ( $5\text{mM M}^+$ ), przypadkowa sekwencja wyizolowana z jąder erytrocytów kurczaka. Zachowanie pierwotnej struktury chromatyny było możliwe dzięki zastosowaniu kriogenicznego mikroskopu elektronowego (ECM). (a) i (b) przedstawiają konformację przestrzenną 30 nanometrowego włókna określaną mianem wstęgi zygzakowatej. Strzałka w b wskazuje strukturę łączy. (c) chromatyna pozbawiona histonu łącznikowego. Strzałki wskazują nukleosomy pozbawione struktury łączy. Poziome kreski odpowiadają 10 nm. Powiększenie  $\times 46\ 000$  (według Bednar i wsp. 1998).

30 nanometrową jest model solenoidu zaproponowany przez Fincha i Kluga w roku 1976, który z licznymi modyfikacjami przetrwał do dziś. Jednak w miarę gromadzenia danych doświadczalnych coraz większe grono zwolenników zyskuje model „wstęgi zygzakowatej” oparty na strukturze „łączy” (Rys. 4a,b). Model ten opiera się na obrazie spod mikroskopu ECM. Również badania za pomocą innych technik takich jak krystalografia rentgenowska potwierdzają słuszność drugiego modelu. Wspomniana struktura łączy powstaje dzięki obecności histonów łącznikowych, a dokładnie interakcji między domenami N- i C-terminalnymi a łącznikowym DNA (van Holde i Zlatanowa, 1996; Bednar i wsp., 1998).

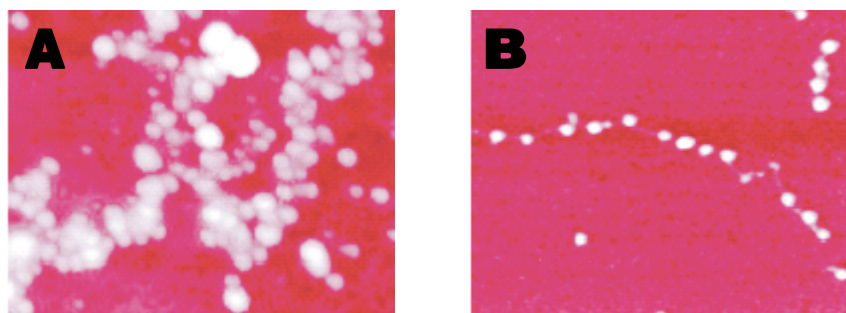
Cechą charakterystyczną modelu wstęgi zygzakowatej jest to, że kolejne nukleosomy nie kontaktują się ze sobą jak to zakłada model solenoidu. Nukleosomy będące w bezpośrednim sąsiedztwie mogą zawierać odcinki DNA znacznie od siebie oddalone. Prawdopodobnie jest to jeden z mechanizmów regulacji transkrypcji polegający na tym, że elementy wzmacniające (ang. enhancer) lub wyciszające (ang. silencer) mogą być

oddalone od genu nawet o kilka tysięcy par nukleotydów. Dzięki takiemu ułożeniu nukleosomów sekwencje takie mogą się znajdować w bliskim fizycznie miejscu umożliwiając ich oddziaływanie z kompleksem transkrypcyjnym.

Ze względu na długość poszczególnych domen odcinek C-terminalny oddziałuje z około 20-30 pnt, natomiast ogon N-terminalny jedynie z 10 pnt. Domena globularna histonu pomimo istnienia miejsca (lub miejsc) wiążącego DNA wydaje się nie odgrywać większego znaczenia w tworzeniu 30 nm włókna, jej funkcja ogranicza się raczej do stabilizacji nukleosomu. Potwierdzają to eksperymenty polegające na trawieniu chromatyny nukleazą z mikrokoków. Obecność histonów łącznikowych „chroni” DNA w efekcie czego w czasie trawienia możemy zaobserwować przejściowe stadium nazywane chromatosomem, zbudowanym z 166 pz, oktameru histonowego i histonu H1 lub H5. Brak histonów łącznikowych skutkuje bezpośrednim rozpadem nukleosomów do cząstek rdzeniowych. Delecja domen CTD i NTD nie ma wpływu na to zjawisko wskazując na kluczową rolę domeny globularnej.

Ogony C-końcowy i N-końcowy histonów łącznikowych dzięki specyficznej strukturze II-rzędowej mogą silnie wiązać się z DNA. Ze względu na niewielkie rozmiary ogona aminoterminalnego jego znaczenie jest małe. Decydującą rolę odgrywają domeny globularna i C-końcowa. Ich brak powoduje występowanie niewłaściwej struktury nukleosomu, który nie wykazuje konformacji łądyżki (Rys. 4c) co uniemożliwia organizację chromatyny w włókno 30 nm (Rys. 5) (van Holde i Zlatanova, 1996).

Funkcja histonów łącznikowych podobnie jak w przypadku histonów rdzeniowych jest powiązana z ich modyfikacją. Fosforylacja specyficznych sekwencji SPKK obecnych w ogonie COOH-terminalnym wpływa na zdolność wiązania się histonu H1 do chromatyny. Szczegółowe badania pod kierownictwem M.J. Hendzela ujawniły, że domena ta w największym



Rys. 5. Zdjęcia chromatyny spod mikroskopu skaningowego (STM). (A) zwyczajna chromatyna wykazująca uorganizowanie 30 nm włókna. (B) chromatyna pozbawiona histonu łącznikowego, kondensacja chromatyny zatrzymuje się na etapie nukleosomów; (według van Holde i Zlatanowa, 1996).

stopniu odpowiada za powinowactwo do chromatyny. Usunięcie części NH<sub>2</sub>-terminalnej powoduje tylko nieznaczne osłabienie wiązania z DNA. Jest to zgodne z odkryciem u *Prokaryota* białek podobnych do domeny C-terminalnej H1 o analogicznej funkcji (Kasinsky i wsp., 2001). Wprowadzenie mutacji punktowych w miejsca ulegające fosforylacji miało różne skutki. Tranzycje, które imitowały fosforylację tych miejsc (przez wprowadzenie ładunku ujemnego – w miejsce aminokwasu zasadowego wprowadzono kwas glutaminowy) skutkowało obniżaniem możliwości wiązania się z DNA. Na tym etapie oddziaływania te można by wytłumaczyć poprzez rozkład ładunków elektrostatycznych, jednak dokładna analiza ujawniła, że miejsca fosforylacji nie są równoważnościowe. Oznacza to, że modyfikacja w jednym miejscu może mieć większe znaczenie niż dwie takie same w innym. Niewykluczone, że wynika to z konformacji przestrzennej w pewnych odcinkach białka. Prawdopodobnie kombinacja obu czynników rozmieszczenia ładunków oraz miejsc o specyficznej budowie drugorzędowej decyduje o funkcji i możliwościach białka (Handzel i wsp., 2004). Podobne wyniki otrzymano badając zdolność histonu H1<sup>o</sup> i jego zmodyfikowanych wariantów do kondensacji chromatyny w struktury wyższego rzędu. W tym przypadku modyfikacja polegała na skróceniu domeny C-terminalnej o 24,

48, 72 i 97 końcowych aminokwasów. Odpowiednie odcinki miały taką samą długość i przybliżony ładunek elektryczny. Wbrew oczekiwaniom skrócenie ogona COOH-końcowego nie było prostoliniowo skorelowane z obniżeniem zdolności do formowania struktur wyższego rzędu. Pewne regiony CTD miały większy wpływ na ten proces niż inne sugerując istnienie odcinków o wyspecjalizowanej funkcji. Przykładowo za przyłączenie się histonu H1 do łącznikowego DNA odpowiada w największym stopniu domena globularna i przylegający do niej odcinek CTD o długości około 25 aminokwasów (delecja pozostałej części domeny C-terminalnej nie miała większego wpływu na proces asocjacji), natomiast organizacja chromatyny zależna była od CTD, a konkretnie dwóch regionów zawierających motyw (S/T)PKK (Lu i Hansen, 2004).

Przedstawione dane jasno precyzują funkcję histonu H1 jako czynnika odpowiadającego za kondensację chromatyny czego konsekwencją powinno być pełnienie roli generalnego represora transkrypcji. Histony łącznikowe ograniczając dostęp do „wolnego” DNA, co jest niezbędne z punktu widzenia transkrypcji, uniemożliwiają przebieg tego procesu. Proces upakowania DNA w struktury wyższego rzędu wydaje się być niezwykle ważny, nic więc dziwnego, że histony łącznikowe, tak jak i pozostałe histony, wykazują wysoki stopień konserwatywności. Histony należą do najwolniej ewoluujących białek i są obecne u wszystkich organizmów eukariotycznych, a białka do nich podobne (ang. histone-like proteins) można spotkać także u organizmów należących do *Prokaryota* (Kasinsky i wsp., 2001). Trudna to jednak pogodzić z dowodami na to, że histon H1 mimo swojej ważnej funkcji nie jest niezbędny dla życia komórki (doświadczenia z wykorzystaniem *T. thermophila* oraz drożdży). Organizmy u których zahamowano ekspresję genów histonu H1 były płodne i nie wykazywały żadnych widocznych zmian morfologicznych, co najwyżej obserwowano zmniejszoną ekspresję niektórych genów (Hallauer i wsp., 2001). Wyjaśnieniem tego paradoksu

może być proces redundacji polegający na istnieniu więcej niż jednego mechanizmu odpowiedzialnego za daną funkcję komórki. W ten sposób w przypadku braku histonu H1 inny układ biologiczny mógłby przejąć jego funkcje. Niestety nie wiemy o żadnym takim mechanizmie w stosunku do białka H1 (Wierzbicki, 2002). Niemniej jednak fakt ten zmusza do zrewidowania poglądu o funkcji histonu H1 jako represora. Bardziej odpowiednie wydaje się uznanie histonów łącznikowych za specyficzne czynniki regulujące ekspresję DNA.

## 1.5 ZRÓŻNICOWANIE HISTONU H1

Histony łącznikowe podobnie jak inne białka histonowe obok wysokiej konserwatywności ewolucyjnej cechują się zróżnicowaniem w obrębie komórki. Prawie wszystkie histony są reprezentowane jako białka posiadające liczne warianty, jedynie histon H4 jest jednorodny. Spośród białek histonowych histony łącznikowe wykazują najwyższą heterogeniczność zarówno międzygatunkową jak i wewnątrzgatunkową. Analiza sekwencji histonu H1 u wszystkich pod tym względem przebadanych organizmów (około 100 gatunków, w tym rośliny, bezkręgowce i kręgowce) ujawniła, że jest on zawsze reprezentowany przez więcej niż jeden wariant w obrębie gatunku (Sullivan, 2002). Najdokładniejsze dane dotyczą ssaków u których możemy wyróżnić co najmniej osiem wariantów: pięć somatycznych oznaczanych odpowiednio H1a-e oraz histony H1t, H1oo i H1<sup>o</sup>.

Histony łącznikowe można podzielić na cztery klasy uwzględniając ich specyficzność komórkową oraz czas ekspresji w trakcie rozwoju. Podział ten zgodny jest również z budową strukturalną na poziomie DNA i białka. Są to:

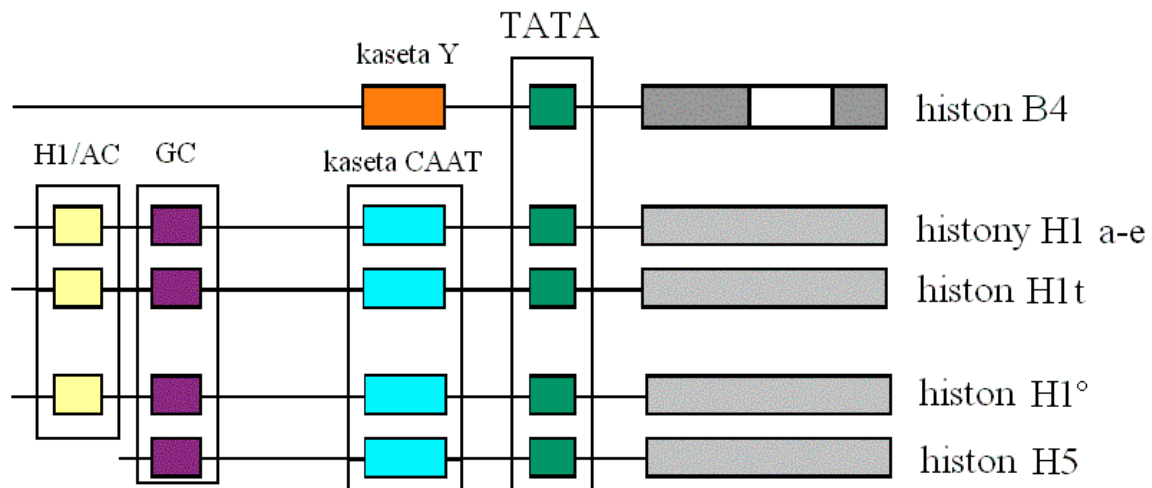
- warianty, których ekspresja następuje we wczesnym etapie rozwoju;
- warianty występujące w komórkach somatycznych;
- histony łącznikowe związane z procesem różnicowania

- wariant charakterystyczny dla jąder.

### 1.5.1. HISTONY OKRESU BRUZDKOWANIA

Pierwszą klasę stanowią histony specyficzne dla komórek intensywnie dzielących się w początkowym etapie embriogenezy oraz w okresie oogenezy (ang. cleavage linker histones). Białka te wyizolowano najpierw u płazów (wariant B4 zwany czasem H1M u *Xenopus laevis* oraz H1X u *Bufo japonicus*) i bezkręgowców (grupa histonów cs-H1 u *Strongylocentrotus purpuratus*, *Paranechinus milaris* i *Lytechinus pictus*), natomiast poszukiwania homologicznego białka u ssaków przez długi czas nie przynosiły rezultatów. Ostatecznie opierając się na analizie cDNA i białek wyżej wymienionych organizmów przy użyciu odpowiednich przeciwciał i sond molekularnych udało się wykryć histon H1oo w oocytach myszy (Tanaka i wsp., 2001). Wydzielenie tych histonów w oddzielną grupę opiera się przede wszystkim na całkowicie odmiennej budowie genów kodujących te białka. Pierwszą rzucającą się w oczy cechą jest obecność intronów. Wszystkie inne geny kodujące histony łącznikowe są ich pozbawione przypominając pod tym względem geny *Procaryota*. Ponadto geny te występują w małej ilości kopii (1-2 kopie/haploidalny genom). Kolejną unikatową cechą jest odmienna budowa promotora. Brak charakterystycznych dla innych histonów łącznikowych elementów cis-aktywujących takich jak region bogaty w guaninę (ang. G-rich) i kasety CAAT, TAAT oraz kasety specyficznej dla histonów H1 (ang. H1 box) o sekwencji 5`AAGAAACACA3`. Zamiast tego wykryto w nich elementy specyficzne dla promotorów genów ulegających ekspresji w oocytach (kasety Y o sekwencji odwróconej w stosunku do CAAT) ( Rys. 6) (Khochbin i Wolffe, 1994; Khochbin , 2001). Również budowa mRNA histonów charakterystycznych dla bruzdkowania jest odmienna. Dzięki obecności w pobliżu końca 3`pre-mRNA sekwencji





Rys. 6. Podział histonów łącznikowych uwzględniający strukturę genów. Szary prostokąt oznacza sekwencję kodującą (egzon), biały sekwencję nie kodującą (intron), na zielono zaznaczono kasetę TATA, na niebiesko kasetę CAAT, kolor fioletowy oznacza region bogaty w nukleotydy GC, żółty sekwencję specyficzną dla H1 (kasetę bogatą w AC), a na pomarańczowo oznaczono kasetę Y, (na podstawie Khochbin i Wolffe, 1994; zmienione).

5'AAUAAA3' mRNA ulega poliadenylacji (spośród histonów jedynie mRNA histonu H1° zachowuje się podobnie). Porównując histony B4, H1<sup>oo</sup> i cs-H1 na poziomie białka równie łatwo dostrzec ich odmienność na tle innych histonów łącznikowych. Są to białka znacznie większe (odpowiednio 273, 289 i 285 aminokwasów) o względnie małej zasadowości – ładunek całego białka jest zrównoważony przez obecność podobnej liczby aminokwasów kwaśnych i zasadowych, co jest nietypowe dla białek histonowych, których cechą wyróżniającą jest wysoka zasadowość (Tanaka i wsp., 2001). Właściwość ta może mieć duże znaczenie w tworzeniu struktury chromatyny w wymienionych komórkach. Mały ładunek ujemny tych histonów może skutkować słabszym powinowactwem do DNA co w tym przypadku jest korzystne. Pozornie mogłoby się wydawać, że histon H1 jako białko stabilizujące chromatynę powinno wykazywać jak najwyższe powinowactwo do DNA Jednak, jeżeli wziąć pod uwagę miejsce występowania histonów B4 i cs-H1, w komórkach intensywnie się dzielących, gdzie okres między

kolejnymi podziałami jest bardzo krótki, a więc odłączanie i przyłączanie histonów do DNA jest częste, wydaje się jasne, że duża zasadowość tych białek byłaby tylko utrudnieniem.

### **1.5.2. SOMATYCZNE HISTONY ŁĄCZNIKOWE**

Drugą wydzieloną klasę obejmują histony występujące w komórkach somatycznych, u myszy są to histony H1a-e. Nazywane także histonami zależnymi od replikacji, ponieważ ich synteza jest ograniczona do fazy S mitozy. Tworzą one wyraźnie wydzieloną grupę histonów H1 o wzorze ekspresji specyficznym dla poszczególnych tkanek. Pomimo różnic w sekwencji aminokwasów (60-85% podobieństwa) posiadają one zbliżoną budowę. Sekwencje promotorowe zawierają kasety TATA, CAAT, sekwencję wzbogaconą w guaninę oraz kasetę specyficzną dla H1, czasem nazywaną kasetą bogatą w AC (Rys. 6). Dodatkowo 450-480 par zasad powyżej czapeczki wykryto tzw. kasetę bogatą w TG (jej odpowiednikiem w wariancie H1<sup>o</sup> jest element nazywany UCE) o sekwencji niemalże dokładnie odwróconej w stosunku do kasety AC. Opisana budowa genów histonu H1 jest utrwalona u większości kręgowców (Khochbin, 2001; Duncliffe i wsp., 1995).

Przy określaniu miejsca występowania poszczególnych podtypów histonu H1 używa się rozmaitych technik. Dwie z nich okazały się szczególnie użyteczne, są to: elektroforeza na różnych nośnikach oraz metoda bardziej czuła polegająca na swoistej reakcji z przeciwciałami. W oparciu o analizę elektroforetyczną wykryto, że poszczególne podtypy somatyczne H1 występują we wszystkich komórkach organizmów i nie da się ich przypisać poszczególnym tkankom. Należy jednak podkreślić, że w obrębie odmiennych narządów proporcje histonów H1a-e są różne. Po dokładnym przebadaniu preparatów myszy pochodzących z takich narządów jak:

wątroba, płuca, śledziona, nerki i inne okazało się, że niektóre somatyczne podtypy H1 występują w większych ilościach w komórkach aktywnie namnażających się, inne zaś są typowe dla komórek zróżnicowanych lub znajdujących się w fazie G<sub>0</sub>. U organizmów młodych (a więc z dużym udziałem komórek intensywnie proliferujących) używając elektroforezy wykryto obecność wszystkich pięciu podtypów H1, z przewagą H1a i H1b. W czasie rozwoju komórki ulegające różnicowaniu wykazują inny wzór ekspresji w którym dominują histony H1e, H1c i H1d. Proporcje odpowiednich wariantów histonów H1 występujących w komórkach somatycznych zależą od rodzaju tkanki oraz jej wieku. Przykładowo komórki wątroby i płuc wykazują największy spadek zawartości H1a i H1b po pierwszych 4 tygodniach życia, a ich miejsce zajmują warianty H1e i H1c. Inaczej proces ten przebiega w komórkach śledziony i grasicy w których nawet po 16 tygodniach histony H1a i H1b przeważają. Inny jest też czas występowania poszczególnych podtypów w komórkach, porównując dwa wcześniej wymienione warianty histon H1a najobficiej występuje przez pierwsze 4 tygodnie, podczas gdy H1b utrzymuje się na względnie stałym poziomie około 3 miesięcy (Lennox i Cohen, 1983). Zróżnicowanie to można wyjaśnić kilkoma czynnikami m.in. odmiennym poziomem ekspresji poszczególnych wariantów oraz różnym okresem półtrwania mRNA i białek (Wang i wsp., 1997).

Sekwencje histonów H1a-e są w dużym stopniu zbliżone jednak różnice w ich obrębie powodują, że cechują się one innym powinowactwem do DNA i chromatyny oraz ulegają modyfikacją posttranslacyjnym w różnym stopniu. Fosforylacja jak już zasygnalizowano wcześniej zależy od obecności specyficznych sekwencji, których ilość jest odmienna u poszczególnych histonów H1. Co więcej modyfikacja ta wykazuje związek z różnicowaniem komórek. Wraz ze wzrostem tego procesu ilość ufosforylowanych form histonu H1 maleje (Lennox i Cohen, 1983).

Histony H1a-e, których ekspresja związana jest z komórkami somatycznymi nie ogranicza się tylko do organizmów w pełni rozwiniętych. Badania przy użyciu przeciwciał wykazały obecność wariantów specyficznych dla komórek somatycznych w komórkach embrionalnych. Używając przeciwciał anti-H1 pochodzących od szczura wykryto histony H1a-e na etapie 4-komórkowych embrionów myszy (Clarke i wsp., 1992). Na podobnej zasadzie ustalono, że histony te występują również w oocytach (Clarke i wsp., 1997). Pod tym względem myszy różnią się od *Xenopus* u którego w jajach jedynym wykrywalnym histonem H1 jest wariant B4. Dokładna analiza ujawniła, że w oocytach myszy istnieje pewien okres rozwoju w którym brak somatycznych histonów H1. Początkowo sądzono, że ich miejsce zajmuje histon H1<sup>o</sup>, ale późniejsze badania wykluczyły taką ewentualność (Adenot i wsp., 2000). Możliwe, że zamiast wariantów somatycznych oocyty posiadają w ich miejscu histon H1<sup>oo</sup>. Histony H1a-e obecne w oocytach, zygotach i zarodkach szybko zastępują inne rodzaje białek, początkowo w ilości ledwo widocznej zaczynają dominować w komórkach embrionu (u myszy na etapie 8-16 komórkowym, natomiast u *X. laevis* dopiero w średnio zaawansowanym stadium blastuli-około 4000 komórek).

### **1.5.3. HISTON H1t**

Jest to nieliczny z histonów łącznikowych wykazujący specyficzną tkankową. Ekspresja H1t jest ograniczona do ściśle określonych komórek w odpowiednim stadium rozwoju, mianowicie mRNA H1t akumuluje się w spermatocytach I rzędu (komórki tetraploidalne) znajdujących się w profazie I mejozy (środkowy i późny pachyten), natomiast białko obecne jest aż do początkowego okresu rozwoju spermatyd (komórki haploidalne), gdzie stanowi ponad 50% histonu H1 obecnego tych komórkach. W dalszym etapie histony, a więc również H1t są zastępowane najpierw przez białka TP (ang.

transition proteins), a później przez protaminy. Podczas tego procesu struktura nukleosomu zanika (w obrazie spod mikroskopu elektronowego brak struktury „koralików na sznurku”), a DNA zostaje silnie skondensowany stając się nieaktywny transkrypcyjnie w plemnikach (Grimes i wsp., 2003).

Pod względem budowy histon H1t przypomina histony somatyczne. Sekwencja aminokwasów „jądrowego” histonu H1 wykazuje około 50% homologii do innych histonów łącznikowych, różni się od nich dużą zawartością argininy oraz obecnością metioniny (inne histony H1 nie posiadają jej wcale) (Fantz i wsp., 2001). Przypuszcza się, że ma to wpływ na mniejsze w porównaniu do innych histonów łącznikowych powinowactwo do nukleosomów (kompleks H1t i nukleosom jest bardziej podatny na działanie nukleaz). Słabsze wiązanie się histonu H1t tak jak w przypadku histonu H1oo może być korzystne ułatwiając replikację i wymianę białek w czasie mejozy poprzez tworzenie mniej zwartej struktury chromatyny (Lin i wsp., 2000).

Podobnie jak u większości histonów koniec 3' mRNA histonu H1t nie posiada ogona poli-(A), zamiast niego w tym miejscu znajduje się konserwatywna 26-nukleotydomowa sekwencja uczestnicząca w tworzeniu struktury „spinki do włosów” (ang. hairpin loop, stem loop), która jest zaangażowana w dojrzewanie i stabilizację mRNA (Dominski i Marzluff, 1999). Również budowa promotora histonu H1t przypomina histony somatyczne (Rys. 6). W jego obrębie występują kasety TATA, CAAT, H1/AC, TG i region bogaty w guaninę. Pomimo istnienia tych samych elementów regulujących transkrypcję histon H1t wykazuje ekspresję w ściśle określonym czasie i miejscu. Fakt ten był przyczyną intensywnych badań nad regulacją tego białka. Analiza sekwencji całego promotora wykazała istnienie negatywnych elementów regulatorowych, które oddziałują hamująco na proces transkrypcji wiążąc się z odpowiednimi białkami w komórkach somatycznych.

Pierwszą taką sekwencję zlokalizowano poniżej kasety TATA. Region ten nazwano drugą sekwencją bogatą w GC (ang. GC box 2). Składa się on z podwójnej sekwencji zawierającej duże ilości cytozyny (5'CCCCCCCCGGACCCCC 3'). O ile wcześniej opisany region bogaty w GC (nazywany dla odróżnienia GC box 1) wzmacnia transkrypcję, to na podstawie mutacji punktowych powodujących zmianę cytozyny w GC box 2 ustalono, że element ten ma silne właściwości represorowe (mutacje takie skutkowały 7-10 krotnym wzrostem aktywności genu). Prawdopodobnie wynika to z możliwości wiązania się tego odcinka promotora z białkami takimi jak Sp1, Sp2, CTB-4 i CTB-5 będącymi czynnikami hamującymi transkrypcję (Clare i wsp., 1997).

Dodatkowo między kasetą CAAT i H1/AC znajduje się element TE zbudowany z TE1, GC box 1 i TE2. Elementy TE1 i TE2 to sekwencję palindromowe (5'CCTAGG 3') znajdujące się między kasetą bogatą w GC. Początkowo sądzono, że regulacja transkrypcji odbywa się przez stymulację za pomocą białkowego czynnika specyficznego dla jąder, który ma właściwości rozpoznawania podwójnych sekwencji palindromowych (Horvath i wsp., 2001), ale później okazało się, że oba te elementy oddziałują w odmienny sposób przypuszczalnie dzięki innym białkom. Odcinki TE1 i GC box 1 aktywują transkrypcję, natomiast TE2 jest represorem. Brak całego elementu TE powoduje dezaktywację promotora (Grimes i wsp., 2003; Wilkerson i wsp., 2002).

Kolejnym represorem jest region promotora leżący między -130 a -106 nukleotydem w stosunku do miejsca startu transkrypcji nazywany elementem RE (znajduje się on w bezpośrednim sąsiedztwie kasety H1/AC, w pozycji -15 względem niej). Chociaż w regulację ekspresji histonu H1t może być zaangażowany jeszcze jeden odcinek promotora (położony w pozycji od -948 do -780, Wolfe i wsp. 1999, dane nie potwierdzone przez inne grupy badawcze) to decydującą rolę w tym procesie przypisuje się proksymalnej

części promotora (około 140 nukleotydów od czapeczki), która obejmuje większość opisanych elementów regulacyjnych (Bartell i wsp., 1996).

Inny mechanizm regulacji transkrypcji H1t może polegać na metylacji DNA. Badania sekwencji kodującej i promotorowej szczurzego histonu H1t wykazały istnienie wielu wysp CpG (sekwencje takie występują stosunkowo rzadko w genomie ssaków tj. raz na 100 pnt, ponieważ <sup>Me</sup>CpG ulegają spontanicznej deminacji w wyniku czego 5'-metylocytozyna ulega przekształceniu w tyminę). Miejsca takie szczególnie łatwo ulegają metylacji (<sup>Me</sup>CpG). Ich położenie wydaje się w tym przypadku krytyczne (przykładowo na siedem wysp CpG obecnych w promotorze dwie znajdują się w obrębie elementu TE). Proces wyciszania transkrypcji przez metylację DNA jest powszechny w komórkach somatycznych i dotyczy wielu genów, których ekspresja jest typowa dla komórek rozrodczych. Inhibicja transkrypcji przez metylację wysp CpG może wynikać z wiązania się do zmodyfikowanego DNA represorów transkrypcji np. MeCP1 i MeCP2 (białka typu 1 i 2 wiążące się z metylowaną cytozyną ) lub braku powinowactwa czynników transkrypcyjnych wrażliwych na metylację (Singal i wsp., 2000).

Histon H1t występuje u ssaków powszechnie, ponadto warianty histonu H1 typowe dla komórek plemnikowych wykryto również u innych organizmów. W obrębie rodziny białek histonowych, także histony rdzeniowe wykazują specyficzność dla męskich komórek rozrodczych (znajdujemy takie warianty w obrębie histonów H2A, H2B i H3).

Łącznikowy histon specyficzny dla gruczołów jądrowych powstał prawdopodobnie w wyniku duplikacji DNA kodującego somatyczne histony H1 (przemawia za tym podobieństwo budowy promotora) oraz późniejszych zmian w obrębie elementów regulatorowych w efekcie których stał się on aktywny tylko w czasie mejozy u samców (Horvath i wsp., 2001).

#### 1.5.4. HISTONY ZWIĄZANE Z PROCESEM RÓŻNICOWANIA

W skład tej klasy histonów wchodzi histon H1<sup>o</sup> oraz H5. Pierwszy z nich jest charakterystyczny dla komórek somatycznych, natomiast drugi stanowi frakcję specyficzną dla jądrzastych erytrocytów. Wydzielenie obu tych histonów w oddzielną grupę dokonano na podstawie ich wzajemnego podobieństwa i różnic w porównaniu z innymi histonami H1.

Pierwszą wyraźną cechą odróżniającą histony H1<sup>o</sup> i H5 od reszty histonów łącznikowych jest budowa promotora (Rys. 6). W skład sekwencji promotorowej wchodzi kasety TATA, H1/AC oraz region bogaty w GC. Brak tutaj kasety CAAT, zamiast której występuje kasety specyficzna dla histonu H4 (ang. H4 box, H4 site II). Porównując wymienione odcinki widać duże różnice między histonami okresu różnicowania, a innymi histonami H1. Podobnie jak większość genów kodujących histony H1, które posiadają nietypową sekwencję w obrębie kasety TATA (mianowicie TATATA), również H1<sup>o</sup> wyróżnia się na tym tle (w tym przypadku jest to sekwencja TAAATA). Przepuszczalnie odmienna budowa kasety TATA histonu H1<sup>o</sup> ma wpływ na mniejsze powinowactwo białek wiążących się z tą sekwencją (białka TBP od ang. TATA binding proteins), co może prowadzić do obniżenia poziomu transkrypcji genu (Dong i wsp., 1995). Kasety specyficzna dla histonu H4 jest unikatową sekwencją 5'TCANNNGGTCC`3 zastępującą kasetę CAAT. Jest to region silnie utrwalony w obrębie całej grupy histonów H4 oraz wśród różnych gatunków. Odgrywa on ważną rolę w regulacji ekspresji genów H4 wiążąc się z specyficznym czynnikiem transkrypcyjnym (H4TF2). Kasety AC/H1 posiada sekwencję identyczną jak u innych histonów H1.



Następnym ważnym elementem regulacyjnym jest UCE (ang. upstream conserved element), czasem nazywany kasetą TG położony w pozycji -435. Jest to odcinek silnie konserwatywny ewolucyjnie (podobieństwo między *Xenopus* i *Mus musculus* wynosi 19/20 par zasad). Zmiany mutacyjne w obrębie elementu UCE niemal całkowicie uniemożliwiają ekspresję genu. Dla prawidłowej regulacji genu H1<sup>o</sup> niezbędna jest obecność wszystkich trzech elementów regulacyjnych, a ich działanie jest wzajemnie powiązane (Khochbin i Wolffe, 1994).

Dodatkowo w proces regulacji zaangażowany jest odcinek w pozycji od -470 do -305, który zawiera trzy elementy regulacyjne. Dwa z nich posiadają specyficzną sekwencję (A/C)GGGGGG(A/C) nazywaną ścieżką (dG)<sub>6</sub> lub sekwencją heksadeoksyguaninową. Mutacje w obrębie tego elementu powodują redukcję ekspresji histonu H1<sup>o</sup> w komórkach dzielących oraz nie dzielących się. Środkowy element pozbawiony ścieżki (dG)<sub>6</sub> bierze udział w aktywacji tylko w komórkach różnicujących się. Co ciekawe sekwencja heksadeoksyguaninowa występuje także w innych odcinkach promotora H1<sup>o</sup> powtarzając się u myszy pięciokrotnie (Dong i wsp., 1995).

W kontroli transkrypcji genu H5 główną rolę odgrywają trzy odcinki: region bogaty w GC, wcześniej wspomniany element UPE oraz odcinek położony poniżej miejsca startu transkrypcji tzw. miejsce wiążące USF (ang. USF-binding site). Wszystkie trzy elementy wzmacniają transkrypcję, a spośród nich najsilniej ostatni z wymienionych. W regulacji negatywnej bierze udział białko CIBR (ang. chicken initiation binding represor), glikoproteina o masie 75 kDa posiadająca możliwość wiązania się z DNA. Białko CIBR łącząc się z sekwencją zlokalizowaną w pobliżu miejsca startu oraz oddziałując z podstawowymi czynnikami transkrypcji GTF hamuje ekspresję genu H5.

Kolejną unikalną cechą histonów H1<sup>o</sup> i H5 jest budowa mRNA. Histony te, w porównaniu do innych histonów H1, posiadają długi odcinek nie ulegający translacji, zarówno od strony 5' oraz 3' (tzw. 5'-UTR i 3'-UTR)

(Franke i wsp., 1998). Wszystkie zbadane kręgowce posiadają jedną kopię genu kodującego histon H1<sup>o</sup>, jedynie u *Xenopus* gen ten jest reprezentowany w dwóch różnych wariantach nieallelicznych. Oznaczono jako H1<sup>o</sup>-1 i H1<sup>o</sup>-2 różnią się od siebie tylko o 16 aminokwasów (ponadto wariant H1<sup>o</sup>-1 jako jedyny histon H1 zawiera tryptofan). Chociaż oba warianty posiadają promotor o identycznym rozmieszczeniu odcinków regulujących są one odmienne pod względem budowy mRNA. Region 5'-UTR mRNA H1<sup>o</sup>-2 wykazuje kilka delecji w porównaniu do H1<sup>o</sup>-1, natomiast 3'-UTR obu cząsteczek mRNA o długości około 200 nukleotydów bardziej przypomina mRNA histonu H5 niż transkrypty H1<sup>o</sup> ssaków, u których odcinek ten przekracza 1000 nukleotydów (Brockard i wsp., 1997). Dodatkowo mRNA histonu H1<sup>o</sup> posiada ogon poli(A). Mysi gen H1<sup>o</sup> zawiera dwa sygnały poliadenylacji w efekcie czego mogą powstać dwa różne produkty: pierwszy typowy dla ssaków długości 2,1kb oraz drugi występujący tylko u myszy o długości 0,9 kb. Obie cząsteczki mRNA są aktywne, ale wykazują różną stabilność. W obrębie odcinka 3'UTR znajdują się elementy regulatorowe zaangażowane w kontrolę stabilności mRNA i przebieg translacji (Khochbin, 2001; Franke i wsp., 1998).

Histon H1<sup>o</sup> regulowany jest również na poziomie translacji. Przemawia za tym kilka obserwacji. Po pierwsze mRNA kodujące histon H1<sup>o</sup> obecne jest w początkowym okresie różnicowania (komórki silnie proliferujące), natomiast synteza białka odbywa się znacznie później na końcowym etapie różnicowania się komórek, gdy ich podziały ustępują. Ponadto w komórkach wątroby regeneracja po częściowej hepatektomii u szczura przebiegała dzięki obniżeniu poziomu białka H1<sup>o</sup>, ale równocześnie w tym samym czasie poziom mRNA kodującego histon H1<sup>o</sup> wzrastał. Zróżnicowanie to tłumaczy się przez wiązanie się mRNA ze specyficznymi białkami, które razem tworzą kompleksy niedostępne dla maszynerii translacyjnej (Khochbin, 2001).

Histony H1<sup>o</sup> i H5 wykazują cechy unikalne jako białka. Histon H5 charakteryzuje się dużą zawartością lizyny, seryny i alaniny (KSA), a w porównaniu z histonem H1<sup>o</sup> zawiera on znaczne ilości argininy (aminokwas ten zastępuje lizynę obecną w analogicznych miejscach w histonie H1<sup>o</sup>) zwłaszcza w domenie C-końcowej oraz obecnością w aminokońcowej części N-terminalnej treoniny, której nie znajdziemy w żadnym z histonów H1. W części tej zlokalizowane są wszystkie reszty aminokwasów aromatycznych oraz większość hydrofobowych. Histon H1<sup>o</sup> najmniejszy spośród wszystkich H1 bogaty w lizynę, alaninę i prolinę cechuje brak cysteiny, mała zawartość aminokwasów aromatycznych oraz obecność histydyny. Histon ten podobnie jak H5 zawiera metioninę w konserwatywnym miejscu domeny globularnej w pobliżu N-końca (Kłyszajko-Stefanowicz, 2002). U ssaków za pomocą elektroforezy wyróżniono dwie frakcje histonu H1<sup>o</sup> oznaczone H1<sup>o</sup>a i H1<sup>o</sup>b, jednak używając techniki RP-HPLC wykryto ich aż cztery. Różnice w ich obrębie wynikają tylko z budowy ogona N-terminalnego (około 30 aminokwasów). Wszystkie one kodowane są przez jeden gen, a ich odmienność polega na modyfikacji białkowych produktów. Klasyczny podział na H1<sup>o</sup>a i H1<sup>o</sup>b opiera się na zablokowaniu, bądź nie grupy aminowej w N-terminalnej serynie poprzez jej acetylację (H1<sup>o</sup>a jest formą N-acetylowaną). Chociaż nie znamy funkcji tego procesu przypuszcza się, że acetylacja jest zaangażowana w regulację metabolizmu białka oraz kontroluje stopień jego degradacji. Należy podkreślić, że występowanie obu form tzn. acetylowanej i nieacetylowanej jest cechą charakterystyczną dla histonu H1<sup>o</sup>, inne histony H1 podlegają procesowi acetylacji. Dodatkowo w obrębie każdej frakcji można wyróżnić dwie kolejne na podstawie występowania odpowiedniego aminokwasu w pozycji 3. Pierwotnie w tym miejscu znajduje się asparagina, lecz w wyniku deaminacji zastępowana jest ona przez kwas asparaginowy. Deaminacja jest procesem nie enzymatycznym postępującym w miarę upływu czasu. Proces ten opóźnia degradację białek przyczyniając

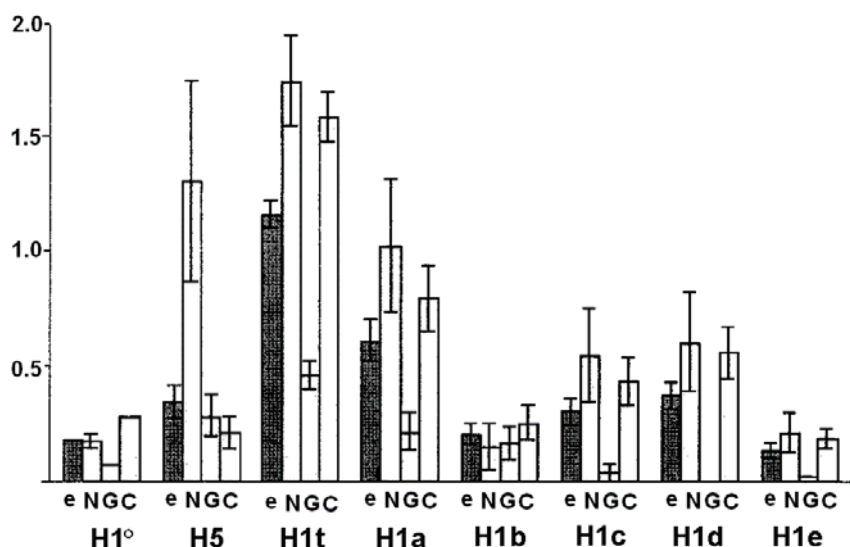
się do regulacji trwałości tych związków. Deaminacja histonu H1<sup>o</sup> wydaje się być zależna od N-terminalnej sekwencji Thr-Glu-Asn-Ser. Rozdział histonu H1<sup>o</sup> na cztery frakcje obserwowany u szczura, myszy i człowieka (organizmy przebadane pod tym względem) przypuszczalnie dotyczy również innych organizmów. Również w tym przypadku nie znamy funkcji tej modyfikacji, ale proporcje poszczególnych izoform zależą od tkanki oraz jej wieku. Można się tu dopatrzeć pewnych prawidłowości, wraz ze wzrostem wieku organizmów obecność histonu H1<sup>o</sup> w formie acetylowanej (H1<sup>o</sup> a Asn-3 oraz H1<sup>o</sup>a Asp-3) oraz deaminowanej (H1<sup>o</sup> a Asp-3 oraz H1<sup>o</sup> b Asp-3) wzrasta (Lindner i wsp., 1998). Histon H5 jak już wspomniano występuje w jądrzastych erytrocytach czyli u ptaków, gadów, płazów i ryb. Nagromadzenie H5 koreluje z kondensacją chromatyny oraz spadkiem replikacji i transkrypcji. Jego odpowiednik histon H1<sup>o</sup> występuje w tkankach silnie zróżnicowanych (np. mózg, wątroba, nerki, płuca), gdzie może stanowić 25-30% ilości histonu H1. Brak go w komórkach i tkankach aktywnie proliferujących (np. jelito, grasicca, śledziona, wątrobiak Morrisa). Histonu H1<sup>o</sup> nie wykryto również w limfocytach, co tłumaczy się łatwym przechodzeniem tych komórek w stan proliferacji w razie potrzeby (Lennox i Cohen, 1983). Zawartość histonu H1<sup>o</sup> w komórce jest odwrotnie proporcjonalna do aktywności mitotycznej, dlatego największe ilości tego białka obserwuje się u organizmów w pełni dojrzałych (u nowonarodzonych myszy histon H1<sup>o</sup> stanowi 3% całej zawartości histonu H1, natomiast u osobników dorosłych odsetek ten wzrasta do 21%). Przyjmuje się, że funkcją histonów H1<sup>o</sup> i H5 jest kondensacja chromatyny oraz represja transkrypcji. Pogląd taki wynika z opisanego specyficzności tkankowej oraz z dużego powinowactwa tych histonów do chromatyny. Histon H5 pod tym względem wykazuje silniejsze właściwości od H1<sup>o</sup>. Decydującą rolę w tym procesie odgrywa silnie zasadowy ogon C-terminalny (zwłaszcza w wariacie H5, dzięki obecności dużej ilości argininy), natomiast domena globularna

wykazuje bardzo słabe powinowactwo do nukleosomów (Yaneva i wsp., 1990; Ali i Singh, 1987; Koutzamani i wsp., 2002).

Oprócz wymienionych wariantów nieallelicznych (tzn. kodowanych przez różne geny znajdujące się w oddzielnych loci) histony łącznikowe podobnie jak większość genów cechują się dużym polimorfizmem genetycznym. Występowanie i zróżnicowanie form allelicznych histonów H1 opisano u różnych gatunków ssaków (Pałyga, 1990) oraz ptaków (Pałyga i wsp., 1993; Pałyga i wsp., 2000; Kowalski i wsp., 2004).

## 1.6. EWOLUCJA BIAŁEK HISTONOWYCH

Niewiele jest białek, które wykazują podobny stopień konserwatywności ewolucyjnej co histony. Białka histonowe należą do najwolniej zmieniających się białek wchodzących w skład żywych organizmów. Spośród całej rodziny białek histonowych histony łącznikowe stanowią grupę o względnie małej stabilności, choć nadal możemy je uważać



Rys. 7. Tempo ewolucji poszczególnych wariantów histonu H1 u kręgowców.

Na osi rzędnych zaznaczono (ilość podstawień niesynomicznych/miejsce/rok)  $\times 10^9$ .

e – całe białko, N – domena aminoterminalna, G - domena globularna, C – domena karboksyterminalna, (wg Ponte i wsp., 1998).

za białka wolno ewoluujące. Pochodzenie histonów H1 sięga *Procaryota* u których można znaleźć wiele białek o zbliżonej budowie i funkcji (Kasinsky i wsp., 2001). Ewolucja histonów łącznikowych różni się w zależności od rozpatrywanego wariantu oraz jego domeny (Rys. 7).

Pod względem budowy histony H1 i H5 można podzielić na trzy domeny. Środkowa domena globularna wykazuje najwyższy stopień stałości. Odcinek ten wykazuje całkowitą zgodność w obrębie tak odległych ewolucyjnie organizmów jak mysz, szczur i człowiek. Domeny otaczające część globularną wykazują znacznie większe zróżnicowanie.

Tabela 1. Średnia długość poszczególnych domen histonu H1 u kręgowców.

Ogon NH <sub>2</sub> -terminalny	Domena globularna	Ogon COOH- terminalny
40 ± 13 aminokwasów	79 ± 5 aminokwasów	106 ± 17 aminokwasów

Sekwencja domen terminalnych wykazuje wysoki stopień prostych, kilku aminokwasowych nie zawsze identycznych powtórzeń ( 4-12 aminokwasów). Motywy te występują najczęściej tandemowo. Istnienie krótkich odcinków, które mogą stanowić nawet 80% sekwencji w tych domenach oraz ich brak w części globularnej sugeruje, że domeny terminalne powstały w wyniku duplikacji krótkich motywów, które uległy mutacją punktowym oraz błędom w czasie replikacji (tzw. poślizg replikacyjny). Również proporcje między domenami wykazują wysoki stopień konserwatywności (wyjątkiem jest np. *E. minor*) (Ponte i wsp., 2003).

Także ewolucja poszczególnych wariantów jest zróżnicowana (Rys. 7). Spośród wszystkich histonów łącznikowych wariant specyficzny dla jąder H1t wykazuje najwyższy poziom zmian. Wynika to prawdopodobnie z położenia tego genu na innym chromosomie niż reszta histonów. Interesujące jest, że histony somatyczne H1a-e występujące wszystkie w grupie na tym samym chromosomie wykazują odmienne tempo ewolucji.

Histony H1a i H1c cechują się wysokim zróżnicowaniem, natomiast warianty H1b, H1d i H1e są stabilne ewolucyjnie (Lennox, 1984). Najwolniej zmieniającym się histonem jest H1e oraz H1° (duże ilości obu form histonu występują w komórkach zróżnicowanych), pomimo iż zlokalizowane są na innych chromosomach. Poszczególne warianty można uszeregować uwzględniając ich tempo ewolucji:

$$H1t > H1a > H1d > H1c > H5 > H1b > H1^\circ > H1e$$

Wyjątkowy na tle całej grupy histonów łącznikowych jest histon H5. Wyróżnia się wysoką konserwatywnością ogona C-końcowego, który jest bardziej stabilny niż domena globularna (Rys. 7). Może to wynikać z dominującej roli tej części histonu H5 w kondensacji chromatyny, podczas gdy pozostałe dwie domeny wydają się nie odgrywać większej roli w tym procesie.

Jak już zaznaczono wcześniej histon H5 ptaków pod względem budowy bardziej przypomina histon H1° występujący u *Xenopus* niż ssaczy wariant H1°. Co więcej histon obecny w erytrocytach *Xenopus* reprezentuje jedynie acetylowana forma H1°-2 (Koutzamani i wsp., 2002). Wszystko to świadczy, że histon H5 wyodrębnił się prawdopodobnie z histonu H1°, a później włączył specyficzne dla linii erytroidalnej odcinki regulatorowe. Podobieństwo widoczne jest od kasety specyficznej dla H4 aż do końca 3'-UTR (Brockard i wsp., 1997).

Zmiany w obrębie poszczególnych wariantów zachodzą z inną szybkością w efekcie czego różnice między tymi genami utrzymują się w przyszłości, a nawet będą się powiększać. Z drugiej strony wysoki konserwatyzm ewolucyjny oraz duże zróżnicowanie histonów łącznikowych świadczy o ważnej funkcji tych białek.

## 2. BADANIE FUNKCJI HISTONU H1 ORAZ JEGO RÓŻNORODNOŚCI

Badając znaczenie genu przyjmuje się cały szereg procedur, które mają na celu wyjaśnienie jaki wpływ ma analizowany obiekt na rozwój oraz funkcjonowanie organizmu. Najpierw ustala się jakie typy komórek produkują oraz (lub) oddziałują z produktem genu, następnie przeprowadza się *in vitro* analizę biochemiczną, której zadaniem jest objaśnienie właściwości genu i jego białkowego produktu. Końcowym etapem jest ustalenie jego biologicznej funkcji w żywych komórkach oraz znaczenie dla organizmu jako całości.

W przypadku histonu H1 dwie pierwsze procedury nie przyniosły zadawalających wyników. Przeprowadzono bardzo dokładne badania w których ustalono w jakich komórkach i kiedy następuje ekspresja poszczególnych wariantów histonu H1. Pozwoliło to na ogólny wgląd w procesy w których różne geny H1 mogą być zaangażowane. Kolejnym etapem badań było poznanie budowy genów i odcinków regulujących ich ekspresję oraz określenie właściwości oczyszczonych produktów białkowych. Izolacja histonów łącznikowych okazała się stosunkowo łatwa, dlatego też badania na tym poziomie mają już dość długą historię. Rozdzielone frakcje histonów H1 analizowano pod różnym kątem, badając ich zdolność do wiązania się z DNA, nukleosomem, tworzenie struktur wyższego rzędu itp. Niestety otrzymane wyniki, niejednokrotnie sprzeczne, nie pozwoliły ustalić funkcji zróżnicowania histonów łącznikowych.

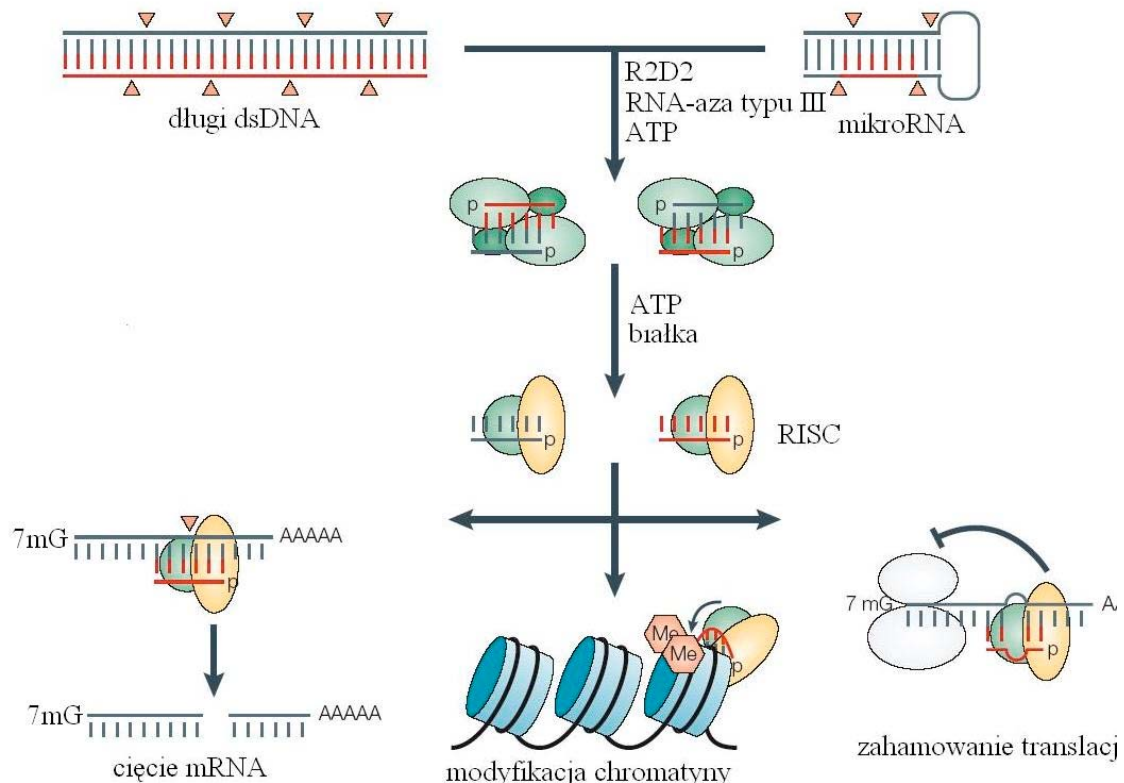
Do omawianego problemu można także podejść od drugiej strony, mianowicie zamiast badać wpływ białka na rozwój organizmu można zapytać czy obecność danego genu/białka jest niezbędna. W tym celu należy stworzyć organizmy w których badany gen jest nieaktywny. Najprostszym rozwiązaniem wydaje się zmiana mutacyjna w obrębie genu lub jeszcze lepiej



jego wyłączenie z genomu (np. przez zastąpienie genu inną sekwencją kodującą). Procedura ta ma oczywiście sens tylko wtedy, gdy posiadamy dokładne dane na temat budowy obiektu oraz potrafimy dokonać precyzyjnych zmian. Mniej inwazyjna metoda polega na inaktywacji genu na poziomie transkrypcji lub translacji. Istnieje kilka technik wykorzystujących w tym celu różnego rodzaju kwasy nukleinowe. Najczęściej używa się trzech procedur, których podstawą są kwas oligodeksynukleinowy (ODN), rybozomy lub mały interferujący RNA (siRNA) reagujące z produktem transkrypcji genu. Cząsteczki ODN to jednoniciowy DNA długości około 20 nukleotydów oddziałujące na zasadzie komplementarności z pre-mRNA i mRNA. Powstały dupleks RNA-DNA jest substratem dla rybonukleazy H (RN-aza H), która tnie RNA na krótkie odcinki. Inny sposób polega na zmodyfikowaniu ODN tak, aby zapobiec łączeniu się z RN-azą H. W tym przypadku wyciszenie genu przebiega poprzez zakłócenie procesu dojrzewania pre-mRNA (splicing). Rybozomy należą do związków katalicznych, które mogą wiązać się z innym rodzajem RNA tnąc go na mniejsze kawałki. Wśród wielu klas rybozymów większość posiada konformacje głowy młotka lub spinki do włosów. Odcinki końcowe rybozomu są komplementarne do docelowej cząsteczki RNA, natomiast część centralna tzw. głowa odpowiada za cięcie. W najnowszej technice wykorzystuje się interferencyjny RNA (RNAi). Cząsteczki RNAi to długie dwuniciowe odcinki RNA, które wprowadzone do komórek zostają pocięte na mniejsze fragmenty czyli siRNA. Kwasy siRNA to klasa RNA długości 21-28 nukleotydów. Wielkość siRNA odpowiada w przybliżeniu wielkości mikroRNA (miRNA), dlatego zasada działania obu rodzajów RNA jest podobna. Niskocząsteczkowy RNA łączy się ze specjalnymi białkami w wyniku czego powstają kompleksy wyciszające indukowane przez RNA (RICS). Kompleksy RICS mogą następnie łączyć się z mRNA zawierającym

komplementarną sekwencję w odległości 10 nukleotydów od końca 5' (Rys. 8).

Słabością wszystkich opisanych technik jest niska efektywność oraz ograniczona skuteczność. Prawie nigdy nie udaje się całkowicie zahamować



Rys.8. Mechanizm hamowania aktywności genów na oddziaływaniu z niskocząsteczkowym RNA.dsRNA jest rozkładany przez RNA-zę typu III na krótkie odcinki siRNA o zbliżonej długości do miRNA. Następnie powstały RNA łączy się z białkami, które powodują zerwanie wiązań wodorowych (energia do tego procesu pochodzi z ATP), powstają kompleksy RISC odpowiedzialne za wyciszenie genu. Zablockowanie eksprecji może przebiegać na trzy sposoby. Na poziomie chromatyny kompleksy RISC wiążą się z DNA prowadząc do jego metylacji (Me). Kompleksy RISC mogą się łączyć także z mRNA. Dupleks RNA-DNA jest następnie rozkładany przez RN-azę H (wyciszenie genu posttranskrypcyjne – strona lewa) lub przeniesiony na rybosomy hamuje translację (strona prawa).Prawdopodobnie istnieją różne rodzaje cząsteczek RISC odpowiedzialne za degradację mRNA, blokowanie translacji i modyfikację chromatyny. 7 mG, 7-metylowana guanina; AAAAA, ogon poliadenylowany; Me, grupa metylowa; p, fosforan 5', R2D2, białko wiążące się z dsRNA (na podstawie Dorsett i Tuschl, 2004).

aktywności genu (poziom ekspresji spada najczęściej o około 90%). Zaletą natomiast jest krótki czas pomiędzy wprowadzeniem cząsteczki, a obserwowanym rezultatem. Wśród wymienionych metod dwie pierwsze, mianowicie cząsteczki ODN i rybozomy próbuje się wykorzystać w leczeniu chorób genetycznych i wirusowych (terapia przeciw HIV oparta na dostarczaniu rybozymów znajduje się obecnie w I i II fazie prób klinicznych).

Wydawałoby się, że blokada ekspresji genów kodującego białka histonowe nie jest konieczna. Powolna ewolucja, powszechne występowanie zdają się świadczyć o ich niezbędności dla życia organizmów. Założenie to jednak okazało się błędne. Całkowita eliminacja genów histonów H1 w co najmniej czterech organizmach (*Tetrahymena* - Shen i wsp., 1995; *Ascobulus* – Barra i wsp., 2000; *Aspergillus* – Ramon i wsp., 2000 oraz *S. cerevisiae* – Patterton i wsp., 1998) nie pociągnęła za sobą większych zmian. Organizmy te nie wykazywały żadnego wynikającego stąd fenotypu, rozwijały i rozmnażały się normalnie. Obserwacje te stały się przyczyną intensywnych badań, które mają wyjaśnić ten fenomen.

Aby zrozumieć zjawiska przebiegające u zmodyfikowanych genetycznie organizmów niezbędne jest omówienie procesów oraz technik pozwalających na manipulację w obrębie genomu organizmów żywych.

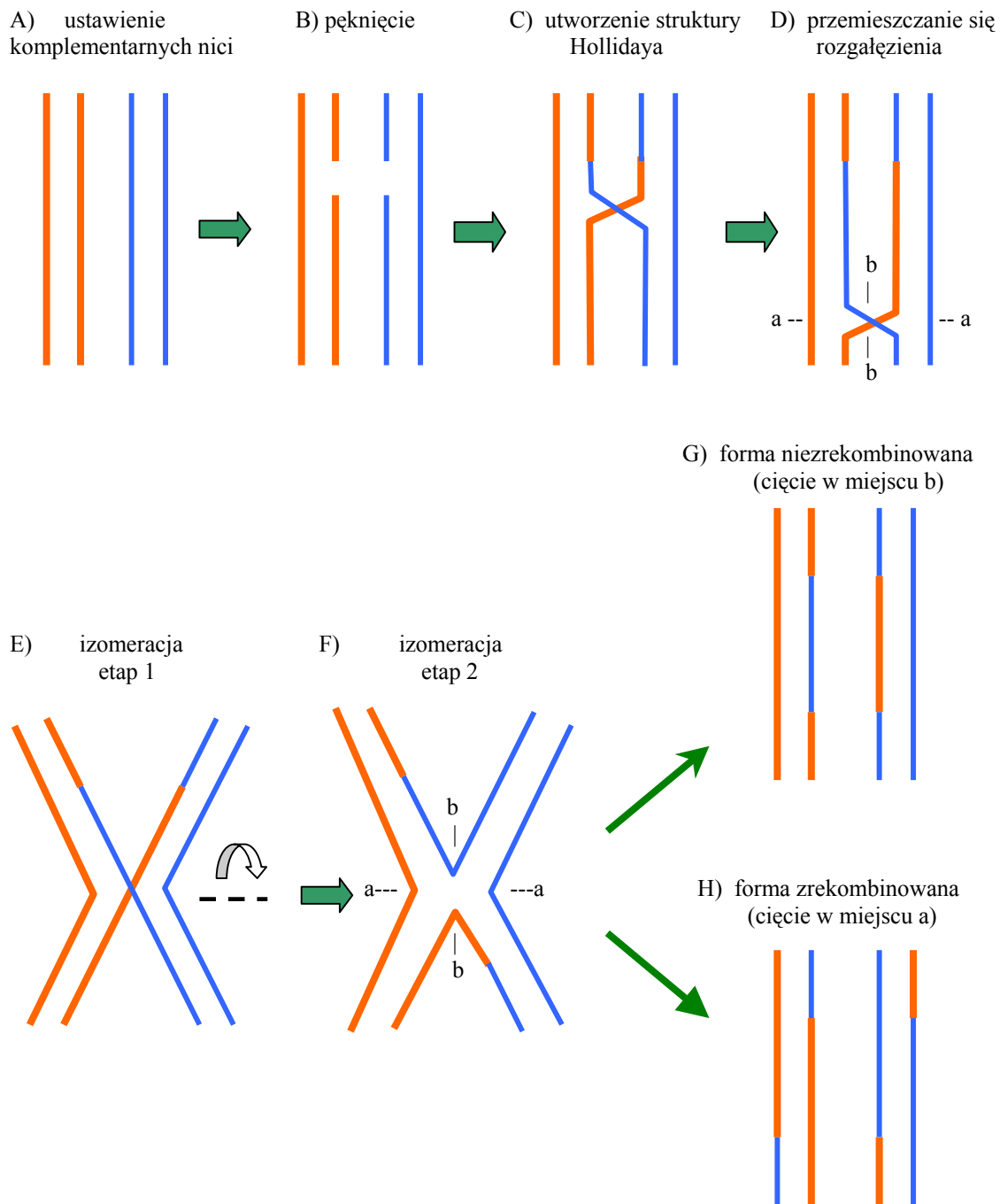
## 2.1. REKOMBINACJA HOMOLOGICZNA

Podstawą obecnie stosowanych technik jest integracja egzogenego DNA z genomem organizmu-biorcy. Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu procesów występujących w naturze oraz ich odpowiedniej modyfikacji. Stwierdzono, że u bakterii „obcy” DNA czasem może ulec trwałemu włączeniu do genoforu. Proces ten zachodził bez względu na pochodzenie egzogenego DNA. Nośnikiem DNA może być inna komórka bakteryjna (koniugacja), fag (transdukcja). Niekiedy sam DNA wystarcza do przebiegu procesu (transformacja). Ponadto już w roku 1909 Janssens zaobserwował zjawisko wymiany segmentów DNA między homologicznymi chromosomami w czasie podziału mejotycznego. Proces ten nazwano crossing-over lub rekombinacją. Wyjaśnienie jego znaczenia przedstawił Morgan, zaś mechanizm do tej pory jest obiektem badań. Niemniej jednak oczywiste było, że genom żywych organizmów jest dynamiczną strukturą mogącą się zmieniać w dużym stopniu na przestrzeni kilku pokoleń, a nie jak dotąd przyjmowano stabilnym, bardzo wolno zmieniającym się w wyniku punktowych mutacji odcinkiem DNA. Pierwszym etapem w zrozumieniu procesu rekombinacji była obserwacja, że w crossing-over wymianie ulegają odcinki znajdujące się w tych samych miejscach chromosomów biorących udział w procesie oraz ustalenie, że w przypadku transdukcji integracja bakteriofaga przebiega zawsze w tym samym miejscu genoforu bakterii. Nie jest to proces przypadkowy, a więc musi być uzależniony od jakiś czynników. Ich ustalenie miało olbrzymi wpływ na dalszy rozwój współczesnej genetyki.

Decydującą rolę w rekombinacji odgrywa podobieństwo (homologia) sekwencji DNA biorących udział w tym procesie. Aby mogło dojść do rekombinacji homologicznej niezbędny jest odcinek o sekwencji niemal identycznej na przestrzeni kilkuset par zasad. Proces ten teoretycznie wydaje się prosty. Dwie cząsteczki ustawiają się obok siebie, a następnie wymieniają

homologiczne odcinki na zasadzie podobieństwa. Jednak w rzeczywistości tak nie jest. Już od samego początku pojawiają się pewne wątpliwości. Po pierwsze w jaki sposób „obcy” DNA jest w stanie odnaleźć homologiczną sekwencję w genomie przeciętnej komórki eukaryotycznej o długości  $3 \times 10^9$  par zasad? Nawet jeśli pominiemy ten problem pozostaje odpowiedzieć na pytanie jak ten proces może przebiegać na poziomie molekularnym. Pierwszy model rekombinacji został przedstawiony w roku 1964 przez Robina Hollidaya (Rys. 9). Koncepcja ta zakładała powstanie przerw w tych samych miejscach na obu helisach (chromosomach), wymianę i połączenie naciętych nici, powstanie charakterystycznych struktur określanych mianem pól chiazm (struktury Hollidaya), ich migrację w wyniku dyfuzji rotacyjnej (obrót helis wokół długiej osi), następnie nacięcie i połączenie nici w jednym z dwóch możliwych miejsc. W wyniku całego procesu mogą powstać dwa produkty: zrekombinowany i niezrekombinowany. Początkowe cięcie i inwazja dotyczy tylko dwóch nici o tej samej polarności (np.  $3' \rightarrow 5'$ ), jednak izomeracja połączonych dupleksów poprzez zmianę położenia w przestrzeni pozwala na zamianę nici biorących udział w rekombinacji (na  $5' \rightarrow 3'$ ). W ten sposób prawdopodobieństwo obu konfiguracji: zrekombinowanej i niezrekombinowanej jest równe.

Model Hollidaya mimo, iż podawał wiarygodny mechanizm procesu rekombinacji nie mógł wyjaśnić wszystkich obserwacji. Konwersja genów jest zjawiskiem w wyniku którego dochodzi do rozdziału DNA niezgodnego z prawami Mendla. Proces ten zaobserwowano u workowców (*Ascomycetes*). Produkty mejozy u tych organizmów w postaci spor trafiają do jednego worka (zaraz po mejozie następuje mitozą w wyniku czego w worku znajduje się osiem komórek przetrwalnikowych, zamiast spodziewanych czterech). Przewidywany rozkład dwóch alleli znajdujących się w tym samym *locus* powinien wynosić 2:2, jednak czasem pojawia się układ 3:1. Dodatkowo w wyniku postmejotycznej mitozy może powstać stosunek 5:3, 4:4 lub rzadziej

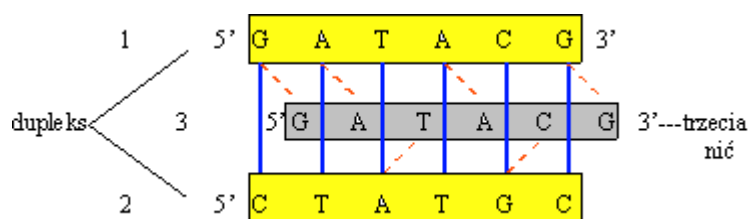


Rys. 9. Model rekombinacji homologicznej Hollidaya. A) Podwójne nici DNA (chromosomy) ustawiają się do rekombinacji. B) Powstanie pęknięć w obu niciach o tej samej polarności w miejscach homologicznych. C) Inwazja sąsiednich nici i ich ligacja w wyniku czego powstaje struktura Hollidaya (pół-chiazma). D) W skutek jednoczesnego obrotu obu nici wokół ich długiej osi rozgałęzienie przemieszcza się (etap migracji); a- jedno z możliwych miejsc cięcia, b- alternatywne miejsce cięcia . E, F) Izomeracja pozwalająca przez obrót w przestrzeni (oś obrotu oznaczono linią przerywaną) na wymianę nici zaangażowanych w proces rekombinacji. G) Brak rekombinacji, układ powstający przez cięcie w miejscu b, wymianie uległ tylko dość krótki odcinek powstały w wyniku migracji rozgałęzienia. H) Rekombinacja (crossing-over) powstała przez cięcie w miejscu a. (Na podstawie Sedivy i Joyner, 1992; zmodyfikowano).

7:1. Odchylen tych nie można było wyjaśnić stosując model zaproponowany przez Hollidaya. Podstawową wadą modelu Hollidaya był jego początkowy etap. W żaden racjonalny sposób nie można było sobie wyobrazić mechanizmu, który powodowałby nacięcie nici w homologicznych miejscach dwóch różnych dupleksów. Ponadto zgromadzono szereg dowodów, że proces ten jest raczej asymetryczny. W ten sposób powstał model Meselsona-Reddinga, którego cechą charakterystyczną jest to, że przerwaniu ulega tylko jedna nić, która dokonuje inwazji drugiego dupleksu. Dzięki obecności homologii obu nici wolny koniec wypiera jedną z nici dupleksu, następuje zajmuje jej miejsce w wyniku czego powstaje heterodupleks.

Pod koniec lat 70-tych przeprowadzając transfekcję komórek za pomocą plazmidów zauważono kolejne procesy sprzeczne z oboma modelami. Po pierwsze przecięcie obu nici pierwotnie kolistej cząsteczki DNA w miejscu homologii powoduje wzrost częstości transfekcji równoległe z wzrostem poziomu rekombinacji homologicznej. Ponadto usunięcie pewnego obszaru homologii w obrębie jednej z nici nie wpływało na ten proces. W jakiś sposób luka w plazmidzie ulegała naprawie na podstawie informacji zawartej w chromosomie komórki. W celu wyjaśnienia tego paradoksu w roku 1983 powstał model zakładający powstanie pęknięć dwuniciowych (model Szostaka). Model ten pozwolił wyjaśnić wszystkie obserwowane zjawiska pozostawiając kluczowe założenia Hollidaya tj. powstawanie pól chiazm czy migracje rozgałęzień (Sedivy i Joyner, 1992).

Jak widać rekombinacja homologiczna jest procesem złożonym, dlatego niezwykle trudno wyobrazić sobie w jaki sposób może przebiegać w żywych komórkach. Pierwsze informacje na ten temat dostarczyły obserwacje mutantów *Escherichia coli*. Otóż mutanty w obrębie genu *recA* praktycznie nie wykazywały zjawiska rekombinacji, dlatego też skupiono się na działaniu jego białkowego produktu. Po wyizolowaniu białka RecA udowodniono *in vitro*, że jest ono w stanie wiązać się z DNA. Proces ten początkowo jest



Rys. 10. Model trójniciowego DNA (tripleks) ukazujący wiązania między poszczególnymi nukleotydami. Na żółto zaznaczono nici występujące w „normalnym” DNA, kolorem szarym oznaczono trzecią nić wiążącą się do dupleksu. Wiązania wodorowe w dsDNA zaznaczono niebieską linią; czerwona, przerywana linia oznacza wiązania między „atakującą” nicią a poszczególnymi nukleotydami dupleksu. W tworzeniu wiązań w trzeciej nici biorą udział tylko puryny dsDNA. (Na podstawie Sedivy i Joyner, 1992; zmienione).

niezależny od sekwencji DNA. Ponadto umieszczając w środowisku reakcji dsDNA, homologiczny do jednej z nici ssDNA oraz RecA przejściowym produktem są cząsteczki trójniciowego DNA (Rys. 10). Brak białka RecA powoduje, że pomimo istnienia homologii obu cząsteczek DNA proces integracji nie następuje. Mechanizm tego zjawiska polega na tym, że białko RecA wiążąc się z jednoniciowym DNA (w proporcji jedna cząsteczka białka na 3-4 nukleotydy) zmienia swą konformację w taki sposób, że cały kompleks nukleoproteinowy nabiera nowych właściwości i może się łączyć z dsDNA o ile ten wykazuje obszary homologii. W czasie tego procesu podwójna helisa ulega zniekształceniu (wzrasta odległość między nukleotydami z 34Å do 51Å) w wyniku czego wiązania wodorowe ulegają naderwaniu. Jeżeli w tym momencie ssDNA i jedna z nici dsDNA wykazuje homologię na dostatecznie długim odcinku reakcja następuje dalej. Białko RecA katalizuje wymianę nici homologicznych podczas której powstaje heterodupleks o normalnej konformacji przestrzennej (nukleotydy oddalone o 34 Å), a trzecia nić zostaje uwolniona. W trakcie rekombinacji DNA ulega różnym przekształceniom, nic więc dziwnego, że w procesie biorą udział różne enzymy. Są to:



- topoisomerazy typu I i II (enzymy zapobiegające powstawaniu napięć w czasie zmiany struktury DNA)
- nukleazy (m.in. egzonukleazy, endonukleazy, syntetazy i ligazy)
- białko SSB (białko to wiąże się z ssDNA uniemożliwiając ponowną asocjację wolnych końców naciętego DNA podczas rekombinacji homologicznej do tych samych miejsc)

Analizując inne mutanty *E. Coli* zidentyfikowano także inne enzymy związane z procesem rekombinacji. Jednym z nich jest kompleks RecABC zbudowany z trzech białek kodowanych odpowiednio przez trzy geny *recB*, *recC* i *recD*. Kompleks ten posiada właściwości ATP-azy, egzonukleazy (zarówno w kierunku  $3' \rightarrow 5'$  i  $5' \rightarrow 3'$ ) i endonukleazy ssDNA. Enzym wiąże się z cząsteczką DNA i rozwija ją rozrywając wiązania wodorowe (prawdopodobnie na tym etapie niezbędny jest nakład energii), aż do napotkania miejsca chi ( $5'GCTGGTGG3'$ ), gdzie enzym nacina jedną z nici na odcinku około 56 nukleotydów w kierunku  $3'$  za miejscem chi. Powstaje jednoniciowy koniec, który dokonuje inwazji nienaruszonej helisy DNA. W procesie tym bierze udział także białko *RecA*. Etap następny polegający na przemieszczaniu się struktur Hollidaya katalizują białka *RuvA* i *RuvB*, które wiążą się w tym miejscu powodując ruch obrotowy obu helis (Brown, 2001). Choć opisany proces dotyczy *E. coli* mechanizm rekombinacji wydaje się procesem konserwatywnym podobnie jak replikacja, transkrypcja i pomimo małych różnic przebiega podobnie u wszystkich organizmów. Założenie to potwierdza wykrycie licznych białek zaangażowanych w rekombinację homologiczną u *Eukaryota* analogicznych do opisanych u *E. coli*. Białka te u drożdży można podzielić na dwie rodziny. Pierwsza obejmuje białka *Rad51*, *Rad52*, *Rad54*, *Rad55* i *Rad57* biorące udział w reakcji wymiany homologicznych nici oraz druga w skład której wchodzi białka *Mre11*, *Rad50*

i Xrs2 posiadające właściwości nukleaz. Białko Rad51 podobnie jak jego bakteryjny odpowiednik RecA łączy się z ssDNA tworząc filamenty nukleoproteinowe katalizuje proces inwazji nici. Inne białka na przykład Rad55 i Rad57 pełnią funkcje pomocnicze w stosunku do Rad51 w czasie wiązania się z ssDNA. Homologiczne białka wykryto również u kręgowców, na dzień dzisiejszy znany jest cały szereg białek biorących udział w rekombinacji. (Vasquez i wsp, 2001).

Oprócz rekombinacji homologicznej w komórkach występuje proces nazywany rekombinacją niehomologiczną (rekombinacja nieuprawniona). Zjawisko to polega na włączeniu się egzogenego DNA do genomu w miejscach nacięcia bez względu na podobieństwo sekwencji. Choć wydaje się, że jest to proces prymitywny nie znamy nawet jego podstaw. Wiadomo natomiast, że rekombinacja niehomologiczna nie występuje u takich organizmów jak *E. coli* i *S. cerevisiae*. Proces ten jest odwrotnie proporcjonalny do zawansowania ewolucyjnego organizmu. U bezkręgowców takich jak *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans* rekombinacja nieuprawniona wykazuje dość duży stopień osiągając najwyższą wartość u ssaków u których stosunek rekombinacji homologicznej i niehomologicznej wynosi od 1:1000 do 1:10000 w zależności od gatunku. Możliwe, że tak wysoki poziom rekombinacji nieuprawnionej odpowiedzialny jest za utrzymanie integralności chromosomów. Rozdział chromosomów w czasie podziału komórki uzależniony jest od występowania na nich centromerów. Struktury te są miejscem do którego przyczepiają się mikrotubule wrzeciona kinetochorowego, skracanie włókien powoduje rozdzielenie chromatyd siostrzanych i rozdział DNA. Chromosomy w których pojawiły się dwuniciowe przerwy (co jest wysoce prawdopodobne zważywszy na ich długość) utracą w trakcie najbliższego podziału odcinek DNA nie posiadający centromeru. Jeżeli wszystkie inne procesy zawiodą wydaje się bardziej

korzystne wbudować taki acentryczny DNA gdziekolwiek indziej w obrębie genomu niż go bezpowrotnie utracić (Sedivy i Joyner, 1992).

## 2.2. TECHNIKI WYKORZYSTYWANE W GENETYCZNYM MODYFIKOWANIU ZWIERZĄT

Aby zbadać funkcję genu można przeprowadzić dwie procedury: wyłączyć gen eliminując jego białkowy produkt lub spowodować jego nadekspresję (np. wprowadzając do genomu nadmiarowe ilości genu), a następnie obserwować jaki ma to wpływ na organizm lub komórki hodowane *in vitro*. Oba podejścia zakładają, że w jakiś sposób musimy dokonać manipulacji w obrębie DNA żywej komórki tak, aby proces ten pozwolił nam na włączenie lub wyłączenie genu. Najpierw musimy skonstruować odpowiedni odcinek DNA, a następnie namnożyć go. W tej części badań powszechnie wykorzystuje się technikę PCR oraz różnego rodzaju wektory. Wektory są ogólnie rzecz biorąc nośnikami DNA, które można łatwo namnożyć i wyizolować. Dobór wektora zależy od wielu czynników spośród

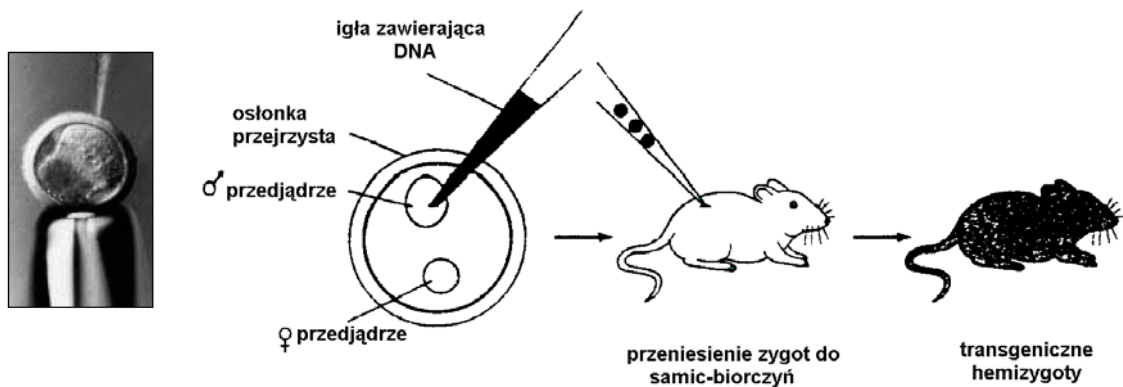
**Tabela 2. Zrekombinowane wektory bakteryjne (wg Bishop, 2001)**

Wektor	Pochodzenie	Wielkość wstawki
Plazmid wielokopowy	różne plazmidy wielokopowe	do 20 kpz
Wektor fagowy $\lambda$	bakteriofag $\lambda$	do 30 kpz
Kosmid	bakteriofag $\lambda$	do 40 kpz
Sztuczny chromosom P1 (PAC)	bakteriofag P1	80-90 kpz
Sztuczny chromosom bakteryjny (BAC)	duży plazmid bakteryjny (czynnik F)	100-300 kpz
Sztuczny chromosom drożdżowy (YAC)	chromosom drożdżowy	100-1000 kpz

których decydującą rolę odgrywa wielkość konstruktu genetycznego (Tabela 2). W momencie gdy mamy wystarczającą liczbę kopii DNA należy je wprowadzić do komórki docelowej.

### 2.2.1. MIKROINIEKCJA DO PRZEDJĄDRZY ZYGOTY

Pierwszą techniką pozwalającą na wprowadzenie egzogenego DNA do komórki była iniekcja do przedjądrzy zygoty. Technikę tą z powodzeniem stosowano u wielu organizmów. Wykorzystuje się tu fakt, że zanim dojdzie do integracji materiału genetycznego oocytu i plemnika w trakcie zapłodnienia przez pierwsze 12 godzin (u myszy) DNA matczyne i ojcowskie wewnątrz zygoty pozostają jako oddzielne struktury nazywane przedjądrzami. W tym czasie dochodzi do wielu przemian wewnątrz DNA (m.in. wymiana protamin na histony). Do zygot będących na takim etapie rozwoju wstrzykuje



Rys. 11. Procedura otrzymywania transgenicznych myszy przy użyciu mikroiniekcji do przedjądrzy. Samicom podaje się gonadotropiny w celu wywołania superowulacji, a następnie łączy z samcami. Po 48 godzinach zygoty wypłukuje się z jajowodów, przylegające do nich komórki usuwa się przez inkubacje w roztworze hialuronidazy. DNA (~5 µg/ml) wstrzykuje się do przedjądrzy pod mikroskopem za pomocą igły, zygota jest przytrzymywana na miejscu przy użyciu tępej pipetki (fotografia). Następnie zygoty przenosi się do samic-biorczyń (samice takie dzień wcześniej łączy się je z samcami po wasektomii w celu synchronizacji cyklu rozrodczego). Około 10-30% urodzonych zwierząt powinna być transgeniczna-hemizygoty; (wg Sedivy i Joyner, 1992).

się kilka pikolitrow płynu zawierającego od 50-1000 kopii transgenu. Z obu przedjądry najczęściej wybiera się większe męskie. Po zabiegu zarodki przenosi się do jajowodów samic (Rys. 11). Technika ta choć wydaje się bardzo drastyczna jest dość wydajna. Około 60% zygot przeżywa zabieg mikroiniekcji, natomiast 30% dożywa do urodzenia. Nie stanowi to większej niedogodności, gdyż do jajowodu wprowadza się większą ilość zarodków tak, aby zrekompensować to zjawisko. Podstawową wadą opisywanej techniki jest losowa integracja wprowadzanego DNA. W żaden sposób nie da się przewidzieć w ilu kopiach i gdzie w obrębie genomu włączy się transgen. Istnienie homologii między egzogennym DNA a jego odpowiednikiem w genomie (jeśli taki istnieje) nie ma wpływu na proces, który przebiega głównie za pomocą rekombinacji niehomologicznej. Otrzymane organizmy transgeniczne są po tym względem unikatowe. Włączenie DNA do poszczególnych chromosomów jest niezależne w wyniku czego organizmy są hemizygotyczne.

### **2.2.2. INTEGRACJA TRANSGENU METODĄ REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ**

Wykorzystując zjawisko rekombinacji homologicznej możliwa stała się celowa i w pełni kontrolowana manipulacja w obrębie genomu. Technika ta nazywa się homologiczną wymianą genów (ang. gene targeting) i polega na zamianie DNA genomowego na konstrukt na zasadzie ich wzajemnej homologii.

Obecnie przy użyciu tej metody można tworzyć całe organizmy transgeniczne lub odpowiednio zmodyfikowane kultury tkankowe. Z założenia technika wymiany homologicznej wydaje się prosta. Należy skonstruować DNA o wystarczająco długim obszarze homologii, ten zaś w wyniku rekombinacji homologicznej ulega włączeniu w odpowiednim miejscu chromosomu

wprowadzając jednocześnie transgen. Niestety wysoki poziom rekombinacji nieuprawnionej powoduje, że w większości komórek proces ten przebiega nie w tym miejscu co trzeba. Z tego powodu proces homologicznej wymiany genów jest mało wydajny. Pociąga to za sobą konieczność selekcji komórek, które włączyły transgen w odpowiednim położeniu. Prawidłowa integracja jest procesem rzadkim, występuje raz na  $10^6$  infekowanych komórek. Znalezienie właściwej komórki wydaje się bardzo trudne, lecz zastosowanie szeregu procedur pozwala na względnie łatwą identyfikację poszukiwanego obiektu. Decydującą rolę odgrywa w tym przypadku budowa wprowadzanego DNA., który oprócz niezbędnego obszaru homologicznego może zawierać gen kodujący produkt łatwo wykrywalny lub wnoszący nową cechę do modyfikowanego organizmu (np. wrażliwość lub odporność na konkretny związek chemiczny). Geny takie nazywa się zamiennie markerami lub genami reporterowymi. W zależności od ich właściwości możliwa staje się selekcja pozytywna lub negatywna transfekowanych komórek (Tabela 3). Selekcja pozytywna polega na tym, że do komórki wprowadza się gen np. *neo*, który niesie odporność na czynnik chemiczny w tym przypadku G418. Gen *neo*

**Tabela 3. Najczęściej stosowane geny reporterowe (wg Bishop, 2001).**

Gen	Pochodzenie	Rodzaj selekcji	Czynnik selekcyjny
<i>neo</i>	bakterie	pozytywna	G418
<i>hph</i>	bakterie	pozytywna	higromycyna
<i>pur</i>	paciorkowce	pozytywna	puromycyna
<i>aprt</i>	ssaki	pozytywna negatywna	pożywka HAT 8-azaadenina
<i>hppt</i>	ssaki	pozytywna negatywna	pożywka HAT 6-tioguanina
<i>HSVtk</i>	wirus opryszczki	negatywna	gancyklowir, FIAU
<i>Dt</i>	bakterie	negatywna	brak (efekt toksyczny)
<i>tk</i>	ssaki	pozytywna negatywna	pożywka HAT 5-Br-urydyna

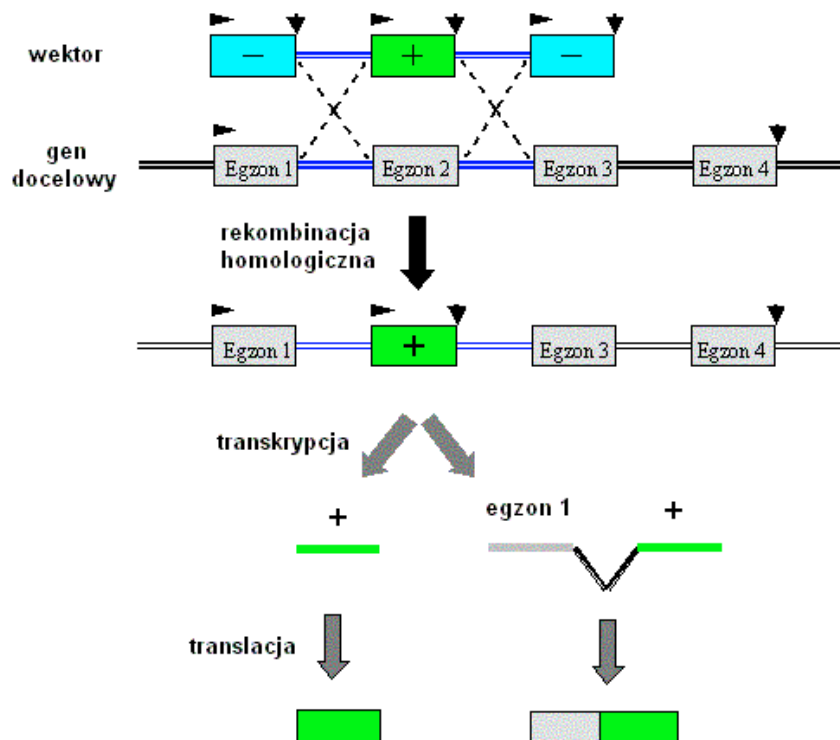
odpowiedzialny jest za odporność na neomycynę. Antybiotyk ten hamuje u bakterii proces translacji, natomiast jego analog G418 wykazuje takie same właściwości w komórkach ssaków. W ten sposób podając G418 wszystkie komórki, które włączyły gen *neo* do swego genomu będą odporne, pozostałe zginą. Selekcja negatywna opiera się zaś na wrażliwości poszukiwanych komórek. Łącząc oba sposoby selekcji łatwo wyizolować komórki o pożądanym właściwościach.

Niestety również w przypadku techniki gene targeting dużym utrudnieniem jest rekombinacja niehomologiczna. Integracja wprowadzonego genu może nastąpić w niezamierzonym miejscu przez co niewłaściwe komórki uzyskają odporność, a cała procedura staje się bezużyteczna. Można jednak tego uniknąć poprzez odpowiednią modyfikację wprowadzanego konstruktów. Obecnie stosuje się dwa podstawowe rodzaje wektorów, które pozwalają na selekcję pozytywno-negatywną (Rys.12) lub warunkową selekcję pozytywną (Rys. 13).

W pierwszym przypadku wektor zawiera dwa rodzaje genów reporterowych: pozytywne i negatywne. Marker negatywny umieszczony jest zewnętrznie w stosunku do obszaru homologicznego. W ten sposób komórki, które włączyły wektor w wyniku rekombinacji homologicznej będą posiadać tylko gen reporterowy pozwalający na pozytywną selekcję, drugi rodzaj markerów zostanie utracony. W przypadku losowej integracji bardziej prawdopodobne jest włączenie obu genów (sprzyja temu tendencja do łączenia się wektorów ze sobą w tzw. tandemy wielokopiiowe zanim jeszcze ulegną integracji do genomu). W selekcji warunkowo pozytywnej wprowadzany transgen zawiera bezpromotorowy gen selekcyjny np. *neo*. W następstwie rekombinacji homologicznej gen ulega integracji w pobliżu komórkowego promotora przez co możliwa jest jego transkrypcja. Włączenie w innym miejscu genomu powoduje, że jest on nieaktywny (w przypadku losowej integracji ekspresja genu z innego promotora jest mało

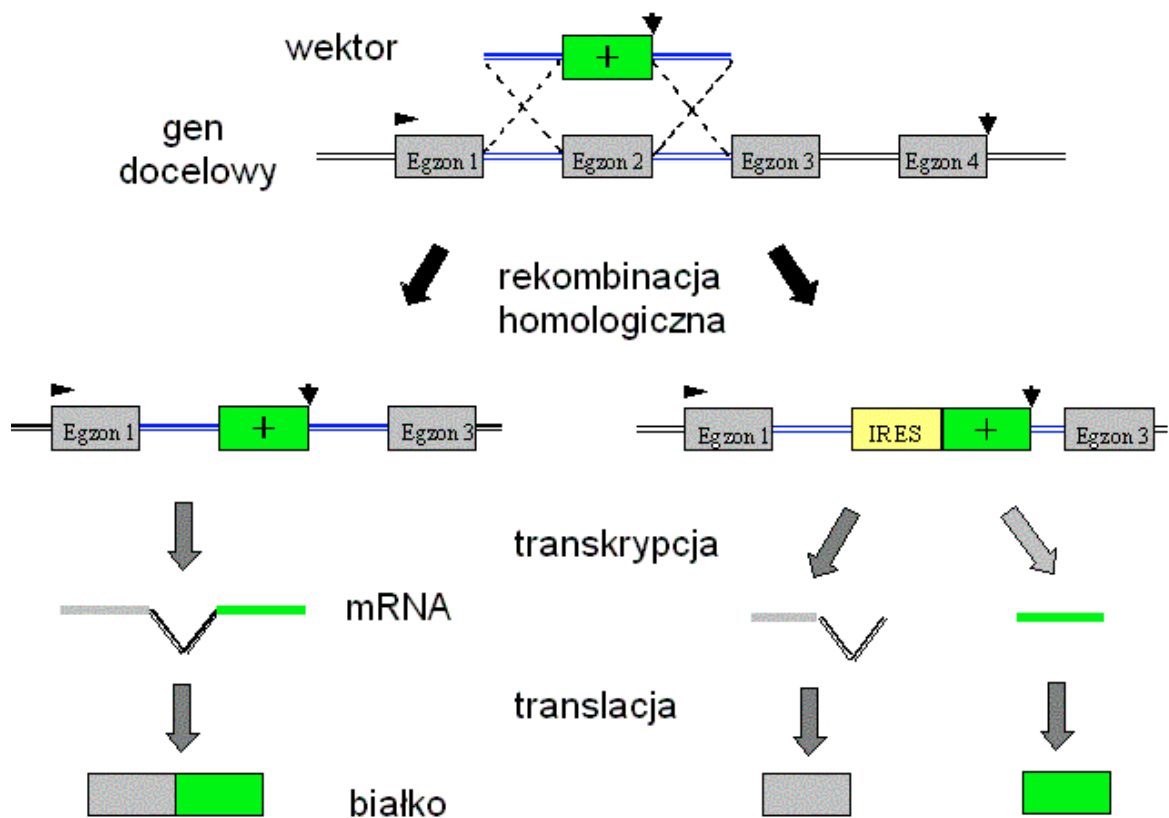
prawdopodobna). Problem lokalizacji genu w odpowiedniej ramce odczytu można rozwiązać umieszczając przed nim sekwencję IRES (Bishop, 2001).

Zastosowanie selekcji oraz ulepszonych wektorów uczyniło technikę „wybijania genów” bardzo wydajną i skuteczną. Homologiczna wymiana genów mogłaby się okazać wysoce nieekonomiczna, gdybyśmy chcieli jej



Rys. 12. Homologiczna wymiana genów przy użyciu wektora zawierającego markery pozytywny „+” i negatywny „-“. Region homologiczny (oznaczony niebieską linią) flankuje marker pozytywny (kolor zielony), geny reporterowe negatywne (kolor jasno niebieski) znajdują się w stosunku do niego zewnątrz. Każdy z genów zaopatrzony jest w odcinek promotorowy (▶) oraz sygnał poliadenylacji (▼). Jeżeli wektor włączy się do genomu za pomocą rekombinacji homologicznej marker negatywny nie zostanie włączony do genu, natomiast gen pozwalający na selekcję pozytywną zastąpi część genu docelowego. W przypadku rekombinacji nieuprawnionej oba geny ulegną integracji z DNA organizmu. Istnieją dwa możliwe produkty zmodyfikowanego genu: białko warunkujące pozytywną selekcję np. neo (w przypadku rozpoczęcia translacji od promotora genu neo) lub białko hybrydowe zbudowane z części genu docelowego i transkryptu markera pozytywnego (rozpoczęcie translacji od głównego promotora).

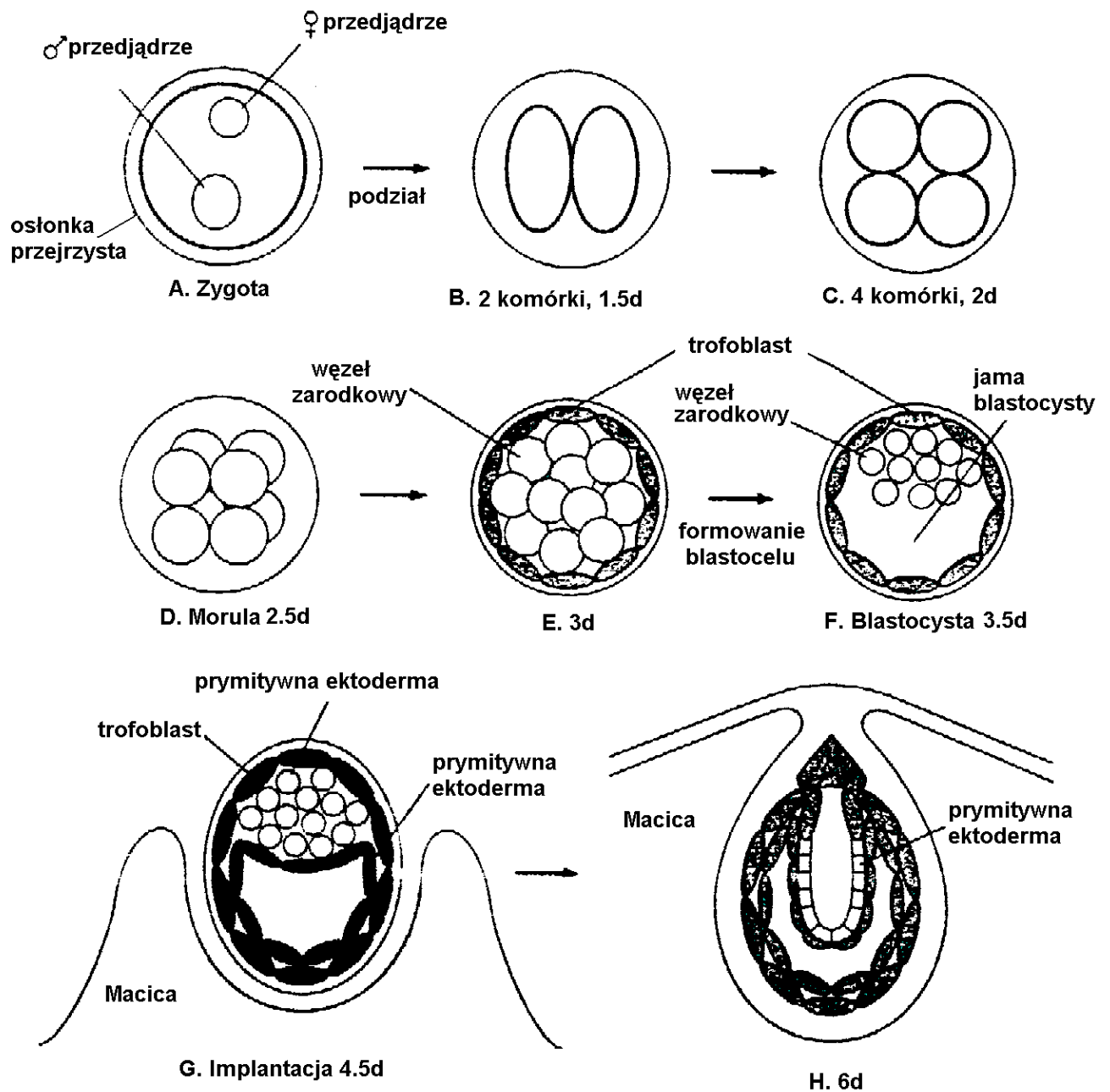




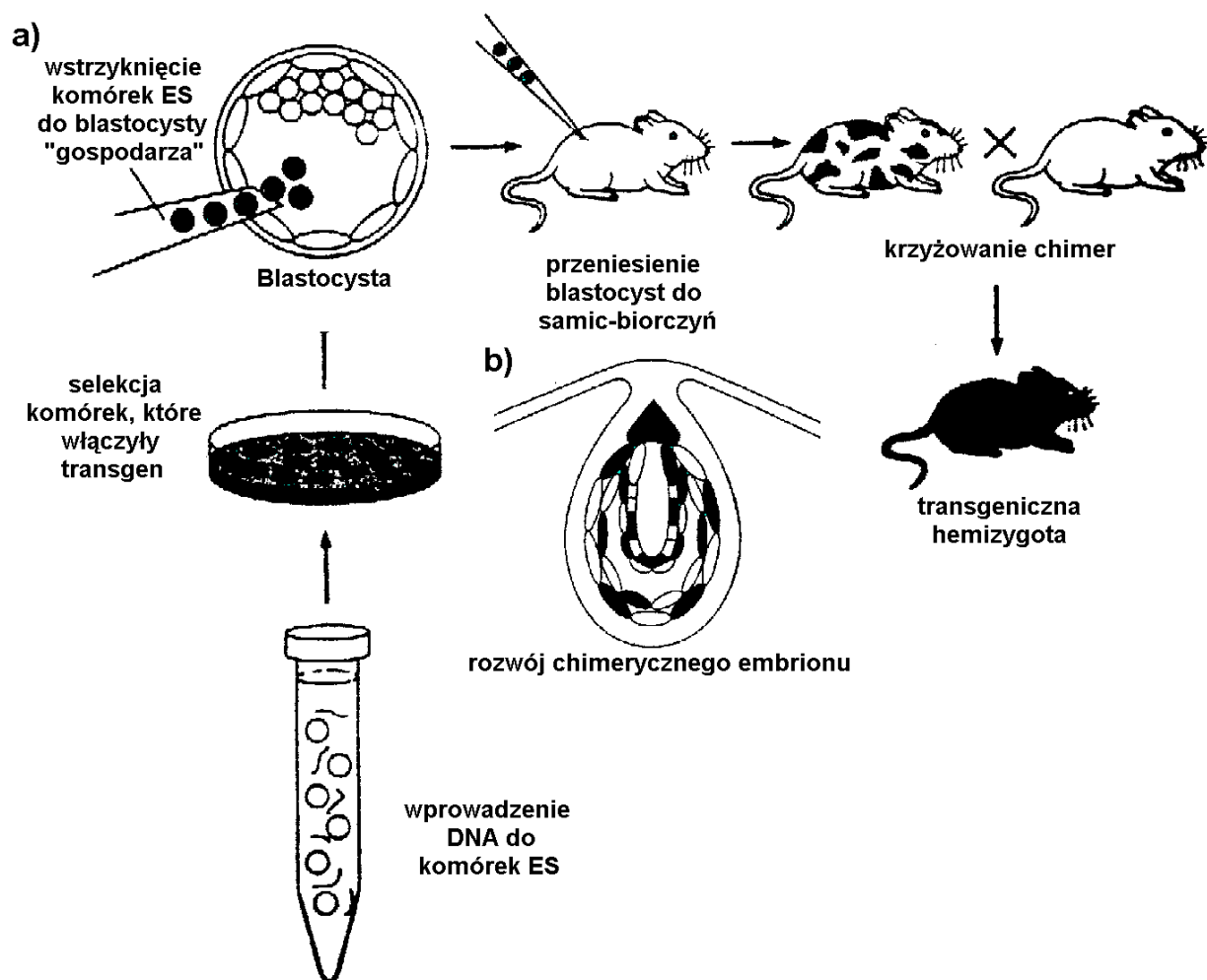
Rys 13. Homologiczna wymiana genów z wykorzystaniem wektora zawierającego gen pozytywnej selekcji pozbawiony własnego promotora. Produktem jest białko hybrydowe (mimo odmiennej budowy od zwykłego białka markerowego hybryda nadal jest aktywna biologicznie i niesie odporność na antybiotyki). Gdy wektor zaopatrzymy w sekwencję IRES (kolor żółty) komórka będzie produkować dwa produkty: N-terminalną część białka (odcinek kodowany na rysunku przez egzon 1) oraz białko markerowe. Wynika to z specyficznej budowy sekwencji IRES, która zawiera kodony terminacyjne we wszystkich trzech ramkach odczytu. Dodatkowo wspomaga ona rozpoczęcie translacji z wewnętrznego kodonu startowego mRNA. Oznaczenia jak w rysunku 12.

użyć do otrzymywania organizmów transgeniczných w podobny sposób jak w trakcie mikroiniekcji. Uzyskanie odpowiedniej ilości zygot byłoby niemożliwe, nawet przy wykorzystaniu superowulacji. Dokładne poznanie cyklu rozwojowego myszy pozwoliło ominąć tę przeszkodę. Otóż na początku lat 80-tych okazało się, że pewne komórki zygoty można pobrać i hodować *in vitro* podobnie jak zwykłe komórki somatyczne. Komórki te nazwano pierwotnymi komórkami zarodkowymi lub w skrócie komórkami

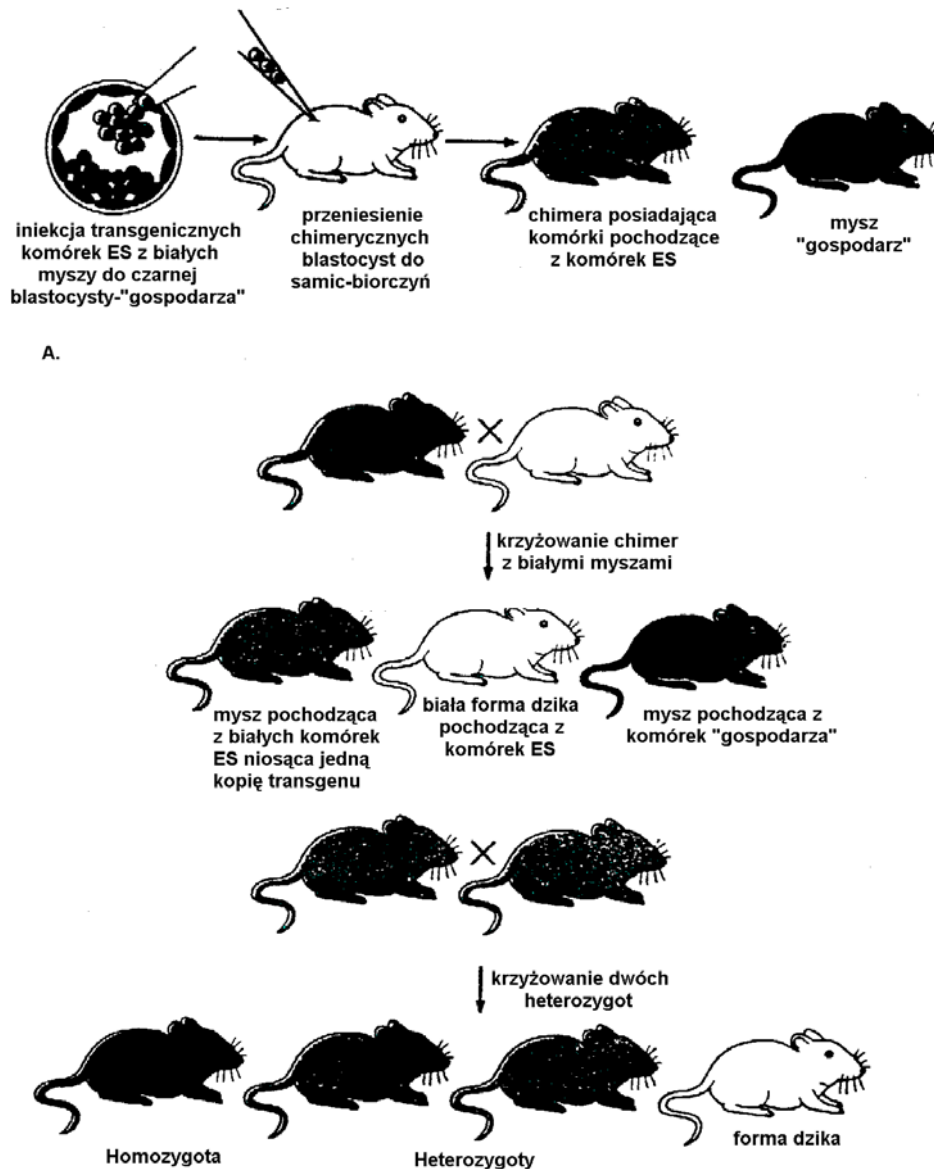
ES (ang. embryonic stem cells). Komórki ES pobiera się z węzła zarodkowego blastocysty (Rys. 14), a następnie rozmnaża w sztucznych warunkach. Po ich wprowadzeniu z powrotem do zarodka (na etapie blastocysty lub moruli) komórki te łączą się z resztą zarodka i biorą udział w jego rozwoju. Pierwotne komórki zarodkowe wykazują właściwości totipotencjalne, lecz w warunkach *in vitro* mają tendencje do szybkiego różnicowania (powstają potworniaki złośliwe tzw. teratokarcinoma) tracąc swój potencjał. Problem ten rozwiązano hodując komórki ES na warstwie komórek odżywczych (fibroblasty płodowe), które w wyniku napromieniowania utraciły zdolność proliferacji. Często zamiast warstwy komórek odżywczych do kultury dodaje się czynnik przeciwbiałaczkowy (LIF), który sprzyja mnożeniu się komórek ES bez ich różnicowania. W ten sposób uzyskano w miarę stabilną kulturę komórkową, której komórki można poddać transfekcji, selekcji i ponownie włączyć do zarodka. Komórki ES różnicują się w miarę rozwoju zarodka zasiedlając różne tkanki w tym również narządy rozrodcze. Ostatecznie rodzą się organizmy chimeryczne, które zbudowane są z komórek pochodzących od dwóch różnych organizmów (Rys. 15). Aby określić poziom chimeryzmu otrzymanych zwierząt standardowo stosuje się marker związany z kolorem sierści. Zygoty białych myszy łączy się z komórkami ES pochodzącymi od czarno umaszczonych osobników lub na odwrót. W ten sposób można łatwo ustalić stopień chimeryzmu myszy, który może się wahać od kilku procent do ponad 90. Następnie chimery rozmnaża się łącząc je z jednym z wcześniej użytych szczepów (krzyżówka wsteczna). Otrzymujemy potomstwo, którego zgodnie z prawem Mendla jedna czwarta będzie heterozygotami w stosunku do transgenu (oczywiście zakładając, że komórki ES weszły w skład linii prekursorowej komórek rozrodczych). Przeprowadzając dalsze krzyżowanie można otrzymać homozygoty (oznacza to całkowite wyłączenie danego genu tzw. knock out) (Rys.16).



Rys. 14. Początkowy etap rozwoju zarodka myszy. Liczby z indeksem „d” oznaczają liczbę dni po zapłodnieniu. Rysunki A-H przedstawiają przekrój poprzeczny przez embrion w różnym okresie rozwoju (wg Sedivy i Joyner, 1992).



Rys. 15. Tworzenie transgenicznych myszy przy użyciu komórek ES. a) najpierw wprowadza się wektor do komórek ES (np. przez elektroporację), następnie przeprowadza selekcję. Komórki, które włączyły transgen za pomocą rekombinacji homologicznej izoluje się i wprowadza do blastocysty „gospodarza” (komórki ES można także połączyć z zarodkami na etapie moruli, nie pokazane na rysunku). Po przeniesieniu zarodków do matek zastępczych embriony rozwijają się dalej, b) embrion zbudowany jest z dwóch rodzajów komórek, jedne pochodzą z komórek ES (kolor czarny), drugie powstały natomiast z komórek gospodarza (kolor biały). Po około trzech tygodniach rodzą się chimeryczne myszy (jeżeli komórki budujące ciało chimery pobrano od szczepów różniących się kolorem sierści, można łatwo ocenić poziom chimeryzmu wzrokowo). Myszy takie krzyżuje się z homozygotami recesywnymi jednego ze szczepów wyjściowych w celu otrzymania organizmów w całości transgenicznych, które mimo wszystko nadal będą hemizygotami. (wg Sedivy i Joyner, 1992, zmienione).



Rys. 16. Otrzymywanie myszy homozygotycznych (wg Sedivy i Joyner, 1992).

Czynnikiem limitującym transgenezę zarówno w komórkach ES i hodowlach komórek somatycznych jest sposób dostarczenia egzogenego DNA do komórki. Bezpośrednie wstrzyknięcie wektora do jądra jest co prawda możliwe, ale jest to metoda w tym przypadku bezcelowa (dostarczenie do każdej z miliona komórek transgenu, a później wybranie 2-3 komórek u których nastąpiła prawidłowa rekombinacja byłoby bezsensowne). Podstawową i najczęściej stosowaną metodą dostarczenia wektora jest

elektroporacja. Technika ta polega na wywołaniu przejściowych zmian w błonie komórkowej pod wpływem prądu elektrycznego (krótki, ale niezwykle silny impuls rzędu kilku kV/cm powoduje powstanie porów w plazmolemie przez które transgen może się przedostać do wnętrza komórki). Na podobnej zasadzie oparta jest metoda wykorzystująca ultradźwięki. Inną często wykorzystywaną techniką jest koprecypitacja w obecności fosforanu wapnia oraz lipofekcja. W pierwszej metodzie do roztworu zawierającego DNA dodaje się chlorek wapnia i fosforan sodu. Oba związki reagują ze sobą tworząc nierozpuszczalny fosforan wapnia, który może się łączyć z DNA. Następnie komórki wchłaniają powstały kompleks na drodze pinocytozy lub fagocytozy. W procesie lipofekcji wykorzystuje się właściwości DNA do tworzenia kompleksów z małymi, dodatnio naładowanymi pęcherzykami lipidowymi. Pęcherzyki te zlewają się z błoną komórkową wprowadzając DNA do wnętrza komórki. Zadaniem wszystkich tych technik, choć różnią się wydajnością i użytecznością w odniesieniu do poszczególnych komórek, jest wprowadzenie obcego DNA do komórki (Tabela 4).

Techniki umożliwiające pośrednią transfekcję (wszystkie oprócz mikroiniekcji) mają zdecydowanie niższą wydajność niż iniekcja do

**Tabela 4. Użyteczność różnych metod dostarczania wektora do komórki. (wg Vasquez i wsp., 2001).**

Metoda transfekcji	Skuteczność transfekcji	Losowa integracja	Integracja miejscowo specyficzna	Współczynnik homologicznej wymiany genów	Użyteczność metody *
Mikroiniekcja	brak danych	$1.2 \times 10^{-1}$	brak danych	$8 \times 10^{-3}$	1:15
Elektroporacja	10%	$8.7 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-7}$	$2.1 \times 10^{-7}$	1:2 400
Koprecypitacja w obecności $\text{CaPO}_4$	24%	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-2}$	$6.3 \times 10^{-7}$	1:40 000
Lipofekcja (z wykorzystaniem LipofectAmine)	98%	$2.2 \times 10^{-1}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$6.2 \times 10^{-7}$	1:350 000

\* im mniejszy stosunek obu wartości tym lepsza użyteczność metody

przedjądrzy. Wynika to z tego, że wektor trafia do cytoplazmy, a nie bezpośrednio do jądra. Po drodze większość DNA jest degradowana przez nukleazy obecne w komórce. W związku z małą częstością z jaką zachodzi rekombinacja homologiczna niezwykle istotne jest zastosowanie procedur, które pozwalają zwiększyć jej udział przy jednoczesnym obniżeniu poziomu rekombinacji niehomologicznej. Można na przykład do konstrukcji wektorów wykorzystać „izogenny” DNA (tzn. pochodzący z komórek szczepu transfekowanego). Analiza doświadczeń wykazała, że w momencie , gdy używa się izogennego DNA współczynnik integracji za pomocą rekombinacji homologicznej znacznie wzrasta (te Riele i wsp., 1992). Dane te dotyczą myszy hodowlanych, natomiast podobna analiza w stosunku do komórek człowieka nie ujawniła takich preferencji. Jest to korzystne , ponieważ w przeciwieństwie do myszy być może będzie możliwe stworzenie jednego wektora użytecznego we wszystkich liniach komórkowych człowieka (Sedivy i Dutriaux, 1999). Innym użytecznym podejściem do problemu może być wykorzystanie istniejących linii komórkowych o szczególnie wysokim poziomie rekombinacji homologicznej np. kurzych limfocytów B linii DT40 powstałych w wyniku wirusowo indukowanej białaczki, bądź też stworzenie sztucznych linii komórkowych o podobnych właściwościach. Komórki takie mogą powstać w wyniku homologicznej wymiany genów zaangażowanych w proces rekombinacji. Włączenie nadmiarowych kopii genów takich jak Rad51 i Ubl1 (gen kodujący ludzkie białko ubikwityno podobne) może znacznie zwiększyć częstość rekombinacji homologicznej. Na podobnej zasadzie można zmniejszyć poziom rekombinacji niehomologicznej (Vasquez i wsp., 2001). Równie ciekawe są obserwacje świadczące, że w przypadku ssaków długość odcinka homologicznego, choć jest ważna, nie jest czynnikiem decydującym o częstotliwości rekombinacji homologicznej. Czynnikiem tym jest ilość i lokalizacja uszkodzeń DNA genomowego (zwłaszcza pęknięć dwuniciowych). Proces rekombinacji homologicznej, a więc również

wymiany genów za pomocą techniki gene targeting, wzrastał znacznie po wprowadzeniu nacięć DNA za pomocą restryktazy (Godwin i wsp., 1994). Wyniki te sugerują, że jeśli w jakiś sposób udałoby się naciąć DNA w wymaganym miejscu można by wielokrotnie zwiększyć współczynnik rekombinacji homologicznej. Użycie któregośkolwiek z naturalnych enzymów restrykcyjnych nie przyniesie odpowiednich rezultatów (sekwencje przez nie rozpoznawane występują w zbyt dużej ilości w genomie i są przy tym mało specyficzne), jednak stworzono już kilka „chimerycznych” nukleaz składających się z niespecyficznej domeny odpowiedzialnej za cięcie DNA oraz domeny wiążącej się z ściśle określoną sekwencją (zawierającą motyw palca cynkowego) (Bibikova i wsp., 2001). Prawdopodobnie już w niedalekiej przyszłości możliwe będzie stworzenie banku takich enzymów. Alternatywnym sposobem tworzenia podwójnych przerw DNA w ściśle określonym miejscu może być wykorzystanie oligonukleotydów tworzących trójniciowe DNA (TFO, ang. triplex-forming oligonucleotides). TFO są krótkimi oligonukleotydami silnie wiążącymi się z specyficznymi miejscami genomu zawierającymi dużą ilość puryn (Rys. 10). Oligonukleotyd łączy się z odpowiednią nicią dzięki wiązaniom wodorowym lokując się w większym rowku dsDNA. Miejsca do których wykazują powinowactwo TFO rozmieszczone są stosunkowo często (mniej więcej co 1kbp), dlatego powinny się one znaleźć teoretycznie w każdym genie. Trójniciowe DNA rozpoznawane jest jako uszkodzenie i ulega wycięciu. Mechanizm tego procesu nadal pozostaje niewyjaśniony (Vasquez i wsp., 2001).

Tworzenie organizmów transgenicznych przy pomocy homologicznej wymiany genów przez długi czas pozostawało możliwe tylko w stosunku do myszy. Komórki ES dzięki którym proces ten był możliwy otrzymano tylko u myszy. Dopiero w drugiej połowie lat 90-tych udało się uzyskać linie o charakterze immortalizowanych (unieśmiertelnionych), pluripotencjalnych komórek u innych organizmów oraz ostatecznie w 1998 roku u człowieka. W

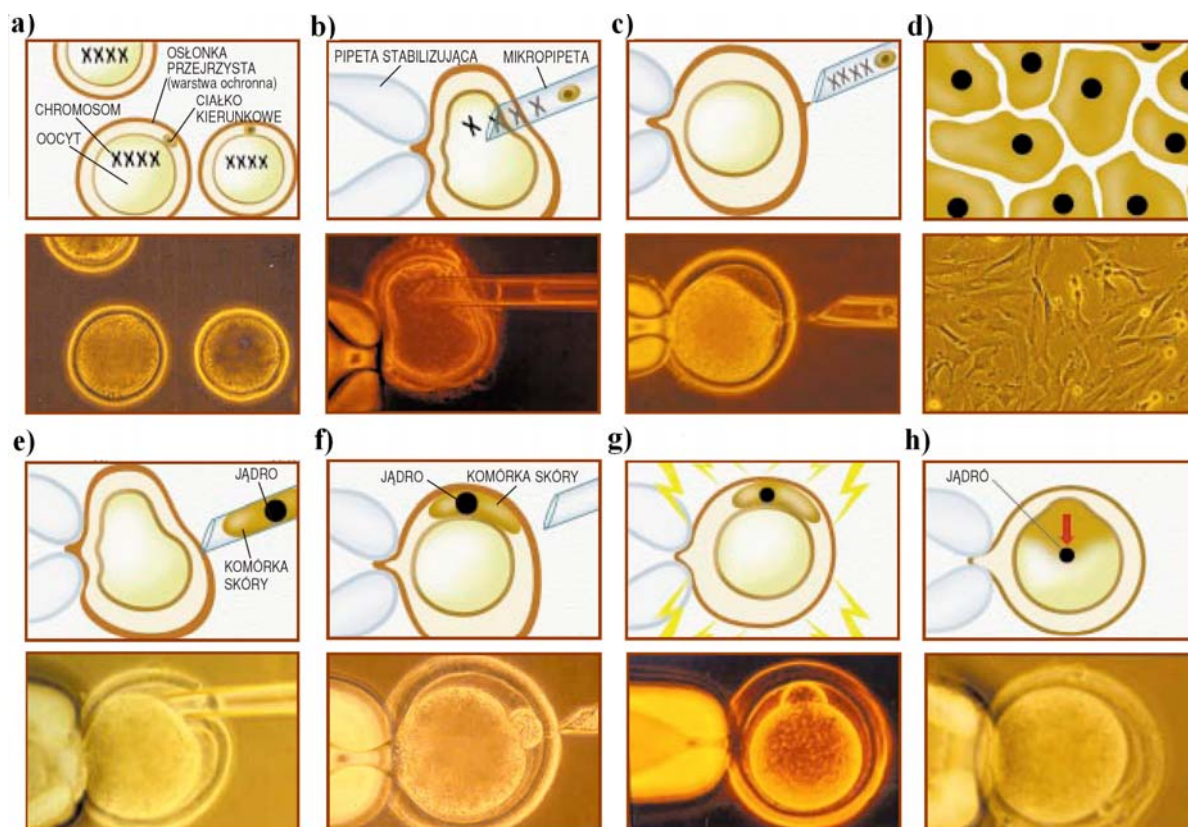


tym ostatnim przypadku procedura analogiczna do stosowanej u myszy, choć wydaje się możliwa, jest nieosiągalna ze względów praktycznych i etycznych (Bishop, 2001).

### **2.2.3. KLONOWANIE SOMATYCZNE**

Najmłodszą, ale i najszybciej rozwijającą się techniką tworzenia zwierząt transgenicznych jest klonowanie somatyczne. Zasada tej techniki polega na umieszczeniu w bezpośrednim sąsiedztwie enukleowanego oocytu (pozbawionego własnego DNA) dowolnej komórki somatycznej lub jej jądra. Oocyt taki poddaje się działaniu prądu (elektrofuzja, zjawisko oparte na tych samych zasadach co elektroporacja) w wyniku czego dochodzi do połączenia obu komórek oraz aktywacji oocytu, który staje się *de facto* zygota (Rys. 17).

Klonowanie jest niestety nadal techniką mało wydajną, ale jej burzliwy rozwój pozwala przypuszczać, że już niedługo sytuacja ta się zmieni. Decydującą rolę wydaje się odgrywać odpowiednia synchronizacja cyklu rozwojowego obu komórek (faza G0/G1). Chociaż technika ta budzi wiele kontrowersji etycznych (klonowanie człowieka) i naukowych (niektórzy wątpią w jej użyteczność ze względu na skracanie się telomerów, które są wyznacznikiem długości życia organizmu) z praktycznego punktu widzenia może się okazać niezwykle użyteczna. Zastosowanie klonowania w transgenezie pozwoli na wykorzystanie hodowli tkankowych jako źródła komórek będących prekursorami organizmów transgenicznych. W ten sposób będzie można pominąć etap komórek zarodkowych oraz organizmów chimerycznych uzyskując w pierwszym pokoleniu organizmy w całości transgeniczne (Modliński i Krasiewicz, 2001).

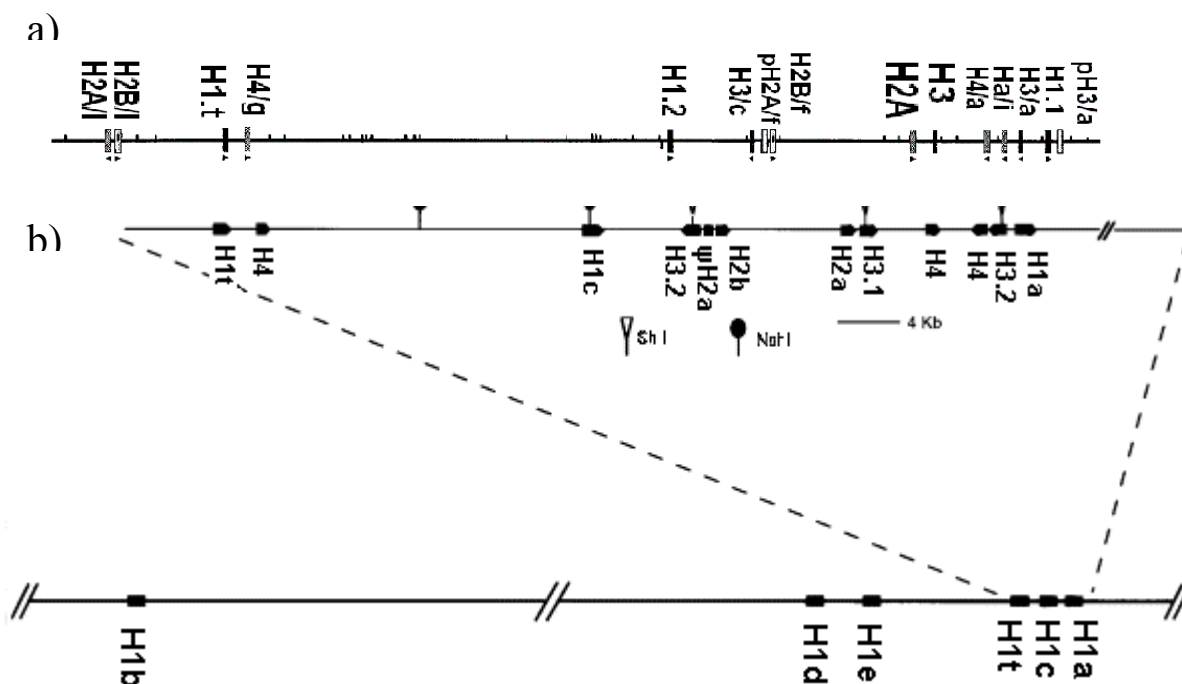


Rys. 17. Klonowanie somatyczne. Pobrane oocyty pod wpływem czynników chemicznych dojrzewają *in vitro*, następnie przy pomocy mikropipety usuwa się z nich chromosomy i ciało kierunkowe (b), wewnątrz osłonki przejrzystej pozostaje tylko cytoplazma. Fibroblasty pobrane z dorosłego zwierzęcia hoduje się na szalkach (d). Jedna z komórek zostaje wciągnięta do mikropipety, którą przekuwa się osłonkę przejrzystą enukleowanego oocytu (e). Komórkę skóry wprowadza się pod osłonkę przejrzystą (f). Komórka jajowa łączy się z fibroblastem pod wpływem impulsu elektrycznego-elektrofuzja (g). Jądro fibroblastu przechodzi do cytoplazmy oocytu (h). Po kilku godzinach komórka zaczyna się dzielić (wg Lanza i wsp., 2001).

### 3. BADANIA NAD HISTONEM H1 MYSZY

Geny kodujące histony ułożone są na chromosomach w grupach, które u niższych *Eukaryota* stanowią tandemowe powtórzenia osobno zgrupowanych genów histonów rdzeniowych i łącznikowych. Inaczej wygląda to u wyższych organizmów u których geny te podobnie tworzą wyraźne grupy, lecz są one wymieszane między sobą. U myszy można wyróżnić co najmniej osiem wariantów histonów H1. Histony H1a-e i H1t zlokalizowane są na chromosomie 13. Histon H1<sup>o</sup> znajduje się na chromosomie 15, natomiast H1<sup>oo</sup> na 6. Rozmieszczenie poszczególnych wariantów wydaje się cechą utrwaloną ewolucyjnie u wielu gatunków. Również u człowieka geny histonów H1a-e i H1t położone są na jednym chromosomie (krótkie ramie 6 chromosomu, region 21.1-22.2), podobnie histon H1<sup>o</sup> leży samotnie na chromosomie 22. U myszy większość genów histonowych zgrupowane jest na odcinku długości 1Mpz (region HIST1). W jego obrębie możemy wyróżnić dodatkowo trzy mniejsze grupy. Pierwsza zawierająca 9 histonów rdzeniowych oraz H1a, H1c i dość zaskakująco H1t zajmuje odcinek 80 kpz. Następna grupa zawiera histony H1d i H1e. W skład ostatniej najbardziej wyróżniającej się grupy oddalonej od poprzednich o blisko 500 kpz wchodzi 16 genów histonów rdzeniowych i histon H1b (Rys. 18). Mimo, iż kolejność genów jest utrwalona ewolucyjnie u organizmów takich jak mysz i człowiek (prawdopodobnie ma to wpływ na regulację ekspresji genów) nie można się tu dopatrzeć żadnego schematu. Przykładowo geny H1a i H1c oddzielone przez H1t znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie ulegają ekspresji we wszystkich komórkach somatycznych, natomiast histon H1t występuje jedynie w spermatocytach.

Ułożenie genów jest ważne, gdy chcemy otrzymać organizmy transgeniczne w których wyłączenie genu (nokaut) ma obejmować więcej niż jeden wariant H1. Geny zlokalizowane na jednym chromosomie są ze sobą

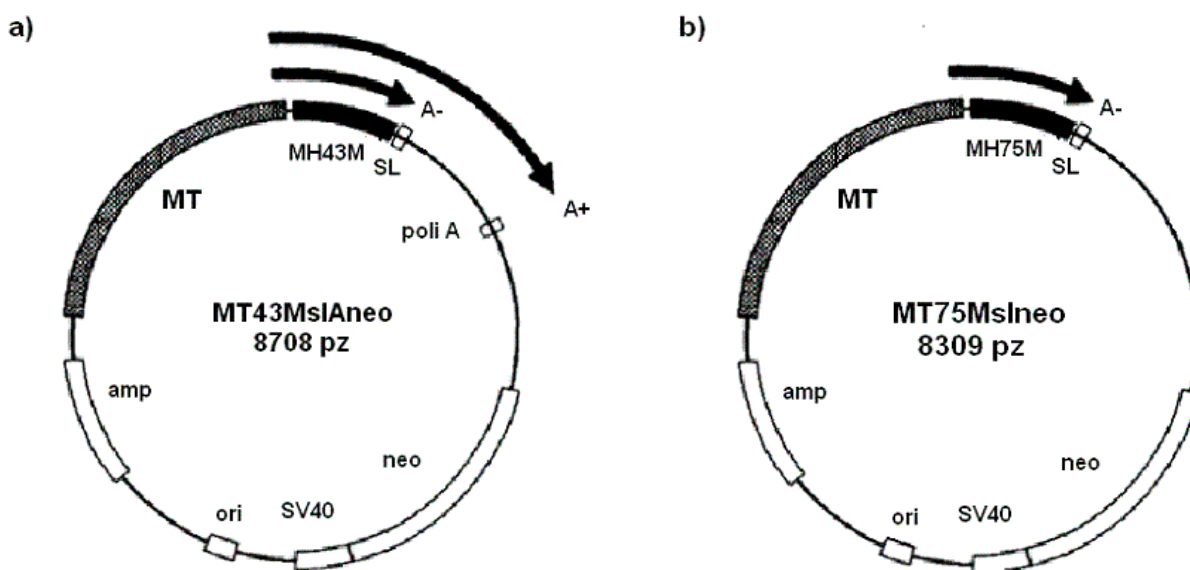


Rys. 18. Organizacja genów histonów H1; a) mapa genów histonowych człowieka. b) mapa genów histonowych myszy. Pomimo różnic w nazewnictwie odpowiednie geny są genami homologicznymi i zajmują te same pozycje u obu gatunków. Przykładowo gen H1.2 znajduje się między genami kodującymi histony H3 i H4, podobnie zlokalizowany jest jego myszy odpowiednik H1c. a) wg Albig i wsp., 1997, b) wg Wang i wsp. 1997.

sprężone, dlatego nie można otrzymać podwójnych nokautów takich genów na drodze krzyżowania odpowiednich homozygot. Położenie większości genów histonów H1 na małej przestrzeni jednego chromosomu znacznie komplikuje procedurę badań (Albig i wsp., 1997, Wang i wsp., 1997)

### 3.1. NADPRODUKCJA HISTONU H1

Jednym ze sposobów pozwalających na określenie funkcji białka jest wprowadzenie nadmiarowych genów w celu wywołania nadprodukcji analizowanych struktur. Geny takie muszą być aktywne w komórkach, a poziom ich ekspresji powinno dać się regulować. Grupa pod przewodnictwem Browna skupiła się na dwóch wariantach histonu H1, mianowicie H1c i H1e. Dzięki zastosowaniu odpowiednich technik udało się stworzyć komórki produkujące duże ilości wspomnianych białek. Na początku skonstruowano odpowiednie wektory. W ich skład wchodziła sekwencja kodująca histonu H1 uzyskana przy wykorzystaniu PCR, promotor MT oraz gen reporterowy neo (Rys. 19).



Rys. 19. Schemat budowy wektorów użytych w celu wywołania nadekspresji. a) plazmid MT43MslAneo niosący sekwencję kodującą histon H1c (MH43M), b) plazmid MT75Mslneo z wbudowaną sekwencją histonu H1e. Należy zwrócić uwagę, że pierwszy plazmid posiada sekwencję poliadenylacji (poli A) i sekwencję „spinki do włosów” (SL) przez co mogą powstać dwa rodzaje białka H1c (strzałki A+ i A- nad wektorem), natomiast plazmid MT75Mslneo wyposażony jest tylko w tę ostatnią strukturę. MT-promotor indukowany metalami ciężkimi; neo i amp - geny reporterowe; ori -początek replikacji. (wg Brown i Sittman, 1993).

Sekwencje kodujące histonów H1 zmodyfikowano w obrębie 19 kodonu tak, aby kodowanym aminokwasem była metionina normalnie nie występująca w żadnym z histonów somatycznych. Kodon 19 koduje alaninę i walinę odpowiednio w histonie H1c i H1e. Porównanie sekwencji u różnych gatunków wykazało, że jest to miejsce mało konserwatywne ewolucyjnie, a więc zmiana mutacyjna w jego obrębie nie powinna wpłynąć na budowę i funkcję białka. W późniejszym etapie badań okazało się, że było to słuszne założenie, zmodyfikowane białka zachowywały się identycznie jak ich endogenne odpowiedniki (aktywnie łączyły się z nukleosomem, szybkość wędrówki obu białek podczas elektroforezy była taka sama jak w kontroli). W czasie hodowli komórek podawano surowicę zawierającą metioninę wyznakowaną promieniotwórczym izotopem siarki [<sup>35</sup>S]. W ten sposób można było łatwo odróżnić produkty białkowe pochodzące od wprowadzonego genu od ich endogennych homologów. Geny znajdowały się pod kontrolą promotora MT (ang. metallothionein). Pozwoliło to na indukcję ekspresji wprowadzonych genów przez podanie soli metali ciężkich (w tym przypadku ZnCl<sub>2</sub>). Wektory dokładnie sprawdzono wykorzystując mapowanie przy pomocy restryktaz, natomiast regiony kodujące H1 w całości zsekwencjonowano (miało to wykluczyć możliwość mutacji). Tak przygotowane wektory wprowadzono do komórek MEL oraz fibroblastów BALB/3T3. Komórki transfekowano metodą koprecypitacji, a następnie poddawano przez 2-3 dni selekcji w roztworze 400 µg/ml G418. Nadprodukcję histonów H1e i H1c indukowano przez głodzenie komórek (faza G<sub>0</sub>) przy jednoczesnym podawaniu ZnCl<sub>2</sub>. Następnie białka izolowano (homogenizacja, wirowanie), a ich rozdział przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanej techniki HPLC oraz na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE). Wyniki jednoznacznie potwierdziły, że dominującym wariantem histonu w indukowanych komórkach był histon egzogeny. Histon H1c wykazywał prawie siedmiokrotny wzrost ilości

stanowiąc w komórkach blisko 60% frakcji histonu H1 (w komórkach kontrolnych było to 17.5%). Nadekspresja H1e była słabsza, ale ostatecznie wariant ten stanowił około 70% całej ilości histonu H1 (kontrola zawierała 53%). Różnice te wynikały z nieobecności sekwencji poliadenylacji w wektorze H1e. Wśród histonów somatycznych jedynie H1c posiada taką sekwencję sygnałową w wyniku czego w komórkach syntetyzowane są dwa rodzaje transkryptów, jeden zakończony ogonem poli A, drugi natomiast typową dla reszty histonów strukturą „spinki do włosów”. Poliadenylowana forma H1c stanowi niewielką frakcję białka H1c w fazie S, ale jej ilość wzrasta wraz z wejściem komórek w fazę G<sub>0</sub>. Wprowadzenie sygnału poliadenylacji (z histonu H1c) do plazmidu niosącego sekwencję histonu H1e przyczyniło się do wzrostu stabilności mRNA genu H1e czego skutkiem było podniesienie poziomu ekspresji genu (histon H1e wyposażony w ogon poli A stanowił aż 84% wszystkich H1). W odpowiedzi na wzmożoną ekspresję

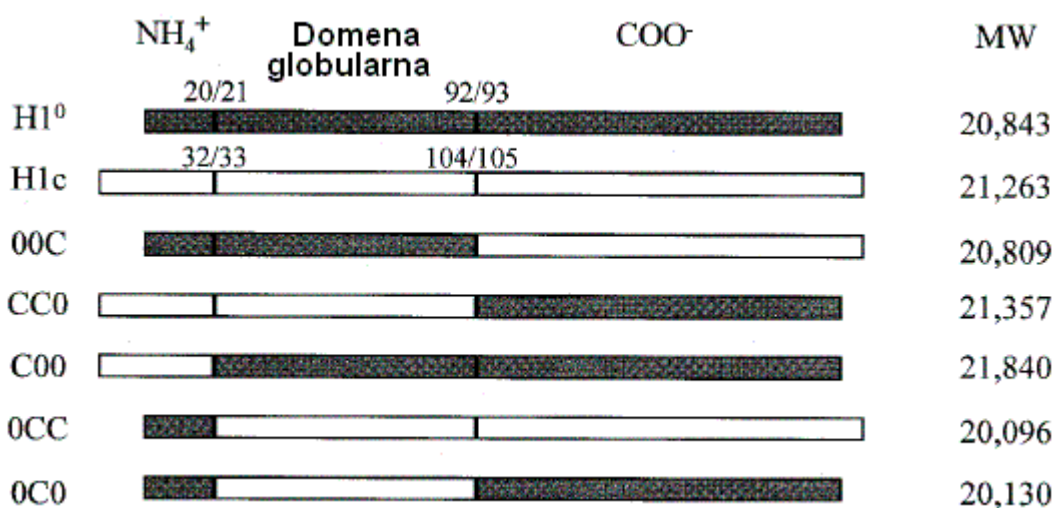
**Tabela 5. Procentowy udział poszczególnych wariantów histonów H1 (wg Brown i Sittman, 1993).**

	Procentowy udział histonów H1					
	A H1°	B H1°	1 H1b	2 H1a	3 H1e	4 H1c
komórki 3T3						
- Zn	2.8	5.3	20.1	1.6	52.7	17.5
+Zn	2.1	5.3	20.0	1.7	53.3	17.6
komórki z nadprodukcją histonu H1e						
- Zn	3.3	5.9	22.6	----	54.2	14.0
+Zn	2.2	4.7	20.5	----	68.8	3.8
komórki z nadprodukcją histonu poli A H1e						
- Zn	3.1	8.3	13.5	----	67.7	10.4
+Zn	1.3	4.1	8.6	----	84.1	2.0
komórki z nadprodukcją histonu H1c						
- Zn	1.4	3.9	23.4	----	46.6	24.8
+Zn	0.6	1.6	15.1	----	24.0	58.7

nadmiarowych genów H1 ilość pozostałych białek H1 spadała (Tabela 5). Komórki produkujące zwiększone ilości białek H1c lub H1e były żywotne i nie wykazywały żadnych nieprawidłowości (Brown i Sittman, 1993).

Wyniki te stały się przyczyną dalszych badań. W analogiczny sposób stworzono komórki produkujące zwiększone ilości H1° i H1c. Sekwencję kodującą histonu H1° włączoną do plazmidu otrzymano w wyniku odwrotnej transkrypcji mRNA komórek BALB/c 3T3 (cDNA), a następnie namnożono za pomocą techniki PCR (sekwencja ta różniła się od sekwencji z banku genów jednym podstawieniem w pozycji 67; Asn→Asp). Otrzymane komórki poddano szczegółowej analizie. Choć były one żywotne wykazywały szereg drobnych zaburzeń. Wykorzystując technikę FACS zaobserwowano, że komórki z nadprodukcją H1° cechowały się przelotnym opóźnieniem w przejściu z fazy G<sub>1</sub> do S. W przypadku komórek produkujących zwiększone ilości H1c nie zaobserwowano takiego zjawiska. Po indukcji komórek poziom egzogennych histonów znacznie wzrastał, w następstwie czego ilość innych histonów malała (zjawisko kompensacji dążące do utrzymania odpowiedniej stechiometrii H1:nukleosom). Zjawisko to nie było jednak w stanie zrównoważyć zwiększonej produkcji nadmiarowych histonów H1, stosunek histonów do nukleosomów uległ znacznej zmianie. W komórkach kontrolnych wynosił on 0.8, natomiast w transgenicznym 1.3 (H1°) i 1.1 (H1c). Za pomocą techniki obrony przed RNA-zą (ang. RNAase protection analysis) zbadano poziom ekspresji kilku genów house keeping oraz genów regulujących cykl komórkowy (c-myc, c-fos, β-aktyna, GAPDH, cyklofilina, cyklina D2 i cdc2). Histon H1° powodował obniżenie poziomu ekspresji wszystkich badanych genów. Komórki produkujące duże ilości H1c utrzymywały jednak ekspresję niektórych genów na niezmiennym poziomie (c-fos, β-aktyna), a nawet wykazywały w pewnych przypadkach znaczny wzrost transkrypcji (GAPDH, c-myc, cyklofilina) (Brown i wsp. 1996). Aby określić, która część histonu H1c i H1° decyduje o obniżeniu lub

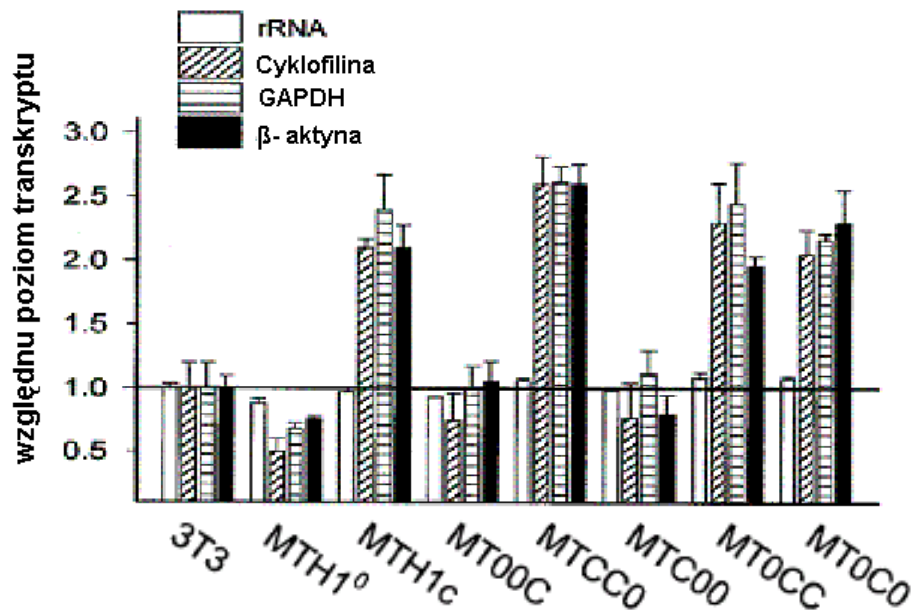




Rys. 20. Chimeryczne histony H1. Poszczególne histony zbudowane są z różnych domen histonów H1c i H1<sup>o</sup>, np. OOC oznacza białko zbudowane z N-terminalnej i centralnej domeny pochodzącej od histonu H1<sup>o</sup> oraz C-terminalnej z H1c. MW oznacza przybliżoną masę białek w Da (wg Brown i wsp., 1997).

podwyższeniu poziomu ekspresji genów stworzono szereg histonów H1 zbudowanych z domen o różnym pochodzeniu (Rys. 20). Po zbadaniu ekspresji badanych genów okazało się, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa domena globularna. Jest to dosyć zaskakująco jeśli wziąć pod uwagę małe różnice w obrębie tej domeny wśród różnych wariantów H1. Domeny C-terminalna i N-terminalna nie miały większego znaczenia na proces. Ekspresja genów cyklofiliny,  $\beta$ -aktyny i GAPDH była 2-3-krotnie wyższa w mutantach produkujących zwiększone ilości białek CCO, OCC i OCO. Komórki wytwarzające duże ilości chimerycznych białek OOC i COO zachowywały się podobnie do tych które produkowały w nadmiarze histon H1<sup>o</sup>, mianowicie powodowały represję genów (Rys. 21) oraz wykazywały identyczne zaburzenia cyklu komórkowego (opóźnienie wejścia w fazę S). Tak duże znaczenie domeny globularnej można wytłumaczyć jedynie przez to, że jest ona miejscem przyłączenia histonów H1 do nukleosomu (Brown i wsp., 1997).

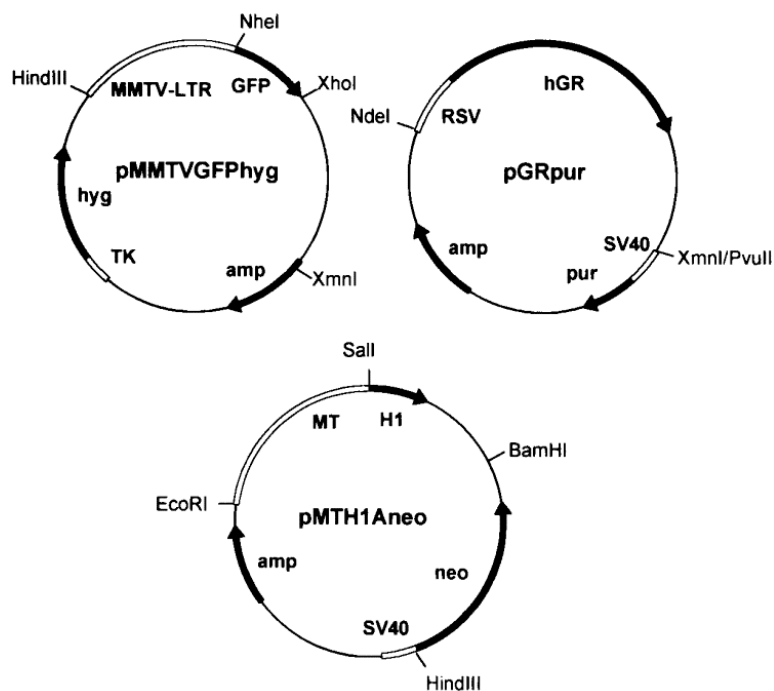
W celu bardziej szczegółowego zbadania wpływu nadprodukcji poszczególnych histonów H1 na aktywację genów oraz na strukturę



Rys. 21. Poziom ekspresji kilku białek w komórkach o wzmożonej syntezie chimerycznych histonów H1. Jako punkt odniesienia posłużył poziom rRNA (wg Brown i wsp., 1997).

chromatyny do komórek wprowadzono dodatkowy transgen. Badano aktywność dwóch genów: GFP (białko fluoryzujące na zielono) i CAT (acetylotransferaza chloramfenikolu) znajdujących się pod kontrolą promotora MMTV (wirus guza sutka myszy). Promotor MMTV obejmuje sześć nukleosomów, na drugim z nich znajduje się element HRE (element odpowiedzi na hormon) tuż obok miejsca startu transkrypcji. Promotor ten indukowany jest przez hormony, zaś jego aktywność zależna jest od konformacji chromatyny, która wpływa na dostępność elementu HRE dla kompleksu hormon-receptor. Dodatkowo na proces przebudowy struktury promotora duży wpływ ma położenie histonu H1. Do komórek włączono także gen hGR (ludzki receptor glikokortykoidów) co pozwoliło na kontrolowaną indukcję promotora MMTV (Rys. 22).

Poziom ekspresji genów CAT i GFP kontrolowany bezpośrednio przez promotor MMTV z komórkami wykazującymi nadprodukcję histonów H1° i H1c wykazywał znaczny wzrost w porównaniu do komórek kontrolnych. Z czasem poziom ten ulegał obniżeniu (typowe zjawisko dla tego promotora),



Rys. 22. Struktura wektorów. Plazmid pMMTVGFPhyg niesie sekwencje genu reporterowego GFP pod kontrolą promotora MMTV-LTR (indukcja za pomocą glikokortykoidów) oraz gen selekcyjny dający odporność na higromycynę (hyg). Plazmid pGRpur zbudowany jest z genu ludzkiego receptora glikokorykoidów (hGR) oraz markera selekcyjnego na puromycynę (pur). Wektor pMTH1Aneo zawiera sekwencję genu H1c lub H1° znajdującego się pod kontrolą promotora MT obok genu odporności na neomycynę (wg Gunjan i Sittman, 1999).

ale wciąż przewyższał ilość transkryptów CAT i GFP w komórkach 3T3. Wynik ten był szczególnie zaskakujący w odniesieniu do histonu H1°, który jak wykazano wcześniej wykazuje tendencje do wyciszania genów. Przyczyny takiego zachowania się komórek o nadekspresji histonów H1 dopatrywano się wzaburzeniu stechiometrii histonów H1 do nukleosomu (0,78 kontrola; 1,32-1,35 H1° i 1,19 H1c), jednak należało tą hipotezę odrzucić, ponieważ zwiększony poziom ekspresji wektora, który nie uległ włączeniu do genomu nie powodował podobnego zjawiska. W ten sposób wykazano, że podłożem procesu są unikatowe właściwości poszczególnych histonów, a nie ich stosunek do nukleosomów. Ponadto wykryto drugi mechanizm regulacji promotora MMTV zależny od acetylacji histonów

rdzeniowych. Działanie na komórki trichostatyną A (inhibitor deacetylacji, powoduje wzrost acetylacji histonów rdzeniowych) skutkowało wzrostem aktywności promotora MMTV (jednocześnie trichostatyna A hamuje syntezę białka, co świadczy o niezależności tego procesu od fazy S). Oba procesy regulacyjne były niezależne od siebie (ich działanie było addytywne). Wzrost aktywności promotora MMTV w komórkach produkujących zwiększone ilości histonów H1 jest intrygujący przynajmniej z jeszcze jednej przyczyny. Otóż *a priori* przyjęto, że regulacja genów odbywa się na drodze odłączania histonu H1 w regionach promotorowych przez co chromatyna w tych miejscach jest luźniejsza i łatwiej dostępna dla czynników transkrypcji. Otrzymane wyniki wskazują, że proces ten może przebiegać na zupełnie innych zasadach niż sobie to wyobrażaliśmy do tej pory (Gunjan i Brown, 1999a).

Również strukturę chromatyny komórek z nadekspresją H1 poddano szczegółowej analizie. Trawienie chromatyny nukleazą z mikrokoków ujawniło, że histon H1<sup>o</sup> wykazuje silniejsze właściwości ochronne niż wariant H1c (trawienie do mononukleosomów trwało dłużej lub wymagało większego stężenia nukleazy). Wykorzystując wcześniej stworzone chimeryczne geny histonów H1 wykazano, że w procesie tym decydującą rolę odgrywają domeny centralna i aminoterminalna. Wyniki te sugerują, że nawet tak krótka domena histonu H1 jak ogon aminoterminalny może mieć duży wpływ na pewne właściwości białka (jest to jeden z nielicznych przykładów ukazujących znaczenie tej części histonu H1). Stosunek histonów H1 do nukleosomów w komórkach z nadprodukcją H1 jest znacznie zmieniony, ale nie zaburza to procesu składania chromatyny (nie wykryto niewłaściwej struktury wyższego rzędu), zaobserwowano jednak wzrost długości DNA łącznikowego o 15-16 pz (Tabela 6). W doświadczeniu tym pośrednio wykazano, że do nukleosomu może łączyć się więcej niż jedno białko H1.

**Tabela 6. Długość powtarzalnej długości nukleosomu w komórkach produkujących zwiększone ilości histonu H1 (wg Gunjan i wsp., 1999b).**

Linia komórkowa	Powtarzalna długość DNA nukleosomu NRL (wyrażona w pz)		
	komórki w fazie G <sub>0</sub>	komórki intensywnie rosnące	komórki intensywnie rosnące w obecności hydroksymocznika*
3T3	188	175	177
MTH1°	192	190	189
MTH1c	191	189	188

\*dodanie do hodowli hydroksymocznika miało na celu określenie czy proces jest zależny od syntezy DNA.

Może mieć to duże znaczenie w regulacji genów, zwłaszcza jeśli zachodzi tylko w określonych regionach chromatyny. Według Browna i współpracowników histon H1° jest odpowiedzialny za tworzenie zwartej struktury chromatyny zastępując inne histony w czasie różnicowania się komórek. Nadprodukcja tego wariantu w komórkach silnie proliferujących naśladuje proces różnicowania (wejście w fazę G<sub>0</sub>) poprzez akumulację H1°. Efektem tego zjawiska jest represja genów obserwowana w tych komórkach. Natomiast histon H1c wykazuje zupełnie inne właściwości. Pomimo, iż białko to wiąże się aktywnie z chromatyną tworzy ono względnie „otwartą” strukturę, która sprzyja transkrypcji i replikacji przez łatwy dostęp czynników zaangażowanych w te procesy. Nadprodukcja H1c skutkuje wiązaniem się nadmiarowych białek H1c z regionami w których normalnie wariant ten nie występuje powodując wzrost aktywności genów w normalnych warunkach wyciszonych (Gunjan i wsp., 1999b).

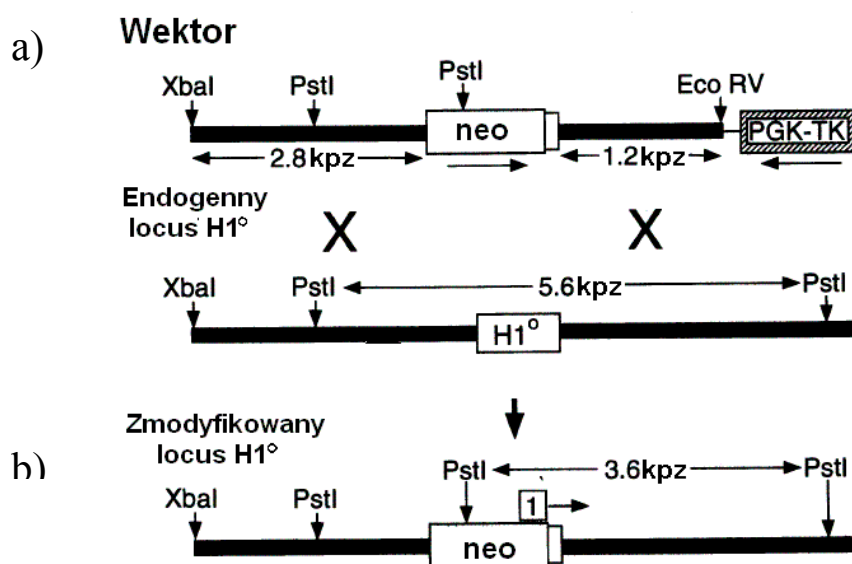
Badając chromatynę komórek o wzmożonej produkcji histonów H1 odkryto także, że wzrost ilości histonów H1 powoduje obniżenie acetylacji histonów rdzeniowych. Proces ten jest niezależny od struktury chromatyny (trawienie nukleazą z mikrokoków nie wpływało na badany proces). Acetylacja histonów powiązana jest z aktywacją transkrypcji. Różne acetylotransferazy histonowe (HAT) są składnikami aktywujących i

koaktywujących kompleksów transkrypcyjnych. Natomiast chromatyna hipocetylowana wykazuje niski poziom aktywności, a w procesie tym uczestniczą deacetylazy histonowe (HDAC). Nadprodukcja histonów H1c i H1<sup>o</sup> przyczyniła się do trzykrotnej redukcji poziomu acetylacji histonów rdzeniowych. Całkowite usunięcie histonów (0,6M KCl) dawało odwrotny skutek podwyższając poziom acetylacji. Analogicznie zachowywały się komórki traktowane trichostatyną A (inhibitor HDAC). Na poziom deacetylacji w komórkach z nadprodukcją H1 najbardziej wpływała struktura chromatyny, natomiast poziom aktywności HAT i HDAC nie zmieniał się. Dodatkowo proces ten może być regulowany na poziomie nukleosomów. Histon H1 łącząc się z rdzeniem nukleosomu powoduje zmianę struktury ogonów histonów rdzeniowych oraz ich interakcji z DNA. (Gunjan i wsp., 2001). Obserwacje te potwierdziły wcześniejsze doświadczenia wskazujące, że obniżenie poziomu deacetylacji sprzyja wzrostowi aktywności włączonych transgenów. Ponadto proces deacetylacji powiązany jest prawdopodobnie z metylacją DNA (metylacja przy współudziale białka MeCP2 sprzyja deacetylacji wyciszając gen), jednak są to procesy niezależne od siebie (Pikaart i wsp., 1998).

Wyniki nadprodukcji H1c i H1<sup>o</sup> są zgodne z proponowaną funkcją obu wariantów H1. Nadekspresja H1<sup>o</sup> przyczynia się do wyciszenia genów przez tworzenie zwartej struktury chromatyny ograniczając dostęp do odcinków promotorowych takim czynnikiem jak HAT. W wyniku tego procesu histony rdzeniowe ulegają deacetylacji, a poziom aktywności genów maleje jeszcze bardziej. W przypadku H1c mamy doczynienia z dokładnie odwrotnym zjawiskiem. H1c wiążąc się w dużych ilościach z chromatyną nie przeszkadza w jej oddziaływaniu z czynnikami transkrypcji oraz HAT i HDAC. W ten sposób część genów pomimo lub wręcz dzięki obecności dużych ilości tego wariantu histonu ulega aktywacji.

### 3.2. KNOCK OUT HISTONÓW H1 U MYSZY.

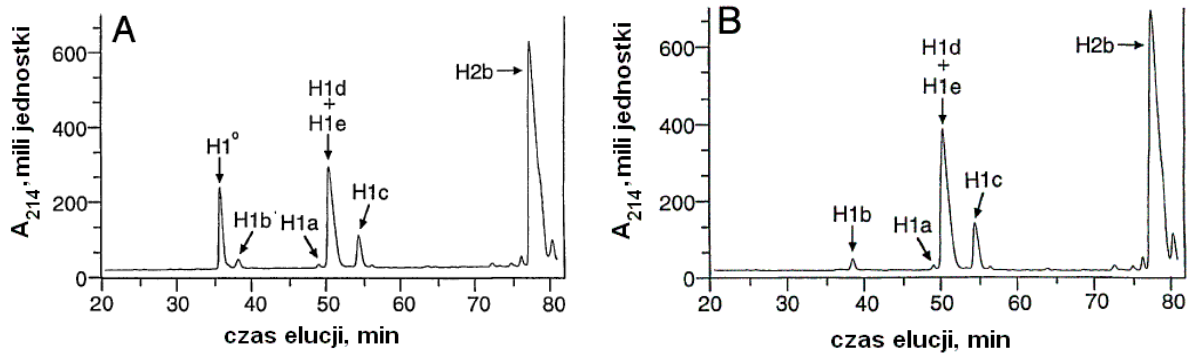
Bezpośrednią metodą pozwalającą na określenie funkcji białka jest jego eliminacja. Wykorzystując technikę homologicznej wymiany genów udało się stworzyć transgeniczne myszy niosące mutacje null w obrębie różnych wariantów H1. Jako pierwszy zbadano histon H1°. Na drodze elektroporacji wprowadzono odpowiedni wektor do komórek ES (Rys. 23), a następnie poddano selekcji na odporność na G418 i gancyklowir. Spośród  $7,5 \times 10^7$



Rys. 23. Homologiczna wymiana genu H1°. a) wektor o długości 5,1 kbp uzyskany z biblioteki genów (odcinek XbaIH1°) zmodyfikowano przez usunięcie 170 kodonów H1° od strony 5' w których miejsce wstawiono gen neo, dodatkowo na zewnątrz od regionu homologicznego (odcinki o długości 2,8 kbp i 1,2 kbp) dołączono gen tk z promotorem PGK pozwalający na selekcję negatywną. b) locus H1° po rekombinacji homologicznej, zamiast genu H1° w miejscu tym znajduje się gen neo (selekcja pozytywna). Gen neo wprowadza dodatkowe miejsce cięcia przez restryktazę PstI, w wyniku czego produktem PCR będzie odcinek długości 3,6 kbp w komórkach które włączyły transgen w locus H1°, zaś w pozostałych komórkach produkt cięcia będzie miał długość 5,6 kbp. (wg Sirotkin i wsp., 1995, zmodyfikowano).

transfekowanych komórek około 720 wykazywało odporność na G418. Wykorzystując technikę PCR i Northern blotting wyodrębniono z nich cztery kolonie u których rekombinacja nastąpiła we właściwym miejscu. Wyselekcjonowane komórki wprowadzono do blastocyst myszy szczepu C57BL/6 i przeniesiono do samic-bioreczi. Poziom chimeryzmu określony na podstawie koloru sierści sięgał 70-100%. Krzyżując chimery otrzymano najpierw heterozygoty, a następnie homozygoty. Rozdział pokolenia F<sub>2</sub> w krzyżówce heterozygot był zgodny z prawem Mendla (22% osobników dzikich, 59% heterozygot i 19% homozygot). Homozygotyczne myszy H1<sup>°</sup>(-/-) odznaczały się po urodzeniu normalną wagą i wielkością. Organizmy te wykazywały całkowity brak histonu H1<sup>°</sup>. Nie wykryto obecności mRNA histonu H1<sup>°</sup> (Northern blotting) ani białka (poliklonalne przeciwciała anti-H1<sup>°</sup>) w komórkach. Poddano szczegółowej analizie 23 rodzaje tkanek wśród których były komórki płuc, śledziony, wątroby i mózgu normalnie zawierające duże ilości H1<sup>°</sup>. Zbadano także dwa rodzaje komórek embrionalnych, które jako jedyne wykazują obecność H1<sup>°</sup> (jądrzaste erytrocyty pochodzące z komórek pęcherzyka żółtkowego i komórki budujące włókna soczewki). W żadnym z nich nie stwierdzono zaburzeń anatomicznych i histologicznych, mimo nieobecności H1<sup>°</sup>. Również synteza DNA przebiegała bez zmian (proces ten zmierzono podając przez trzy tygodnie z pożywieniem [<sup>3</sup>H] tyminę). Zbadano także poziom ekspresji białka  $\alpha$ -fetoproteiny (AFP), które jest aktywne w embrionalnych hepatocytach i wraz z urodzeniem zanika. W procesie wyciszenia genu AFP bierze prawdopodobnie udział histon H1<sup>°</sup> wiążąc się z chromatyną w tym regionie. Używając techniki Southern blotting nie wykryto mRNA genu AFP w komórkach myszy H1<sup>°</sup>(-/-) po urodzeniu, a ilość albumin znajdowała się na właściwym poziomie. Przeprowadzając krzyżowanie wsobne myszy H1<sup>°</sup>(-/-) okazało się, że były one żywotne, a ich zdolności rozrodcze pozostały





Rys. 24. Chromatografia przepływowa fazy odwróconej histonów z organizmów dzikich (A) i homozygotycznych myszy  $H1^{\circ}/-$  (B). Frakcjonowaniu poddano około 100  $\mu\text{g}$  ekstraktu histonowego z chromatyny z wątroby 20-tygodniowych myszy (wg Sirotkin i wsp, 1995).

niezmienione (otrzymane potomstwo nie wykazywało żadnych zaburzeń). Ilość białek histonowych określono przy pomocy RF-HPLC. Analiza ta ujawniła, że inne warianty histonu H1 rekompensowały utratę  $H1^{\circ}$  w następstwie czego stechiometria histonu H1 do nukleosomu pozostawała bez zmian (Rys. 24 i Tabela 7). Wyniki te były dość zaskakujące zważywszy na wyraźnie wyodrębnioną funkcję histonu  $H1^{\circ}$ , która związana jest z procesem różnicowania komórek. Ponadto wariant ten różni się od innych histonów H1 przypominając pod wieloma względami histon H5. Kolejnym argumentem świadczącym o unikatowych właściwościach  $H1^{\circ}$  może być lokalizacja genu  $H1^{\circ}$  na oddzielnym chromosomie z dala od innych genów histonowych.

**Tabela 7. Porównanie składu histonów H1 chromatyny w wątrobie myszy dzikich (+/+) i  $H1^{\circ}/-$  (wg Sirotkin i wsp., 1995).**

	% wszystkich histonów H1 <sup>‡</sup>					Stosunek histonu H1 do nukleosomu*
	$H1^{\circ}$	H1a	H1b	H1c	H1d + H1e	
+/+	28,6 ± 0,8	1,1 ± 0,1	3,4 ± 0,6	12,3 ± 1.1	54,5 ± 2,3	0,71 ± 0.02
-/-	0	1,3 ± 0,0	3,9 ± 0,1	19,1 ± 0.3	75,7 ± 0,3	0,68 ± 0,04

<sup>‡</sup> na podstawie analizy RP-HPLC poziomu wybranego H1 do wszystkich histonów H1

\* na podstawie analizy RP-HPLC poziomu wszystkich histonów H1 do histonu H2b

Pomimo wszystkich tych różnic histon H1<sup>o</sup> nie okazał się niezbędny dla życia komórek, a inne warianty H1 były w stanie go zastąpić (Sirotkin i wsp., 1995). Następnym zbadanym genem H1 był wariant H1t. Trzy niezależne grupy badawcze wykorzystując technikę homologicznej wymiany genów stworzyły organizmy całkowicie pozbawione białka H1t (Lin i wsp., 2000; Fantz i wsp., 2001; Drabent i wsp., 2000). Histon H1t wydawał się ciekawym obiektem badań z kilku przyczyn. Po pierwsze jest to wariant specyficzny tkankowo, którego ilość sięga nawet 55% zawartości H1 w spermatocytach i spermatydach, a więc jego brak powinien powodować względnie duży efekt w tych komórkach. Jednocześnie nie wpłynęłoby to na żywotność organizmów. Jako wektora użyto zmodyfikowanego fragmentu DNA zawierającego sekwencję H1t pochodzącego z biblioteki genomowej. Obszar od miejsca 285 pnt powyżej do 110 pnt poniżej genu H1t został zastąpiony przez kasetę PGK-Neo, dodatkowo od strony 3' w odległości 3,4 kbp od genu neo włączono gen reporterowy pozwalający na selekcję negatywną (PGK-TK). Wektor wprowadzono do komórek ES klonu WW6 (Ioffe i wsp., 1995) przy użyciu elektroporacji. Podwójnie odporne kolonie wyizolowano o przebadano na obecność produktów cięcia restryktazą BamHI (Southern blotting). Następnie komórki wstrzyknięto do blastocyst. Potomstwo wykazywało chimeryzm na poziomie 40-99%. W dalszym etapie badań chimery łączono, aby otrzymać osobniki heterozygotyczne. Myszy H1t +/- nie wykazywały żadnych odchyłeń w stosunku do form dzikich. Krzyżując heterozygoty wyprodukowano osobniki homozygotyczne. Brak histonu H1t w mutantach H1t -/- potwierdzono wykorzystując elektroforezę PAGE-AU i SDS-PAGE oraz technikę HPLC. U myszy tych szczegółowej analizie poddano jądra. Nie wykryto zaburzeń histologicznych i anatomicznych ani przy użyciu mikroskopii świetlnej ani elektronowej. Waga, wymiary i struktura jąder pozostawały niezmiennione. Również ilość plemników (analiza hemocytometryczna) oraz ich zdolność ruchu (mikroskopia fazowa) nie

różniły się od form dzikich. Brak histonu H1t nie wpływa też na płodność, myszy H1t  $-/-$  krzyżowane ze sobą dawały zdrowe, żywotne i płodne potomstwo. Homozygoty null względem histonu H1t przebadano pod kątem stechiometrii histonów H1. Okazało się, że inne warianty H1 są w stanie w całości zrekompensować brak histonu H1t utrzymując stosunek H1/nukleosom na nie zmienionym poziomie. Nie wykryto szczególnych preferencji któregośkolwiek z wariantów H1 w procesie rekompensacji, wszystkie podtypy w równym stopniu uczestniczyły w tym procesie. Grupa pod kierunkiem Fantza potwierdziła większość z opisanych wyżej obserwacji Lina i współpracowników z jedną istotną różnicą. Otóż dokładna izolacja spermatocytów i spermatyd przy użyciu wirowania pozwoliła otrzymać frakcję o 75% czystości (sądząc po wielkości i wzorze barwienia chromatyny jąder komórkowych). Analiza homogenatów wykazała, że poziom histonu H1 do histonów rdzeniowych w komórkach H1  $-/-$  malał o 26% w spermatydach i 21% w spermatocytach. Zjawisko to próbowano wyjaśnić opierając się na obserwacjach świadczących o słabszym powinowactwie histonu H1t do nukleosomu dzięki czemu proces wymiany histonów na protaminy podczas spermatogenezy przebiega sprawniej. Miejsce histonu H1t u myszy H1t  $-/-$  zajmują inne warianty H1. Te zaś odznaczają się względnie dużym powinowactwem do chromatyny, tak więc aby proces wymiany białek mógł przebiegać wydajnie ilość histonu H1 musi zostać obniżona. Chociaż proces spermatogenezy w homozygotach przebiega normalnie, a plemniki nie wykazywały zaburzeń podczas wymiany białek (poziom białek TP1 i TP2 zbadano przy użyciu przeciwciał) nie oznacza to, że histon H1t nie posiada specyficznej roli w komórkach rozrodczych. Jedną z sugerowanych funkcji H1t może być przeciwdziałanie mutacją (Fantz i wsp., 2001). Istnieje hipoteza według której białka zawierające metioninę mogą uczestniczyć w naprawie oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Levine i wsp., 1999). Histon H1t

jest pod tym względem białkiem unikatowym na tle innych histonów w sekwencji których brak tego aminokwasu.

Podobne wyniki otrzymano w wyniku homologicznej wymiany genów H1c, H1d i H1e. Homozygoty uzyskano wykorzystując analogiczną do opisaną wcześniej procedurę. Różnice dotyczyły jedynie restryktaz oraz genów selekcyjnych użytych do konstrukcji wektorów. Dodatkowym utrudnieniem wynikłym w czasie określania zawartości histonów H1 była zbliżona masa wariantów H1e i H1d, które migrują podczas HPLC jako jedna frakcja (Rys. 24). Poziom histonów H1e i H1d można było ocenić dopiero za pomocą spektrometrii masowej (TOF-SM). Myszy ze znokautowanym jednym genem H1 rozwijały się normalnie i były płodne. W tkankach nie wykryto zaburzeń histologicznych i anatomicznych, a poziom H1 do nukleosomu pozostawał bez zmian w skutek kompensacji przez inne warianty. Myszy H1c  $-/-$ , H1d  $-/-$  i H1e  $-/-$  skrzyżowano z wcześniej otrzymanymi mutantami H1<sup>o</sup> w celu stworzenia podwójnych nokautów histonu H1. Ponownie przebadano otrzymane potomstwo. Wyniki jednoznacznie wskazywały, że myszy pozbawione nawet dwóch wariantów H1 nie odznaczają się żadnym szczególnym fenotypem, a ich brak jest tolerowany nie wpływając na rozwój organizmów. Stechiometria H1/nukleosom nie uległa zmianie nawet u mutantów H1<sup>o</sup>/H1e ( $-/-$ ,  $-/-$ ) w tkankach w których warianty te stanowią blisko 70% histonu H1 (Tabela 8). Nie udało się jednak otrzymać podwójnych nokautów H1c/H1d lub H1c/H1e kojarząc ze sobą odpowiednie myszy. Wynika to z ułożenia obu genów na jednym chromosomie w bliskim sąsiedztwie. Żadne z ponad 1000 przebadanych przypadków mejozy nie wykazało crossing over między tymi genami (Fan i wsp., 2001a). Brak wyraźnego fenotypu nie musi oznaczać, że nieobecność białka nie wpływa na poziom ekspresji innych genów. Aby wyjaśnić czy „wybicie” histonu H1 oddziałuje na strukturę chromatyny i regulację aktywności genów zbadano stopień ekspresji egzogennych genów uwzględniając efekt pozycji.

**Tabela 8. Skład histonu H1 w chromatynie wątroby form dzikich i podwójnych homozygot (wg Fan i współ., 2001a).**

Genotyp	% poszczególnych wariantów H1						Stosunek histonu H1 do nukleosomu
	H1°	H1a	H1b	H1c	H1d	H1e	
forma dzika	27,4 ± 0,6	0,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	11,6 ± 0,4	16,1 ± 0,1	42,1 ± 0,2	0.73 ± 0,02
H1°/H1c -/-,-/-	0	1,5 ± 0,2	2,7 ± 0,7	0	27,1 ± 0,3	68,6 ± 0,4	0.71 ± 0,01
H1°/H1d -/-,-/-	0	1,8 ± 0,5	5,1 ± 3,1	22,7 ± 3,9	0	70,5 ± 4,5	0.71 ± 0,04
H1°/H1e -/-,-/-	0	1,8 ± 0,1	3,8 ± 0,7	44,6 ± 1,7	49,7 ± 2,1	0	0.76 ± 0,03

Efekt ten objawia się różnym poziomem ekspresji genu w zależności od jego położenia na chromosomie. Zmiany lokalizacji genu mogą wynikać z rearanżacji chromosomowych, crossing over lub losowej integracji transgenów. Proces ten zależny jest także od wieku organizmów i większości przypadków polega na stopniowym wyciszeniu genu. Efekt pozycji związany jest z kontrolą mechanizmów epigenetycznych oraz strukturą chromatyny. Wychodząc z tego założenia transgeny wprowadzone w różne miejsca genomu można traktować jako bardzo czułe indykatory zmian ekspresji genów i struktury chromatyny. Obiektem badań był gen kodujący ludzką  $\beta$ -globinę wprowadzony do komórek ES. Otrzymane organizmy łączono następnie z myszami pozbawionymi jednego z wariantów H1. Pomimo niskiego poziomu  $\beta$ -globiny i specyfiki tkankowej gen ten wybrano ze względu na łatwość wykrycia produktu białkowego oraz stabilność ekspresji niezależnie od wieku. W pierwszym teście użyto odcinka DNA długości 4,4 kbp zawierającego ludzki gen  $\beta$ -globiny wraz z regionami flankującymi długości 2,1 kbp i 0,8 kbp od końca 5' i 3'. Southern blotting ujawnił, że integracji uległo około 10 kopii transgenu. Poziom ekspresji sięgał 14% mysiej  $\beta$ -globiny u nowonarodzonych myszy i malał wraz z wiekiem. U osobników 6-7 miesięcznych wynosił poniżej 4%, a w wieku dwóch lat był niewykrywalny. Proces wyciszania genu nie był związany z lokalizacją

transgenu z regionami tworzącymi heterochromatynę. Analiza FISH wykazała, iż egzogenne geny włączone zostały w środku akrocentrycznego chromosomu z dala od telomerów i centromeru. Również metylacja wysp CpG zlokalizowanych w obrębie transgenów nie miała wpływu na obniżenie ekspresji  $\beta$ -globiny. Poziom metylacji komórek erytroidalnych był stały i wynosił 70% niezależnie od wieku badanych organizmów (metylacja wysp CpG komórek mózgu sięgała 100%). Krzyżując myszy niosące gen ludzkiej  $\beta$ -globiny z heterozygotami i homozygotami pozbawionymi poszczególnych wariantów H1 wykryto, że brak histonu H1e i w mniejszym stopniu H1d osłabiał proces wyciszenia  $\beta$ -globiny, natomiast nieobecność H1a, H1c i H1<sup>o</sup> nie wpływała na analizowane zjawisko. Mocnym argumentem świadczącym o tym, że przyczyną spadku aktywności transgenów wraz z wiekiem organizmów jest brak konkretnego wariantu H1 jest obserwacja osobników heterozygotycznych H1d<sup>+/-</sup> i H1e<sup>+/-</sup>, które wykazywały właściwości pośrednie między homozygotami H1d<sup>-/-</sup> lub H1e<sup>-/-</sup>, a formami dzikimi. W drugim teście do komórek wprowadzono wektor YAC<sub>277w</sub> o długości 150 kpb zawierający gen ludzkiej  $\beta$ -globiny wraz ze wszystkimi znanymi elementami regulatorowymi (Alami i wsp., 2000). Otrzymano organizmy u których transgen uległ integracji w środkowej części chromosomu 3, a poziom ekspresji wynosił 60% w porównaniu z mysim odpowiednikiem. Hemizygotyczne myszy YAC<sub>277w</sub> łączono następnie z heterozygotami i homozygotami H1a, H1c i H1e. Brak histonu H1e powodował niemal dwukrotny wzrost ilości komórek wykazujących ekspresję transgenu, natomiast myszy H1c<sup>-/-</sup> i H1e<sup>-/-</sup> wykazywały tylko nieznaczne podniesienie wskaźnika. Wyniki obu testów sugerują, że histony łącznikowe posiadają subtelny, ale łatwo wykrywalny wpływ na wyciszenie transgenów. Aby zbadać czy poziom ekspresji  $\beta$ -globiny jest powiązany bezpośrednio z określonymi wariantami H1 do komórek wprowadzono trzeci wektor, mianowicie YAC<sub>264-inv</sub> zbudowany podobnie jak YAC<sub>277w</sub> z tą różnicą, że

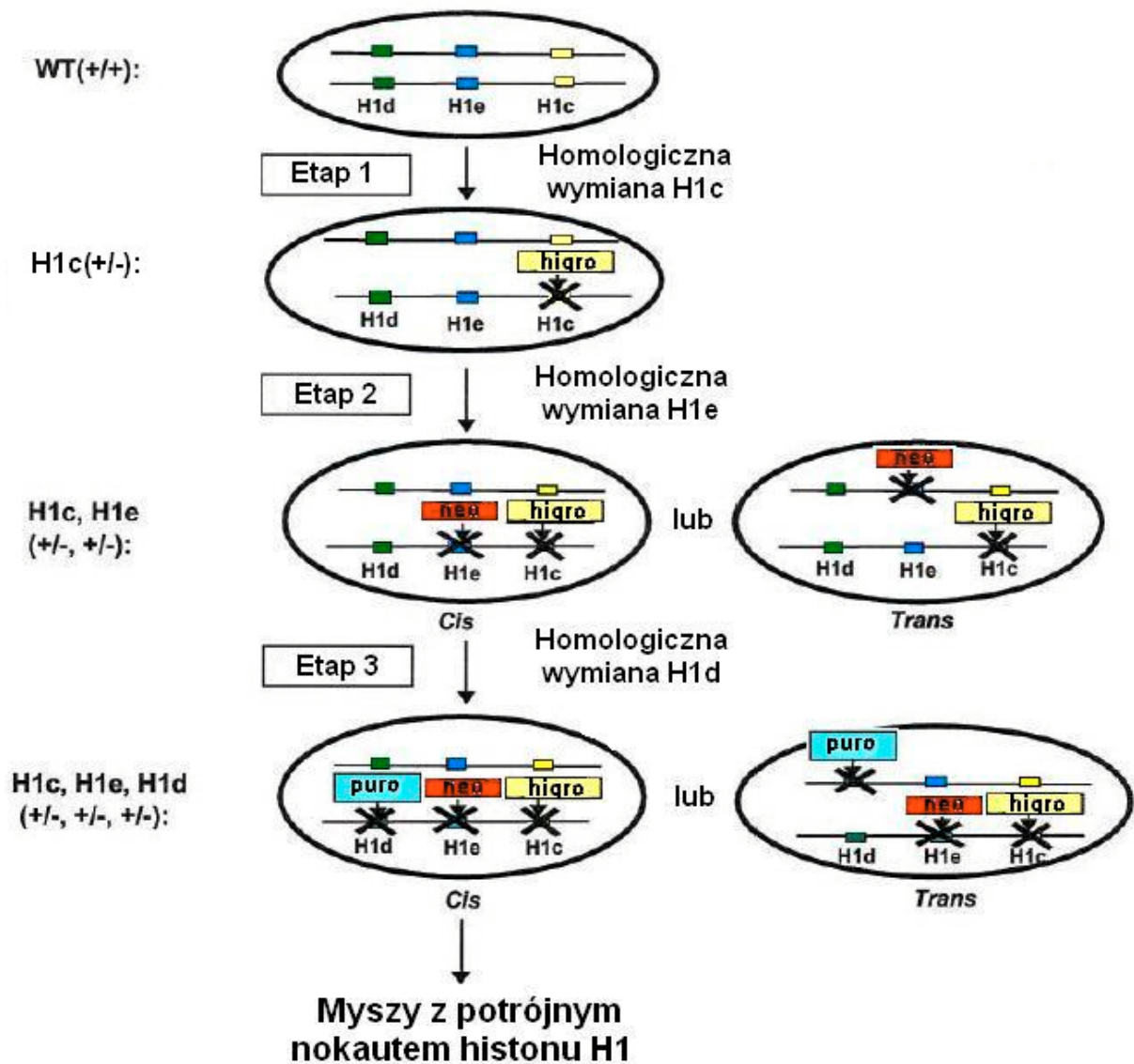
odcinek regulatorowy  $\beta$ -globiny jest odwrócony. Transgen włączono do chromosomu 2. Myszy heterozygotyczne YAC<sub>264-inv</sub> i homozygotyczne pod względem delecji H1a, H1c lub H1e wykazywały odmienne właściwości. Nieobecność histonu H1a związana była ze spadkiem ekspresji ludzkiej  $\beta$ -globiny o ponad 50%. Równocześnie brak histonów H1e i H1c nie dawał podobnego efektu, a nawet można było zaobserwować nieznaczny wzrost ekspresji. Proces wyciszenia transgenów może być także powiązany ze zmianą całkowitej ilości histonu H1. Porównanie zawartości H1 u młodych myszy (około 1 miesiąca) z osobnikami starszymi (około 2 lat) wykazało, że poziom stechiometrii nie był stabilny i wraz z wiekiem stosunek H1/nukleosom wzrastał o 15%. Tak, więc wyciszenie genów  $\beta$ -globiny może być następstwem tego zjawiska (Alami i wsp., 2003).

Doświadczenia te w prosty sposób udowodniły, że poszczególne warianty H1 obok generalnej roli strukturalnej posiadają specyficzne funkcje regulatorowe. Histon H1a związany jest z regionami aktywnej chromatyny, natomiast H1d i H1e okupują miejsca nie ulegające transkrypcji. Regulacja ekspresji badanych transgenów związana jest z obecnością lub brakiem pewnych wariantów H1 co prawdopodobnie skutkowało powstaniem subtelných, aczkolwiek istotnych zmian chromatyny. Dodatkowo proces ten nie jest powiązany z metylacją DNA, a histony H1 poprzez nieznaną mechanizm mogą regulować ekspresję genów.

Następstwem doświadczeń z pojedynczym i podwójnym „wybiciem” genów H1 było stworzenie organizmów o jeszcze większej redukcji ilości histonów H1. Celu tego nie da się osiągnąć krzyżując odpowiednie homozygoty, dlatego cała procedura musi być oparta na homologicznej wymianie co najmniej dwóch genów jednocześnie. W pierwszym etapie otrzymano myszy homozygotyczne względem genów H1c i H1e. Dużym utrudnieniem jest fakt, że integracja drugiego genu selekcyjnego do heterozygot np. H1c<sup>+/-</sup> może przebiegać na dwa sposoby. Transgen może ulec

włączeniu w pozycji cis lub trans w stosunku do pierwszego genu (Rys. 25). Dla dalszych badań użyteczne są jedynie komórki w których oba geny ułożone są w konfiguracji cis, dlatego niezbędne jest odróżnienie obu układów. Można to osiągnąć na dwa sposoby. Pierwszy polega na analizie genotypów potomstwa. Niezależna segregacja genów świadczy o tym, że

komórki ES:



Rys. 25. Otrzymywanie potrójnie znokautowanych myszy względem histonu H1. Geny histonów H1d (kolor zielony), H1e (niebieski) i H1c (żółty) ułożone na homologicznych chromosomach są zastępowane kolejno przez geny selekcyjne higr0 (żółty), neo (czerwony) i puro (niebieski). Do otrzymywania transgeniczných organizmów wybiera się tylko komórki ES w układzie cis (etap 2 i 3) (wg Fan i wsp., 2003a).



allele występowały w położeniu trans, natomiast kosegregacja jest dowodem potwierdzającym konfigurację cis. Metoda ta jest żmudna i pracochłonna. Wymaga ona kilku dodatkowych miesięcy hodowli i badań wielu osobników. Alternatywą dla metody analitycznej może być wykorzystanie techniki FISH. Jest to metoda prostsza, skuteczniejsza i znacznie szybsza. Wyniki otrzymujemy już na etapie komórek ES w wyniku czego zbędna jest hodowla wszystkich komórek ES i organizmów od nich pochodzących. Procedura polega na wprowadzeniu do komórek znajdujących się w interfazie fluorescencyjnie wyznakowanych oligonukleotydów o sekwencji antysensownej do RNA transgenów. W przypadku układu cis transkrypty obu genów będą zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie, natomiast skutkiem konfiguracji trans jest losowe ułożenie sond molekularnych z dala od siebie (Fan i wsp., 2001b).

Otrzymane homozygoty H1cH1e<sup>-/-</sup> jak można było przewidzieć były żywotne i nie wykazywały żadnych zmian histologicznych i anatomicznych. Analiza HPLC i TOF-SM wątroby potwierdziła brak obu wariantów oraz prawidłowy stosunek histonu H1 do nukleosomu w wyniku kompensacji przez inne podtypy H1. Jediną widoczną różnicą była wielkość homozygotycznych samców (myszy H1cH1e<sup>-/-</sup> po tygodniu ważyły 4,4g, podczas gdy osobniki dzikie 5,52g), ale zjawiska tego nie obserwowano u samic. Następnym celem homologicznej wymiany genów był wariant H1d (Rys. 25), ponieważ jest on najbardziej podobny do H1e i H1c pod względem sekwencji oraz to głównie H1d zastępuje brakujące warianty w homozygotach null H1c, H1e. Kojarzenie heterozygot H1cH1dH1e<sup>+/-, +/-, +/-</sup> dało ciekawe wyniki. W pokoleniu F<sub>2</sub> nie wykryto ani jednej potrójnej homozygoty. Wśród 638 sztuk potomstwa 239 osobników wykazywało genotyp dziki, a pozostałe 399 było heterozygotami +++/---. Stosunek wynosił 1:1,67 i różnił się od spodziewanego rozkładu według praw Mendla. Świadczyło to o podwyższonej śmiertelności heterozygot +++/--- (17%

plodów obumarło przed urodzeniem). Analiza embrionów w różnym wieku ujawniła, że powyżej 11,5 dnia nie można było wykryć żadnych osobników homozygotycznych, natomiast największy spadek liczby homozygot zastępował w przedziale 7,5-11,5 dnia życia płodowego (Tabela 9). Badania histologiczne i anatomiczne wykazały szerokie spektrum zaburzeń. Embriony były mniejsze i wyraźnie opóźnione w rozwoju. Na etapie 9,5 dnia woreczek żółtkowy był mniejszy i bledszy, nie widać było krwi i naczyń krwionośnych. Chromatografia HPLC homozygotycznych embrionów ujawniła zmniejszoną ilość H1 w stosunku do nukleosomu o blisko 50%. Prawdopodobną przyczyną letalności mógł być pięciokrotny wzrost ilości H1°. Występowanie tego wariantu związane jest z komórkami zróżnicowanymi, a jego redukcja powoduje wejście komórek w cykl komórkowy. Obecność dużej liczby histonu H1° mogła skutkować przedwczesnym różnicowaniem w wyniku czego część genów niezbędnych dla prawidłowego rozwoju uległa wyciszeniu. Hipotezę tą jednak odrzucono, ponieważ mutanty null względem histonów H1°, H1c, H1d, H1e uzyskane na drodze krzyżowania z myszami H1<sup>-/-</sup> wykazywały jeszcze większe zmiany histologiczne, pomimo

**Tabela 9. Genotypy embrionów potomstwa heterozygot H1cH1dH1e<sup>+++/-</sup> (wg Fan i wsp., 2003a).**

Etap rozwoju	Całkowita ilość badanych embrionów	Liczba embrionów			
		+++ / +++	+++ / ---	--- / ---	embriony zresorbowane
7,5 d	55	14	32	7	2
8,5 d	62	22	29	10	1
9,5 d	230	56	123	32 (+3)*	15
10,5 d	81	23	40	5 (+2)*	11
11,5 d	50	11	18	1 (+1)*	16
12,5 d	26	8	12	0	6
13,5 d	26	7	15	0	4
osobniki po urodzeniu	638	239	399	0	—

\* wartość w nawiasach oznacza liczbę homozygotycznych embrionów, które uległy autolizie w czasie badania.

d – dzień po zapłodnieniu



Badaniu poddano również wielkość jąder komórkowych i szybkość trawienie chromatyny nukleazą z mikrokoków (MN-aza). Jądra limfocytów wyizolowanych z śledziony i grasicy homozygot  $H1^{\circ}H1cH1e^{-/-}$  nie różniły się średnicą od jąder u osobników dzikich. Także trawienie MN-azą przebiegało za zbliżonym poziomie. Analiza powstałych oligonukleotydów pozwoliła zaobserwować zmianę długości łącznikowego DNA skorelowaną z ilością H1 w komórce (Tabela 11). Przykładowo limfocyty z grasicy homozygot  $H1^{\circ}H1cH1e^{-/-}$  i heterozygot  $H1cH1dH1e^{-/+}$  wykazywały podobny spadek powtarzalnej długości nukleosomów (NRL) o 8 pnt (obniżenie zawartości histonu H1 wynosiło odpowiednio 43% i 50%), natomiast splenocyty i hepatocyty cechowały się nieznacznym spadkiem NRL o 4 pnt przy redukcji histonu H1 na poziomie 20-25%. Zmiana długości NRL u organizmów pozbawionych kilku wariantów H1 jest zgodna z obserwacjami komórek wykazujących nadprodukcję histonu H1 u których obserwowano wzrost długości łącznikowego DNA (Fan i wsp., 2003; Fan i Skoultchi, 2003).

**Tabela 11. Zmiana powtarzalnej długości nukleosomu (NRL) w mutantach pozbawionych kilku histonów H1 (wg Fan i wsp., 2003a, nieznacznie zmodyfikowano).**

Tkanka	Genotyp		Stechiometria H1/nukleosom	Zmiana długości NRL w porównaniu z formą dziką (pz)*		
Grasica	forma dzika (+/+)		0,83 ± 0,10 n=12			
	$H1^{\circ}(-/-)H1c,H1e(-,-,-)$		0,47 ± 0,26 n=8	-8	-9	-5
	$H1c,H1d,H1e(-,+,-,-,-)$		0,41 ± 0,16 n=6	-7	-9	-10
Wątroba	wątroba I	forma dzika (+/+)	0,79 ± 0,07 n=5			
		$H1^{\circ}(-/-)H1c,H1e(-,-,-)$	0,64 ± 0,01 n=4	-4	-4	-3
	wątroba II	forma dzika (+/+)	0,76 ± 0,07 n=5			
		$H1c,H1d,H1e(-,+,-,-,-)$	0,50 ± 0,15 n=6	nie oznaczono		
Śledziona	forma dzika (+/+)		0,79 ± 0,03 n=3			
	$H1^{\circ}(-/-)H1c,H1e(-,-,-)$		0,59 n=1	-3	-2	-1
	$H1c,H1d,H1e(-,+,-,-,-)$		nie oznaczono	-5	-4	

\* każda z liczb oznacza wartość uzyskaną w oddzielnym eksperymencie

wątroba I – narząd pochodzący od osobników dojrzałych

wątroba II – narząd wyizolowany z nowonarodzonych myszy

Doświadczenia nad organizmami pozbawionymi trzech i więcej wariantów H1 udowodniły, że histon H1 jest białkiem niezbędnym dla prawidłowego rozwoju ssaków, a jego brak w przeciwieństwie do niższych organizmów powoduje szereg zaburzeń rozwojowych oraz zmian w obrębie chromatyny. Dodatkowo wyniki te sugerują, że wartość 50% histonu H1 jest krytyczna dla życia komórek. W zgodzie z tym twierdzeniem wydają się najnowsze dane uzyskane z badań nad homozygotami H1tH1c<sup>-/-</sup>. Myszy takie rozwijały się normalnie i były płodne. Brak obu wariantów H1, które stanowią u form dzikich w spermatocytach 67% histonu H1 skutkowało obniżeniem stosunku H1 do nukleosomu tylko o 25%. Inne warianty nie były w stanie utrzymać normalnej stechiometrii nawet przy 4-krotnym wzroście ilości histonów H1d i H1e oraz 2,5-krotnym wzroście H1c. Pomimo to spermatocyty nie wykazywały istotnych zmian histologicznych. Ilość plemników, wielkość i waga jąder pozostawały w normie. Także procesy zachodzące podczas spermatogenezy wydawały się przebiegać bez zakłóceń, chociaż wiele danych sugeruje, że obecność histonu H1 ma tutaj duże znaczenie. Mejoza w homozygotach H1tH1c<sup>-/-</sup> odbywała się równie sprawnie jak u form dzikich. Procesy takie jak parowanie chromosomów i crossing over przebiegały prawidłowo. Analizie poddano także poziom ekspresji genów. Przebadano ponad 9 tysięcy genów z czego tylko 17 zmieniło poziom ekspresji 2-krotnie (wszystkie wykazywały spadek), a 85 genów 1,5-krotnie ( w 67 przypadkach wykryto zmniejszoną ilość transkryptu). Obserwowany spadek aktywności genów powstały w wyniku braku histonu H1 jest nieco zaskakujący, ponieważ ogólnie przyjętą rolą histonu H1 jest represja genów przez tworzenie bardziej zwartej struktury chromatyny. W świetle powyższych doświadczeń histon H1 należy uznać za szczególny rodzaj regulatora, który w zależności od genu i rodzaju komórki może mieć charakter pozytywny lub negatywny.

#### 4. HISTONY ŁĄCZNIKOWE KURY

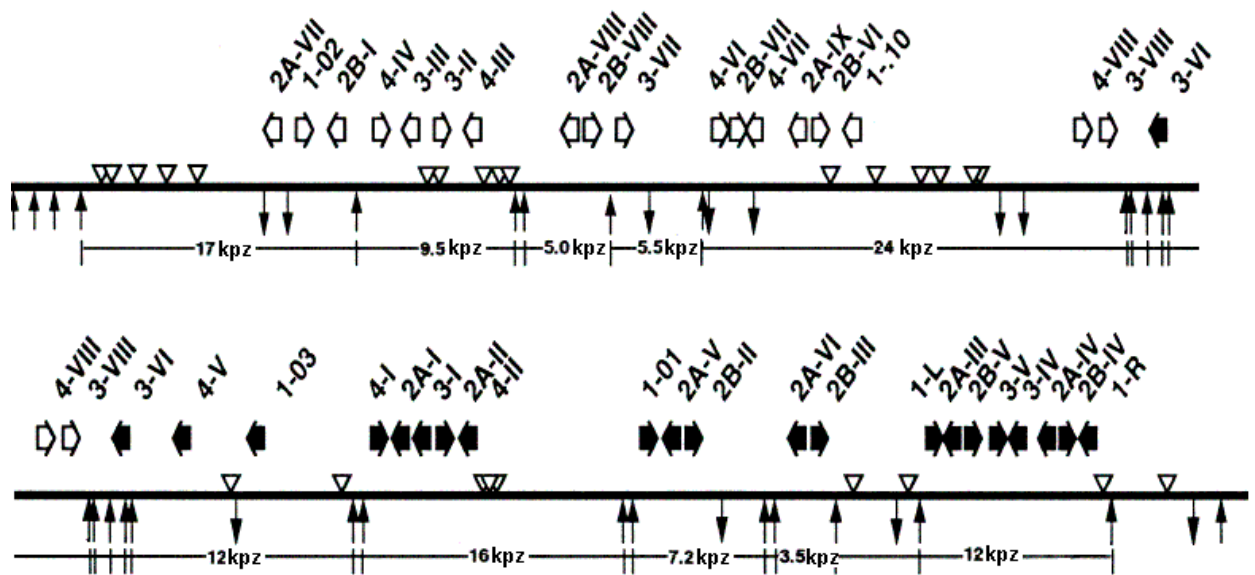
Na 44 geny kodujące białka histonowe 39 zlokalizowanych jest na chromosomie 1 w obrębie odcinka długości 110 kpz. Pozostałe geny histonowe znajdują się w czterech oddzielnych grupach zawierających histon H2A (wariant z intronami), histony H3 i H2A oraz dwa odizolowane histony H3 posiadające introny. W skład głównego zgrupowania wchodzi sześć wariantów histonu H1, trzy warianty H2A, cztery warianty H2B, dwa warianty H3 i jeden gen histonu H4 (Rys.26). Histony łącznikowe u kury możemy podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią histony H1 będące odpowiednikiem somatycznych histonów H1 u ssaków, natomiast druga grupa obejmuje histon H5, którego homologiem u innych organizmów jest histon H1°. Obecnie histony kury oznaczają się na dwa sposoby. Starsza nomenklatura uwzględnia kolejność rozdziału tych białek podczas elektroforezy, podczas gdy w nowszym systemie oznaczeń kładzie się nacisk na ich podłoże genetyczne (Tabela 12).

Kurze histony H1 wykazują typowe cechy genów i białek H1. Odcinek promotorowy zawiera kasetę H1/AC i obszar bogaty w guaninę o wydłużonej sekwencji charakterystycznej dla wszystkich kurzych histonów H1 (3'GCGGGGCGGGCT 5'). Ponadto elementy promotorowe każdego z histonów H1 zawierają specyficzne odcinki, dlatego można sądzić, że ich

**Tabela 12. Nomenklatura kurzych histonów H1 i ich udział procentowy (kompilacja danych z Shannon i Wells, 1987).**

Oznaczenie genu	11L	11R	03	.10	02	01
Oznaczenie białka	a	a'	b	c	c'	d
Procentowy udział*	36-38%		20%	23%		18-19%

\* ilość histonu H1 ustalono na podstawie PAGE-AU, procentowy udział histonów 11L i 11R oraz .10 i 02 podany jako wartość sumaryczna ponieważ dokładny rozdział tych frakcji za pomocą tej techniki nie jest możliwy



Rys.26. Organizacja genów histonowych u kury. 1, 2A, 2B, 3 i 4, oznaczają poszczególne warianty histonów H1, H2A, H2B, H3 i H4 odpowiednio. Cały odcinek jest długości około 110 kbp i przypomina pod tym względem odcinek kodujący histony u myszy. Kierunek transkrypcji genów zaznaczono poziomą strzałką (ponadto za pomocą strzałek wypełnionych na czarno zaznaczono geny, które usunięto podczas homologicznej wymiany odcinka  $\Delta 57$  kbp). Pionowa strzałka skierowana w górę oznacza miejsca cięcia przez restryktazę EcoRI, pionowa strzałka skierowana w dół – BamHI,  $\nabla$  – HindIII; (według Takami i wsp., 1997).

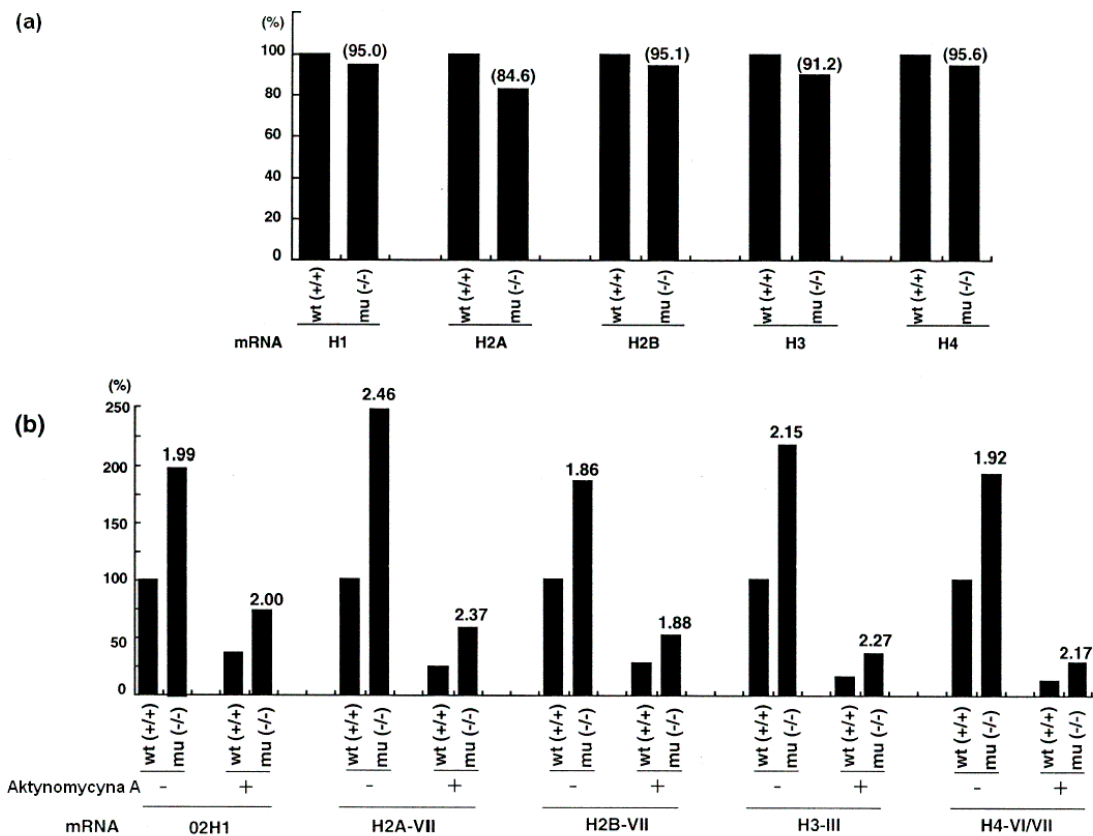
ekspresja jest zróżnicowana. W skład odcinka 3'UTR wchodzi region bogaty w purynę o sekwencji 3'CCAAAAAGAGCTG 5'. Jednocześnie brak w jego obrębie sygnału poliadenylacji. Również na poziomie białka histony H1 u kury przypominają histony innych organizmów. Są to białka o długości 217-224 aminokwasów odznaczające się wysoką konserwatywnością domen globularnych zarówno pod względem długości i sekwencji aminokwasowej, przy dużej zmienności domen CTD i NTD (Rys. 27). Dodatkowo histony H1 możemy podzielić na dwie grupy, mianowicie warianty 11L, 11R i 03 w domenie COOH-terminalnej posiadają głównie lizynę, a warianty 01, .10, 02 w odpowiednich miejscach zawierają 3,2,1 argininę. Skutkiem takiej zmiany





#### **4.1. HOMOLOGICZNA WYMIANA GENÓW HISTONOWYCH W KURZYCH LIMFOCYTACH B LINII DT40**

Linia DT40 limfocytów DT40 uzyskana w wyniku wirusowo indukowanej białaczki cechuje się wysokim poziomem rekombinacji homologicznej co znacznie ułatwiło przebieg doświadczeń. Pierwszym genem, który poddano procedurze homologicznej wymiany genów był wariant 01H1. Na początku histon 01H1 podstawiono genem neo uzyskując komórki heterozygotyczne 01H1+/. Aby otrzymać homozygoty zależało wprowadzić drugi gen selekcyjny (w tym przypadku był to gen bsr). Otrzymane komórki zarówno heterozygotyczne i homozygotyczne poddano szczegółowym badaniom. Nie wykryto żadnych zaburzeń proliferacji (czas podwojenia wielkości koloni był podobny jak u form dzikich i wynosił 12 godzin). Poziom mRNA poszczególnych wariantów H1 oceniono wykorzystując technikę obrony przed RNA-zą. Histon 01H1 stanowi 9,9% mRNA histonu H1 w komórkach DT40, około połowę tej wartości w komórkach heterozygotycznych, a u homozygot nie występuje wcale. Pomimo braku histonu 01H1 stechiometria H1/nukleosom pozostała niezmienną dzięki wzrostowi ilości innych wariantów H1. Komórki 01H1+/- i 01H1-/-, choć pozornie nie różniły się od niezmodyfikowanej linii DT40 wykazywały zmiany w składzie ilościowym i jakościowym produkowanych białek. Analiza 2D-PAGE ujawniła odmienny wzór ekspresji białek zarówno w komórkach heterozygotycznych i homozygotycznych. Część białek normalnie obecnych w komórkach DT40 występowało w mniejszych ilościach, a kilka z nich zanikało całkowicie. Ponadto dla niektórych białek zaobserwowano proces odwrotny (Seguchi i wsp., 1995). Podobne rezultaty przyniosła inaktywacja pozostałych wariantów H1. Brak któregośkolwiek z histonów H1 nie wpływał na żywotność komórek, jedynie ekspresja innych białek w zmutowanych komórkach uległa zmianie. Należy



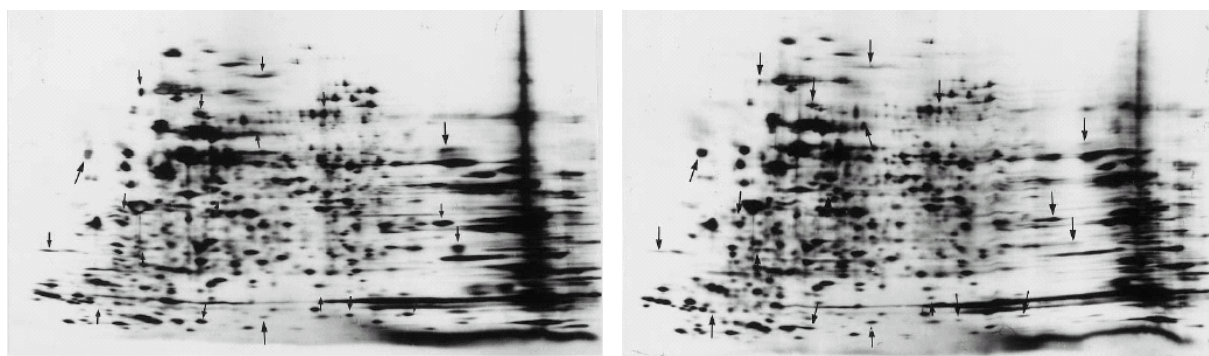
Rys. 27. Porównanie poziomu mRNA histonów w komórkach typu dzikiego (wt, +/+) i homozygotycznych mutantach (mu, -/-). (a) poziom histonów mRNA H1, H2A, H2B, H3 i H4 w komórkach +/+ i -/-. (b) poziom mRNA poszczególnych wariantów histonów H1, H2a, H2B, H3 i H4, poziom histonu w komórkach +/+ przyjęto za 100%, liczby nad słupkami odnoszącymi się do komórek -/- oznaczają wzrost pozostałych histonów po usunięciu niektórych z wariantów. Podano wyniki dwóch niezależnych eksperymentów przeprowadzonych przy obecności i nieobecności aktynomycyny A; (według Takami i wsp., 1997)

Należy podkreślić, że delecja poszczególnych wariantów H1 ma odmienny skutek na poziom ekspresji różnych białek. Przykładowa inne białka ulegały nadekspresji w komórkach 01H1<sup>-/-</sup>, a inne w mutantach 02H1<sup>-/-</sup>. Również siła oddziaływania wariantów H1 na poziom produkcji białek jest zróżnicowana. Najmniejsze zmiany widoczne były przy braku histonu 11LH1 (Takami i wsp., 2000). Dane te jednoznacznie świadczą o tym, że warianty histonów H1 mają odmienny i specyficzny wpływ na regulację genów. Każdy z nich mimo, iż może być zastąpiony przez inne histony H1 przez co proces

składania chromatyny przebiega normalnie wykazuje unikatowe właściwości jako regulator ekspresji różnych genów czego następstwem są obserwowane zmiany na elektroforogramach 2D-PAGE.

Kolejnym etapem badań było usunięcie z odcinka zawierającego większość genów histonowych ( $\Delta 110$  kpz) obszaru o długości 57 kpz, który zawiera 21 genów histonów rdzeniowych i łącznikowych (Rys. 25). Z histonów H1 pozostały jedynie warianty .10 i 02. Całkowity brak odcinka  $\Delta 57$  kpz nie powodował zaburzeń stechiometrii histonów. Poziom pozostałych wariantów zarówno rdzeniowych jak i łącznikowych znacznie wzrastał kompensując braki (Rys. 27). Jednocześnie wykazano, że produkcja białek w komórkach  $\Delta 57$  kpz $^{-/-}$  uległa dużym zmianom (Rys. 28). Pomimo to delecja prawie połowy genów histonowych nie pociągnęła za sobą letalności komórek pozostawiając pytanie dotyczące znaczenia histonów H1 bez odpowiedzi (Takami i wsp., 1997).

Dopiero homologiczna wymiana całego odcinka  $\Delta 110$  kpz pozwoliła potwierdzić, że białka histonowe są niezbędne dla prawidłowego rozwoju.



Rys. 28. Porównanie poziomu białek niehistonowych produkowanych przez komórki +/+ (strona lewa) i  $\Delta 57$ kpz  $^{-/-}$  (strona prawa). Użycie 2D-PAGE pozwoliło uwidocznić i rozdzielić białka na podstawie pH 3-10 i masy cząsteczkowej. Strzałki skierowane w dół oznaczają białka których ilość znacznie zmniejszyła się lub całkowicie brakuje ich w komórkach  $\Delta 57$ kpz  $^{-/-}$ . Strzałki skierowane do góry oznaczają białka, które nie występowały w komórkach +/+ lub wykazują nadekspresję w zmutowanych komórkach; (według Takami i wsp., 1997).

Osobniki heterozygotyczne pod względem całego odcinka  $\Delta 110$  kpz rozwijały się normalnie, a obecność jednego allelu była wystarczająca dla utrzymania właściwej stechiometrii białek histonowych. Wszystkie histony w równym stopniu podnosiły poziom ekspresji zajmując odpowiednie miejsce w chromatynie w wyniku czego nie obserwowano zmian ilościowych i jakościowych białek podczas elektroforezy 2D-PAGE. Nie udało się jednak otrzymać komórek homozygotycznych względem delekcji odcinka  $\Delta 110$  kpz (Takami i Nakayama, 1997a). Z doświadczenia tego wynikają dwa wnioski:

- I. jeden allel głównego zgrupowania genów histonowych zawierający 39 genów wystarcza dla proliferacji komórek oraz utrzymania właściwego poziomu histonów
- II. brak obu alleli odcinka  $\Delta 110$  kpz skutkuje letalnością komórek.

Niestety homologiczna wymiana odcinka zawierającego większość histonów oznacza eliminację dużej ilości histonów rdzeniowych, a więc nie można wykluczyć, że śmiertelność komórek wynikała z braku tych histonów, a nie histonów H1. W tej sytuacji należało „wybić” jak najwięcej histonów H1 nie naruszając przy tym struktury sąsiadujących genów. Procedura badawcza polegała na stopniowym zastępowaniu poszczególnych wariantów za pomocą różnych genów reporterowych. W sumie wykorzystano pięć markerów (neo, bsr, hisD, gpt, hig) za pomocą których podstawiono prawie wszystkie allele genów H1 inaktywując 17 genów histonów rdzeniowych. W efekcie otrzymano zmutowane komórki u których brakowało 10 alleli histonu H1 ( $\Delta 10/12H1$ ) oraz 11 alleli histonu H1 ( $\Delta 11/12H1$ ). Pomimo dużych starań nie udało się uzyskać żywotnych komórek całkowicie pozbawionych histonu H1 co świadczy o jego niezbędności dla przeżycia. Mutanty  $\Delta 10/12H1$  u których jedynym histonem był wariant 02H1 wykazywały stały poziom H1/nukleosom (przez blisko sześciokrotny wzrost ekspresji histonu 02H1). Dopiero homologiczna wymiana jednego z pozostałych alleli 02H1

doprowadziła do redukcji ilości białka H1 do połowy. Jednocześnie stwierdzono dwukrotny wzrost ilości białek HMG. Struktura chromatyny komórek  $\Delta 11/12H1$ , sądząc po analizie produktów trawienia MN-azą, nie uległa zmianie w porównaniu do komórek DT40. Zjawisko to może mieć związek ze wzrostem ilości białek HMG, które prawdopodobnie potrafią w pewnym stopniu zrekompensować brak histonu H1. Limfocyty  $\Delta 11/12H1$  mnożyły się z podobną siłą jak ich dzikie odpowiedniki jednak wzór ekspresji białek przez nie produkowanych uległ znacznym zmianom (Takami i Nakayama, 1997b).

Doświadczenie to po raz kolejny wykazało, że histony łącznikowe należy traktować jako szczególny rodzaj aktywnego czynnika regulującego transkrypcję, a nie jak do niedawna sądzono biernego represora ograniczającego aktywność genów na drodze czysto mechanistycznej. Ponadto udowodniono, że obecność już jednej kopii histonu H1 wystarcza dla przeżycia komórek DT40.

## 5. ZAKOŃCZENIE

Histon H1 stanowi nieodłączny składnik chromatyny u wszystkich *Eucaryota*. Wraz z odkryciem dużej liczby nieallelicznych form tego białka pojawiło się pytanie o funkcję zróżnicowania histonów H1. Początkowo przyjęto, że białka H1 stanowią wewnątrzjądrowy system represji genów. Zasada działania wydawała się prosta. W miejscach w których histon H1 aktywnie łączy się z chromatyną ekspresja genów zostaje zablokowana poprzez ograniczony dostęp maszynerii transkrypcyjnej do wolnego DNA. Model ten został potwierdzony w licznych doświadczeniach *in vitro* (Zlatanova i van Holde, 1992 i literatura tam cytowana). Nie tłumaczyło to w najmniejszym stopniu obserwowanej różnorodności histonów łącznikowych. W najprostszym przypadku duża liczba genów H1 wynika z silnego zapotrzebowania na białka histonowe w ściśle określonym czasie (faza S). Zwielokrotnienie liczby genów H1 powoduje zwiększenie ekspresji, natomiast różnice w sekwencji nukleotydów mogą wynikać z prostych zmian DNA nagromadzonych w miarę upływu czasu (mutacje punktowe, dryft genetyczny). Trudno jednak hipotezę tą pogodzić z faktem, że histony H1 należą do białek niezwykle konserwatywnych ewolucyjnie. Poszczególne warianty H1 są tak silnie utrwalone, że sekwencja DNA dwóch podtypów histonu H1 u tego samego organizmu różni się bardziej niż sekwencje histonu H1 jednego rodzaju pochodzących z bardzo odległych ewolucyjnie organizmów. Oznacza to, że histon H1a człowieka bardziej przypomina wariant homologiczny na przykład u żaby, niż ludzki histon H1°. Jest to dowodem dużej presji selekcyjnej i świadczy najprawdopodobniej o funkcjonalnym zróżnicowaniu. Innym wytłumaczeniem może być hipoteza według której warianty histonu H1 powstały w odpowiedzi na różnice w budowie składników chromatyny, głównie DNA (Brown 2001). W momencie gdy histony H1 wykształciły się jako oddzielna grupa białek i zajęły swoje

miejsce na nukleosomie mógł powstać dodatkowy mechanizm kontroli genów. Liczne modyfikacje białek histonowych stworzyły szerokie pole dla mechanizmów regulujących transkrypcję. Prawdopodobnie w posttranslacyjnych zmianach histonów należy upatrywać źródła bogactwa odpowiedzi komórki na czynniki środowiskowe. Różnice w budowie poszczególnych wariantów H1 powodują, że mogą one podlegać odrębnym, specyficznym dla siebie modyfikacją. Ponadto te same zmiany mogą mieć inne znaczenie w zależności od budowy białka (Hendzel i wsp., 2004). Histony H1 nie działają jako niezależny składnik regulacyjny, ale dzięki licznym oddziaływaniom z innymi białkami komórki stanowią złożony system kontroli. Histony łącznikowe przez swoją obecność wpływają na strukturę i modyfikacje jakim podlegają histony rdzeniowe. Od nich uzależniona jest aktywność czynników transkrypcji takich jak Sp1 i SWI/SNF (Ramachandran i wsp., 2003). Prawdopodobnie to wyjaśnia pozornie sprzeczne wyniki eksperymentów *in vitro*, które jako uproszczone modele pozbawione liczych elementów komórkowych funkcji których często nawet nie znamy, nie są dobrym odzwierciedleniem procesów zachodzących w żywych organizmach.

Istnieją dowody świadczące o wybiórczych właściwościach wariantów H1 w stosunku do DNA w zależności od jego sekwencji. Zaobserwowano, że aktywność genów 5S rRNA komórkach embrionalnych *Xenopus* koreluje z wymianą histonu B4 na histony somatyczne. W skład genomu tych organizmów wchodzi liczne geny 5S rRNA, które można podzielić na dwie grupy: geny ulegające ekspresji w oocytach i początkowym stadium rozwoju oraz geny aktywne w komórkach somatycznych. Oocytarne 5S rRNA wykazują silne preferencje do wiązania się z wariantem B4, który powoduje ich aktywację. W tym samym czasie histon B4 przyłączając się do regionów DNA kodujących somatyczne 5S rRNA zostaje zablokowany. Sytuacja ulega zmianie wraz z pojawieniem się innych histonów H1 w wyniku czego

dochodzi do transkrypcji wyłącznie genów somatycznych 5S rRNA (Bouvet i wsp., 1994; Sera i Wolffe, 1998; Wolffe, 1997). Również inne wyniki badań sugerują, że poszczególne warianty H1 zajmują miejsce w chromatynie w sposób nielosowy (Parseghian i wsp., 2000). Niestety nic nie wiemy o naturze tego procesu. Niemniej jednak fakt ten w połączeniu z olbrzymią możliwością posttranslacyjnych modyfikacji histonów stał się podstawą dla hipotezy według której możemy mówić o epigenetycznym kodzie białek histonowych, którego funkcja i znaczenie byłaby porównywalna do kodu DNA (Jenuwein i Allis, 2001). Krokiem w kierunku poznania zasad działania tego kodu są liczne badania nad histonem H1. Organizmy u których wyeliminowano część lub nawet wszystkie geny H1 za pomocą homologicznej wymiany genów stanowią bogate źródło informacji o funkcji i znaczenia tych białek. Dużym utrudnieniem jest proces kompensacji histonów, który często uniemożliwia interpretację wyników. W najbliższej przyszłości niezbędne będzie stworzenie organizmów pozbawionych pewnych genów H1, a w ich miejsce wstawienie innych genów kodujących histony H1. Pozwoli to zanalizować wpływ konkretnego wariantu H1 nie zaburzając stechiometrii histonu H1 do nukleosomu. Już dziś powstanie takich organizmów jest możliwe (np. wykorzystując system Cre-loxP; Bishop, 2001; Zheng i wsp., 2000) i wydaje się kwestią czasu. Nie oznacza to, że obecne badania nie przyniosły żadnych rezultatów. Jako przykład może posłużyć histon H1t. Wszystkie histony H1 wyraźnie wpływają na metylację DNA. Ich brak skutkuje hipoacetylacją DNA. W genomie wszystkich organizmów znajduje się wiele genów, które mogą stać się przyczyną śmierci śmieci komórki (onkogeny, transpozony). W większości przypadków są one silnie metylowane i przez to nieaktywne. Histon H1 sprzyjając metylacji DNA działa jako silny czynnik zapobiegający śmierci lub nowotworzeniu komórek. Hipotezę tą potwierdza obecność wyspecjalizowanego wariantu histonu H1t w komórkach znajdujących się w krytycznym momencie rozwoju. Mejoza jest procesem od którego zależy jak



będzie wyglądał organizm powstały z komórek rozrodczych. Błędy w trakcie mejozy mogą mieć bardzo duży wpływ na funkcjonowanie nowopowstałego organizmu. Niezwykle istotne jest ściśle kontrolowanie tego procesu co ma na celu przekazanie jak najwierniejszej kopii materiału genetycznego. Postuluje się, że histon H1t dzięki swej szczególnej budowie (występowanie metioniny) może zapobiegać powstawaniu mutacji na skutek oksydacyjnej działalności wolnych rodników.

O szczególnym znaczeniu histonów H1 w procesach nowotworowych komórki świadczą intensywne badania mające na celu wykorzystanie białek histonowych w leczeniu raka (m.in. firma Symbiotec). Prawdopodobnie histon H1 reprezentuje stary system obronny organizmu zapobiegający zmianom nowotworowym. Histony łącznikowe jak wszystkie białka powstaje na terenie cytoplazmy i dopiero później transportowane są do jądra komórkowego. Zaobserwowano, że również w cytoplazmie histony H1 podlegają ścisłej kontroli. Ponadto w przeciwieństwie do histonów rdzeniowych wraz z białkami HMG histony H1 występują w dużych ilościach poza jądrem stanowiąc zapas białek przeznaczonych do bezpośredniego użytku, a ich transport przez pory jądrowe odbywa się za pomocą specyficznych receptorów. Z drugiej strony jedną z cech charakterystycznych komórek ulegających transformacji nowotworowej są liczne modyfikacje błony komórkowej. Niezwykle ciekawe jest, że histony H1 obecne w cytoplazmie rozpoznają takie zmiany łącząc się z błoną komórkową co prowadzi do jej destabilizacji. Następstwem całego procesu jest śmierć komórki nowotworowej. Wyniki badań są bardzo obiecujące. Stwierdzono, że histon H1 zabija więcej komórek nowotworowych niż jakikolwiek stosowany lek (np. taxol). Ponadto jest on aktywny w dużo mniejszych stężeniach, nietoksyczny i nie wywołuje odpowiedzi układu immunologicznego (jako naturalny składnik komórek) ani efektów ubocznych podobnych do

powstających w czasie chemioterapii. Nie zaobserwowano również narastania oporności komórek wraz z czasem stosowania.

Celem przyszłych badań nad histonem H1 nie jest udowodnienie funkcjonalności zróżnicowania histonu H1, ponieważ to jest oczywiste już teraz, ale wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za lokalizację poszczególnych wariantów. Badania przedstawione w niniejszej pracy wielokrotnie udowodniły, że występowanie licznych form nieallelicznych histonu H1 odgrywa istotną rolę dla prawidłowego funkcjonowania organizmów. Poznanie zasad według których histon H1 reguluje procesy komórkowe pozwoli na leczenie nowotworów oraz lepsze zrozumienie epigenetycznej regulacji genów czego pośrednim skutkiem będzie rozwój terapii genowej i zapobieganie chorobom genetycznym.

## 6. LITERATURA

- Adenot, P.G., Campion, E., Legouy, E., Sllis, C.D., Dimitrov, S., Renard, J.-P., Thomson, E.M. (2000) Somatic linker histone H1 is present throughout mouse embryogenesis and is not replaced by variant H1°. *J. Cell Sci.* 113, 2897-2907.
- Alami, R., Fan, Y., Pack, S., Sonbuchner, T.M., Besse, A., Lin, Q., Graelly, J.M., Skoultchi, A.I., Bouhassira, E.E. (2003) Mammalian linker-histone sybtypes differentially affect gene expression *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(10), 5920-5925.
- Alami, R., Grealley, J.M., Tanimoto, K., Hwang, S., Feng, Y.-Q., Engel, J.D., Fiering, S., Bouhassira, E.E. (2000)  $\beta$ -globin YAC transgenes exhibit uniform expression levels but position effect variegation in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9(4), 631-636.
- Albig, A., Kioschis, P., Poustka, A., Meergans, K., Doenecke, D. (1997) Human histone gene organization: nonregular arrangement within gene kluster. *Genomics* 40, 314-322.
- Ali, Z., Singh, N. (1987) Binding of linker histones to the core nucleosome. *J. Biol. Chem.* 262(27), 12989-12993.
- Barra, J.L., Rhounim, L., Rossignol, J.L., Faugeron, G. (2000) Histone H1 is disepesable for methylation-associated gene silencing in *Ascobulus immerus* and essential for long life span. *Mol. Cell. Biol.* 20, 61-69.
- Bartell, J.G., Davis, T., Kramer, E.J., Dewey, M.J., Kistler, W.S. (1996) Expression of the rat testis-specific histoneH1t gene in transgenic mice. One kilobase of 5`-flanking sequence mediates correct expression of a *lacZ* fusion gene. *J. Biol. Chem.* 271(8), 4046-4054.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoriev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order

- folding and compaction of chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14173-14178.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D.J., Trautman, J.K., Smith, J., Kim, Y.-G., Chandrasegaran, S. (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. Mol. Cell. Biol. 21(1), 289-297.
- Bishop, J. (2001) Ssaki transgeniczne. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Bouvet, P., Dimitrov, S., Wolffe, A.P. (1994) Specific regulation of chromosomal 5S rRNA gene transcription *in vivo* by histone. Genes Dev. 8, 1147-1159.
- Brocard, M.-P., Triebe, S., Peretti, M., Doenecke, D., Khochbin, S. (1997) Characterization of the two H1<sup>o</sup>-encoding genes from *Xenopus laevis*. Gene 189, 127-134.
- Brown, D.T. (2001) Histone variants: are they functionally heterogeneous? Genome Biology 2(7): reviews 0006.1-0006.6.
- Brown, D.T., Alexander, B.T., Sittman, D.B. (1996) Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. Nucleic Acids Res. 24(3), 486-493.
- Brown, D.T., Gunjan, A., Alexander, B.T., Sittman, D.B. (1997) Differential effect of H1 variant overexpression on gene expression is due to differences in the central globular domain. Nucleic Acids Res. 25(24), 5003-5009.
- Brown, D.T., Sittman, D.B. (1993) Identification through overexpression and tagging of the variant type of the mouse H1e and H1c genes. J. Biol. Chem. 268(1), 713- 718.
- Brown, T.A. (2001) Genomy. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa

- Clare, S.E., Fantz, D.A., Kistler W.S., Kistler, M.K. (1997) The testis-specific histone H1t gene is strongly repressed by a G/C-rich region just downstream of the TATA box. *J. Biol. Chem.* 272(52), 33028-33036.
- Clarke, H.J., Bustin, M., Oblin, C. (1997) Chromatin modifications during oogenesis in the mouse; removal of somatic subtypes of histone H1 from oocyte chromatin occurs post-natally through a post-transcriptional mechanism. *J. Cell Sci.* 110, 477- 487.
- Clarke, H.J., Oblin, C., Bustin, M. (1992) Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histone H1 is first detectable at the 4-cell stage. *Development* 115, 791-799.
- Coles, L.S., Robins, A.J., Madley, L.K., Wells, J.R.E. (1987) Characterization of the chicken histone H1 gene complement. Generation of a complete set of vertebrate H1 protein sequences. *J. Biol. Chem.* 262(20), 9656-9663.
- Dominsky, Z., Marzluff, W.F. (1999) Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* 239, 1-14.
- Dong, Y., Liu, D., Skoultchi, A.I. (1995) An upstream control region required for inducible transcription of the mouse H1<sup>o</sup> histone gene during terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 15(4), 1889-1990.
- Dorsett, Y. & Tuschl, T. (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 318-329.
- Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D. (2000) Spermatogenesis in mice without linker histone H1t. *Histochem. Cell. Biol.* 113, 433-442.
- Dunckliffe, K.N., Rondahl, H.M.E., Wells, R.E. (1995) A H1 histone gene-specific AC-box-related element influences transcription from a major chicken H1 promoter. *Gene* 163, 227-232.
- Fan, Y., Braut, S.A., Lin, Q., Singer, R.H., Skoultchi, A.I. (2001b) Determination of transgenic loci by expression FISH. *Genomics* 71, 66-69.

- Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E.M., Zhao, J., Magnuson, T.R., Woodcock, Ch.L., Skoultchi, A.I. (2003) H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23(13), 4559-4572.
- Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R.G., Ayala, J., Skoultchi, A.I. (2001a) Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1<sup>o</sup> replacement subtype. *Mol. Cell. Biol.* 21(23), 7933-7943.
- Fan, Y., Skoultchi, A.I. (2003) Genetic analysis of H1 linker histone subtypes and their functions in mice. *Methods Enzymol.*, 377, 85-107.
- Fantz, D.A., Hatfield, W.R., Horvath, G., Kistler, M.K., Kistler W.S. (2001) Mice with targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 64, 425-431.
- Franke, K., Drabent, B., Doenecke, D. (1998) Expression of murine H1 histone genes during postnatal development. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 232-242.
- Gajiwala, K.S., Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 110-116.
- Godwin, A.R., Bollag, R.J., Christie, D.-M., Liskay, R.M. (1994) Spontaneous and restriction enzyme-induced chromosomal recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 12554-12558.
- Goldknopf, I.L., Wilson, G., Ballal, N.R., Busch, H. (1980) Chromatin conjugate protein A24 is cleaved and ubiquitin is lost during chicken erythropoiesis. *J. Biol. Chem.* 255, 10555-10558.
- Grimes, S.R., Wilkerson, D.C., Noss, K.R., Wolfe, S.A. (2003) Transcriptional control of the testis-specific histone H1t gene. *Gene* 304, 13-21.

- Gunjan, A., Alexander, B.T., Sittman, D.B., Brown, D.T. (1999a) Effect of H1 histone variant overexpression on chromatin structure. *J. Biol. Chem.* 274(53), 37950-37956.
- Gunjan, A., Brown, D.T. (1999b) Overproduction of histone H1 variants *in vivo* increases basal and induced activity of the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic Acids Res.* 27(16), 3355-3363.
- Gunjan, A., Sittman, D.B., Brown, D.T. (2001) Core histone acetylation is regulated by linker histone stoichiometry *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 276(5), 3635-3640.
- Hellauer, K., Sirard, E., Turcotte, B. (2001) Decreased Expression of Specific Genes in Yeast Cells Lacking Histone H1. *J. Biol. Chem.* 276(17), 13587-13592.
- Hendzel, M.J., Level, M.A., Crawford, E., Th'ng, J.P.H. (2004) The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin *in vivo*. *J. Biol. Chem.* (*in press*) M400070200
- Horvath, G.C., Clare, S.E., Kistler, M.K., Kistler W.S. (2001) Characterisation of the H1t promoter: role of conserved histone 1 AC and TG elements and dominance of the cap-proximal silencer. *Biol. Reprod.* 65, 1074-1081.
- Ioffe, E., Liu, Y., Bhaumik, M., Poirier, F., Factor, S.M., Stanley, P. (1995) WW6: An embryonic stem cell line with an inert genetic marker that can be traced in chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7357-7361.
- Jenuwein, T., Allis, D.C. (2001) Translating the histone code. *Science* 293(5532), 1074-1080.
- Kasinsky, H.E., Lewis, J.D., Dacks, J.B., Ausió, J. (2001) Origin of H1 linker histones. *FASEB J.* 15, 34-42.
- Khochbin, S. i Wolffe, A.P. (1994) Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. *Eur. J. Biochem.* 225, 501-510.

- Khochbin, S. (2001) Histone H1 diversity: binding regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271, 1-12.
- Kłyszajko – Stefanowicz, L. (2002). *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Koutzamani, E., Loborg, H., Sarg, B., Lindner, H.H., Rundquist, I. (2002) Linker histone subtype composition and affinity for chromatin *in situ* in nucleated mature erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 277(47), 44688-44694.
- Kowalski, A., Pałyga, J., Górnicka-Michalska, E. (2004) Identification of histone H1.z components in a Muscovy duck (*Cairina moschata* L.) population. *Comp. Biochem. Physiol. B* 137, 151-157.
- Lanza, R.P., Dresser, B.L., Damiani, F. (2001) Klonowanie arki Noego. *Świat Nauki* (1), 62-67.
- Lennox, R.W. i Cohen, L.H. (1983) The histone H1 complements of dividing and nondividing cells of the mouse. *J. Biol. Chem.* 258(1), 262-268.
- Lennox, R.W. (1994) Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. Implication for the roles of H1 subtypes in chromatin. *J. Biol. Chem.* 259(1), 669-672.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L., Stadtman, E.R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* 107, 323-332.
- Lin, Q., Inselman, A., Han, X., Xu, H., Zhang, W., Handel, M.A., Skoultchi, A.I. (2004) Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J. Chem. Biol.* (*in press*) M400925200.
- Lin, Q., Sirotkin, A., Skoultchi, A.I. (2000) Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Mol. Cell. Biol.* 20(6), 2122-2128.



- Lindner, H., Sarg, B., Hoertnagl, B., Helliger, W. (1998) The microheterogeneity of the mammalian H1<sup>o</sup> histone. *J. Biol. Chem.* 273(21), 13324-13330.
- Lu, X. & Hansen, J.C. (2004) The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin *in vivo* *J. Biol. Chem.* (*in press*)
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution. *Nature* 389, 231-233.
- Modliński, J.A. i Karasiewicz, J. (2001) Klonowanie somatyczne ssaków. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, V, suppl. 1, 9-25.
- Pałyga, J. (1990) Variability of histone H1 in rabbit populations. *Int. J. Biochem.* 22, 1351-1361.
- Pałyga, J., Górnicka-Michalska, E., Kowalski, A. (1993) Genetic polymorphism of histone H1.z in duck erythrocytes. *Biochem. J.* 294, 859-863.
- Pałyga, J., Górnicka-Michalska, E., Kowalski, A., Książkiewicz, J. (2000) Natural allelic variation of duck erythrocyte histone H1b. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 665-675.
- Parseghian, M.H., Newcomb, R.L., Winokur, S.T., Hamkalo, B.A. (2000) The distribution of somatic H1 subtypes is non-random on active vs. inactive chromatin: distribution in human fetal fibroblasts. *Chromosome Res.* 8, 405-424.
- Patterson, D., Wolffe, A.P. (1996) Developmental roles for chromatin and chromosomal structure. *Dev. Biol.* Vol. 173, 2-13.
- Patterson, H.G., Landel, C.C., Landsman, D., Peterson, C.L., Simson, R.T. (1998) The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273(13), 7268-7276.

- Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F., Felsenfeld, G. (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* 12, 2852-2862.
- Ponte, I., Vidal-Taboada, J.M., Suau, P. (1998) Evolution of the vertebrate H1 histone class: evidence for the functional differentiation of the subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 15(6), 702-708.
- Ponte, I., Vila, R., Suau, P. (2003) Sequence complexity of histone H1 subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 20 (3), 371-380.
- Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arens, G., Moudrianakis, E.N., Wolffe, A.P. (1996) An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science* 274, 614-617
- Ramachandran, A., Omar, M., Cheslock, P., Schnitler, G.R. (2003) Linker histone H1 modulates nucleosome remodeling by human SWI/SNF. *J. Biol. Chem.* 278(49), 48590-48601.
- Ramakrishnan, V., (1997) Histone structure and the organization of the nucleosome. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 83-112.
- Ramon, A., Muro-Pastor, M.I., Scazzocchio, C., Gonzales, R., (2000) Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 35, 223-233.
- Sedivy, J.M. & Dutriaux, A. (1999) Gene targeting and somatic cell genetics a rebirth or a coming of age? *Trends Genet.* 15(3), 88-90.
- Sedivy, J.M., Joyner, A.L. (1992) *Gene targeting*. W.H. Freeman Press, New York.
- Seguchi, K., Takami, Y., Nakayama, T. (1995) Targeted disruption of 01H1 encoding a particular H1 histone variant causes changes in protein patterns in the DT40 chicken B cell line. *J. Mol. Biol.* 254, 869-880.

- Sera, T., Wolffe, A.P. (1998) Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* 18(7), 3668-3680.
- Shannon, M.F., Wells, J.R.E. (1987) Characterization of the six chicken histone H1 proteins and alignment with their respective genes. *J. Biol. Chem.* 262(20), 9664-9668.
- Shen, X., Yu, L., Weir, J.W., Gorovsky, M.A. (1995) Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*. *Cell* 82, 47-56.
- Singal, R., van Wert, J., Bashambu, M., Wolfe, S.A., Wilkerson, D.C., Grimes, S.R. (2000) Testis specific histone H1t is hypermethylated in nongerminal cells in mouse. *Biol. Reprod.* 63, 1237-1244.
- Sirotkin, A.M., Edelman, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, Skoultschi, A.I. (1995) Mice develop normally without the H1<sup>o</sup> linker histone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6434-6438.
- Sullivan, S., Sink, D.W., Trout, K.L., Makalowska, I., Baxevanis, A.D., Landsman, D. (2002) The Histone Database. *Nucleic Acids Res.* 30(1), 341-342
- Takami, Y., Nakayama, T. (1997a) One allele of the major histone gene cluster is enough for cell proliferation of the DT40 chicken B cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1354, 105-115.
- Takami, Y., Nakayama, T. (1997b) A single copy of linker H1 genes is enough for proliferation of the DT40 chicken B cell line, and linker H1 variants participate in regulation of gene expression. *Genes Cells* 2, 711-723.
- Takami, Y., Nishi, R., Nakayama, T. (2000) Histone H1 variants play individual roles on transcription regulation in the DT40 chicken B cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 501-508
- Takami, Y., Takeda, S., Nakayama, T. (1997) An approximately half set of histone genes is enough for cell proliferation and a lack of several

- histone variants causes protein pattern changes in the DT40 chicken B cell line. *J. Mol. Biol.* 265, 394-408.
- Tanaka, M., Hennebold, J.D., Macfarlane, J., Adashi, E.Y. (2001) A mammalian oocyte-specific linker histone H1oo: Homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128, 655-664.
- te Riele, H., Maandag, E.R., Berns, A. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5128-5132.
- Travers, A. (1999) The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem. Sci.* 24, 4-7.
- van Holde, K., Zlatanova, J. (1996) What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10548-10555.
- Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z., Wilson, J.H. (2001) Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(15), 8403-8410.
- Vila, R., Ponte, I., Collado, M., Arrondo, J.L.R., Suau, P. (2001b) Induction of Secondary Structure in a COOH-terminal Peptide of Histone H1 by Interaction with the DNA. *J. Biol. Chem.* 276(33), 30898-30903.
- Vila, R., Ponte, I., Collado, M., Arrondo, J.L.R., Jiménez, M.A., Rico, M., Suau, P. (2001a) DNA-induced  $\alpha$ -Helical Structure in the NH<sub>2</sub>-terminal Domain of Histone H1. *J. Biol. Chem.* 276(49), 46429-46435
- Vila, R., Ponte, I., Jiménez, M.A., Rico, M., Suau, P. (2000) A helix-turn motif in the C-terminal domain of histone H1. *Protein Sci.* 9, 627-636
- Vila, R., Ponte, I., Jiménez, M.A., Rico, M., Suau, P. (2002) An inducible helix-Gly-Gly-helix motif in the N-terminal domain of histone H1e A CD and NMR study. *Protein Sci.* 11, 214-220

- Wang, Z.-F., Sirotkin, A.M., Buchold, G.M., Skoultchi, A.I., Marzluff, W.F., (1997) The mouse histone H1 genes: gene organization and differential regulation. *J. Mol. Biol.* 271, 124-138.
- Wierzbicki, A.T. (2002) Zagadka histonu H1. *Post. Biochem.* 43 (3), 167-174.
- Wilkerson, D.C., Wolfe, S.A., Grimes, S.R. (2002) H1t/GC-box and H1t/TE1 element are essential for promoter activity of the testis-specific histone H1t gene. *Biol. Reprod.* 67, 1157-1164.
- Wolfe, S.A., Mottram, P.J., vanWert, J.M., Grimes, S.R., (1999) Localization of upstream elements involved in transcriptional regulation of the rat testis-specific histone H1t gene in somatic cells. *Biol. Reprod.* 61, 1005–1011.
- Wolffe, A.P. (1997) Histone H1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29(12), 1463-1466.
- Wu, J., Grunstein, M. (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem. Sci.* 25, 619-624.
- Yaneva, J., Zlatanova, J., Paneva, E., Srebrevva, L., Tsanev, R. (1990) Interaction of histones H1 and H1<sup>o</sup> with superhelical and linear DNA. *FEBS J.* 263(2), 225-228.
- Zheng, B., Sage, M., Sheppard, E.A., Jurecic, V., Bradley, A. (2000) Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol. Cell. Biol.* 20(2), 648-655.
- Zlatanova, J., van Holde, K. (1992) Histone H1 and transcription: still an enigma? *J. Cell Science* 103, 889-895.