

Andrzej Wierzbicki

**Zastąpienie głównych wariantów histonu H1
w tytoniu przez histon H1-2 z *Arabidopsis*.
Analiza efektów fenotypowych**



Praca magisterska wykona
na Wydziale Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego
pod kierunkiem
prof. dr hab. Andrzeja Jerzmanowskiego

Warszawa, 2000

Serdecznie dziękuję dr Tomaszowi Calikowskiemu,
który był moim opiekunem naukowym, promotorowi
prof. dr hab. Andrzejowi Jerzmanowskiemu i wszystkim
którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

Spis treści

STRESZCZENIE.....	3
WSTĘP.....	5
MATERIAŁ I METODY	10
Tworzenie konstruktów.....	10
Transformacja roślin.....	10
Weryfikacja transgeniczności.....	11
Izolacja i analiza elektroforetyczna histonów łącznikowych.....	12
Ocena stopnia uszkodzeń pyłku.....	13
Susza.....	13
Metody komputerowe obróbki danych.....	13
WYNIKI.....	14
Nowa anomalia rozwojowa u roślin ze zmienionymi proporcjami wariantów H1.....	14
Układ do podwójnej transformacji roślin.....	14
Rośliny, w których część natywnych histonów zastąpiono wariantem H1-2 z Arabidopsis	17
Histon H1-2 z Arabidopsis nie likwiduje efektu fenotypowego obniżenia poziomu H1A i B.....	21
Układ do podwójnej transformacji nie pozwala na zwiększenie nadekspresji białek.....	23
Susza nie wpływa na proporcje wariantów H1 w tytoniu.....	23
Proporcje wariantów H1 są identyczne w pączkach kwiatowych na różnych etapach rozwoju.....	24
DYSKUSJA.....	25
LITERATURA.....	29

STRESZCZENIE

Histony łącznikowe są powszechnie występującymi białkami wpływającymi na strukturę i funkcję chromatyny. Mają one ograniczony i specyficzny wpływ na ekspresję genów, a w tytoniu szczególnie związane są z rozwojem kwiatu. Przy pomocy opracowanego układu do podwójnej transformacji otrzymano rośliny, w których główne warianty H1 w sporej części zastąpiono przez podobny do nich H1-2 z *Arabidopsis*. Rośliny te miały podwyższony poziom mniejszych wariantów H1, co świadczy o obojętności heterologicznego H1-2 względem mechanizmu kompensacji stężeń H1, oraz wykazywały pełną gamę anomalii w kwiatach charakterystyczną dla roślin pozbawionych głównych wariantów H1, co skupia uwagę na mniejszych wariantach jako najprawdopodobniej bezpośrednio odpowiedzialnych za zaburzenia w kwiatach.

Opisano również nową anomalię rozwojową w kwiatach roślin pozbawionych głównych wariantów H1, polegającą na zmianie barwy i kształcie działek kielicha. Wykazano brak zmiany proporcji wariantów histonów łącznikowych w odpowiedzi na suszę oraz podczas rozwoju kwiatów.

WSTĘP

DNA w jądrach komórek eukariotycznych znajduje się w postaci chromatyny. Połączenie kwasów nukleinowych z białkami strukturalnymi pozwala na fizyczne upakowanie genomu i jednocześnie umożliwia zachodzenie i regulowanie procesów związanych z DNA. Podstawowym poziomem organizacji chromatyny jest struktura nukleosomowa. Podwójna helisa DNA nawinięta jest na białkowe rdzenie zbudowane z histonów H2A, H2B, H3 i H4. Na oktamer histonowy, w skład którego wchodzi po dwie cząsteczki każdego histonu rdzeniowego, nawinięte jest 145 par zasad, tworząc niespełna dwie pętle. Histony rdzeniowe uważane są za istotny element systemu regulacji transkrypcji (Strahl i Allis 2000). DNA łączący nukleosomy zwykle związany jest z histonem łącznikowym, czyli H1. Przy istotnym udziale histonów łącznikowych nukleosomy zwijają się we włókno o średnicy 30 nm, co umożliwia wyższy stopień upakowania DNA. (Zlatanova i van Holde 1996) Struktura cząsteczki rdzeniowej nukleosomu została ustalona za pomocą metod krystalograficznych (Luger *et al.* 1997), natomiast dokładne umiejscowienie cząsteczki histonu łącznikowego względem nukleosomu oraz charakter włókna 30nm pozostają nadal w sferze hipotez. (Bednar *et al.* 1998, Widom 1998) Jest to istotne, gdyż histony łącznikowe i struktura ponadnukleosomowa uważane są również za istotne czynniki regulacji ekspresji genów (Weintraub 1984, Zlatanova i van Holde 1996). Pytanie o funkcję histonów łącznikowych jest szczególnie ważne właśnie wobec kluczowego w biologii pytania o mechanizmy regulacji ekspresji genów w procesach rozwoju i odpowiedzi na czynniki środowiska.

Histony z grupy H1 są białkami silnie zasadowymi, bogatymi w lizynę. Składają się z centralnej domeny globularnej oraz domen C- i N- końcowej o słabo ustalonej strukturze. (Ramakrishnan 1993) Występują u wszystkich wielokomórkowych organizmów eukariotycznych. Praktycznie u wszystkich przebadanych organizmów grupa H1 reprezentowana jest przez szereg nieallelicznych wariantów. Różnią się one w pewnym stopniu sekwencją, a także rozmieszczeniem przestrzennym i okresem pojawiania się w tkankach. (Ascenzi i Gantt 1999, Gantt i Lenvik 1991, Przewłoka 2000, Widom 1998, Zlatanova i van Holde 1996)

Powszechność występowania histonów łącznikowych i ich obecność w jądrze komórkowym w dużej ilości sprawiły, że traktowano je jako białka o kluczowym znaczeniu dla funk-

cjonowania organizmu. Uważano również, że działają jako ogólne represory transkrypcji. Liczne badania *in vivo* z ostatniego dziesięciolecia wykazały błędność takiego założenia. Okazało się, że znaczenie histonów łącznikowych jest ograniczone i silnie specyficzne. Linia *Tetrahymena thermophila* pozbawiona genu białka podobnego do histonu H1 wykazywała normalny wzrost i niezmienny ogólny poziom transkrypcji. Zmieniona w niej była ekspresja tylko pewnej niewielkiej grupy genów i to zarówno na plus, jak i na minus. (Shen i Gorovsky 1996) Podobny skutek odniosło silne zaburzenie proporcji wariantów H1 w hodowanych *in vitro* komórkach kurzych DT40 (Takami *et al.* 2000) oraz mysich 3T3 (Brown *et al.* 1996). Badania na poziomie organizmów wielokomórkowych potwierdzają te wyniki. U myszy (Sirotkin *et al.* 1995) a także w *Arabidopsis thaliana* (Ascenzi i Gantt 1999a) pozbawionych jednego z wariantów H1 nie znaleziono żadnych nieprawidłowości. Rośliny tytoniu ze zwiększoną ilością histonów łącznikowych wykazywały tylko niewielkie zmiany, zwłaszcza dotyczące kwiatów. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1996) Podobnie było w przypadku tytoniu z silnie zmienionymi proporcjami wariantów histonu H1. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1999) Obecnie uważa się histony łącznikowe za białka o zdecydowanie specyficznym wpływie na regulację transkrypcji.

Istnieją liczne potwierdzone danymi eksperymentalnymi przypuszczenia co do mechanizmu działania histonów H1. Pierwsze oparte jest na spostrzeżeniu, że H1 jest zdolny do organizowania struktury ponadnukleosomowej. (Zlatanova i van Holde 1996) Stwierdzono lokalizację nieaktywnych transkrypcyjnie genów w odcinkach chromatyny o silnie zaznaczonej strukturze wyższego rzędu związanej z obecnością H1. (Weintraub 1984) Jednocześnie stwierdzono, że geny silnie ekspresjonowane leżą w odcinkach chromatyny o mniejszej zawartości H1, które są niezdolne do tworzenia struktur wyższego rzędu. (Kamakaka i Thomas 1990) Histony łącznikowe mogą również ograniczać dostęp różnych białek do DNA przez ograniczanie ruchliwości nukleosomów (Pennings *et al.* 1994, Ura *et al.* 1995) oraz przez zmniejszanie przejściowego odłączania DNA z powierzchni nukleosomu. (Juan *et al.* 1997) Do ciekawych wniosków prowadzą wyniki badań krystalograficznych. Wykazały one zaskakujące podobieństwo strukturalne domeny globularnej H1 do domen wiążących DNA wielu czynników transkrypcyjnych. (Clark *et al.* 1993, Ramakrishnan *et al.* 1993) Okazało się, że czynniki transkrypcyjne przyłączają się do nukleosomów w tym samym miejscu co histon H1 i że miejsca te są w chromatynie aktywnej transkrypcyjnie wolne, a w nieaktywnej zajęte

te. Stwierdzono także, że zmiana zaledwie kilku kluczowych aminokwasów nadaje czynnikom transkrypcyjnym zdolność do ochrony DNA łączącego nukleosomy przed trawieniem nukleazą, co jest znaną cechą histonów łącznikowych. (Cirillo *et al.* 1998) Bardzo atrakcyjna wydaje się zatem hipoteza, że histony H1 specyficznie regulują transkrypcję pewnych genów przez współzawodnictwo z czynnikami transkrypcyjnymi o miejsca wiązania do nukleosomu. Istotne dla działania histonów łącznikowych mogą być także interakcje z innymi białkami, zwłaszcza HMG. (Zlatanova i van Holde 1996)

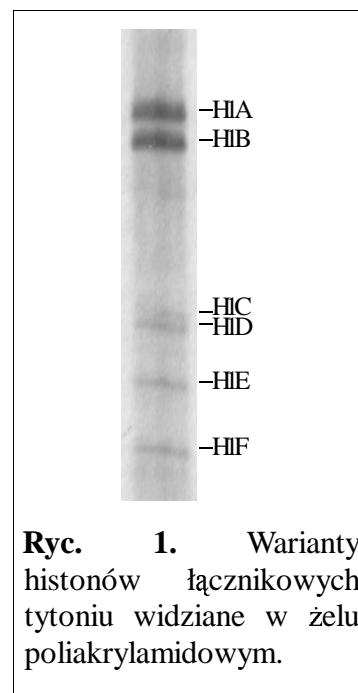
Poczyniono liczne obserwacje potwierdzające różnice funkcjonalne między wariantami histonów łącznikowych. Kwestia ta została dobrze zbadana w kurzych komórkach DT40, gdzie usunięcie każdego z sześciu wariantów H1 spowodowało zmiany ekspresji innej grupy genów. (Takami *et al.* 2000) Również w mysich komórkach 3T3 nadekspresja wariantu H1^o charakterystycznego dla terminalnie zróżnicowanych tkanek wywołała odmienny wpływ na przebieg cyklu komórkowego i transkrypcję genów niż nadekspresja wariantu H1c. (Brown *et al.* 1995) Stwierdzono też odmienności w powinowactwie mysich wariantów H1 do różnych sekwencji DNA (Wellman *et al.* 1999) oraz różnice w zdolności do hamowania ruchliwości nukleosomów. (Pennings *et al.* 1994) Interesujące zjawisko występuje we wczesnych etapach rozwoju *Xenopus laevis*. Wariant oocytarny histonu H1 zastępowany jest wtedy przez warianty somatyczne zarodka. Pociąga to za sobą zahamowanie syntezy oocytarnego 5S rRNA. (Bouvet *et al.* 1994, Kandolf 1994) Ma to też istotne znaczenie w rozwoju, gdyż powoduje utratę kompetencji mezodermalnej na odpowiednim stadium rozwojowym. (Steinbach *et al.* 1997) Specyficzny efekt wariantów H1 na ekspresję genów ma więc tu ważne znaczenie funkcjonalne.

W kilku różnych układach doświadczalnych zauważono, że zawartość wariantów H1 podlega wspólnemu mechanizmowi regulacyjnemu. Sztuczne zaburzenie poziomu jednego z wariantów wiąże się z kompensacją ze strony pozostałych. Gdy wyłączono jeden wariant, zawartość pozostałych wzrastała tak, że sumaryczny stosunek H1:DNA pozostał niezmienny. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1999, Sirotkin *et al.* 1995, Takami *et al.* 2000) Również w przypadku nadekspresji zawartość pozostałych wariantów obniżała się, choć w stopniu niewystarczającym aby uchronić przed wzrostem stosunku H1:DNA. (Brown *et al.* 1996, Gunjan i Brown 1999, Prymakowska-Bosak *et al.* 1996)

W roślinach diploidalnych typowo występują najprawdopodobniej 3 warianty H1. Scharakteryzowano je dobrze w *Arabidopsis thaliana*. (Gantt i Lenvik 1991, Ascenzi i Gantt 1997, Ascenzi i Gantt 1999a) Niewiele wiadomo na temat rzeczywistej funkcji poszczególnych wariantów. Wykazano specyficzność przestrzenną pewnych wariantów (Ascenzi i Gantt 1999b, Tanaka *et al.* 1999) oraz wykryto, że jeden z histonów H1 w *Arabidopsis thaliana* (Ascenzi i Gantt 1997) oraz w *Lycopersicon pennellii* (Wei i O'Connell 1996) jest indukowany przez stres suszy. Jednak dokładna analiza roślin z zaburzonym poziomem tego interesującego wariantu pokazała, że nie ma on żadnego wyraźnego wpływu na morfologię roślin ani na przebieg odpowiedzi na stres suszy. (Ascenzi i Gantt 1999a)

Prymakowska-Bosak i inni (1999) w pracy, która stała się punktem wyjścia dla opisywanych tu eksperymentów, wykazali wpływ wariantów histonów łącznikowych na rozwój organów rozmnażania generatywnego u roślin. Przeprowadzili oni doświadczenie, w którym przy pomocy strategii antysensu obniżyli poziom dwóch z sześciu wariantów H1 w tytoniu (tytoń jest organizmem allotetraploidalnym). Skutkiem tego było silne kompensacyjne zwiększenie stężeń pozostałych wariantów H1, tak że stosunek H1:DNA był tylko nieznacznie zmniejszony. Rośliny o tak zmienionych proporcjach wariantów histonów łącznikowych wykazywały zaburzenia w budowie kwiatu i rozwoju męskiej linii płciowej. W kwiatkach zaobserwowano skrócenie korony i pręcików, co powodowało charakterystyczne wystawanie słupka ponad inne części kwiatu. Powstawanie i rozwój gametofitu męskiego były zaburzone już w stadium pierwszego podziału mejotycznego, gdzie występowały liczne aberracje chromosomowe.

Natura wpływu zmiany w proporcjach wariantów H1 na zaburzenia w rozwoju kwiatu pozostała jednak niejasna. W szczególności otwarte zostało pytanie, czy odpowiedzialnością za te zmiany obarczać należy tylko obniżenie poziomu głównych wariantów H1, czy też bezpośredni wpływ na budowę kwiatu wywiera podwyższone przez mechanizm kompensacji stężenie pozostałych wariantów. Gdyby pierwsza z tych ewentualności była prawdziwa, dodatkowe sztuczne podwyższenie poziomu głównych wariantów powinno zlikwidować



zaburzenia w rozwoju kwiatów. Jeśli tak by się nie stało świadczyłoby to o tym, że jednak pozostałe warianty (H1C, D, E i F) ponoszą odpowiedzialność za obserwowane anomalie rozwojowe.

Gdyby udało się potwierdzić rolę podwyższenia poziomu wariantów H1C, D, E i F w generowaniu zaburzeń rozwojowych w kwiatach, nader ciekawe wydawało by się połączenie dwóch faktów. Po pierwsze, H1C z tytoniu jest analogiem wariantów indukowanych przez suszę (Przewłoka 2000). Po drugie, susza w czasie mejozy wywołuje zaburzenia w rozwoju męskiej linii płciowej (Saini 1997, Lalonde *et al.* 1997) w pewnym stopniu podobne do występujących w tytoniu o zmienionych proporcjach wariantów H1. Może więc za to istotne z gospodarczego punktu widzenia zjawisko odpowiadają warianty H1 indukowane przez stres suszy?

Jeśli warianty H1C, D, E i F rzeczywiście biorą udział w regulacji rozwoju kwiatu, należy oczekiwać również, że proporcje wariantów H1 zmieniają się w czasie tego procesu. Wykazanie różnicowej regulacji wariantów histonów łącznikowych w rozwoju kwiatu silnie potwierdziło by zatem tę teorię.

Celem tej pracy było

- ◆ stworzenie układu doświadczalnego pozwalającego na jednoczesne wprowadzenie dwóch różnych genów do roślin,
- ◆ zastąpienie głównych wariantów H1 w tytoniu przez histon H1-2 z *Arabidopsis thaliana* oraz opisanie skutków takiej operacji,
- ◆ opisanie nowej anomalii rozwojowej w roślinach ze zmienionymi proporcjami wariantów H1,
- ◆ sprawdzenie, czy w rozwoju kwiatu lub w odpowiedzi na suszę zmieniają się proporcje histonów łącznikowych.

MATERIAŁ I METODY

Tworzenie konstruktów

Trawienie enzymami restrykcyjnymi *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *XbaI* (Life Technologies i New England Biolabs) prowadzono według zaleceń producenta enzymu. DNA rozdzielano w 1% żelu agarozowym z 0,00005% bromkiem etydyny. Wielkość prążków oceniano względem markera wielkości 1kb+ Ladder (Life Technologies). DNA izolowano z żelu przy pomocy zestawów QIAEX II oraz QIAquick (Qiagen, USA). Ligację DNA prowadzono ligazą T4 (Life Technologies) przez 60 min. w 22°C. Reakcję prowadzono w 25µl przy proporcji stężeń molarnych wstawki do plazmidu 3:1, sumarycznym stężeniu DNA 6ng/µl i w obecności 0,5u ligazy T4. Całością mieszaniny ligacyjnej transformowano bakterie *Escherichia coli* szczepów XL1-blue lub DH5α (Sambrook *et al.* 1989) przygotowane według Palamarczyk *et al.* (1995). Elektrotransformację prowadzono przy napięciu 2,5 kV. Bakterie hodowano na pożywce LB (Sambrook *et al.* 1989) z 0,005% kanamycyną lub 0,006% ampicyliną. Plazmidowe DNA z bakterii izolowano metodą lizy alkalicznej na małą skalę (Sambrook *et al.* 1989) lub na większą skalę przy pomocy zestawu Plasmid Midi Kit (Qiagen).

Transformacja roślin

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Hoekema *et al.* 1983) transformowano przez elektroporację i hodowano na pożywce YEB z 0,0025% rifampicyną i 0,005% kanamycyną. Transformację potwierdzano trawieniami enzymami restrykcyjnymi. Bakterie z hodowli nocnej odpłukane od pożywki w 0,2M CaCl₂ lub 10mM MgSO₄ użyto do transformacji odpowiednio krążków liściowych lub siewek. Używano tytoniu *Nicotiana tabacum* cv. SRI. Liście roślin hodowanych w ziemi sterylizowano 2 min. w 70% etanolu, 15 min. w rozcieńczonym 13:1 ACE i płukano czterokrotnie wodą. Następnie cięto i zalewano zawiesiną *A. tumefaciens*. Po 15 min. osuszano na sterylnej bibule i przenoszono na stałą pożywkę MS. Po 5 dniach krążki liściowe przenoszono na stałą pożywkę MS z dodatkiem 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 100 mg/l kanamycyny, 500 mg/l claforanu i 50 mg/l higromycyny. Kallusy przenoszono na świeże podłoże co 10 dni. Powstające pędy odcinano i umieszczano w stałej pożywce MS z kanamycyną i higromycyną. Ukorzenione roślinki wsadzano do ziemi

ogrodniczej i hodowano w szklarni. Siewki kiełkujące przez tydzień na podłożu MS w warunkach sterylnych zalewano zawiesiną bakterii i poddawano próżni przez 5 min. Dalej postępowano identycznie jak z krążkami liściowymi. Aby uzyskać rośliny z dwoma wprowadzonymi różnymi T-DNA, transformacji przez krążki liściowe poddano rośliny z pokolenia F₁ roślin transgenicznych. Siewki transformowano mieszaniną bakterii niosących dwa różne plazmidy. Przy transformacji tylko jednym plazmidem stosowano jeden antybiotyk selekcyjny.

Weryfikacja transgeniczności

Transgeniczność uzyskanych roślin sprawdzano za pomocą PCR oraz hybrydyzacji metodą Southerna.

DNA genomowe z roślin na małą skalę ekstrahowano ze 100 mg zhomogenizowanej tkanki buforem zawierającym 200mM Tris HCl pH 7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS i wytrącano izopropanolem. PCR prowadzono z 2,5U polimerazy termostabilnej *Taq* (Qiagen) przy temperaturze annealingu wynoszącej 56,5°C. Użyto mieszaniny czterech starterów specyficznych dla genów oporności na kanamycynę: NP1: 5'-GAGAGGCTATTCGGCTATATGACTG; NP2: 5'-CTGATGCTCTTCGTCCAGATCATC - oczekiwana wielkość produktu 440pz; oraz higromycynę: HPT102: 5'-CAGCTTCGATGTAGGAGGGC; HPT605: 5'-AGGACATTGTTGGAGCCGAA - oczekiwana wielkość produktu 504pz. Sekwencje starterów ustalono i sprawdzono za pomocą serwisu internetowego <http://www.williamstone.com/primers/> oraz programu Oligo. Startery NP1 i NP2 według Calikowski (2000). Matrycą do reakcji było 50 ng DNA genomowego izolowanego na małą skalę z liści tytoniu.

DNA genomowe do hybrydyzacji według Southerna izolowano według następującej procedury. Jeden gram zhomogenizowanej w ciekłym azocie tkanki inkubowano przez 30 min. w 60°C w 5 ml buforu zawierającego 100mM Tris HCl pH 8,0; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-merkaptioetanol i następnie ekstrahowano 15 min. chloroformem z alkoholem izoamylovym (24:1). Z fazy wodnej po odwirowaniu wytrącano DNA izopropanolem i płukano w 76% etanolu z 10 mM octanem amonu. 25 μg DNA trawiono wobec 100u wysokojednostkowego enzymu *EcoRI* (New England Biolabs) przez 16 godzin, rozdzielano na żelu agarozowym i poddano depurynacji (250mM HCl; 10 min.), denaturacji (1,5M NaCl; 0,5M NaOH; 45 min.) i neutralizacji (1M Tris HCl pH 7,4; 1,5M NaCl;

2x30 min.) Następnie przeniesiono metodą transferu kapilarnego w 20xSSC (3M NaCl; 0,3M cytrynian sodu; pH 7,0) z żelu na membranę nylonową (Micron Separations Inc.) i zapiekano 5 min. w promieniach UV. Sondę znakowano ^{32}P -dATP metodą random priming przy pomocy zestawu Fermentas DNA Labelling Kit i oczyszczano za pomocą zestawu QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen). Hybrydyzację prowadzono przez noc w temperaturze 68°C w roztworze APH (750mM NaCl; 75mM cytrynian sodu; 1% SDS; 0,1% ficoll 400; 0,1% poliwinylpirolidyna; 0,1% BSA frakcja V; pH 7,0). Płukano kolejno: 30 min. w 3xSSC; 20 min. w 2xSSC; 20 min. w 1xSSC. Wynik hybrydyzacji wizualizowano autoradiograficznie.

Izolacja i analiza elektroforetyczna histonów łącznikowych

Izolację prowadzono w 5% kwasie nadchlorowym zmodyfikowaną metodą według Mazzolini *et al.* (1989) Jeden gram liści tytoniu lub trzy kwiaty ucierano w ciekłym azocie i zalewano 1,5 ml 7,5% kwasu nadchlorowego. Z supernatantu po dwukrotnym odwirowaniu wytrącano białka 18% kwasem trichlorooctowym i dializowano na filtrze nitrocelulozowym 0,025 μm (Millipore, USA) przez 30 min. wobec 0,1mM PMSF. Metoda ta pozwala uzyskać wiele preparatów o bardzo podobnym stężeniu białek w relatywnie krótkim czasie.

Otrzymane preparaty analizowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z mocznikiem i kwasem octowym (AU-PAGE) według Panyim i Chalkley (1969). Żel zatężający miał stężenie 7,5% z 2,5M mocznikiem i 375mM octanem potasu; pH 4,0. Żel rozdzielający 15% z 5,4% kwasem octowym i 2,5M mocznikiem. Jako katalizatorów polimeryzacji używano odpowiednio: 1,5% TEMED i 0,2% nadsiarczan amonu oraz 0,5% TEMED i 0,125% nadsiarczan amonu. Próbki nakładano na żel w buforze zawierającym 0,375M octan potasu; 15% sacharozę; 0,05% pironinę Y; pH 4,0. Elektroforezę prowadzono w 0,9M kwasie octowym przy natężeniu prądu 2,5mA/cm.

Żele barwiono w roztworze zawierającym 0,15% Coomassie Brilliant Blue G-250; 0,15% Coomassie Brilliant Blue R-250; 40% metanol i 10% kwas octowy przez 16 godzin. Odbarwiano w 10% metanolu.

Ocena stopnia uszkodzeń pyłku

Z kwiatów tytoniu pobierano nieotwarte pylniki, ważono, przecinano na pół i rozgniatało na szkiełku w kropli wody. Liczono prawidłowe i uszkodzone ziarna pyłku w polu wi-

dzenia oraz sporządzono dokumentację mikrofotograficzną. Z otrzymanych wartości wyliczono średnią arytmetyczną i przedział ufności testu T-Studenta dla $P > 0,95$.

Susza

Rośliny tytoniu w grupach po 3 były poddawane suszy w kolejnych etapach rozwoju od wielkości około 10 cm, kiedy powstają pierwsze zawiązki pączków kwiatowych, do początku kwitnienia. Suszenie polegało na wstrzymaniu podlewania na okres dziesięciu dni. Następnie podlewanie przywracano. Jedną grupę roślin podlewano minimalną ilością wody umożliwiającą przeżycie aż do końca kwitnienia. Obserwowano powstające kwiaty i izolowano histony łącznikowe.

Metody komputerowe obróbki danych

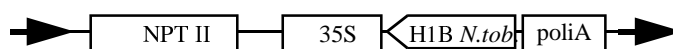
Analizę densytometryczną prowadzono za pomocą programu TNImage (<http://las1.ninds.nih.gov/>) Żel skanowano i następnie obliczano gęstość optyczną prążków odpowiadających wariantom H1. Od uzyskanych wartości odejmowano gęstość optyczną tła zmierzoną pomiędzy prążkami. Wyliczono procentowy udział wariantów w puli histonów łącznikowych. Przyjęto, że z powodu obniżonej podatności histonu H1-2 z *Arabidopsis thaliana* na barwienie przez Coomassie Brilliant Blue (Moechs *et al.* 1988, Prymakowska-Bosak *et al.* 1996) ilość tego białka wyznaczona metodą pomiaru gęstości optycznej jest dwukrotnie zaniżona. Dlatego do obliczeń brano podwojoną wartość gęstości optycznej prążka H1-2 z *Arabidopsis*. Założenie oparto na zdjęciach publikowanych w drugiej z zacytowanych prac.

Podobieństwa sekwencji i dendrogram obliczono za pomocą programu Pileup (Wisconsin Package)

WYNIKI

Nowa anomalia rozwojowa u roślin ze zmienionymi proporcjami wariantów H1

Przeprowadzono transformację roślin tytoniu plazmidem zawierającym cDNA histonu H1B z tytoniu w orientacji antysensownej. (Ryc. 2) Otrzymane rośliny zgodnie z oczekiwaniami (Prymakowska-Bosak *et al.* 1999) miały zmienione proporcje wariantów H1 - mniej wariantów A, B i więcej C, D, E, F. Wystąpiły również zaburzenia w budowie kwiatów identyczne, jak opisano w cytowanej



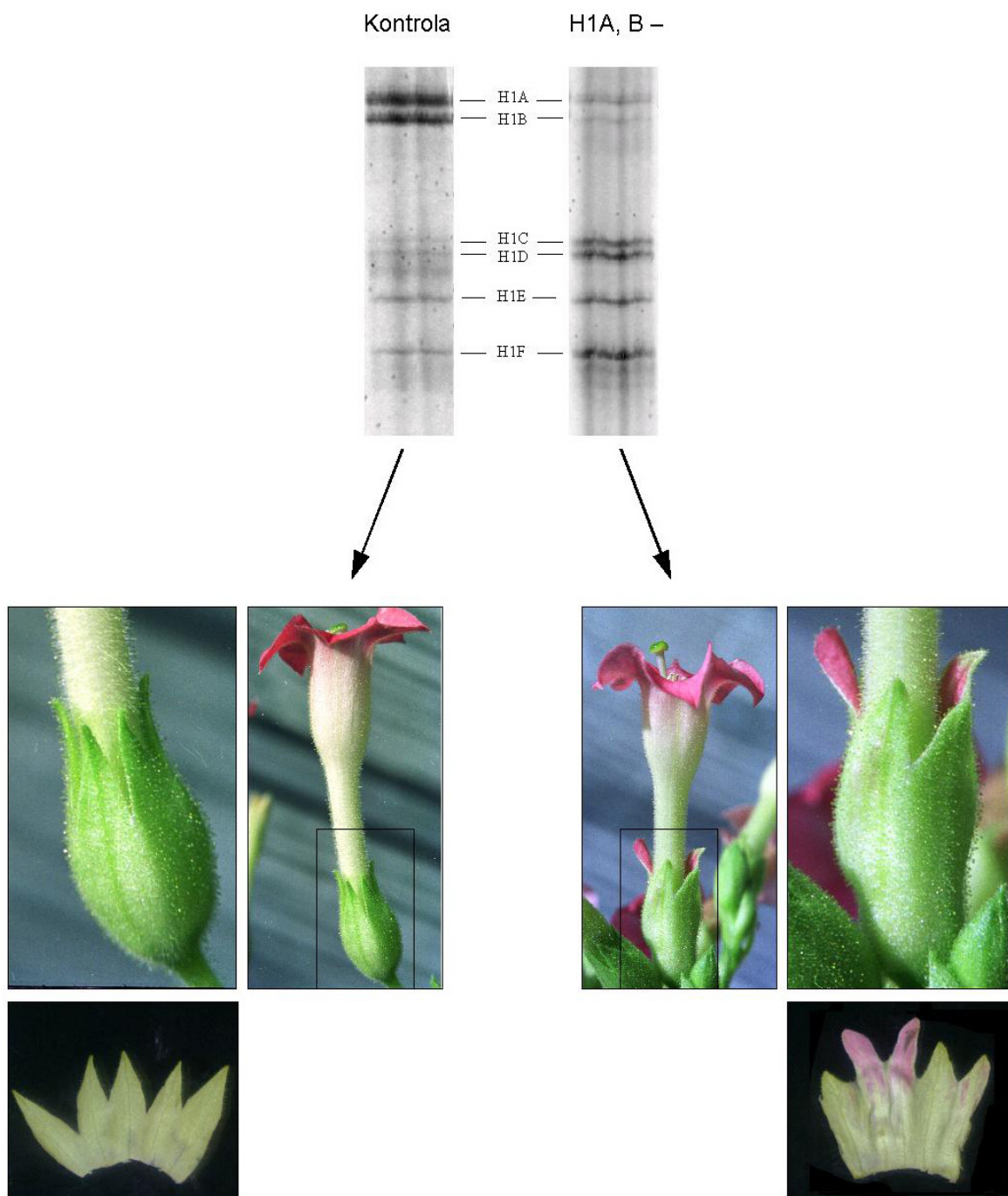
Ryc. 2. Konstruktu w plazmidzie pRokF19 zawierający cDNA histonu H1B z tytoniu w orientacji antysensownej. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1999)

NPT II - gen fosfotransferazy neomycyny; 35S - enhancer i promotor 35S wirusa mozaiki kalafiora; H1B *N.tob.* - cDNA H1B z tytoniu w orientacji antysensownej; poliA - sygnał poliadenylacji wirusa mozaiki kalafiora.

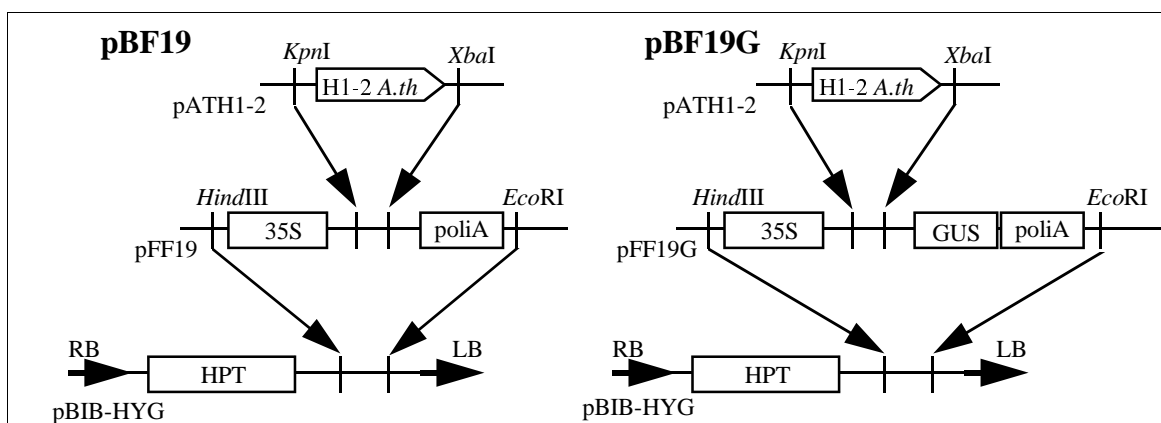
wyżej pracy: skrócenie płatków korony i pręcików oraz niedorozwój pyłku. Udokumentowano nową, nie opisaną wcześniej anomalię rozwojową u roślin ze zmienionymi proporcjami wariantów H1. Polega ona na zmianie kształtu i barwy działek kielicha. Działki były wydłużone i miały wyraźne różowe przebarwienia czyniące je w pewnym stopniu podobnymi do płatków korony. (Ryc. 3)

Układ do podwójnej transformacji roślin

Opracowano układ pozwalający na niezależne wprowadzenie dwóch T-DNA do roślin. Bazuje on na plazmidach z genami oporności na różne antybiotyki. Plazmid pRokF19 (Prymakowska-Bosak *et al.* 1996) niesie oporność na kanamycynę i zawiera promotor oraz terminator 35S wirusa mozaiki kalafiora. Plazmid pBF19 został otrzymany przez wstawienie kasety z promotorem i terminatorem 35S wirusa mozaiki kalafiora oraz polilinkerem z plazmidu pFF19 (Timmermans *et al.* 1990) do plazmidu pBIB-HYG (Becker 1990) niosącego oporność na higromycynę B. (Ryc. 5.) Otrzymano też odmianę tego plazmidu zawierającą gen β -glukuronidazy (GUS). Schemat plazmidu pBF19 przedstawiono na ryc. 6, a przebieg konstrukcji na ryc. 5.

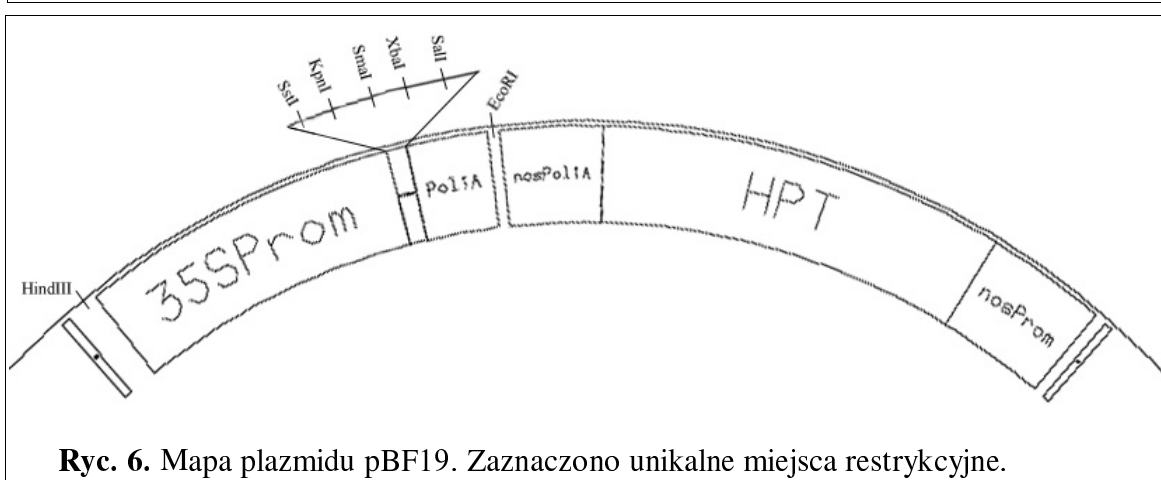


Ryc. 3. Nowa anomalia rozwojowa w kwiatach o zmienionych proporcjach wariantów H1 (po prawej) w porównaniu z kwiatami normalnymi (po lewej). Widać wyraźną zmianę kształtu i przebarwienia działek kielicha. Widać również opisane wcześniej skrócenie korony i pęcików.



Ryc. 5. Schemat konstrukcji plazmidów pBF19 i pBF19G z wstawionym genem histonu H1-2 z *Arabidopsis*.

KpnI, *XbaI*, *HindIII*, *EcoRI* – miejsca cięcia enzymów restrykcyjnych; H1-2 *A.th.* – cDNA histonu H1-2 z *Arabidopsis thaliana*; 35S – enhancer i promotor 35S wirusa mozaiki kalafiora; poliA – sygnał poliadenylacji wirusa mozaiki kalafiora; HPT – gen gosfototransferazy higromycyny; RB i LB – prawa i lewa granica T-DNA; pATH1-2 – plazmid niosący gen H1-2 z *Arabidopsis* (Gantt i Lenvik 1991); pFF19 i pFF19G – plazmidy pFF19 i pFF19G (Timmermans *et al.* 1990); pBIB-HYG – plazmid binarny pBIB-HYG (Becker 1990).

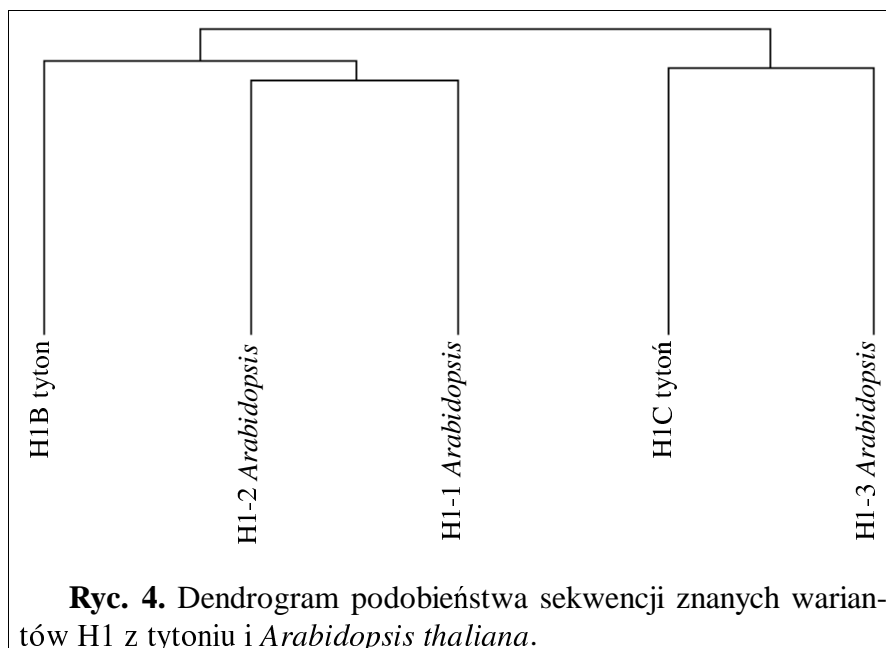


Ryc. 6. Mapa plazmidu pBF19. Zaznaczono unikalne miejsca restrykcyjne.

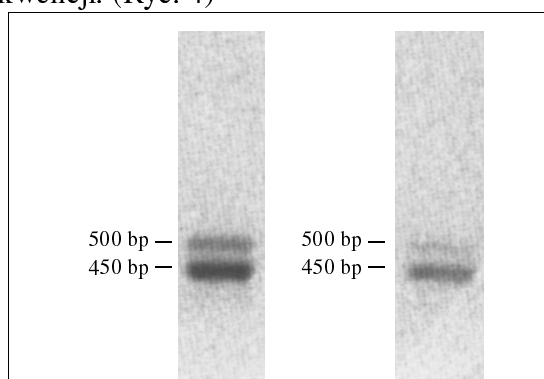
Rośliny, w których część natywnych histonów zastąpiono wariantem H1-2 z *Arabidopsis*

Aby uzyskać rośliny mające obniżony poziom H1A i B oraz jednocześnie nadeksprymujące H1-2 z *Arabidopsis thaliana*, przygotowano plazmid pBF19 z wstawionym cDNA histonu H1-2 *Arabidopsis*. (Ryc. 5) Jednocześnie z nim do transformacji użyto plazmid pRokF19 z genem histonu H1B z tytoniu w orientacji antysensownej. (Ryc. 2) Ze względu na duże podobieństwo sekwencji antysensowny H1B wycisza też H1A. Uzyskano sześć zregenerowanych roślin. Otrzymano również po trzy rośliny z trzech grup kontrol-

nych: niosące plazmid pBF19 ze wstawką i pRokF19 pusty, pBF19 pusty i pRokF19 ze wstawką oraz niosące dwa puste plazmidy. Podobieństwo H1-2 z *Arabidopsis* do głównych wariantów H1 z tytoniu potwierdzono dokonując porównania sekwencji. (Ryc. 4)

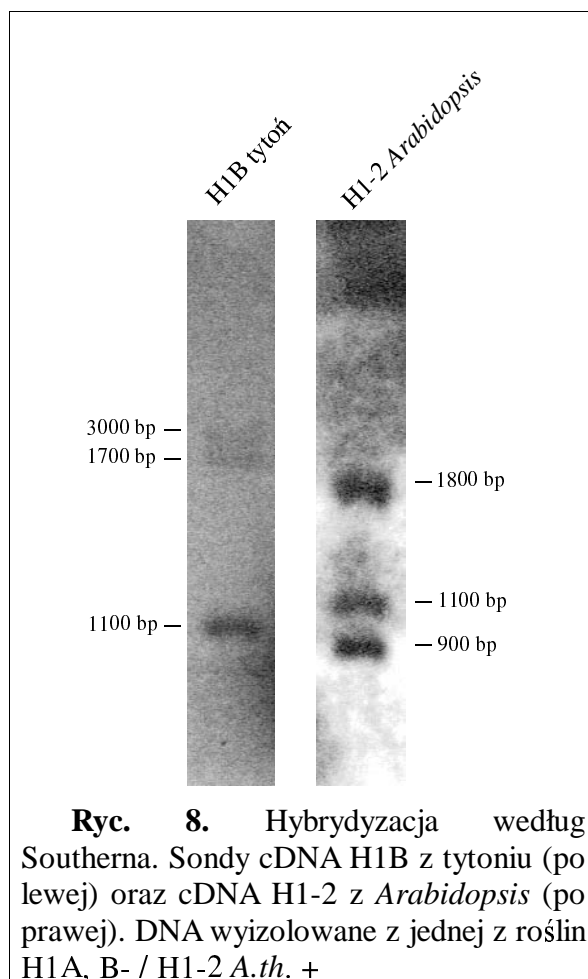


Ryc. 4. Dendrogram podobieństwa sekwencji znanych wariantów H1 z tytoniu i *Arabidopsis thaliana*.



Ryc. 7. Weryfikacja transgeniczności roślin z wprowadzonymi dwoma plazmidami. Jedna z roślin H1A, B- / H1-2 *A.th.* + (po lewej), jedna z roślin z genem H1-2 z *Arabidopsis* wprowadzonym na dwóch plazmidach. (po prawej)

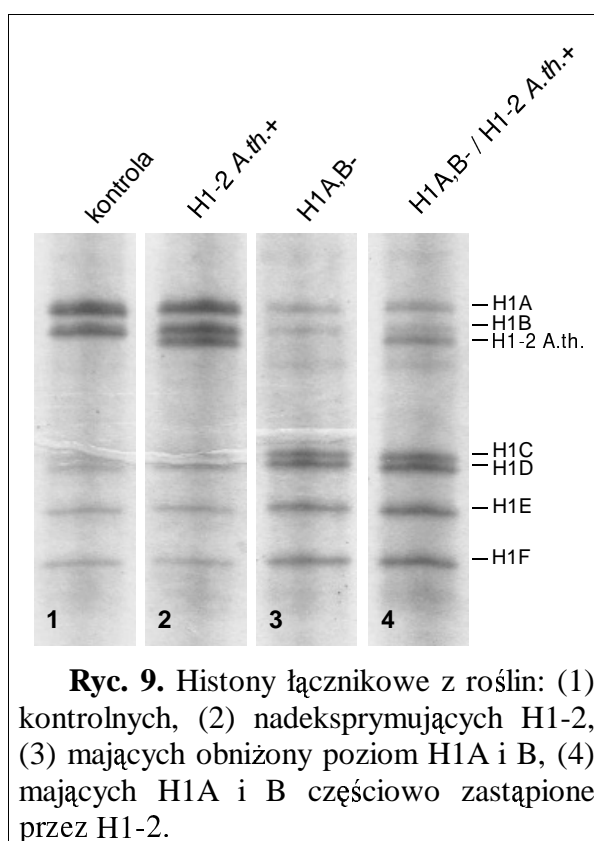
Transgeniczność uzyskanych roślin potwierdzono przeprowadzając reakcję PCR na wyizolowanym z nich DNA genomowym. We wszystkich reakcjach powstały dwa produkty: o wielkości około 450pz, i około 500pz. (Ryc. 7) Świadczy to o obecności w



Ryc. 8. Hybrydyzacja według Southerna. Sondy cDNA H1B z tytoniu (po lewej) oraz cDNA H1-2 z *Arabidopsis* (po prawej). DNA wyizolowane z jednej z roślin H1A, B- / H1-2 *A.th.* +

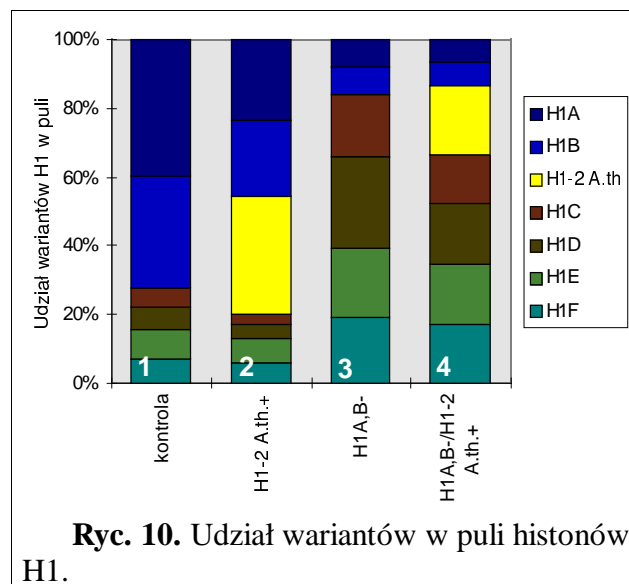
analizowanych roślinach T-DNA pochodzącego z obu wprowadzanych plazmidów. Dalszej weryfikacji transgeniczności dokonano metodą hybrydyzacji Southerna. Jako sondy użyto cDNA histonu H1B z tytoniu oraz cDNA histonu H1-2 z *Arabidopsis*. Gdy użyto sondy H1B z tytoniu, to w DNA ze wszystkich wybranych do analizy roślin pojawił się prążek o wielkości 3000 par zasad odpowiadający natywnemu genowi. W roślinach z wprowadzonym H1B w orientacji antysensownej uwidoczniły się transgeny w postaci dodatkowych prążków (Ryc. 8). W DNA z roślin z wprowadzonym H1-2 z *Arabidopsis* również wykazano jeden do trzech prążków odpowiadających kopiom transgenu.

Ze sprawdzonych roślin wyizolowano histony łącznikowe w 5% kwasie nadchlorowym i analizowano w żelu poliakrylamidowym z mocznikiem i kwasem octowym. Obraz elektroforetyczny (Ryc. 9) okazał się być zgodny z oczekiwaniami. W roślinach kontrolnych (Ryc. 9-1) układ histonów był identyczny jak w dzikich. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1999) W roślinach niosących tylko gen H1-2 z *Arabidopsis* potwierdzono nadekspresję tego białka (Ryc. 9-2), a w niosących gen H1B z tytoniu w orientacji antysensownej obniżenie poziomu głównych wariantów histonów łącznikowych (Ryc. 9-3). We właściwych roślinach doświadczalnych zawierających wprowadzone oba te geny wykazano jednoczesne obniżenie poziomu wariantów H1A i B oraz nadekspresję H1-2 z *Arabidopsis* (Ryc. 9-4). Zaobserwowano kompensacyjny wzrost stężenia wariantów H1C, D, E i F w roślinach o obniżonym poziomie głównych wariantów. (Ryc. 9-3) Zwiększenie zawartości H1C, D, E i F wystąpiło również w roślinach z jednoczesnym obniżeniem poziomu głównych wariantów H1 i nadekspresją H1-2 z *Arabidopsis*. (Ryc. 9-4) Świadczy to, że nadekspresyjny H1-2 z *Arabidopsis* jest obojętny względem zjawiska kompensacji niedoboru H1A i B przez pozostałe warianty.



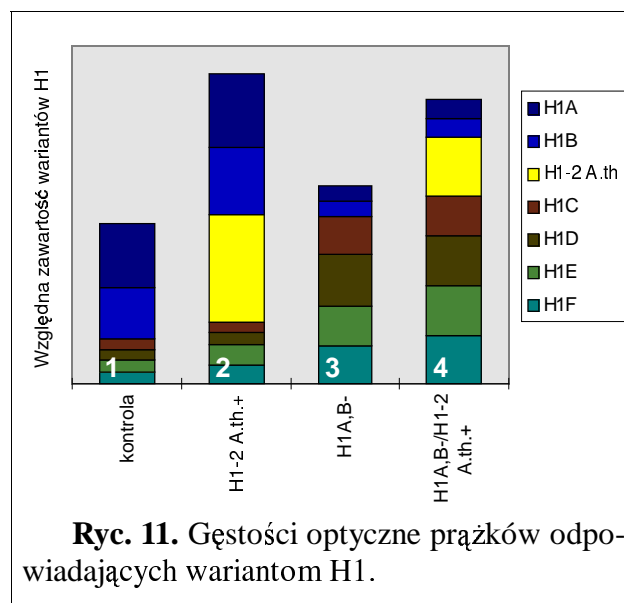
Ryc. 9. Histony łącznikowe z roślin: (1) kontrolnych, (2) nadekspresyjnych H1-2, (3) mających obniżony poziom H1A i B, (4) mających H1A i B częściowo zastąpione przez H1-2.

Analiza densytometryczna wykazała, że nadekspresja H1-2 z *Arabidopsis* skompensowała w połowie niedobór H1A i B wywołany przez antysensowny gen H1B w stosunku do puli histonów. (Ryc. 10) Bezwzględna zawartość histonów H1 trudno ustalić wprost, ponieważ nie przeprowadzono analizy pozwalającej na odniesienie zawartości H1 do innego białka o stałym stężeniu w tkankach. Szacując tę wartość trzeba więc oprzeć się na powtarzalności metody ekstarkcji w 5% kwasie nadchlorowym. Jeśli przyjmiemy, że suma wystandaryzowanych gęstości optycznych świadczy o bezwzględnym



Ryc. 10. Udział wariantów w puli histonów H1.

stężeniu histonów łącznikowych w tkance, to zarówno w roślinach tylko nadeksprymujących H1-2 z *Arabidopsis*, jak i jednocześnie nadeksprymujących H1-2 oraz mających obniżony poziom H1A i B sumaryczna zawartość H1 jest wyraźnie podwyższona. (Ryc. 11) W takim ujęciu kompensacja niedoboru H1A i B przez wprowadzony H1-2 z *Arabidopsis* jest blisko stuprocentowa. Łączna ilość głównych wariantów H1 (H1A, H1B, H1-2 A.th.) w kontroli (Ryc. 11-1) i w wariancie doświadczalnym (Ryc. 11-4) jest prawie jednakowa. Rośliny doświadczalne mają dodatkowo silnie podwyższoną zawartość mniejszych wariantów (H1C, D, E i F), stąd podwyższenie sumarycznej zawartości H1.



Ryc. 11. Gęstości optyczne prążków odpowiadających wariantom H1.

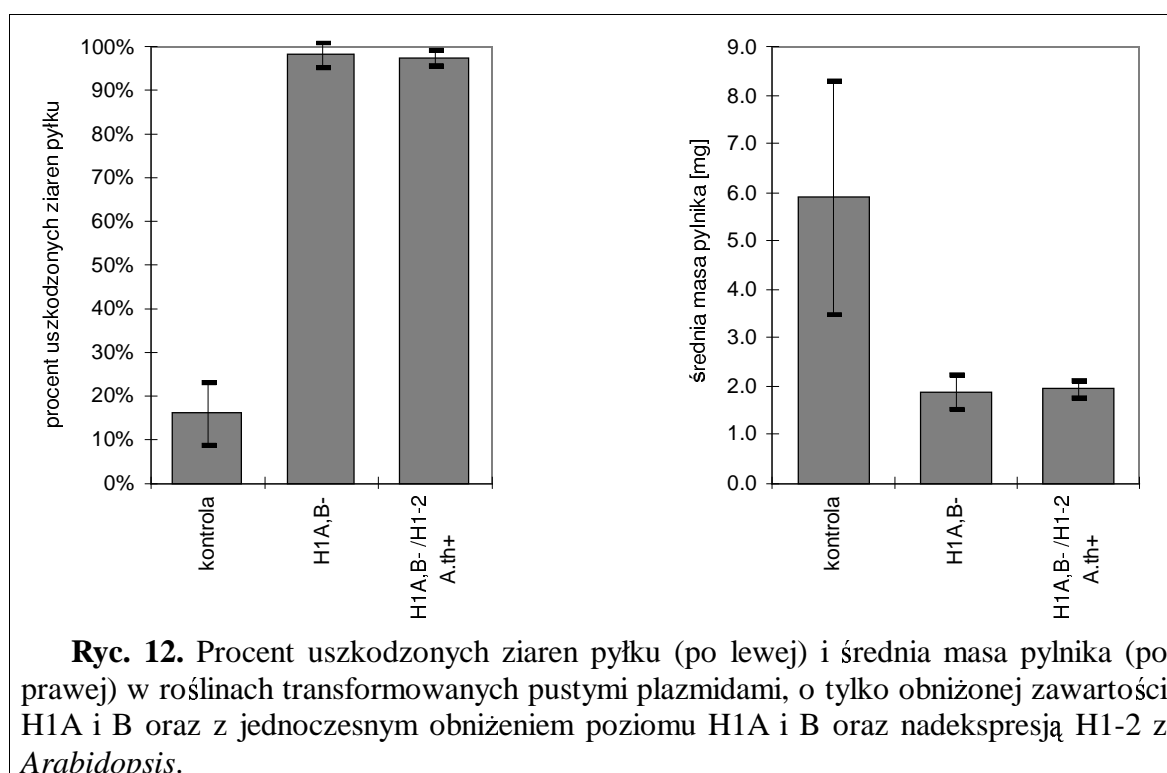
Analiza histonów w żelach poliakrylamidowych pozwala więc stwierdzić, że w otrzymanych roślinach jednocześnie nadeksprymujących H1-2 z *Arabidopsis* oraz mających obniżony poziom H1A i B stężenie głównych wariantów skompensowane jest na pewno w 50%, a

prawdopodobnie w 100%, natomiast wariantów H1C, D, E i F jest znacząco więcej niż normalnie. Jednocześnie stosunek H1:DNA jest prawdopodobnie podwyższony.

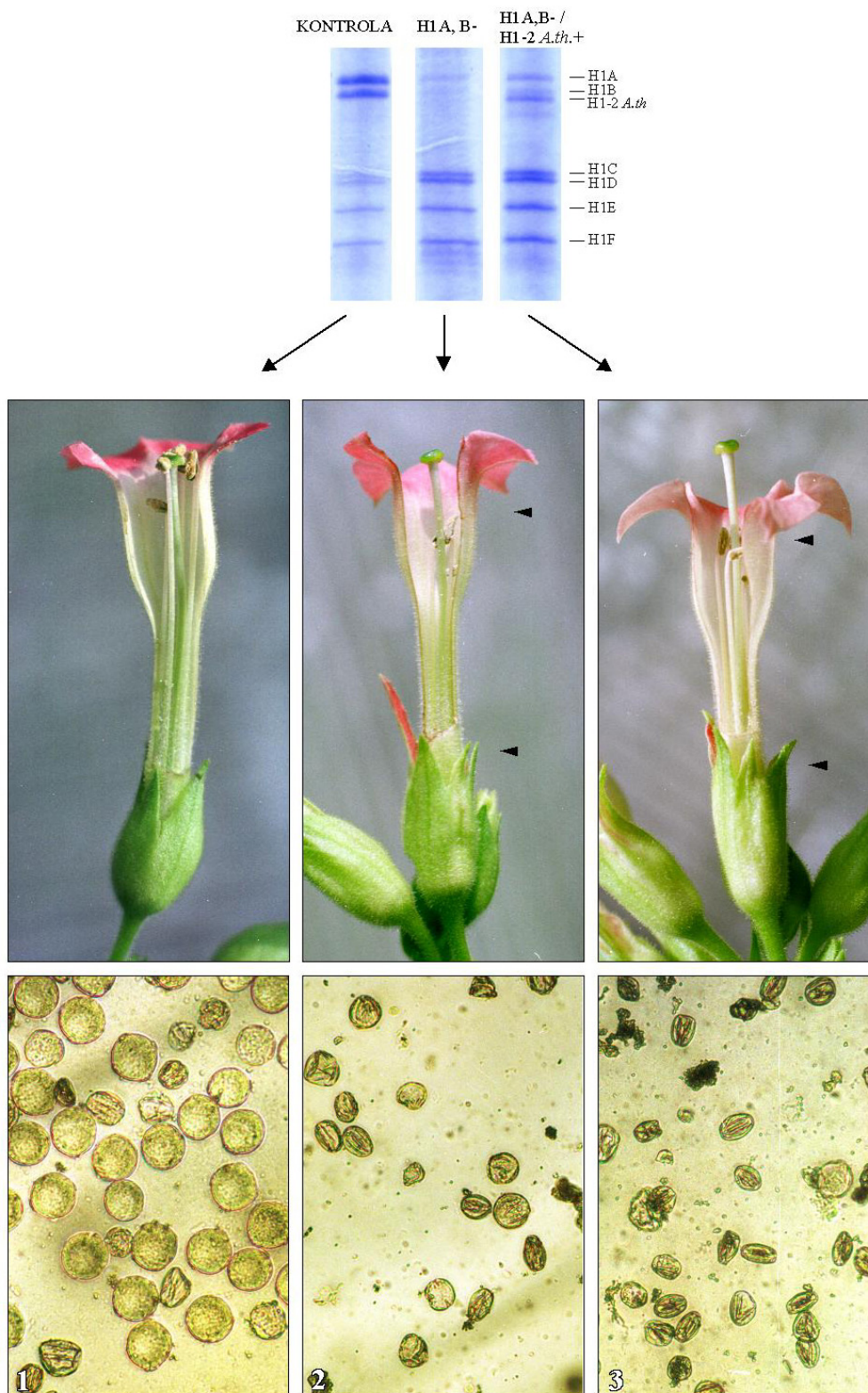
Histon H1-2 z *Arabidopsis* nie likwiduje efektu fenotypowego obniżenia poziomu H1A i B

Przeprowadzono obserwacje fenotypu. Rośliny kontrolne i tylko nadeksprymujące H1-2 z *Arabidopsis* miały kwiaty normalne. W roślinach mających tylko obniżony poziom H1A i B budowa kwiatów była zmieniona identycznie, jak to opisano wyżej: skrócenie płatków korony i pręcików, przebarwienia i zmiana kształtu działek kielicha. Jednoczesna nadekspresja H1-2 z *Arabidopsis* i obniżenie zawartości H1A i B skutkowały identycznymi zmianami w budowie kwiatów. (Ryc. 13) Tak więc histon H1-2 z *Arabidopsis* nie skompensował efektu fenotypowego obniżenia poziomu głównych wariantów H1 w tytoniu.

Podobnie okazało się być z rozwojem pyłku. Rośliny jednocześnie nadeksprymujące H1-2 z *Arabidopsis* oraz mające obniżony poziom H1A i B miały pylniki silnie zmniejszone i



prawie 100% uszkodzeń pyłku, identycznie jak w roślinach tylko o obniżonej zawartości H1A i B. (Ryc. 12, 13) Zatem również wpływ niedoboru H1A i B na zaburzenia w rozwoju pyłku nie został skompensowany przez dodanie H1-2 z *Arabidopsis*.

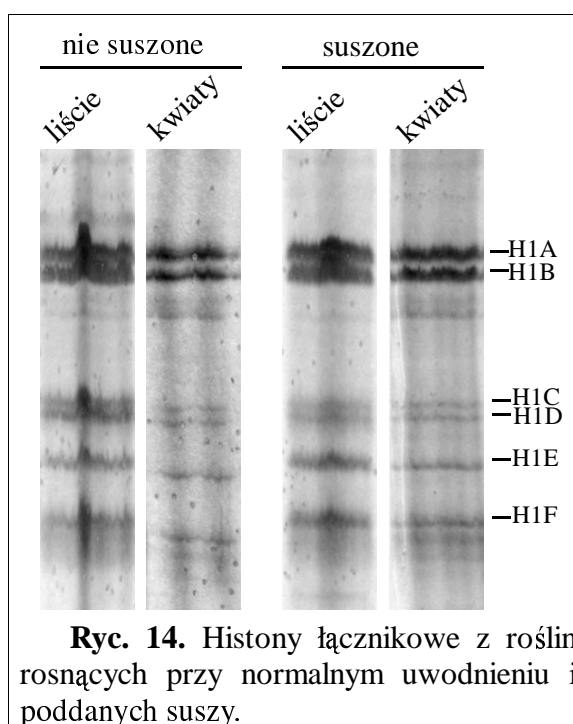


Ryc. 13. Obraz elektroforetyczny histonów H1 (na górze), budowa kwiatu (w środku) i obraz mikroskopowy pyłku (na dole) roślin: kontrolnych (1), o obniżonym poziomie głównych wariantów H1 (2) oraz o głównych wariantach H1 częściowo zastąpionych przez nadeksprimowany H1-2 z *Arabidopsis* (3).

Ponieważ mimo dużego podobieństwa sekwencji H1-2 z *Arabidopsis* nie kompensuje efektu obniżenia poziomu H1A i B, może więc za obserwowane efekty fenotypowe odpowiada nie tyle obniżenie poziomu głównych, co wzrost zawartości mniejszych wariantów H1?

Układ do podwójnej transformacji nie pozwala na zwiększenie nadekspresji białek

Aby sprawdzić, czy opracowany układ do podwójnej transformacji nadaje się do zwiększenia poziomu nadekspresji, przeprowadzono próbę użycia go do wprowadzenia histonu H1-2 z *Arabidopsis* jednocześnie na dwóch plazmidach. Stransformowano krążki liściowe rośliny mającej wprowadzony plazmid pRokF19 z cDNA histonu H1-2 plazmidem pBF19 misącym ten sam gen. Uzyskany poziom nadekspresji był jednak identyczny jak w przypadku pojedynczej transformacji (dane nie przedstawione). Układ bazujący na plazmidzie pRokF19 i pBF19 nie nadaje się zatem do wymuszenia wyższego poziomu nadekspresji genów w roślinach.



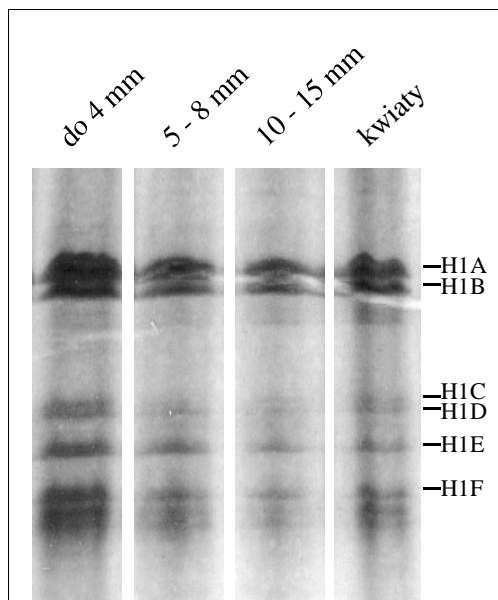
Ryc. 14. Histony łącznikowe z roślin rosnących przy normalnym uwodnieniu i poddanych suszy.

Susza nie wpływa na proporcje wariantów H1 w tytoniu

Aby sprawdzić, czy na proporcje wariantów histonów łącznikowych w tytoniu ma wpływ susza, przeprowadzono eksperyment, w którym rośliny tytoniu poddano suszeniu na różnych etapach rozwoju. W toku eksperymentu nie zaobserwowano żadnych widocznych gołym okiem anomalii rozwojowych. Nie stwierdzono również zaburzeń w proporcjach histonów H1. (Ryc. 14)

Proporcje wariantów H1 są identyczne w pączkach kwiatowych na różnych etapach rozwoju

Sprawdzono, czy proporcje wariantów H1 zmieniają się w czasie rozwoju kwiatu. Wyizolowano histony łącznikowe w 5% kwasie nadchlorowym z pączków na różnym etapie rozwoju. Stadium rozwojowe określono według klasyfikacji zaproponowanej przez Koltunow *et al.* (1990): pączki wielkości do 4 mm – stadium przedmeiotyczne, 5-8 mm – mejoza, 10-15 mm – stadium postmeiotyczne, dojrzałe kwiaty. Stwierdzono, że przez cały czas proporcje wariantów H1 w całych pączkach tytoniu pozostają zasadniczo niezmiennie. (Ryc. 15)



Ryc. 15. Histony łącznikowe izolowane z pączków o różnej wielkości, znajdujących się w różnych stadiach rozwojowych.

DYSKUSJA

We wszystkich eukariotycznych organizmach wielokomórkowych występują niealleliczne warianty histonów H1. Badania ich funkcji (patrz wstęp) pozwoliły odrzucić teorię o działaniu tych białek jako kluczowych ogólnych regulatorów transkrypcji, na korzyść tezy, że mają one ograniczony i ściśle specyficzny wpływ na pewne procesy biologiczne. W szczególności okazało się, że proporcje wariantów H1 są istotne dla prawidłowego rozwoju kwiatu w tytoniu. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1999) Opisana teraz nowa anomalia rozwojowa w kwiatach tytoniu o zaburzonych proporcjach histonów łącznikowych jest interesująca, gdyż wykracza daleko poza opisywaną uprzednio zmianę wymiarów części kwiatów. Zmiana koloru i kształtu działek kielicha (Ryc. 3) upodabnia je do płatków korony, a taką zmianę można nazwać mutacją homeotyczną. Świadczy to o zależności funkcjonalnej między histonami łącznikowymi a genami homeotycznymi sterującymi rozwojem kwiatu, zwłaszcza genami pełniącymi funkcję A i B. (Theissen 2000) Może wręcz niektóre czynniki transkrypcyjne regulujące budowę kwiatu są podobne do histonów H1, analogicznie jak opisał to Clark *et al.* (1993) dla czynników HNF-3 i działają na zasadzie kompetycji o miejsca wiązania na nukleosomie? Te kwestię rozstrzygnąć może ustalenie struktury, zwłaszcza białka AP2 (Okamuro *et al.* 1997, Theissen 2000), najbardziej interesującego w tym kontekście.

Opisany w niniejszej pracy układ do podwójnej transformacji oparty jest na dwóch antybiotykach selekcyjnych: kanamycynie i higromycynie B. Oba są osobno powszechnie stosowane (na przykład Tsugeki i Fedorff 1999, Amedeo *et al.* 2000). Udało się potwierdzić, że nadają się one do równoczesnego stosowania w celu wprowadzenia dwóch różnych T-DNA do roślin - uzyskano stabilną integrację obu transgenów. Ostatnio często opisywane jest zjawisko transkrypcyjnego wyciszenia genów (transcriptional gene silencing) powodowane podobieństwem sekwencji w obszarze promotora i związane z metylacją DNA. (Jones *et al.* 1999, Kooter *et al.* 1999) Ponieważ w układzie bazującym na plazmidach pRokF19 i pBF19 promotory są identyczne, istnieje poważne ryzyko wystąpienia tego zjawiska. Odnotowano jednak znaczący efekt genów z obu plazmidów na poziomie białka, co świadczy o tym, że wyciszenie zaszło tylko w bardzo niewielkim stopniu.

Do zastąpienia natywnych głównych wariantów H1 tytoniu przez gen H1-2 pochodzący z *Arabidopsis* użyto kombinacji dwóch podejść eksperymentalnych: nadekspresji genu pochodzącego z innego gatunku oraz strategii antysensu. Nadekspresja, mimo pewnych niedoskonałości, jest powszechnie stosowana w badaniu funkcji białek i to zarówno strukturalnych, takich jak histony (Ascenzi i Gantt 1999a, Prymakowska-Bosak *et al.* 1996), jak i regulacyjnych, na przykład sterujących rozwojem kwiatu. (Theissen *et al.* 2000) Głównym ograniczeniem jest tutaj praktyczna niemożność odtworzenia specyficznego czasowego i przestrzennego wzoru ekspresji białek. Strategia antysensu polega na wytwarzaniu RNA komplementarnego do mRNA genu będącego celem zabiegu, co powoduje degradację tego ostatniego. (Crooke 2000, Mol *et al.* 1990) W roślinach jest to najlepiej sprawdzona metoda selektywnego wyłączania ekspresji genów, nadal częściej stosowana od ponoć skuteczniejszych, opartych na niedawno odkrytych oddziaływaniach RNA. (Baulcombe 1999, Smith *et al.* 2000) Ponieważ mechanizm działania antysensu jest bardzo słabo poznany, zachowanie po raz pierwszy stosowanego układu doświadczalnego jest trudne do przewidzenia. Udało się tu potwierdzić, że możliwe jest jednoczesne obniżenie poziomu ekspresji genu za pomocą strategii antysensu i nadekspresja podobnego genu pochodzącego z innego gatunku.

Aby użyć histonu H1-2 z *Arabidopsis* do zastąpienia głównych wariantów H1 tytoniu, trzeba wcześniej stwierdzić, czy jest on podobny do wariantów H1A i B tytoniu. Dendrogram przedstawiony na ryc. 4 potwierdza to podobieństwo, przynajmniej względem pozostałych znanych wariantów H1. Nie dowodzi to wprost tożsamości funkcjonalnej głównych wariantów H1 tytoniu i H1-2 *Arabidopsis*, stanowi jednak przesłankę wystarczającą, aby uzyskane w tym układzie wyniki traktować poważnie. Dla wiarygodności wyników ważne jest również ustalenie rzeczywistego poziomu poszczególnych wariantów H1 w otrzymanych roślinach podwójnie transgenicznym. Proporcje wariantów ustalono precyzyjnie, jednak nie przeprowadzono szczegółowej analizy umożliwiającej określenie bezwzględnego poziomu białek histonowych. Zabrakło tu możliwości odniesienia sygnałów danych przez warianty H1 do jakiegoś białka o stałym stężeniu, na przykład histonu H4 (Prymakowska-Bosak *et al.* 1996) Trudność sprawia również histon H1-2 z *Arabidopsis*, który jest mniej podatny na barwienie Coomassie Brilliant Blue niż H1 z tytoniu. (Moechs *et al.* 1988, Prymakowska-Bosak *et al.* 1996) Z braku precyzyjnych danych przyjęto tutaj –

dla ostrożności - że ilość H1-2 jest zanizowana dwukrotnie. Zdjęcia prezentowane w pracy Prymakowskiej-Bosak *et al.* (1996) pokazują, że intensywność optyczna prążka odpowiadającego histonom H1-1 i H1-2 w roślinach *Arabidopsis* jest zdecydowanie słabsza od prążka głównych wariantów H1 w tytoniu przy podobnej intensywności prążków histonów rdzeniowych. Niewykluczone, że rzeczywista różnica w podatności na barwienie jest sporo większa.

Analiza wariantów H1 na żelu prowadzi do obserwacji, że przy jednoczesnym obniżeniu H1A i B oraz nadekspresji H1-2 z *Arabidopsis*, poziom wariantów H1C, D, E i F jest podwyższony. (Ryc. 9-4) Mimo dużego dodatku H1-2 mechanizm kompensacyjny utrzymuje podwyższony poziom małych wariantów H1, tak jak to się dzieje, gdy tylko obniży się poziom H1A i B. (Ryc. 9-3, Prymakowska-Bosak *et al.* 1999) Nadeksprimowany H1-2 z *Arabidopsis* jest zatem niejako przezroczysty dla mechanizmu kompensacyjnego wariantów H1. Przybliżyła nas to w do wyjaśnienia natury tego mechanizmu. Zaobserwowano, że przy nadekspresji H1-2 z *Arabidopsis* w dojrzałych roślinach tytoniu często występuje obniżenie poziomu natywnych H1. (Prymakowska-Bosak *et al.* 1996) Nie zaobserwowano tego natomiast w intensywnie dzielących się komórkach BY-2. (Calikowski 2000) Sugerowało to, że w nie dzielących się częściach rośliny stale eksprimowany pod konstytutywnym promotorem H1-2 wypierał z chromatyny natywne warianty, które następnie ulegały degradacji. W świetle opisywanego w tej pracy eksperymentu mało prawdopodobne wydaje się, aby kompensacja opierała się na degradacji białek. W przeciwnym wypadku w opisanym tu układzie kompensacji przez małe warianty H1 by nie było lub była by bardzo słabo zaznaczona. Również mało prawdopodobne jest, że obszary promotorowe genów histonów łącznikowych są silnie wrażliwe na stężenie H1 i działają na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego, zwiększając ekspresję przy każdym obniżeniu stężenia histonów H1. Prezentowany tu wynik sugeruje raczej, że mechanizm kompensacji niedoboru histonów łącznikowych jest bardziej skomplikowany i w tytoniu oparty na pewnych subtelnych właściwościach mRNA lub samego białka, których nadeksprimowany H1-2 z *Arabidopsis* nie posiada.

Dodanie histonu H1-2 z *Arabidopsis* nie zniósło efektu fenotypowego obniżenia poziomu H1A i B w tytoniu. Dotyczy to zarówno anomalii w budowie kwiatu, jak i uszkodzeń pyłku. Skoro poziom głównych wariantów H1 został dwukrotnie zwiększony, a według dalej idącej interpretacji przywrócony do fizjologicznego, to dane te wskazują na warianty

H1C, D, E, F jako bezpośrednią przyczynę zaburzeń rozwojowych. Wynik ten pozostaje w sprzeczności z danymi mówiącymi o braku efektu fenotypowego nadekspresji histonu H1-3 (podobnego do H1C tytoniu) w *Arabidopsis*. (Ascenzi i Gantt 1999a)

Wykazany tu brak różnicowej regulacji proporcji wariantów H1 w czasie rozwoju kwiatu świadczy o tym, że efekt patologiczny zaburzenia wariantów H1 wynikał raczej z przypadku niż ingerencji w specyficzny wyraźny mechanizm objawiający się fluktuacjami proporcji H1. Oczywiście nie wiadomo, jak proporcje wariantów H1 kształtują się w różnych częściach rozwijającego się kwiatu. Niewykrycie wpływu suszy na proporcje wariantów H1 i budowę kwiatu świadczy o tym, że w tytoniu nie ma obserwowanej w *Arabidopsis* (Ascenzi i Gantt 1997) i *Lycopersicon pennellii* (Wei i O'Connell 1996) indukcji jednego z wariantów H1 przez odwodnienie, co sugerowały porównania sekwencji. (Przewłoka 2000) W świetle tego wyniku podobieństwo uszkodzeń pyłku wywołanych suszą (Saini 1997, Lalonde *et al.* 1997) do uszkodzeń wywołanych zaburzeniami proporcji wariantów H1 może wydawać się przypadkowe. Ponieważ brak indukcji jednego z wariantów H1 przez suszę jest prawdopodobnie cechą gatunkową tytoniu, aby ostatecznie rozstrzygnąć zależność między suszą, histonami H1 a uszkodzeniem pyłku, należy przyjrzeć się raczej gatunkowi w którym zaobserwować można następujące zjawiska: (1) indukcję jednego z H1 przez suszę, (2) uszkodzenia pyłku spowodowane zaburzeniem proporcji wariantów H1 oraz (3) uszkodzenia pyłku wywołane suszą. Należy zaznaczyć, że *Arabidopsis* nie nadaje się do tego celu, gdyż ani zaburzenia proporcji H1, ani susza nie wywołały tam anomalii rozwojowych w kwiecie. (Ascenzi i Gantt 1999a)

LITERATURA

1. Amedeo P, Habu Y, Afsar K, Scheid OM, Paszkowski J (2000) Disruption of the plant gene MOM relases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* 405, 203-206
2. Ascenzi R, Gantt JS (1997) A drought-stress inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol. Biol.* 34, 629-641
3. Ascenzi R, Gantt JS (1999a) Molecular genetic analysis of the drought-inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 41, 159-169
4. Ascenzi R, Gantt JS (1999b) Subnuclear distribution of the entire complement of linker histone variants in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 108, 345-355
5. Baulcombe DC (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 109-113
6. Becker D (1990) Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucleic Acid Res.* 18, 203-204
7. Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, Woodcock CL (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
8. Bouvet P, Dimitrov S, Wolffe AP (1994) Specific regulation of *Xenopus* chromosomal 5S rRNA gene transcription in vivo by histone H1, *Genes Dev.* 8, 1147-1159
9. Brown DT, Alexander BT, Sittman DB (1996) Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 24, 486-493
10. Calikowski TT (2000) Zmiana poziomu wariantów histonu H1 w komórkach BY-2 tytoniu jako model do badania funkcji biologicznej histonów łącznikowych. Praca doktorska, IBB PAN
11. Cirillo LA, McPherson CE, Bossard P, Stevens K, Cherian S, Shim EY, Clark KL, Burley SK, Zaret KS (1998) Binding of the winged-helix reanscription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J.* 17, 244-254
12. Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364, 412-420
13. Crooke ST (2000) Progress in antisense technology: the end of the begining. *Methods Enzymol.* 313, 3-45

-
14. Gantt S, Lenvik TR (1991) *Arabidopsis thaliana* H1 histones; analysis of two members of a small gene family. *Eur. J. Biochem.* 202, 1029-1039
 15. Gunjan A, Brown DT (1999) Overproduction of histone H1 variants in vivo increases basal and induced activity of the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic Acid Res.* 27, 3355-3363
 16. Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180
 17. Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC (1999) RNA-DNA interactions and DNA Methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11, 2291-2301
 18. Juan LJ, Utey RT, Vignali M, Bohm L, Workman JL (1997) H1-mediated repression of transcription factor binding to a stably positioned nucleosome. *J. Biol. Chem.* 272, 3635-3640
 19. Kamakaka RT, Thomas JO (1990) Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes. *EMBO J.* 9, 3997-4006
 20. Kandolf H (1994) The H1A histone variant is an *in vivo* repressor of oocyte-type 5S gene transcription in *Xenopus laevis* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7257-7261
 21. Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RM (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2, 1201-1224
 22. Kooter JM, Matzke MA, Meyer P (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4, 340-347
 23. Lalonde S, Beebe DU, Saini HS (1997) Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sex. Plant Reprod.* 10, 40-48
 24. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389, 251-260
 25. Mazzolini L, Vaeck M, Montagu M (1989) Conserved epitopes on plant H1 histones recognized by monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* 178, 779-789
 26. Moechs CP, McElwain EF, Spiker S (1988) Chromosomal proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 11, 507-515
 27. Mol JN, van der Krol AR, van Tunen AJ, van Blokland R, de Lange P, Stuitje AR (1990) Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett.* 268, 427-430

-
28. Okamoto JK, Caster B, Villarreal R, Van Montagu M, Jofuku KD (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7076-7081
 29. Palamarczyk G, Rytka J, Skoneczny M (1995) Inżynieria genetyczna i biologia molekularna Metody. Podręcznik laboratoryjny IBB PAN. *IBB PAN*, Warszawa
 30. Panyim S, Chalkley R (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Bioch. Biophys.* 130, 337-346
 31. Pennings S, Meersseman G, Bradbury EM (1994) Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10275-10279
 32. Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Iwkiewicz J, Egiersdorff S, Kuraś M, Chaubet N, Gigot C, Spiker S, Jerzmanowski A (1996) Histone H1 overexpressed to high level in tobacco affects certain developmental programs but has limited effect on basal cellular functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10250-10255
 33. Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Ślusarczyk J, Kuraś M, Lichota J, Kiliańczyk B, Jerzmanowski A (1999) Linker histones play a role in male meiosis and the development of pollen grains in tobacco. *Plant Cell* 11, 1-14
 34. Przewłoka M (2000) Identyfikacja i klonowanie genu oraz analiza funkcjonalna histonu z grupy H1 w tytoniu. Praca doktorska, Uniwersytet Warszawski
 35. Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362, 219-223
 36. Saini HS (1997) Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex. Plant Reprod.* 10, 67-73
 37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
 38. Shen X, Gorovsky MA (1996) Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell* 86, 475-483
 39. Sirotkin AM, Edelman W, Cheng G, Klein-Szanto A, Kucherlapati R, Skoultschi AI (1995) Mice develop normally without the H1^o linker histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6434-6438
 40. Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320
 41. Steinbach OC, Wolffe AP, Rupp RA (1997) Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in *Xenopus*. *Nature* 389, 395-399

-
42. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45
43. Takami Y, Nishi R, Nakayama T (2000) Histone H1 variants play individual roles in transcription regulation in the DT40 chicken B cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 501-508
44. Tanaka I, Akahori Y, Gomi K, Suzuki T, Ueda K (1999) A novel histone variant localized in nucleoli of higher plant cells. *Chromosoma* 108, 190-199
45. Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Kunstler T, Winter KU, Saedler H (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42, 115-149
46. Timmermans MC, Maliga P, Vieira J, Messing J (1990) The pFF plasmids: cassettes utilizing CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J. Biotechnol.* 14, 333-344
47. Tsugeki R, Fedorff NV (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12941-12946
48. Ura K, Hayes JJ, Wolffe AP (1995) A positive role for nucleosome mobility in the transcriptional activity of chromatin templates: restriction by linker histones. *EMBO J.* 14, 3752-3765
49. Weintraub H (1984) Histone-H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. *Cell* 38, 17-27
50. Wei T, O'Connell A (1996) Structure and characterization of a putative drought-inducible H1 histone gene. *Plant Mol. Biol.* 30, 255-268
51. Wellman SE, Song Y, Mamoon NM (1999) Sequence preference of mouse H1^o and H1t. *Biochemistry* 38, 13112-13118
52. Widom J (1998) Chromatin structure: linking structure to function with histone H1. *Curr. Biol.* 8, 788-791
53. Zlatanowa J, van Holde K (1996) The linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 52, 217-259