

Weronika Sura

Wydział Biologii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**Udział wariantu histonowego H2A.Z
w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów
u *Arabidopsis thaliana***

Praca doktorska

wykonana

w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem dra hab. Piotra Ziółkowskiego

Poznań, 2018

Dziękuję promotorowi dr. hab. Piotrowi Ziółkowskiemu oraz prof. dr. hab. Janowi Sadowskiemu, który pełnił rolę mojego promotora przez ponad cztery lata moich studiów doktoranckich.

Dziękuję pani mgr Hannie Korcz-Szatkowskiej oraz dr. Tomaszowi Bieluszewskiemu, a także pozostałym członkom Zakładu Biotechnologii i Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii za okazywaną przez te lata pomoc i życzliwość. Podziękowania kieruję również do prof. UAM dra hab. Władysława Polcyna.

Dziękuję prof. Jacquesowi Côté, dr Catherine Lachance oraz całemu ich zespołowi z Centre de Recherche sur le Cancer w Québecu za możliwość odbycia stażu i przekazane umiejętności.

Szczególnie dziękuję moim Rodzicom i Siostrze, którzy zawsze we mnie wierzyli i mnie wspierali. Dziękuję wszystkim Bliskim i Przyjaciołom, którzy trzymali za mnie kciuki.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE	11
SUMMARY	12
1. WSTĘP.....	13
1.1. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji u eukariotów	13
1.2. Wpływ struktury chromatyny na transkrypcję	15
1.2.1. Znaczenie metylacji DNA dla funkcjonowania genów	15
1.2.2. Nukleosom jako podstawowa jednostka organizacji chromatyny	18
1.2.3. Wpływ nukleosomów na proces transkrypcji.....	19
1.2.4. Koncepcja kodu histonowego i jego roli w regulacji ekspresji genów	24
1.2.5. Rola wariantów histonowych w regulacji transkrypcji	28
1.3. H2A.Z jako uniwersalny wariant histonowy	31
1.3.1. Różnice strukturalne między wariantem H2A.Z a kanonicznym H2A	32
1.3.2. Wpływ H2A.Z na stabilność i pozycję nukleosomu oraz na tworzenie skondensowanych form chromatyny	34
1.3.3. Specyfika rozmieszczenia H2A.Z w genomach.....	36
1.3.4. Modulacja roli H2A.Z w aktywności genów przez jego modyfikacje potranslacyjne.....	37
1.4. Wymiana H2A.Z z histonem kanonicznym H2A w chromatynie	37
1.4.1. Wprowadzanie a usuwanie H2A.Z z chromatyny	37
1.4.2. Kompleksy wymieniające wariant H2A.Z	38
1.4.3. Budowa kompleksu SWR1	38
1.4.4. Inkorporacja dimeru H2A.Z-H2B do nukleosomu przez kompleks SWR1 w modelu drożdżowym	42
1.4.5. Kompleks INO80 w usuwaniu H2A.Z z chromatyny.....	44
1.4.6. Związek H2A.Z z acetylacją histonów.....	46
1.5. Rola H2A.Z w regulacji ekspresji genów u różnych organizmów	50
1.5.1. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
1.5.2. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u <i>Caenorhabditis elegans</i>	55
1.5.3. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u <i>Drosophila melanogaster</i>	57

1.5.4.	Wariant H2A.Z a ekspresja genów u kręgowców	59
1.5.5.	Wariant H2A.Z a ekspresja genów u roślin.....	64
1.6.	Inne funkcje H2A.Z.....	73
2.	ZAŁOŻENIA I CELE	76
3.	MATERIAŁY	77
3.1.	Material roślinny	77
3.2.	Odczynniki do hodowli roślin.....	77
3.2.1.	Odczynniki do sterylizacji nasion	77
3.2.2.	Pożywka stała do hodowli Arabidopsis na szalkach	77
3.2.3.	Odżywka do podlewania roślin	78
3.3.	Odczynniki do amplifikacji fragmentów DNA	79
3.3.1.	Reakcja PCR.....	79
3.3.2.	Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).....	79
3.4.	Startery do reakcji PCR	79
3.4.1.	Startery do genotypowania roślin	79
3.4.2.	Startery do mapowania pozycji nukleosomów i H2A.Z	80
3.5.	Elektroforeza w żelu agarozowym	85
3.6.	Izolacja chromatyny z liści Arabidopsis.....	85
3.7.	Trawienie chromatyny MNazą.....	85
3.8.	Crosslinking reversal i izolacja DNA z chromatyny	85
3.9.	Precypitacja chromatyny i izolacja DNA z Chelexem	86
4.	METODY.....	87
4.1.	Sterylizacja nasion <i>A. thaliana</i> przed wysianiem na torfy	87
4.2.	Hodowla roślin.....	87
4.3.	Genotypowanie roślin.....	87
4.3.1.	Szybka metoda izolacji DNA z liści.....	87
4.3.2.	Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR	88
4.4.	Testy kiełkowania <i>A. thaliana</i> na szalkach.....	88
4.5.	Eksperymenty stresu suszy	88
4.5.1.	Przeprowadzenie stresu suszy	88
4.5.2.	Zbieranie materiału roślinnego.....	89
4.5.3.	Pomiar względnej zawartości wody (ang. <i>relative water content</i> , RWC).....	89
4.6.	Techniki transkryptyczne	90

4.6.1.	Izolacja RNA	90
4.6.2.	DNazowanie RNA na potrzeby sekwencjonowania wysokoprzepustowego	91
4.6.3.	DNazowanie RNA i odwrotna transkrypcja na potrzeby RT-qPCR	91
4.7.	Izolacja chromatyny z liści <i>Arabidopsis</i> i uzyskanie mononukleosomowego DNA	92
4.7.1.	Sieciowanie DNA i białek (ang. <i>cross-linking</i>)	92
4.7.2.	Izolacja chromatyny	93
4.7.3.	Trawienie MNazą	93
4.7.4.	Odwrócenie sieciowania (ang. <i>cross-linking reversal</i>) i izolacja DNA z nukleosomów	94
4.8.	Izolacja mononukleosomowego DNA w celu mapowania pozycji nukleosomów (input)	95
4.9.	Precypitacja chromatyny z linii eksprymującej HTA11 z dołączoną biotyną (ChAP, ang. <i>chromatin affinity purification</i>)	95
4.10.	Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time qPCR</i>)	96
4.11.	Seqwencjonowanie wysokoprzepustowe i analiza jego wyników	97
4.11.1.	RNA-seq i analiza jego wyników	97
4.11.2.	MNase-seq i ChAP-seq oraz analiza ich wyników	97
5.	WYNIKI	99
5.1.	Porównanie wpływu wybranych stresów abiotycznych na rośliny z normalnym oraz obniżonym poziomem H2A.Z w chromatynie	99
5.2.	Deregulacja genów w linii mutantu <i>arp6</i> w warunkach kontrolnych i stresu suszy	102
5.3.	Linia <i>Arabidopsis</i> do badania rozmieszczenia H2A.Z w chromatynie w warunkach kontrolnych i stresu suszy	105
5.4.	Znacznie obniżony poziom H2A.Z w genach aktywnych transkrypcyjnie w linii mutantu <i>arp6</i>	106
5.5.	Szeroka odpowiedź transkryptomyczna <i>Arabidopsis</i> na stres suszy	109
5.6.	Zmiana dystrybucji H2A.Z w genach pod wpływem stresu suszy	110
5.7.	Dystrybucja H2A.Z w genach odpowiadających na stres	113
5.8.	Dystrybucja H2A.Z w genach, których ekspresja zależy od obecności H2A.Z w chromatynie (hiper- i hipoaktywnych w linii <i>arp6</i>)	118
5.9.	Analiza genów reagujących na stres suszy i zależnych od H2A.Z	120

5.10. Zmiana stanu transkrypcyjnego genów zależnych od ARP6/H2A.Z	121
6. DYSKUSJA	124
6.1. Linie mutantów Arabidopsis używane do badania roli H2A.Z.....	124
6.2. Odpowiedź na stres u roślin o obniżonym poziomie chromatynowego H2A.Z	127
6.3. Deregulacja genów w linii mutantu <i>arp6</i>	127
6.4. Linia 5D do śledzenia zmian w obecności H2A.Z w chromatynie	128
6.5. Zmiany poziomu ekspresji genów i poziomu H2A.Z w tych genach w odpowiedzi Arabidopsis na stres suszy.....	129
6.6. Nadreprezentacja HTA11 w ciałach genów odpowiadających na stres	130
6.7. Trudności w interpretacji zależności między ekspresją genów a poziomem H2A.Z.....	131
6.8. Dystrybucja H2A.Z w genach od niego zależnych – i co nam ona „mówi” o wpływie tego wariantu na poziom ich transkrypcji.....	133
7. WNIOSKI	136
8. BIBLIOGRAFIA.....	139

WYKAZ SKRÓTÓW

ACC	– 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
Act1	– actin 1
Act2	– actin 2
ANP32E	– acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E
Arp4	– actin-related protein 4
Arp5	– actin-related protein 5
Arp6	– actin-related protein 6
AtERF14	– Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding factor 14
ATM	– ataxia-telangiectasia mutated
Bdf1	– bromodomain-containing factor 1
BLRP	– biotin ligase recognition peptide
BRCA1	– breast cancer 1
ChiB	– basic chitinase
Chz1	– chaperone for H2AZ-H2B
CMT3	– chromomethylase 3
DNMT1	– DNA methyltransferase 1
DNMT3A	– DNA methyltransferase 3A
DNMT3B	– DNA methyltransferase 3B
DREAM	– DP, Retinoblastoma [Rb]-like, E2F, and MuvB
DRM2	– domains rearranged methyltransferase 2
DSB	– double-strand break
Eaf6	– Esa1-associated factor 6
EMT	– epithelial-mesenchymal transition
Epl1	– enhancer of polycomb-like protein 1
ERF1	– ethylene response factor 1
Esa1	– essential Sas2-related acetyltransferase 1
ESC	– embryonic stem cells
FACT	– facilitates chromatin transcription
FLC	– flowering locus C
FRET	– Förster resonance energy transfer
FRI	– FRIGIDA
FT	– flowering locus T

GAL1 – galactokinase
 GAL4 – galactose-responsive transcription factor GAL4
 GAL10 – bifunctional UDP-glucose 4-epimerase/aldose 1-epimerase
 Gcn5 – general control of amino acid synthesis protein 5
 GO – gene ontology
 GTF – general transcription factor
 H2A.Bbd – Barr body-deficient H2A
 HAT – histone acetyltransferase
 HCT 116 – human colon cancer cell line
 HeLa – Henrietta Lacks' cervical cancer cell line
 HP1 α – heterochromatin protein 1 α
 HR – homologous recombination
 HR – hypersensitivity response
 HSE – heat shock element
 HSF1A – heat shock factor 1a
 HSP70 – heat shock protein 70
 INO80 – inositol requiring 80
 INO80-C – inositol requiring 80 complex
 Inr – initiator element,
 Lap1 – lack of acidic patch
 MAF5 – MADS-affecting flowering 5
 MAF6 – MADS-affecting flowering 6
 mdc1 – mediator of DNA damage checkpoint protein 1
 MDCK – Madin-Darby Canine Kidney
 MET1 – methyltransferase 1
 Nap1 – nucleosome assembly protein 1
 NDR – nucleosome-depleted/deficient region
 NFR – nucleosome-free region
 NHEJ – nonhomologous end-joining
 NuA4 – nucleosomal acetyltransferase of histone H4
 Oct4 – octamer-binding transcription factor 4
 TIP60 – Tat interactive protein 60kDa
 p53BP1 – p53 binding protein 1
 PHO5 – acid phosphatase

PIC	– pre-initiation complex
PIE1	– photoperiod-independent early flowering 1
PR	– pathogen resistance
PRC1	– polycomb repressive complex 1
PRC2	– polycomb repressive complex 2
PSR	– Pi starvation response
Rbp3	– retinol-binding protein 3
RISC	– RNA-induced silencing complex
Rnf2	– Ring finger protein 2
Rpb1	– RNA polymerase II subunit B1
Rvb1	– RuvB-like protein 1
Rvb2	– RuvB-like protein 2
SAGA	– Spt-Ada-Gcn5-Acetyl transferase
SAHF	– senescence-associated heterochromatic foci
SAR	– salicylic acid response
SAS	– something about silencing
Sef	– serrated leaves and early flowering
shRNA	– short hairpin RNA
SOC1	– suppressor of overexpression of CONSTANS 1,
Spt16	– suppressor of Ty protein 16
Spt6	– suppressor of Ty protein 6
Srb4	– suppressor of RNA polymerase B
SRCAP	– Snf-2-related CREB-binding protein activator protein
Suf3	– suppressor of frigida 3
Suz2	– suppressor of Zeste 2
Swc2	– SWR complex protein 2
Swc3	– SWR complex protein 3
Swc4	– SWR complex protein 4
Swc5	– SWR complex protein 5
Swc6	– SWR complex protein 6
Swc7	– SWR complex protein 7
SWI/SNF	– Switch/sucrose non-fermentable
Swi1	– switching deficient
SWR1	– Swi2/Snf2-related 1

SWR-C – Swi2/Snf2-related 1 complex, sick with RSC/Rat1 complex
Taf1 – TATA-box binding protein associated factor 1
TBP – TATA-binding protein
Tet – ten-eleven translocation
TFIID – transcription factor IID
TGF- β – transforming growth factor β
TSS – transcription start site
U2 snRNP – U2 small nuclear ribonucleoprotein
U5 snRNP – U5 small nuclear ribonucleoprotein
WT – wild type
Yaf9 – yeast homolog of AF9
Yng2 – yeast ING1 homolog 2

STRESZCZENIE

Regulacja aktywności genów jest kluczowa dla życia i funkcjonowania organizmów. Jednym z poziomów, na którym może ona zachodzić u organizmów eukariotycznych jest struktura chromatyny. W jej obrębie zamiast kanonicznych histonów mogą występować tzw. warianty histonowe, pełniące określone funkcje. Wśród nich wyróżnia się wariant H2A.Z, który ze względu na bardzo wysoką zachowawczość ewolucyjną, jego niezbędność dla złożonych eukariotów oraz specyficzne rozmieszczenie w genomach na 5'końcu genów wydaje się istotnym elementem tej regulacji. W niniejszej pracy poddano badaniu rolę białka H2A.Z w regulacji aktywności transkrypcyjnej genów w odpowiedzi *Arabidopsis thaliana* na stres suszy. W tym celu przeprowadzono analizy transkryptomyczne linii mutantów o obniżonym poziomie chromatynowego H2A.Z oraz porównano zmiany ekspresji genów i zmiany dystrybucji tegoż wariantu w odpowiedzi na stres suszy z użyciem technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego (RNA-seq i ChAP-seq). Uzyskane wyniki pokazują, że H2A.Z u *A. thaliana* w wysokim stopniu wzbogaca ciała genów silnie odpowiadających na stres suszy, których poziom transkrypcji podlega dużym zmianom w zależności od warunków, sugerując jego istotny udział w regulacji tych zmian. Poza tym zaobserwowano, że akumulacja H2A.Z w ciałach genów jest związana z ich represją, możliwe więc, że wariant ten odgrywa rolę w zapobieganiu ekspresji genów w warunkach nieindukujących. Jednocześnie jednak, przynajmniej dla niektórych genów, obecność H2A.Z w miejscu startu transkrypcji (ang. *transcription start site*, *TSS*) wydaje się konieczna dla ich odpowiednio wysokiej ekspresji.

SUMMARY

Regulation of gene activity is a key factor in organisms' life and functioning. Chromatin structure is one of the levels of this regulation in eukaryotes. There, instead of canonical histones, histone variants may occur that play specific roles. One of such variants is H2A.Z, whose very high evolutionary conservation, essentiality for complex eukaryotes and specific distribution at 5' end of genes suggest that it is an important player in the control of gene expression. In this thesis, the role of H2A.Z protein in the regulation of gene transcription in *A. thaliana* response to drought stress is studied. For this purpose, the transcriptome of mutant line deficient in H2A.Z incorporation was analyzed, as well as changes in H2A.Z distribution and changes in gene expression in response to drought stress were compared using whole genome sequencing approaches (RNA-seq and ChAP-seq). The results show that H2A.Z in *A. thaliana* is highly enriched in bodies of genes strongly responding to the stress, whose transcriptional level changes significantly depending on the conditions; this suggests its vital role in the regulation of these changes. Moreover, the correlation between H2A.Z accumulation in gene bodies and their repression was observed; therefore this histone variant maybe important in prevention of unwanted gene expression in non-inductive conditions. Simultaneously, however, at least for some genes H2A.Z presence at transcription start site (TSS) appears to be necessary for their proper expression.

1. WSTĘP

1.1. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji u eukariotów

Każdy organizm posiada zestaw genów potrzebnych do jego funkcjonowania i namnażania się, jednak tylko skoordynowana regulacja ich aktywności ostatecznie umożliwia te funkcje. Odpowiednie włączanie i wyłączanie genów oraz modulowanie ilości ich produktów warunkuje rozwój organizmu, wyspecjalizowanie jego części do pełnienia określonych funkcji (tkanki, organy) i ich koordynację prowadzącą do homeostazy, a także reagowanie na zmiany w środowisku. Ekspresja genów w dużym stopniu kontrolowana jest na etapie transkrypcji, gdzie największą rolę odgrywa kompleks polimerazy razem z licznymi czynnikami transkrypcyjnymi. Do wielu mechanizmów regulujących aktywność genów na tym poziomie u eukariotów należą:

- 1) Struktura chromatyny – stopień zwarcia kompleksu DNA z białkami w obrębie genów i ich promotorów. Wpływ na nią mają modyfikacje chromatynowe: metylacja DNA, modyfikacje potranslacyjne histonów, obecność wariantów histonowych, działanie kompleksów remodelujących chromatynę (Lenhard i in., 2012)
- 2) Modyfikacje chromatynowe *per se* – oprócz wpływu na strukturę chromatyny mogą pośredniczyć w wiązaniu koniecznych czynników transkrypcyjnych (Weake i Workman, 2010)
- 3) Sekwencja promotora, na który składają się:
 - a) rdzeniowy promotor (ang. *core promoter*), otaczający miejsce startu transkrypcji (ang. *transcription start site, TSS*), do którego przyłączają się główne czynniki transkrypcyjne (ang. *general transcription factors, GTFs*) i polimeraza RNA, tworząc kompleks pre-inicjacyjny (ang. *pre-initiation complex, PIC*). Jego powstanie jest jednym z najbardziej limitujących etapów transkrypcji.
 - b) rozszerzony promotor (ang. *extended promoter* lub *promoter-proximal region*), do którego przyłączają się dodatkowe czynniki transkrypcyjne, dalej modulujące podstawowy poziom ekspresji.

Mimo mnogości potencjalnych kompozycji promotorów, u tkankowców (*Metazoa*) można generalnie wyróżnić trzy skrajne typy promotorów, których

budowa (zarówno sekwencja DNA, jak i obsadzenie nukleosomami i modyfikacjami chromatyny) przekłada się na sposób ich regulacji (Lenhard i in., 2012):

- a) promotory ubogie w sekwencje CG, często z sekwencją TATA i sekwencją inicjatora (ang. *initiator element, Inr*), posiadające tylko jedno miejsce startu transkrypcji (ang. *transcription start site, TSS*), przez co określane są jako „wąskie” lub „skupione” (ang. *sharp, focused, peaked promoters*); pokryte są mało uporządkowanymi nukleosomami (potencjalnie konkurującymi o dostęp do DNA z czynnikami transkrypcyjnymi), poniżej TSS podlegającymi trimetylacji H3K4 po aktywacji genu - charakteryzują geny specyficzne tkankowo i geny odpowiedzi na bodźce
 - b) promotory bogate w dinukleotydy CG, bez sekwencji TATA, zawierające kilka alternatywnych TSS, zwane przez to „szerokimi” (ang. *broad promoters*); mają silnie pozycjonowane nukleosomy z H3K4me3, otaczające wyraźny region ubogi w nukleosomy (ang. *nucleosome-depleted region, NDR*), potencjalnie wyznaczający używany TSS – charakteryzują geny szeroko i ciągle ekspresjonowane
 - c) „szerokie” promotory z długimi wyspami CpG, będące przedmiotem represji przez kompleks Polycomb, bogate jednocześnie w H3K4me3 i H3K27me3 (tzw. biwalentne promotory, Bernstein i in., 2006) - geny regulowane rozwojowo (Lenhard i in., 2012)
- 4) Dostępność dodatkowych czynników transkrypcyjnych na etapie inicjacji transkrypcji, w tym aktywatorów i ko-aktywatorów (Weake i Workman, 2010)
 - 5) Wpływ kaskad sygnalizacyjnych, prowadzących do zmian ekspresji genów w odpowiedzi na odczuwalne zmiany warunków środowiska (Weake i Workman, 2010)
 - 6) Oddziaływanie odległych sekwencji wzmacniających bądź wyciszających transkrypcję (odpowiednio ang. *enhancers* i *silencers*), a także sekwencji izolujących od innych jednostek transkrypcyjnych (ang. *insulators* lub *boundary elements*) (Semenza, 1994, Trzyna i in., 2012)
 - 7) Zjawisko pauzowania polimerazy, szczególnie w pobliżu promotora (ang. *promoter-proximal polymerase pausing*), które dotyczy około 30% genów

Drosophila melanogaster i ssaczych, i uwalnianie polimerazy z tego stanu do efektywnej elongacji (Adelman i Lis, 2012); w przypadku roślin pauzowanie polimerazy w pobliżu miejsca poliadenylacji (Hetzel i in., 2016)

- 8) Dostępność czynników transkrypcyjnych koniecznych do wydajnej elongacji i terminacji transkrypcji
- 9) Procesy zachodzące kotranskrypcyjnie jak dodawanie czapeczki na 5' końcu transkryptów, splicing, poliadenylacja
- 10) Procesy degradacji RNA prowadzone przez egzonukleazy (od obu końców po usunięciu czapeczki i ogona polyA) bądź zależne od sekwencji cięcia przez kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*).

Czynniki chromatynowe mogą wpływać na proces transkrypcji na wszystkich jej etapach. Szeroki wachlarz możliwych modyfikacji chromatyny dodatkowo przemawia za możliwością, że mogą one być doskonałym narzędziem do ścisłej regulacji ekspresji genów u eukariotów.

1.2. Wpływ struktury chromatyny na transkrypcję

1.2.1. Znaczenie metylacji DNA dla funkcjonowania genów

Metylacja DNA jest jedną z najwcześniej zidentyfikowanych i najdłużej badanych modyfikacji chromatyny. Mimo to zarówno jej znaczenie, jak i mechanizmy zaangażowane w jej powstawanie, usuwanie bądź oddziaływanie z innymi czynnikami regulującymi np. ekspresję genów wciąż pozostają w dużym stopniu niejasne. Ze względu na to, że w genomach eukariotów występuje silny antagonizm występowania metylacji DNA i wariantu histonowego H2A.Z (Zilberman i in., 2008; Coleman-Derr i Zilberman, 2012), warto przyjrzeć się wpływowi metylacji DNA na ekspresję genów.

Metylacja DNA w genomach

Reszta metylowa głównie dołączana jest do cytozyny, chociaż niedawno w genomie ssaczym odkryto również metylację adeniny (Wu i in., 2016). W cytozynie grupa metylowa przyłączana jest do piątego atomu pierścienia pirymidynowego (powstaje 5-metylocytozyna, 5mC) przez enzymy zwane metylotransferazami DNA. Podzielono je na takie, które utrzymują wzór metylacji po replikacji, wzorując się na zmetylowanej nici DNA (u ssaków

DNMT1, u roślin DRM2, MET1 i CMT3), oraz na wprowadzające metylację *de novo* (DNMT3A i DNMT3B, u roślin DRM2) (Iyer i in., 2011, Cao i Jacobsen, 2002). Kolejne badania pokazują jednak, że funkcje te prawdopodobnie nie są tak jasno wyznaczone (np. niekiedy do utrzymania metylacji konieczne są DNMT3A i DNMT3B, Jones i Liang, 2009). Usuwanie reszty metylowej jest bardziej skomplikowane i raczej odbywa się przez wycięcie całej zasady azotowej przy okazji replikacji bądź naprawy DNA (Bhutani i in., 2010, Popp i in., 2010). Ponadto grupa metylowa może być przekształcana w hydroksymetylową przez enzymy z rodziny Tet (Tahiliani i in., 2009) - tak powstaje 5-hydroksymetylocytozyna, która potencjalnie również może regulować ekspresję genów.

Zjawisko metylacji DNA pojawiło się prawdopodobnie bardzo wcześnie w historii ewolucji świata ożywionego, gdyż występuje zarówno u Prokaryota, jak i Eukaryota (Iyer i in., 2011, Rana i Ankri, 2016). Jednak podczas gdy dla pewnych grup organizmów jest ono konieczne od pierwszych etapów rozwoju zarodkowego (ssaki) dla prawidłowego różnicowania komórek i rozwoju (Zemach i in., 2010), inne nie wykazują tego zjawiska (drożdże czy nicienie *Caenorhabditis elegans*, Capuano i in., 2014, Simpson i in., 1986). Podobnie zróżnicowany jest wzór metylacji – u ssaków zdecydowanie dominuje metylacja dinukleotydów CG, u roślin z kolei metylowane są sekwencje CG, CHG i CHH, gdzie H to A, T lub C (Zemach i in., 2010).

Dawniej, ze względu na intensywną metylację DNA inaktywowanego chromosomu X u ssaków czy rolę metylacji DNA w imprintingu rodzicielskim (zrelacjonowane przez Feila i Bergera, 2007), modyfikacji tej przypisywano represyjny wpływ na ekspresję genów. Dziś, po wielu badaniach, w tym całogenomowych analizach metylacji DNA u różnych gatunków wyłania się inny, bardziej zróżnicowany obraz jej znaczenia, zależny od usytuowania w genomie i prawdopodobnie innych modyfikacji chromatyny (Jones, 2012).

Metylacja DNA w rejonie promotorowym

Ponad połowa ssaczych promotorów bogata jest w powtórzenia CG, zwane wyspami CpG (70% według Sandelin i in., 2007), jednak ich większość pozostaje niemetylowana. Te jednak, które są zmetylowane w rejonie TSS, okazują się być trwale wyciszonymi genami takimi jak geny wczesnej ontogenezy. Stąd pojawiła

się hipoteza, że metylacja DNA w pobliżu TSS jest swoistego rodzaju „zamkiem”, który przypieczętowanie wyciszenie transkrypcyjne genu, współdziałając w tym z innymi cechami zamkniętych promotorów, jak gęste obsadzenie nukleosomami. Faktycznie, w promotorach metylacja DNA antykoreluje z modyfikacjami charakterystycznymi dla aktywnych genów jak H3K4me2 i H3K4me3 (Ooi i in., 2007) oraz omija rejony ubogie w nukleosomy (ang. *nucleosome depleted regions, NDRs*), okolonowane nukleosomami z H2A.Z (Zilberman i in., 2008). Metylacja DNA może wywierać wyciszający wpływ przez blokowanie przyłączenia czynników transkrypcyjnych (Watt i Molloy, 1988) oraz przyciąganie deacetylaz histonowych (Jones i Laird, 1999). Ostatnio pojawiają się też głosy, że nie tylko stan wyraźnej hipometylacji czy hipermetylacji promotora miałyby wskazywać na status transkrypcyjny genu, ale również niewielkie zmiany w poziomie metylacji promotorów niektórych genów (<10%) mogłyby mieć rolę modulacyjną ich ekspresji (Levenson, 2010, Leenen i in., 2016). Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań. Niemniej zaburzenia metylacji DNA są obserwowane w licznych jednostkach chorobowych, a zwłaszcza w nowotworach, m.in. nadmiernej metylacji i wyciszaniu ulegają geny supresorowe nowotworów, a hipometylacji i uaktywnieniu onkogeny (De Smet i in., 1999; Sieber i in., 2005). Poza promotorami również w innych sekwencjach regulatorowych transkrypcji, jak sekwencje wzmacniające (ang. *enhancers*) i izolatory (ang. *insulators*), występują wyspy CpG o zróżnicowanym profilu metylacji (Leenen i in., 2016).

Metylacja DNA w ciałach genów (ang. *gene bodies*)

Ciała genów zasadniczo są ubogie w wyspy CpG (co najprawdopodobniej wynika z transpozycji 5mC na T), ale obecne dinukleotydy CG są stosunkowo często metylowane (Jones, 2012). 5mC, w odróżnieniu od inicjacji transkrypcji, nie przeszkadza w jej wydajnej elongacji; poziom metylacji w ciałach genów pozytywnie koreluje z ich poziomem ekspresji (np. Hellman i Chess, 2007). Jednocześnie metylacja DNA zapobiega aktywacji transpozonów znajdujących w sekwencji genów (zapewniając przy tym stabilność genomu, Yoder i in., 1997) oraz inicjacji transkrypcji z tzw. kryptycznych miejsc startu transkrypcji (Maunakea i in., 2010).

1.2.2. Nukleosom jako podstawowa jednostka organizacji chromatyny

Chromatyna jest kompleksem DNA z białkami, który służy upakowaniu, ochronie, regulacji replikacji i transkrypcji DNA w jądrze komórki eukariotycznej. Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom czyli kompleks ośmiu histonów (po dwa białka H2A, H2B, H3 i H4) z nawiniętym na nie dwuniciowym DNA (Kornberg, 1974).

Ze względu na ważną i uniwersalną funkcję, jaką spełniają białka histonowe, ich sekwencja aminokwasowa jest silnie zachowawcza, ich geny występują w wielu kopiach w genomie, a ich ekspresja jest silnie uzależniona od replikacji DNA (Talbert i Henikoff, 2010).

Histony tworzące nukleosom, czyli tzw. histony rdzeniowe (ang. *core histones*), w odróżnieniu od zupełnie odmiennego histonu linkerowego H1, mają taki sam, silnie zakonserwowany plan budowy, tzw. *histone fold domain*. Składają się na niego trzy helisy α , rozdzielone dwiema pętlami L1 i L2 (od ang. *loop*). Taka budowa jest ewolucyjnie zachowawcza zarówno w histonach eukariotów, jak i archeonów (Pereira i in., 1997); pozwala ona na skuteczną dimeryzację (H3 z H4, H2A z H2B) oraz dalsze składanie tetramerów, heksamerów i oktamerów (Sandman i in., 1998). Histony łączą się w pary, ustawiając się w konfiguracji głowa-ogon, tak, że na każdym końcu dimeru leży pętla L1 jednego i pętla L2 drugiego histonu; przypomina to splecenie dłoni w geście podania ręki, stąd motyw ten nazwano *handshake motif*. Następnie dimery oddziałują ze sobą tworząc „wiązkę czterech helis” (ang. *four-helix bundle*) – H3 jednego dimeru H3-H4 oddziałuje z H3 drugiego dimeru, tworząc tetramer. Podobna struktura tworzy się przy każdym z dwóch histonów H4 – każdy oddziałuje z H2A dimeru H2A-H2B, i w ten sposób tworzy się i jest utrzymywany oktamer histonowy (Luger i in., 1997). Histony eukariotyczne posiadają dodatkowo tzw. ogony (ang. *histone tails*), wystające swobodnie poza nukleosom i będące miejscem szczególnie intensywnych modyfikacji potranslacyjnych.

Na tak złożoną konstrukcję białkową nawinięte jest DNA. Lewoskrętnie i superhelikalnie zwinięte DNA o długości 146 - 147 pz oplata oktamer 1,67 razy, tak, iż miejsce „wejścia” i „zejścia” z oktameru leżą blisko siebie (Richmond i in., 1984, Luger i in., 1997). Kolejne nukleosomy oddzielone są od siebie tzw. linkerowym DNA o zmiennej długości 10 – 80 pz, tworząc strukturę

przypominającą „koraliki na sznurku”, zwaną też włóknem 10 nm (Felsenfeld i Groudine, 2003).

Przez lata postulowano, że struktura ta ulega dalszej kondensacji z udziałem histonu H1 do tzw. włókna 30 nm, a ta forma pod wpływem kolejnych białek może kondensować do struktur wyższego rzędu (Felsenfeld i Groudine, 2003). Brakowało jednak technik do weryfikacji, czy struktury te faktycznie istnieją *in vivo*. Badania z użyciem nowszych metod nie wykazały jednak istnienia regularnych struktur poza włóknami 10 nm (Fussner i in., 2012). Co więcej, niekiedy obserwuje się tak silną kondensację DNA, która nie byłaby możliwa w przypadku istnienia struktury włókna 30 nm. Wydaje się więc, że chromatyna składa się z włókna 10 nm, podlegającemu łączeniu w różnego typu agregaty (Razin i Gavrilov, 2014, 2018). Zwyczajowo chromatynę dającą się zaobserwować przez mikroskop jako luźną strukturę nazywa się euchromatyną, a jako zwartą, o niedostępnym DNA – heterochromatyną. Najbardziej zwartą strukturę chromatyna reprezentuje podczas metafazy podziałów komórkowych – przyjmuje ona wtedy postać chromosomów (Felsenfeld i Groudine, 2003).

Nukleosomy i ich dalsze upakowanie mają silny wpływ na dostępność DNA dla różnych białek i tym samym procesów angażujących DNA. Dotyczy to także dostępności np. sekwencji promotorowych dla czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA, koniecznej dla inicjacji transkrypcji. Również nukleosomy obecne wzdłuż sekwencji genu stanowią pewną barierę dla przesuwanej się w trakcie elongacji polimerazy (por. niżej). Dlatego najogólniej nukleosomy można rozpatrywać jako negatywne regulatory transkrypcji. Dowodem na to może być chociażby obserwacja, że transkrypcja *in vitro* sekwencji DNA z HIV-1 pokrytej nukleosomami zachodziła 35 razy mniej wydajnie niż nagiej sekwencji (Zhou i in., 2007).

1.2.3. Wpływ nukleosomów na proces transkrypcji

Determinacja położenia nukleosomów

Jak się okazuje, na pozycję nukleosomów *in vivo* wpływ ma sekwencja nukleotydowa DNA, kompleksy remodelujące nukleosomy, które mogą je przesuwać lub usuwać, czynniki transkrypcyjne i sama polimeraza RNA (Struhl i Segal, 2013).

Pozycjonowanie nukleosomów i obsadzenie nukleosomami

W odniesieniu do nukleosomów używa się dwóch pojęć – pozycjonowania (ang. *positioning*) i obsadzenia (ang. *occupancy*). Pozycjonowanie jest miarą mobilności nukleosomów; silnie pozycjonowany nukleosom to taki, który w homogenicznej populacji komórek przyjmuje tę samą pozycję w genomie w przeciwieństwie do słabo pozycjonowanego nukleosomu – którego pozycja względem sekwencji DNA różni się między komórkami (jest jakby rozmyta, ang. *fuzzy nucleosome*) (Cosgrove i in., 2004). Z kolei obsadzenie nukleosomami jest miarą ich stabilności tudzież wymiany (ang. *turnover*) – wysokie obłożenie nukleosomami świadczy o dużej ich stabilności w określonym miejscu (Henikoff, 2007). Oba te pojęcia miały znaczenie w moich badaniach.

Wpływ nukleosomów na inicjację transkrypcji w rejonie promotorowym

Nukleosomy w promotorach ograniczają dostęp czynników transkrypcyjnych do rozpoznawanych przez nie sekwencji (Kornberg i Lorch, 1999; Polach i Widom, 1995), kształtując swoistą gradację dostępności DNA. Najbardziej dostępne jest DNA nienukleosomowe (linkerowe bądź w obrębie NDR), potem na brzegach nukleosomów, wreszcie tylko niektóre czynniki transkrypcyjne potrafią przyłączać się do sekwencji na powierzchni nukleosomu. Miejsca „zasłonięte” przez nukleosomy mogą zostać udostępnione w wyniku remodelowania nukleosomów, czyli ich usunięcia bądź przesunięcia, co też często zachodzi z udziałem kompleksów remodelujących chromatynę (Cairns, 2009).

Wobec powyższego nie dziwi fakt, że częstą cechą promotorów eukariotycznych jest obecność tzw. regionu wolnego od nukleosomów/ubogiego w nukleosomy (ang. *nucleosome-free region, NFR, nucleosome-depleted/deficient region, NDR*) bezpośrednio przy miejscu startu transkrypcji. Region ten ma zróżnicowaną długość, jednak najnowsze badania dowodzą, że nie przekracza długości zajmowanej przez nukleosom czyli 150 pz (Kubik i in., 2015). Okazuje się również, że wiele opisanych wcześniej NFR w istocie zawiera jeden bądź dwa niestabilne nukleosomy (ang. *fragile nucleosomes*) (Kubik i in., 2015). Ich obecność sugerowały również niektóre wcześniejsze prace (np. Jin i in., 2009).

Do powstawania NDRów przyczynia się kilka czynników. Pierwszym jest sekwencja DNA – częste w promotorach trakty poli(dA:dT) nie sprzyjają

formowaniu nukleosomów i ich występowanie w genomach koreluje z rejonami ubogimi w nukleosomy (Anderson i Widom, 2001; Segal i Widom, 2009; Kaplan i in., 2009). Drugim jest działanie kompleksów remodelujących chromatynę - u drożdży przede wszystkim RSC (ang. *remodels the structure of chromatin*), który odsuwa nukleosomy -1 i +1 od siebie (Lorch i Kornberg, 2015; Kubik i in., 2015). Kolejnym - oddziaływanie podstawowych czynników transkrypcyjnych (Kubik i in., 2015) czy samej polimerazy.

Jak już wcześniej wspomniano, wyraźny NDR wyznaczony przez silnie pozycjonowane nukleosomy występuje przede wszystkim w tzw. „szerokich” promotorach genów o konstytutywnej i szerokiej ekspresji. Posiadają one zazwyczaj kilka TSS i ściśle wyznaczenie NDR wydaje się faworyzować jedno z nich (Lenhard i in., 2012). Jednak część promotorów nie ma wyraźnego NDR – czy to „wąskie” promotory tkankowców, czy „zakryte” promotory drożdży (por. punkt 1.5.1). Występują one w genach o tkankowo specyficznej ekspresji bądź genach odpowiedzi na różne bodźce. Posiadają pojedynczy TSS i słabo uporządkowane nukleosomy w jego pobliżu. Przykrycie promotora nukleosomami według niektórych badaczy miałyby się wiązać z większą jego „plastycznością” (w rozumieniu modulowania aktywności) (Tirosh i Barkai, 2008, Rach i in., 2011, Lenhard i in., 2012).

W promotorach dochodzi zatem do konkurowania nukleosomów i czynników transkrypcyjnych o dostęp do DNA (Workman i Kingston, 1998). Najbardziej obrazowy przykład tej konkurencji uchwycono *in vivo* w silnie indukowanym (20-40-krotnie) głodem fosforanowym genie *Pho5* u *S. cerevisiae*. Do jego promotora, w stanie represji obsadzonego nukleosomami, w warunkach indukujących przyłącza się aktywator transkrypcyjny Pho4, który z kolei wiąże liczne kompleksy i białka biorące udział w remodelowaniu chromatyny (m. in. SAGA, SWI/SNF, białka opiekuńcze histonów) prowadząc do usunięcia kilku nukleosomów (-4, -3 i -2), odsłaniając kolejne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych (Boeger i in., 2003; Korber i Barbaric, 2014). Jednakże chromatynowa regulacja genu *Pho5* wydaje się być ekstremalnym przykładem, gdyż dla większości drożdżowych genów zmiany dotyczące nukleosomów w obrębie promotora są znacznie skromniejsze, obejmujące może jeden nukleosom (Dudek i in., 2010; Huebert i in., 2012).

Pokrycie nukleosomami zapobiega inicjacji transkrypcji z nieprawidłowych miejsc. Turner (2014) wskazuje, że w dużych genomach eukariotycznych sekwencje rozpoznawane przez poszczególne czynniki transkrypcyjne (o długości zwykle 6-8 pz) pojawiają się przypadkowo raz na 4^6 nukleotydów; ograniczenie ich dostępności jest zatem kluczowe dla prawidłowego odczytywania genomu. Twierdzenie to jest zgodne na przykład z obserwacjami Whitehouse'a i in. (2007), że zaburzone pozycjonowanie nukleosomów w pobliżu TSS (zawierających H2A.Z i H3K4me3) skutkowało antysensowną transkrypcją z tzw. kryptycznych miejsc (ang. *cryptic sites*).

Wpływ nukleosomów na przejście polimerazy do etapu elongacji i transkrypcję w ciele genu

Już sama polimeraza II RNA podczas procesu transkrypcji ma tendencje do zatrzymywania się (ang. *stalling*) nawet na nagim DNA. Zatrzymanie to jest zależne od sekwencji DNA i albo może być po chwili przezwyciężone (wtedy jest to tzw. *polymerase pausing*), albo może skutkować nawet cofnięciem się kompleksu polimerazy (ang. *backtracking*) i w efekcie jego uwięzieniem na DNA (ang. *polymerase arrest*); z tego stanu uwolnić mogą go tylko określone czynniki transkrypcyjne (głównie TFIIS) (Cheung i Cramer, 2011; Dangkulwanich i in., 2013). Owinięte wokół oktamerów histonowych DNA stanowi dla polimerazy dodatkowe, znaczne utrudnienie. Polimeraza II RNA poza szczególnymi przypadkami genów o wysokiej ekspresji, z których nukleosomy są usuwane (Kristjuhan i Svejstrup, 2004, Schwabish i Struhl, 2004), musi na całej długości genu wielokrotnie przechodzić przez nukleosomy.

U dotąd zbadanych pod tym względem eukariotów (drożdże, drozofila, człowiek) potwierdzono, że każdy nukleosom powoduje zatrzymanie (*pausing*) polimerazy II RNA po transkrypcji 40-50 nukleotydów nukleosomalnego DNA [czyli + (40–50) nukleotydów za tzw. miejscem wejścia DNA na oktamer (ang. *entry site*), albo też inaczej - w pobliżu osi diady nukleosomu] (Izban i Luse, 1991, Kireeva i in., 2005, Bondarenko i in., 2006). Na zatrzymanie się w tym miejscu ma wpływ sekwencja DNA na wysokości +(75-79) i +(99-102) i jej oddziaływanie z histonami. Jeżeli w tym miejscu przebyty już odcinek nukleosomowego DNA zwinie się tworząc na powierzchni oktameru małą pętlę, powoduje to częściowe odwinięcie leżącego poniżej DNA, umożliwiając przejście

polimerazy i tym samym wznowienie jej aktywności (Gaykalova i in., 2015). Nukleosom jednak pozostaje. Pewne prace wskazują na utratę jednego dimeru H2A-H2B przy przejściu polimerazy przez nukleosom (Kireeva i in., 2002), chociaż nie wiadomo, w którym dokładnie momencie to następuje (Churchman i Weissman, 2011). Przy przechodzeniu przez barierę +(40-50) polimeraza DNA może zostać też uwięziona (ang. *arrest*) i ulec cofaniu (ang. *backtracking*); ze stanów tych enzymowi znacznie trudniej się uwolnić (Gaykalova i in., 2015).

Badania *in vitro* Bondarenko i in. (2006) pokazały, że polimeraza II RNA oprócz pozycji +45 ma też tendencję do zatrzymywania się w miejscu +15, na styku dimeru H2A-H2B z DNA. Z kolei analizy *in vivo* na drozofili wykazały zatrzymywanie się polimerazy II RNA w pozycji -7 i +20 w stosunku do miejsca wejścia DNA na nukleosom. Autorzy różnicę między swoimi badaniami a badaniami *in vitro* upatrują w specyfice naprężeń, które naturalnie powstają w strukturze chromatyny, a których nie ma w przypadku rekonstruowanych nukleosomów (Weber i in., 2014). Inni badacze natomiast uznają wyniki grupy Henikoffa za „dodatkowe” bariery (Gaykalova i in., 2015). Bardzo istotną obserwację Weber i in. (2014) poczynili w stosunku do pierwszego nukleosomu zaraz poniżej TSS w genach – otóż bariera -7 jest przy nim najwyższa ze wszystkich nukleosomów. Według zespołu Henikoffa (Teves i in., 2014) zatrzymanie się Pol II w tym miejscu może ułatwiać zgromadzenie wszystkich koniecznych czynników elongacyjnych i zapobiegać przedwczesnemu przerwaniu transkrypcji z powodu ich braku. Powodem zaś szczególnie dużej bariery potencjalnie może być fakt, że podczas transkrypcji dochodzi do tworzenia negatywnych superzwinięć DNA za polimerazą, a pozytywnych przed nią; pozytywne superzwinięcia natomiast destabilizują nukleosomy, na początku transkrypcji jednak efekty te mogą być jeszcze za słabe.

Weber i in. (2014) wzięli pod uwagę fakt, że 5' końce genów są wzbogacone w wariant histonowy H2A.Z. Okazało się, że wysokość wzbogacenia w H2A.Z antykorelowała z zatrzymywaniem Pol II, sugerując, że H2A.Z może ułatwiać pokonywanie bariery nukleosomów zarówno +1, jak i tych w ciele genu.

Zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro* dostarczają wartościowych informacji na temat mechanizmu przechodzenia polimerazy II RNA przez nukleosom w procesie transkrypcji. W natywnym układzie wpływ na to przejście mają liczne czynniki – oprócz transkrypcyjnych również modyfikacje histonów,

warianty histonowe, białka opiekuńcze (ang. *chaperons*) histonów oraz kompleksy remodelujące chromatynę. Dla przykładu, zachowawczy ewolucyjnie kompleks FACT (ang. *facilitates chromatin transcription*) wspomaga polimerazę w procesie transkrypcji, częściowo odwijając DNA i powodując oddysocjowanie jednego dimeru H2A-H2B (Kireeva i in., 2002; Kulaeva i in., 2010).

1.2.4. Koncepcja kodu histonowego i jego roli w regulacji ekspresji genów

Koncepcja kodu histonowego

Nukleosomy same w sobie tworzą przeszkodę dla procesu transkrypcji, jednak wielkość tej przeszkody może być potencjalnie modulowana również przez dodawanie odpowiednich grup chemicznych do histonów. W ciągu lat badań nad nukleosomem i histonami odkryto szereg modyfikacji potranslacyjnych histonów, występujących zwłaszcza na ich wolnych końcach aminowych. Szczególnie częste są metylacja, acetylacja, fosforylacja i ubikwitynacja. Skutki takich modyfikacji upatrywano w zmianie stabilności nukleosomu, wpływie na strukturę chromatyny wyższego rzędu lub na oddziaływania z różnymi białkami. Co ciekawe, dotąd właściwie tylko jedna modyfikacja ma dobrze udokumentowany wpływ na stabilność nukleosomów – acetylacja (Brower-Toland i in., 2005).

Korelacja obecności poszczególnych modyfikacji ze zwiększonym bądź obniżonym poziomem ekspresji miała świadczyć o charakterze tych modyfikacji – aktywującym lub represjonującym (zresztą nie do końca uzasadnionym, o czym mowa niżej). Tak zrodziła się koncepcja kodu histonowego rozumianego jako regulowanie przejścia między transkrypcyjnie aktywną a transkrypcyjnie wyciszoną chromatyną przez kombinacje modyfikacji potranslacyjnych histonów (Jenuwein i Allis, 2001). I tak powszechnie przyjęto, że aktywne promotory są bogate w acetylację histonów, di- i trimetylację H3K4 oraz wariant histonowy H2A.Z, transkrybowane regiony w H3K36me3 i H3K79me2, wyciszone geny w H3K9me2/3 i H3K27me3, a sekwencje wzmacniające w H3K4me1/2 i H3K27ac (Zhou i in., 2011).

Luki w koncepcji kodu histonowego

Poznanie reguł jakiegokolwiek kodu powinno umożliwić przewidywanie jego działania. Jednakże po latach badań nad modyfikacjami histonów nadal nie

możemy sprowadzić ich do jasnych skutków. Jednocześnie wiedza o rodzajach grup chemicznych, które mogą być przyłączane do histonów, jak i resztach aminokwasowych, na których do tego dochodzi, wciąż rośnie (zebrane np. w Rothbart i Strahl, 2014). Tak jak liczba niuansów, nad którymi badacze się zastanawiają. Dlaczego niektóre modyfikacje są powszechne w chromatynie, a inne rzadkie? Czy funkcje tych rzadkich są bardziej dyskretne bądź specyficzne? Zastanawiają takie zjawiska jak asymetria w rozlokowaniu modyfikacji (obecność tylko na jednym z dwóch takich samych histonów w nukleosomie, Voigt i in., 2012) i współwystępowanie modyfikacji o antagonistycznym wpływie na chromatynę w tym samym nukleosomie (jak H3K27me3 i H3K4me3, Voigt i in., 2013). Identyfikowane są białka przyłączające określone grupy chemiczne (ang. *writers*), usuwające je (ang. *erasers*) oraz te, które mogą rozpoznawać określone modyfikacje na histonach i się do nich przyłączać, powodując określone skutki (czyli niejako je odczytujące, ang. *readers*). Jednakże sprawę komplikuje fakt, że często dane modyfikacje mogą być rozpoznawane jednocześnie przez wiele białek – czy więc ostateczny rezultat zależy od ich kompetycji o miejsce wiązania? Z drugiej strony są też białka wielodomenowe rozpoznające więcej niż jedną modyfikację naraz (lub modyfikację histonu i metylację DNA), na tym samym bądź pobliskich łańcuchach histonów. Przykłady takich „multiwalentnych” białek dostarczają w pracach przeglądowych Rando (2012) czy Rothbart i Strahl (2014). Zazwyczaj powinowactwo tych białek do chromatyny rośnie, gdy modyfikacje współwystępują. Dla niektórych białek obserwowane jest jednak przeciwne zjawisko – występowanie jednej modyfikacji inhibuje przyłączenie się do innej. Osobnym, bardzo istotnym zagadnieniem jest występowanie i funkcje wariantów histonowych, zastępujących kanoniczne histony (o tym niżej). Potencjał regulatorowy histonów jest więc ogromny, tak iż niektórzy mówią wręcz o sygnalizacji nukleosomowej (Turner, 2014).

Potencjał regulacyjny modyfikacji histonów a jego wykorzystanie

Z drugiej jednak strony, całogenomowe analizy *in vivo* u różnych gatunków pokazują, że cały potencjał tkwiący w modyfikacjach potranslacyjnych nie musi być wykorzystany. Okazuje się, że wiele modyfikacji ze sobą współwystępuje i już kilka lub niewiele więcej ich kombinacji okazuje się być dominująca dla większości określonych rejonów w genomie (u *S. cerevisiae* Liu i in., 2005, u *Drosophila melanogaster* Filion i in., 2010, Kharchenko i in., 2011, u *Arabidopsis thaliana* Roudier i in., 2011). Przykłady takiego funkcjonalnego podziału chromatyny na podstawie całogenomowych badań zamieściłam w **Tabeli 1**.

Tab. 1. Porównanie domen funkcjonalnych chromatyny w genomach *D. melanogaster* i *A. thaliana*. Puste pola oznaczają, że charakterystyczne dla danej domeny są białka inne niż modyfikowane histony.

Rejon w genomie u <i>D. melanogaster</i> (Filion i in., 2010)	Markery histonowe	Rejon w genomie u <i>A. thaliana</i> (Roudier i in., 2011)	Markery histonowe
Perycentryczna heterochromatyna i chromosom 4	H3K9me2	Klasyczna heterochromatyna, transpozony	H3K9me2, H4K20me1, H3K27me1
Heterochromatyna związana z PcG	H3K27me3	Geny respresjonowane (przez PRC2) i o niskiej ekspresji	H3K27me3/2
Przeważająca w genomie domena heterochromatyny		Rejony międzygenowe i geny o niskiej ekspresji	
Euchromatyna – geny o szerokim spektrum ekspresji	H3K4me2 H3K79me3 H3K36me3	Aktywne geny	H3K4me3/2 H3K36me3 H3K9me3 H2Bub H3K56ac
Euchromatyna – geny ściślej regulowane	H3K4me2, H3K79me3		

Rando (2012) tłumaczy to zjawisko niską specyficznością białek modyfikujących (np. wiele reszt lizyny może być jednocześnie acetylowana), skupianiem się ich w określonych rejonach (np. grupa modyfikatorów – ang. *modifiers* - przesuująca się wraz z transkrybującą Pol II) czy tzw. wzajemnym oddziaływaniem histonów (ang. *histone crosstalk*) – kiedy jedne modyfikacje przyciągają innych modyfikatorów. Poza tym nierzadko mutanty nawet uniwersalnych znaczników chromatynowych nie wykazują silnych zaburzeń w funkcjonowaniu czy ściślej w ekspresji genów. Często pomimo kolokalizowania danej modyfikacji z licznymi genami, tylko część z nich „cierpi” na skutek utraty tej modyfikacji. Możliwe więc, że niektóre modyfikacje służą nie tyle do rekrutowania jakichś czynników dalej wpływających np. na transkrypcję, ile do allosterycznego modulowania aktywności czynników zrekrutowanych niezależnie od modyfikacji (Rando, 2012).

Modyfikacje histonów – przyczyny czy konsekwencje stanu transkrypcyjnego genów?

Niektórzy badacze postulują, że obserwowana siła wiązania domen odczytujących modyfikacje jest za niska, aby powodować rekrutację czynników do rozpoznawanych grup chemicznych (Henikoff i Shilatifard, 2011). Równie sceptycznie podchodzą też do samej koncepcji kodu histonowego. W przypadku wielu rozpoznanych dotąd modyfikacji wciąż bowiem nie wiemy, jaki jest główny ich skutek; co gorsza często nawet nie jesteśmy w stanie jednoznacznie stwierdzić, czy to modyfikacje histonów powodują konsekwencje w postaci wpływu na różne procesy angażujące DNA, czy też na odwrót – one są konsekwencjami tychże procesów, pozostałościami po nich. Wśród badaczy rozpowszechniona jest (błędna) tendencja do określania danej modyfikacji mianem aktywującej lub represjonującej w zależności od obserwowanej korelacji jej występowania ze wzmożoną bądź wyciszoną transkrypcją. W większości badań brak jednak eksperymentalnego uzasadnienia, że modyfikacje chromatyny są „instrukcyjne” (Henikoff i Shilatifard, 2011). Co więcej w obecnie stosowanych podejściach badawczych nie sposób określić, co jest bezpośrednim, a co pośrednim efektem danej modyfikacji bądź jej braku (np. w badaniach mutantów). Z takimi problemami zetknęłam się również w swoich badaniach.

1.2.5. Rola wariantów histonowych w regulacji transkrypcji

Warianty histonowe

Równoległe z przyłączaniem określonych grup chemicznych do histonów, do nukleosomów wprowadzane są histony o już odmiennych właściwościach fizykochemicznych, wynikających ze znacząco odmiennej sekwencji aminokwasowej. Białka te to tzw. warianty histonowe. Oprócz innej struktury pierwszorzędowej od tak zwanych histonów kanonicznych (czyli „zwykłych” H1, H2A, H2B, H3 i H4) odróżnia je przede wszystkim ekspresja i depozycja niezależna od fazy cyklu komórkowego w określonych miejscach w chromatynie przez specjalne kompleksy białkowe (March-Díaz i Reyes, 2009). W odróżnieniu od zwykłych histonów, których geny występują raczej w wielu kopiach w genomie, i to najczęściej w grupach, co ułatwia ich wspólną intensywną ekspresję w fazie S mitozy, geny wariantów histonowych występują pojedynczo bądź w niewielu kopiach (Malik i Henikoff, 2003). Warianty takie mogą występować u wielu eukariotów i wtedy nazywane są uniwersalnymi wariantami histonowymi, bądź tylko w pewnych liniach ewolucyjnych (Talbert i Henikoff, 2010). Ich ekspresja może ograniczać się tylko do pewnych tkanek (np. do jąder u ssaków). Niemniej, po dokładniejszym zbadaniu warianty te okazują się pełnić pewne specyficzne role, takie jak np. H2A.X w sygnalizacji pęknięć dwuniciowych czy cenH3 w powstawaniu chromatyny centromerowej. Role te bywają tak ważne, że czasem brak danego wariantu histonowego pomimo istnienia szeregu innych histonów jest letalny.

Powiązania wariantów histonowych z ekspresją genów

Wydaje się, że ze znanych wariantów histonowych H2A.Z ma najszerzej udokumentowany udział w regulacji ekspresji genów. Jednak funkcję tę proponuje się również innym wariantom, takim jak H2A.Bbd, macroH2A czy H3.3, chociaż nie zawsze jest to wystarczająco dobrze eksperymentalnie uzasadnione.

H2A.Bbd jest wariantem histonu H2A, występującym wyłącznie u ssaków. Swoją nazwę zawdzięcza lokalizacji w genomie (Bbd, ang. *Barr body-deficient*, bo nie występuje w inaktywowanym chromosomie X) lub charakterystycznej cesze budowy (Lap1, ang. *lack of acidic patch*). Wykazuje

ograniczone podobieństwo aminokwasowe do kanonicznego H2A (50%) i brakuje mu 19 aminokwasów w rejonie C-końcowym, co powoduje skrócenie ogona C i domeny dokującej, odpowiedzialnej za oddziaływanie z tetramerem (H3-H4)₂. Z tego powodu nukleosomy z H2A.Bbd są znacznie mniej stabilne (Bao i in., 2004, Doyen i in., 2006). H2A.Bbd nie posiada również tzw. kieszeni kwasowej, umożliwiającej oddziaływanie z sąsiednim nukleosomem i tym samym tworzenie bardziej skondensowanych struktur chromatyny. Dlatego ludzkie nukleosomy z H2A.Bbd wręcz zapobiegają tworzeniu skondensowanych włókien (Zhou i in., 2007). Badania na komórkach ludzkich i mysich pokazały, że poziom ekspresji genów pozytywnie koreluje ze wzbogaceniem ich ciał w H2A.Bbd (Tolstorukov i in., 2012, Chen i in., 2014), a w mysich jądrach – ze wzbogaceniem ich promotorów (Soboleva i in., 2012). W komórkach ludzkich i mysich obniżenie ekspresji H2A.Bbd (ang. *knockdown*) skutkowało zmianami w poziomie ekspresji genów, i to najczęściej obniżeniem tego poziomu (Tolstorukov i in., 2012, Chen i in., 2014). Co więcej, skutkiem było też obniżenie wydajności splicingu RNA (Tolstorukov i in., 2012).

Szczególnym wariantem histonowym, znalezionym dotąd jedynie u kręgowców i kilku bezkręgowców, jest macro-H2A. Histon ten posiada dodatkową domenę macro, znajduwaną w różnych białkach wiążących metabolity, chociaż nie wiadomo, do czego mogłaby ona służyć histonowi. Przez tę domenę macro-H2A jest trzykrotnie większy od kanonicznego H2A. Znajduwany jest w największych ilościach w nieaktywnym chromosomie X (Costanzi i Pehrson, 1998), heterochromatynowych foci związanych ze starzeniem (ang. *senescence-associated heterochromatic foci*, SAHF, Zhang i in., 2005) i dużych domenach wyciszonych transkrypcyjnie (Gamble i in., 2010), co sugeruje jego rolę w wyciszaniu transkrypcyjnym genów. Zostało to zresztą w kilku pracach pokazane, a negatywny wpływ macro-H2A na transkrypcję potwierdzono również metodami *in vitro* (Doyen i in., 2006a). Sprawę komplikują jednak fakty takie jak ten, że macroH2A w istocie nie jest wymagany do inaktywacji chromosomu X (Changolkar i in., 2007), a także niespodziewanie dla niektórych genów obecność macro-H2A wydaje się ułatwiać ucieczkę przed heterochromatynowym wyciszeniem i podbijać ich ekspresję (Gamble i in., 2010). Mechanizm, który stoi za tak przeciwstawnymi funkcjami macro-H2A wciąż

pozostaje do odkrycia. Jednak jest to też kolejny przykład, jak bardzo złożona i wieloznaczna może być funkcja modyfikacji chromatyny.

Z kolei rozpowszechnionymi (występującym u wszystkich eukariotów) wariantami histonu H3 są CenH3 (zwany również CENP-A) oraz H3.3.

Prawdopodobnie kilka razy dochodziło do powstania H3.3, tak, że w królestwach roślin i zwierząt wyewoluowały one konwergentnie (Thatcher i Gorovsky, 1994; Waterborg i Robertson, 1996; Malik i Henikoff, 2003). Jest to tym bardziej zaskakujące, że H3.3 różni się od kanonicznego H3 zaledwie czterema do pięciu aminokwasów (z których trzy leżą w domenie zwinięcia histonowego, Malik i Henikoff, 2003, Weber i Henikoff, 2014). Początkowo H3.3 rozpoznany został jako forma H3 ulegająca ekspresji w czasie całego cyklu komórkowego, a więc służąca do uzupełniania H3 w nukleosomach traconych w czasie transkrypcji czy naprawy DNA (Malik i Henikoff, 2003). Z czasem zaczęto wskazywać na jego kluczową rolę w procesach takich jak gametogeneza, zapłodnienie i różnicowanie komórek u tkankowców (opisane m. in. przez Filipescu i in., 2013). Badania całogenomowe wskazywały na wzbogacenie nim sekwencji wzmacniających (ang. *enhancers*), promotorów i ciał genów (Venkatesh i Workman, 2015). Jego obecność w ciałach genów pozytywnie koreluje z ich aktywnością transkrypcyjną, a w sekwencjach wzmacniających – z wiązaniem czynników transkrypcyjnych (Jin i in., 2009; Goldberg i in., 2010). Stąd H3.3 wiązano z utrzymywaniem stanu dostępności DNA do różnych czynników. Obecność H3.3 nawet w nieaktywnych promotorach tłumaczono utrzymywaniem genów w stanie „przygotowania” do reaktywacji (ang. *poised state*). Jednak znowu niekiedy H3.3 jest wymagany do tworzenia heterochromatyny (Wong i in., 2009; Santenard i in., 2010). W 2007 roku Jin i Felsenfeld pokazali, że nukleosomy kręgowców zawierające wariant H3.3 zamiast H3 są znacznie mniej stabilne w wysokich stężeniach soli (150 mM NaCl); co więcej niestabilność ta jeszcze wzrasta, gdy w tym samym nukleosomie występuje wariant H2A.Z zamiast kanonicznego H2A. Nukleosomy zawierające oba warianty występują szczególnie w rejonach NDR (ang. *nucleosome-deficient regions*) powstających przy TSS genów, a także w sekwencjach wzmacniających i izolatorowych (Jin i in., 2009). Zdaniem badaczy połączenie obu wariantów miałyby zatem tworzyć w tych miejscach niestabilne nukleosomy, ułatwiając białkom dostęp do DNA. Do jednak innych wniosków doszli Hartley i Madhani

(2009) – w ich badaniach H2A.Z nie był konieczny do powstania NFR, ale powstanie NFR najprawdopodobniej promowało wprowadzanie tam H2A.Z. Ciekawa jest też całkiem odmienna obserwacja poczyniona u *A. thaliana* - występowanie H3.3 w chromatynie jest tu negatywnie skorelowane z H2A.Z (Stroud i in., 2012). Z kolei histon o cechach H3.3 jest jedyną formą H3 oprócz CenH3 występującą u *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* - nie mają one tzw. kanonicznych H3 (Malik i Henikoff, 2003).

1.3. H2A.Z jako uniwersalny wariant histonowy

H2A.Z jest wariantem histonu H2A, który to histon posiada największą liczbę dotąd poznanych wariantów. Na tle innych wariantów H2A.Z cechuje jednak uniwersalne występowanie wśród organizmów eukariotycznych oraz wyjątkowo duża zachowawczość sekwencji aminokwasowej. Dla przykładu H2A.Z u *Xenopus laevis* jest podobne do H2A tylko w 57% (mimo że ogólna budowa nie odbiega znacznie od H2A), a do ludzkiego H2A.Z aż w 88 % (Iouzalén i in., 1996). Sugeruje to, że H2A.Z wyodrębnił się wcześniej w ewolucji od H2A (Talbert i Henikoff, 2010; Baldi i Becker, 2013).

H2A.Z występuje właściwie na całej przestrzeni genomów, jednak nie losowo. Najogólniej można by za Ranjanem i in. (2015) określić H2A.Z jako uniwersalny znacznik promotorów genów, sekwencji wzmacniających i innych sekwencji regulatorowych eukariotycznej chromatyny. Jest to jednak bardzo uproszczone określenie.

H2A.Z jako uniwersalnie występujący wariant bada się w różnych gatunkach. Zazwyczaj stanowi on nie więcej niż kilka - kilkanaście procent puli H2A w komórce, ulegając ekspresji niezależnie od fazy cyklu komórkowego (4% H2A w komórkach mysich - West i Bonner, 1980 - i 9% H2A u drożdży - Luk i in., 2010). Co ważne, w przeciwieństwie do wielu enzymów modyfikujących histony, których brak często nie wpływa znacząco na rozwój i żywotność organizmu, brak H2A.Z jest letalny dla wielu eukariotów (w rozwoju embrionalnym), począwszy od *Tetrahymena thermophila* (Liu i in., 1996), przez muszkę owocową (Clarkson i in., 1999) i żabę szponiastą (Ridgway i in., 2004) po mysz domową (Faast i in., 2001). Wskazuje to na istotną i ewolucyjnie zakonserwowaną funkcję, jaką H2A.Z musi spełniać u wielokomórkowych eukariotów. U drożdży bowiem brak H2A.Z (Htz1) nie jest letalny; komórki takie

wykazują jednak wolniejszy wzrost (Carr i in., 1994; Santisteban i in., 2000), niestabilność chromosomową (Carr i in., 1994; Krogan i in., 2004) i nadwrażliwość na mutageny oraz stres środowiskowy (Jackson i Gorovsky, 2000; Kobor i in., 2004; Mizuguchi i in., 2004). Wciąż też nie wiadomo, jakie skutki niesie całkowity brak H2A.Z u roślin.

Znamienne, że pomimo uniwersalności H2A.Z u eukariotów, charakteryzuje się on u poszczególnych organizmów pewnymi unikalnymi cechami. U muszki owocowej H2A.v ma cechy dwóch wariantów histonowych naraz - H2A.Z i H2A.X (Raisner i Madhani, 2006). Z kolei u kręgowców występują dwa geny H2A.Z, różniące się promotorami i profilem ekspresji w tkankach (Dryhurst i in., 2009). Dodatkowo *H2A.Z2* ulega w komórkach ludzkich alternatywnemu splicingowi, zjawisku atypowemu dla transkryptów histonów (Bönisch i Hake, 2012).

Wariant H2A.Z na tle innych białek H2A u *A. thaliana*

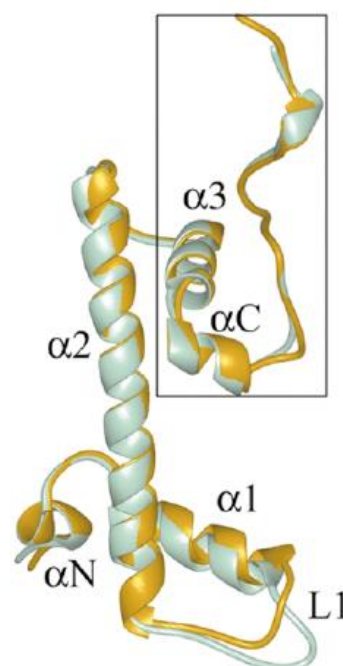
U *Arabidopsis* H2A.Z jest reprezentowany przez trzy geny: *HTA8*, *HTA9* i *HTA11*. Poza nimi oprócz czterech genów kanonicznego H2A występują dwa geny wariantu H2A.X, zaangażowanego w naprawę pęknięć dwuniciowych DNA (*HTA3* i *HTA5*, Lang i in., 2012) i trzy niedawno zidentyfikowanego wariantu H2A.W, charakterystycznego dla heterochromatyny i promującego jej powstawanie (*HTA6*, *HTA7* i *HTA12*, Yelagandula i in., 2014). Inne warianty histonu H2A, występujące u kręgowców – H2A.Bbd i macroH2A - nie zostały znalezione u roślin (Zhou i in., 2015).

1.3.1. Różnice strukturalne między wariantem H2A.Z a kanonicznym H2A

Po raz pierwszy struktura przestrzenna histonu H2A.Z (mysiego) w nukleosomie została krystalograficznie zbadana przez zespół Luger w 2000 roku (Suto i in., 2000). Pomimo faktu, że sekwencja aminokwasowa H2A.Z pokrywa się z kanonicznym H2A tylko w ok. 60%, ogólna budowa typowa dla H2A jest zachowana (**Ryc. 1**). W około 130-aminokwasowym białku między wolnymi końcami N i C występuje pięć α -helis – tzw. wydłużenie N, helisy $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ oraz wydłużenie C. Helisy $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ wraz z występującymi między nimi pętlami L1 i L2 tworzą typowe zwinięcie histonu (ang. *histone fold*). Największe różnice w stosunku do H2A zaobserwowano w tzw. domenie dokującej,

odpowiedzialnej za oddziaływanie z tetramerem (H3-H4)₂. Tworzona ona jest głównie przez helisy α_3 i $\alpha\text{-C}$, a substytucja Gln 104 \rightarrow Gly 107 miałyby nieco destabilizować wiązanie z histonem H3. Z kolei przez substytucje Asn94 \rightarrow Asp97, Lys95 \rightarrow Ser98 oraz delecję po reszcie 100 wydłużeniu uległa tzw. kieszeń kwasowa, tworzona przez dimer H2A-H2B. W niej dochodzi do oddziaływania z końcem N histonu H4 z sąsiedniego nukleosomu, co ma znaczny wpływ na tworzenie chromatynowych struktur wyższego rzędu. Wyżej wymienione zmiany miałyby stabilizować włókno 30 nm i destabilizować struktury trzeciorzędowe. Kolejne znaczące różnice aminokwasowe odnotowano w pętli L1 tworzonej przez helisy α_1 i α_2 , przez którą to pętlę histon kontaktuje się z drugim białkiem typu H2A w nukleosomie. Co ciekawe, autorzy postulowali, że ze względów sterycznych niemożliwe jest współwystępowanie H2A.Z i kanonicznego H2A w jednym nukleosomie. Jednakże zarówno Luk i in. (2010) w pączkujących drożdżach piekarskich, jak i zespół Henikoffa (Weber i in., 2010) u muszki owocowej (a po nich i inni) dowiedli istnienia tak zbudowanych nukleosomów. Horikoshi i in. (2016) rozwiązując strukturę heterotypowego nukleosomu, tj. zawierającego zarówno H2A i H2A.Z, pokazali, że w takim nukleosomie pętla L1 H2A.Z ulega dużym zmianom strukturalnym, zapobiegając zawadzie sterycznej. Nie zmienia to jednak faktu, że nukleosomy homotypowe (zawierające dwa histony H2A.Z) mogą mieć inne właściwości niż heterotypowe (zawierające tylko jeden H2A.Z; Weber i in., 2010).

Ryc. 1. Nałożone struktury mysiego H2A.Z (szaroniebieski) i H2A z *Xenopus laevis* (złoty) z pracy Suto i in. (2000). Oznaczono poszczególne helisy α , a także rejony największych różnic – pętlę L1, która kontaktuje się z drugim białkiem typu H2A, oraz domenę dokującą (w prostokącie), kotwiczącą dimer H2A-H2B w tetramerze (H3-H4)₂.



1.3.2. Wpływ H2A.Z na stabilność i pozycję nukleosomu oraz na tworzenie skondensowanych form chromatyny

Wpływ H2A.Z na stabilność nukleosomu

Znanych jest kilka badań na temat wpływu H2A.Z na stabilność nukleosomu, ale ich wyniki nie są zgodne. Według Zhanga i in. (2005a) Htz1 był łatwiej wymywany z drożdżowej chromatyny płukaniem o rosnącej sile jonowej niż jego kanoniczny odpowiednik, co miaoby wskazywać na destabilizujący wpływ Htz1 na nukleosom. Z kolei badania nad wymywaniem z rekonstruowanych nukleosomów histonów z *Xenopus laevis* z użyciem techniki FRET sugerowały przeciwny efekt – większą stabilność nukleosomów z H2A.Z (Park i in., 2004). Podobnymi metodami nieco większą stabilność nukleosomu potwierdził Hoch i in. (2007). Na podobną stabilność nukleosomów H2A.Z/H2B i H2A/H2B wskazywały badania Jina i Felsenfelda (2007). Różnice w wynikach mogą odzwierciedlać obserwowane różnice strukturalne w stosunku do H2A, czyli mocniejsze kontakty z drugim H2A w obrębie pętli L1 oraz słabsze z H3 w obrębie domeny dokującej (Suto i in., 2000). W swojej pracy Horikoshi i in. (2016) pokazali natomiast, że dimery H2A.Z-H2B dysocjują z nukleosomu homotypowego (ZZ) przy niższej temperaturze niż dimer H2A-H2B z nukleosomu z wyłącznie kanonicznym H2A, za to nukleosom heterotypowy jest trochę bardziej stabilny; podobne rezultaty uzyskali przy wysokim stężeniu soli (250 mM NaCl). Ostateczny wpływ na nukleosom może też być modulowany modyfikacjami potranslacyjnymi czy oddziaływaniami ze specyficznymi białkowymi partnerami. Niedawne symulacje dynamiki molekularnej przeprowadzone przez Bowermana i Wereszczynskiego (2016) sugerują, że sama obecność H2A.Z ma nikły wpływ na stabilność nukleosomu. Różnice w wynikach poprzednich grup mogły więc nawet zależeć od użytej metody. Osobiście zastanawia mnie, czy na obserwowaną przez Zhanga i in. (2005a) destabilizację nukleosomu z Htz1 mógł mieć wpływ po prostu fakt, że u drożdży powszechnie występującym w chromatynie białkiem H3 jest H3.3 (Malik i Henikoff, 2003)?

Jak już wspominałam wcześniej, Jin i Felsenfeld (2007) badając chromatynę z komórek HeLa zaobserwowali, że nukleosomy zawierające wariant histonowy H3.3 zamiast kanonicznego H3 są dużo bardziej labilne w wyższych stężeniach soli (150 mM NaCl). Co więcej niestabilność ta jeszcze wzrasta, gdy w

tym samym nukleosomie współwystępuje H2A.Z. Labilne nukleosomy zawierające oba warianty okazały się występować w regionach ubogich w nukleosomy (NDR) w promotorach, sekwencjach wzmacniających i izolatorowych (Jin i in., 2009). Według badaczy nukleosomy te były często tracone w preparatyce z użyciem roztworów o wysokim stężeniu soli. Obecności nukleosomów podatnych na rozpad (ang. *fragile nucleosomes*) w obrębie NDR dowodzą badania u innych gatunków, np. u drożdży (Kubik i in., 2015). Tramantano i in. (2016) twierdzą jednak, że te nukleosomy nie zawierają H2A.Z.

Wpływ H2A.Z na pozycję nukleosomu

Stabilność nukleosomu wpływa na poziom obsadzenia danego fragmentu chromatyny nukleosomami (ang. *occupancy*). Czy jednak H2A.Z wpływa na ich pozycję (ang. *positioning*)? Wiadomo, że H2A.Z u wielu gatunków wzbogaca nukleosomy wokół NDR na początku genów, a te nukleosomy są zwykle mocno pozycjonowane. Czy jednak to H2A.Z może mieć wpływ na ich pozycję? Przeprowadzone dotąd badania pokazały, że w pewnym stopniu tak. Otóż Fan i in. (2002) pokazali, że w warunkach *in vitro* kurzy nukleosom zawierający H2A.Z wykazuje bardziej stałe położenie niż nukleosom z kanonicznymi H2A. Oktamer z kanonicznym H2A najczęściej przyjmował dwie pozycje na użytej sekwencji DNA z częstością odpowiednio 44% i 29%, natomiast ten z H2A.Z - te same pozycje w proporcji 70% do 19%, mniejszy udział miały też w tym wypadku pozostałe pozycje. Podobnie drożdżowe (Guillemette i in., 2005) i ludzkie (Hardy i in., 2009) nukleosomy z H2A.Z przyjmują ściślej określone pozycje.

Wpływ H2A.Z na strukturę chromatyny

Jedną z najwcześniej przypisanych ról H2A.Z jest udział w zapobieganiu ektopowemu rozprzestrzenianiu się heterochromatyny u drożdży (Meneghini i in., 2003). Htz1 wzbogaca euchromatynowe rejony sąsiadujące z granicami heterochromatyny, a u mutantu *htz1* dochodziło do wyciszenia genów leżących w pobliżu telomerów.

Podjęto się również sprawdzenia, jak H2A.Z może bezpośrednio modulować strukturę chromatyny. W badaniach *in vitro* Fana i in. (2002) sznury nukleosomów zawierające H2A.Z w porównaniu do tych z kanonicznym H2A promowały kondensację wewnątrz sznura, analogiczną do hipotetycznego włókna

30 nm, a osłabiały oddziaływania między włóknami (ich oligomeryzację). Dalsze badania tej samej grupy badawczej pokazały, że za promowanie powstawania tego typu włókien i inhibicję ich asocjacji najprawdopodobniej odpowiedzialna jest wydłużona kieszeń kwasowa H2A.Z. Wariant histonowy H2A.Bbd bowiem nie posiada w ogóle tej kieszeni i wykazuje przeciwny wpływ (Zhou i in., 2007).

H2A.Z współdziała również z białkiem HP1 α (zakonserwowanym od drożdży po człowieka) w tworzeniu heterochromatyny perycentrycznej i domen heterochromatynowych w euchromatynie (Fan i in., 2004).

1.3.3. Specyfika rozmieszczenia H2A.Z w genomach

Opracowanie metody immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) i rozwój technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA (ang. *high-throughput sequencing*) umożliwiło poznanie lokalizacji licznych czynników chromatynowych, w tym H2A.Z, w wielu genomach. Okazało się, że mimo występowania na przestrzeni większości genomu, H2A.Z szczególnie wzbogaca 5' końce genów zarówno drożdży *S. cerevisiae* (Raisner i in., 2005; Zhang i in., 2005a), nicienia *C. elegans* (Whittle i in., 2008), muszki *D. melanogaster* (Mavrich i in., 2008), komórek mysich (Creyghton i in., 2008), jak i rośliny *A. thaliana* (Zilberman i in., 2008). U wszystkich organizmów najwyższe piki obecności H2A.Z obserwowano w nukleosomie wsięępującym zaraz za TSS (nukleosom +1); w niektórych genomach duże wzbogacenie obserwowano również w nukleosomie z drugiej strony NDR, tj. nukleosomie -1. Może to jednak wynikać z faktu, że w niektórych genomach często dochodzi do rozpoczęcia transkrypcji z jednego miejsca w obu kierunkach – wtedy nukleosom -1 dla jednego genu może pełnić też rolę nukleosomu +1 dla drugiego genu (Tramantano i in., 2016).

Inną uniwersalną cechą występowania H2A.Z w genomach jest silna antykorelacja między obecnością H2A.Z i obecnością metylacji DNA, którą początkowo zaobserwowano w genomie *Arabidopsis* (Zilberman i in., 2008), potem również w innych genomach (Zemach i in., 2010). Prawdopodobnie skutkiem tej zależności jest brak H2A.Z w nukleosomach znajdujących się w transpozonach (Zilberman i in., 2008).

1.3.4. Modulacja roli H2A.Z w aktywności genów przez jego modyfikacje potranslacyjne

H2A.Z, podobnie jak i inne histony, podlegać może różnym modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak acetylacja (szerzej zreferowana w punkcie **1.4.6**), metylacja, ubikwitynacja i SUMOilacja lizyny.

W komórkach mysich monometylacji ulegają K4 i K7 histonu H2A.Z, uniemożliwiając acetylację w tych miejscach. Antykorelacja H2A.ZK4me1K7me1 i zacetylowanego H2A.Z oraz korelacja z H3K27me3 w promotorach niektórych genów sugerują represyjny charakter tych metylacji H2A.Z (Binda i in., 2013).

Z kolei monoubikwitynacji w komórkach ludzkich ulegać mogą lizyny znajdujące się na C-końcu H2A.Z – K120, K121 i K125. Reakcję tę przeprowadza podjednostka RING1 kompleksu Polycomb, a monoubikwitynowany H2A.Z występuje w dużych ilościach w inaktywowanym chromosomie X (Sarcinella i in., 2007). Co ciekawe, poza komórkami ssaczymi nie zidentyfikowano nigdzie monoubikwitynowanego H2A.Z (Sevilla i Binda, 2013).

Białka SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) to białka podobne do ubikwityny, które mogą być kowalencyjnie przyłączane do lizyn. U drożdży taka SUMOilacja zachodzi na K126 i K133 w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcie DNA i ma swoją rolę w przemieszczeniu tego pęknięcia do peryferii jądra komórkowego (Kalocsay i in., 2009). SUMOilowany motyw nie jest zachowany w H2A.Z ssaków (Sevilla i Binda, 2013).

1.4. Wymiana H2A.Z z histonem kanonicznym H2A w chromatynie

1.4.1. Wprowadzanie a usuwanie H2A.Z z chromatyny

Dystrybucja i poziom H2A.Z w chromatynie jest wypadkową przeciwstawnych procesów, czyli jego inkorporacji i usuwania z nukleosomów. Dla obu procesów znane są wielopodjednostkowe kompleksy i pojedyncze białka, które przynajmniej w pewnym stopniu przeprowadzają je w sposób zależny od chromatynowego kontekstu. Maszyna dla obu procesów jest ewolucyjnie zakonserwowana. Niektórzy badacze próbują przypisać większą rolę jednemu lub drugiemu procesowi na przykład w kształtowaniu charakterystycznego dla H2A.Z

wzbogacenia nukleosomów w pobliżu TSS. Poza tym obecność H2A.Z może podlegać fluktuacjom związanym z niespecyficznym obrotem (ang. *turnover*) histonów, zachodzącym np. podczas przechodzenia polimerazy w czasie transkrypcji (np. Hardy i in., 2009; Tramantano i in., 2016).

1.4.2. Kompleksy wymieniające wariant H2A.Z

Główne kompleksy wymieniające wariant H2A.Z w chromatynie – kompleks deponujący H2A.Z SWR1 (ang. *Swi2/Snf2-related 1*, inaczej SWR-C – ang. *sick with RSC/Rat1 complex*) i kompleks stamtąd go usuwający INO80 (ang. *inositol requiring 80*, INO80-C) należą do kompleksów remodelujących chromatynę. W ten sposób opisuje się kompleksy białkowe, które zużywają energię zmagazynowaną w ATP do zmian oddziaływań między DNA a histonami, w efekcie przesuując nukleosomy, usuwając dimery typu H2A-H2B czy powodując rozpad całego nukleosomu (Clapier i Cairns, 2009). W szczególnych przypadkach, jakimi są SWR1 i INO80, mogą one przeprowadzać wymianę dimerów histonowych. Oba kompleksy po raz pierwszy zostały opisane u drożdży *S. cerevisiae* i tam najpełniej scharakteryzowane. Składają się z wielu podjednostek, a cztery z nich dzielą ze sobą (Rvb1, Rvb2, Act1 i Arp4). Ich największe i zarazem katalityczne podjednostki – odpowiednio Swr1 i Ino80, posiadają podobne, rozdzielone (ang. *split*) domeny ATPazowe i przez to należą do tej samej rodziny kompleksów remodelujących chromatynę SWI/SNF i podrodziny INO80 (Morrison i Shen, 2009). Dodatkowo, według najnowszych badań z wykorzystaniem zaawansowanych technik jak mikroskopia elektronowa, SWR1 i INO80 wykazują ogólne podobieństwo w budowie, gdzie można łatwo rozróżnić dynamiczny „ogon” oraz bardziej kompaktową „głowę” z heksamerycznym pierścieniem złożonym z podjednostek Rvb1 i Rvb2 (Watanabe i in., 2015).

1.4.3. Budowa kompleksu SWR1

U drożdży kompleks SWR1 składa się z 14 podjednostek: Act1, Arp4, Arp6, Rvb1, Rvb2, Swc2, Swc3, Swc4, Swc5, Swc6, Swc7, Swr1, Yaf9 oraz Bdf1 (Krogan i in., 2003; Kobor i in., 2004; Mizuguchi i in., 2004). Jego całkowita masa wynosi około 1,2-1,5 MDa (Morrison i Shen, 2009). Jak już wspomniano, największą podjednostką z domeną katalityczną (ATP-azową), niezbędną dla

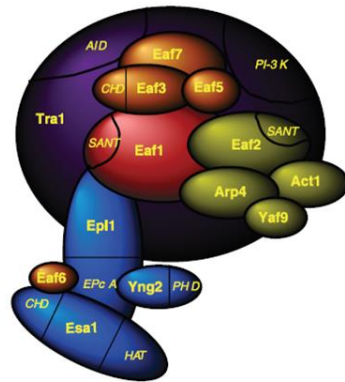
działania kompleksu *in vivo*, jest Swr1 (Mizuguchi i in., 2004). Dzięki badaniom przeprowadzonym na odtworzonych „sznurach nukleosomów” i eksperymentom typu *pull-down* Wu i in. (2005, 2009) stwierdzili, że z częścią N-kończącą Swr1 asocjują Act1, Arp4, Swc4, Swc5, Yaf9, Swc7 i Bdf1, a z domeną ATPazową - Arp6, Swc2, Swc4, Swc6 oraz Rvb1 i Rvb2; określili również wzajemne zależności między podjednostkami. Wyróżnili białka oddziałujące z Htz1- Swc2 i Swr1, oddziałujące zarówno z nukleosomem, jak i Swc2 - Swc6 i Arp6, a także z acetylowanymi resztami histonów H3 i H4 - Bdf1. Kompleks SWR1 wyizolowany ze szczepów *swc2Δ*, *swc5Δ*, *swc6Δ*, *yaf9Δ* i *arp6Δ* miał znacząco zredukowaną aktywność wymiany histonów. W szczepie mutantu *arp6Δ* mogło to być spowodowane nie tylko utratą oddziaływania z nukleosomami, ale też obserwowaną utratą z kompleksu białek Swc2, Swc3 i Swc6.

Godny uwagi jest fakt, że podczas gdy wiele mutacji dotyczących znaczników chromatynowych nie jest szczególnie szkodliwa dla organizmu, to brak następujących podjednostek SWR1 jest u drożdży letalny: Act1, Arp4, Rvb1, Rvb2 i Swc4. Może to jednak wynikać z faktu, że białka te uczestniczą również w budowaniu innych kompleksów – jak już wspomniano Rvb1, Rvb2, Arp4 i Act1 są składnikami kompleksu INO80, natomiast Arp4, Act1, Swc4 (i Yaf9) należą też do kompleksu acetylotransferazy histonowej NuA4.

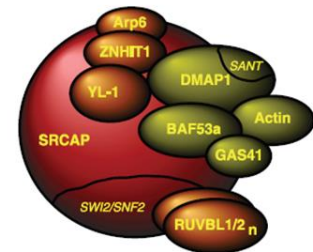
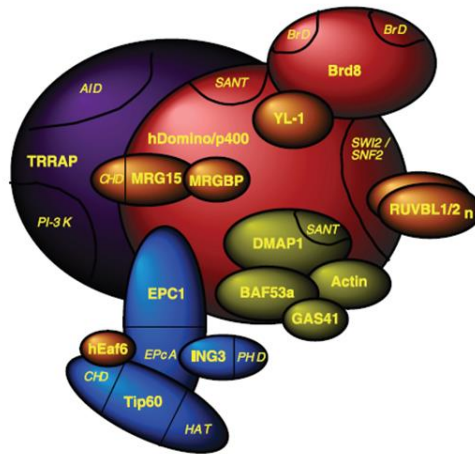
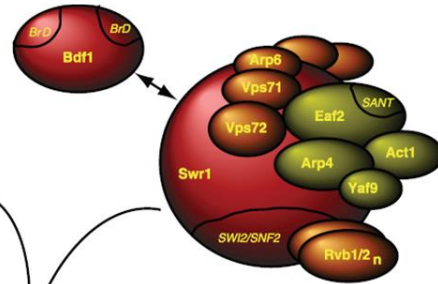
Homologi kompleksu SWR1 w innych organizmach

U człowieka znane są dwa kompleksy odpowiedzialne za inkorporację dimeru z H2A.Z-H2B do nukleosomu – SRCAP i p400/TIP60. Oba posiadają homologi Swr1 – odpowiednio SRCAP (ang. *Snf-2-related CREB-binding protein activator protein*) i p400 (Cai i in., 2005; Ruhl i in., 2006; Choi i in., 2009; Matsuda i in., 2010; Bönisch i Hake, 2012). Kompleks SRCAP ma skład najbardziej podobny do drożdżowego homologa SWR1 i wcześniej stwierdzono jego aktywność inkorporacji H2A.Z do nukleosomu (Ruhl i in., 2006). p400/TIP60 natomiast, którego wszystkie podjednostki są albo homologami SWR1, albo kompleksu acetylotransferazy histonowej NuA4 (ang. *nucleosomal acetyltransferase of histone H4*), łączy dwie funkcje – depozycji H2A.Z i acetylacji histonów (Auger i in., 2008, Ryc. 2). Badania dowodzą, że zarówno SRCAP, jak i p400/TIP60 oddziałują z produktami genów *H2A.Z.1* i *H2A.Z.2* (Matsuda i in., 2010).

**Drożdżowy kompleks NuA4
(acetylacja histonów)**



**Drożdżowy kompleks SWR1
(inkorporacja H2A.Z)**



**Ludzki kompleks SRCAP
(inkorporacja H2A.Z)**

**Ludzki kompleks NuA4/Tip60
(acetylacja histonów, inkorporacja H2A.Z)**

Ryc. 2. Modele drożdżowych i ludzkich kompleksów odpowiedzialnych za inkorporację H2A.Z do chromatyny. U drożdży rolę tę pełni kompleks SWR1, który dzieli kilka podjednostek z innym dużym kompleksem – NuA4, acetylującym histony H2A i H4. U ludzi zidentyfikowano dwa kompleksy wykazujące homologię do SWR1 - SRCAP i NuA4/Tip60. SRCAP przeprowadza wyłącznie wymianę H2A.Z. NuA4/Tip60 oprócz aktywności wymiany H2A.Z wykazuje też aktywność acetylotransferazy NuA4. Skład tego kompleksu i budowa platformowej podjednostki hDomino/p400, wykazującej cechy białek platformowych drożdżowego SWR1 (m. in. domena SWI/SNF) i NuA4 (m. in. domena SANT), wskazują na połączenie obu kompleksów w historii ewolucji. Dotąd nie wiadomo, czy w roślinach występują oddzielne kompleksy typu SWR1 i NuA4, czy ich aktywności są podobnie połączone jak u zwierząt, jednakże u *Arabidopsis* występują homologi białek platformowych obu kompleksów (Noh i Amasino, 2003; Bieluszewski i in., 2015). Rycina z: Auger i in. (2008).

U *A. thaliana* zidentyfikowano homologi większości podjednostek kompleksu SWR1 (Choi i in., 2005b). Ze względu na trudności w uzyskaniu linii z całkowicie wyłączoną ekspresją H2A.Z, ich mutanty chętnie wykorzystywano jako symulację braku H2A.Z w chromatynie. Do tego celu nadają się właściwie mutanty dwóch genów: *PIE1* (ang. *photoperiod-independent early flowering 1*, homolog drożdżowego *Swr1*) i *ARP6* (ang. *actin-related protein 6*). Pozostałe podjednostki albo nie są niezbędne do działania kompleksu, albo występują również w innych kompleksach remodelujących chromatynę, przez co skutki ich wyłączenia trudno byłoby przypisać wyłącznie zaburzeniom w inkorporacji H2A.Z do chromatyny.

Mutanty przypuszczalnego roślinnego kompleksu SWR1: *pie1* i *arp6*

Bez platformowej i katalitycznej podjednostki jaką jest PIE1 roślinny kompleks SWR1 nie mógłby działać. Linie Col z insercją T-DNA w genie *PIE1* wykazują szereg nieprawidłowości rozwojowych. Rośliny są małe, ze skróconym pędem głównym, za to ze zwiększoną liczbą drugo- i trzeciorzędowych pędów, sprawiając wrażenie „krzaczastych”. Liście są bardziej ząbkowane na brzegach, a w niektórych kwiatach pojawiają się nadmiarowe płatki. Rośliny te charakteryzuje również wcześniejsze kwitnienie (zarówno w warunkach dnia krótkiego, jak i dnia długiego) oraz zmniejszona płodność (Noh i Amasino, 2003; March-Díaz i in., 2008).

Podobne, choć mniej mniej intensywne zaburzenia prezentują linie mutantów *arp6*: wcześniejsze kwitnienie, zmniejszenie dominacji wierzchołkowej, ząbkowanie liści, zwiększenie liczby płatków w niektórych kwiatach, zredukowana płodność (Choi i in., 2005b; Deal i in., 2005). Różnice w intensywności zaburzeń fenotypowych mutantów *pie1* i *arp6* wskazują, że PIE1 może mieć dodatkowe funkcje poza kompleksem SWR1.

ARP6 bowiem też jest niezbędny do działania kompleksu SWR1. W drożdżowym kompleksie od obecności Arp6 zależy obecność Swc3, Swc6 i Swc2, wiążącego H2A.Z (badania *in vitro* Wu i in., 2005). Jednakże również u drożdży niezależnie od kompleksu SWR1 Arp6 znaleziono w centromerach, promotorach genów białek rybosomalnych czy niektórych rejonach telomerowych. Samodzielnie Arp6 okazało się pośredniczyć w przemieszczaniu

tych sekwencji do porów w otoczce jądrowej, wpływając na aktywność tamtejszych genów (Yoshida i in., 2010).

U *A. thaliana* kilka grup niezależnie uzyskiwało mutanty *piel* (Noh i Amasino, 2003; Deal i in., 2007) i *arp6* (Choi i in., 2005b; Deal i in., 2005; Kumar i Wigge, 2010). Mutanty te wielokrotnie były badane jako linie o upośledzonej inkorporacji H2A.Z do chromatyny (Deal i in., 2007; March-Díaz i in., 2008; Zilberman i in., 2008; Smith i in., 2010; Qin i in., 2014; Choi i in., 2016; Berriri i in., 2016; Dai i in., 2017; Torres i Deal, 2018).

1.4.4. Inkorporacja dimeru H2A.Z-H2B do nukleosomu przez kompleks SWR1 w modelu drożdżowym

Wprowadzanie wariantu H2A.Z do nukleosomu przebiega na drodze wymiany dimeru H2A-H2B znajdującego się w nukleosomie na dimer H2A.Z-H2B związany z kompleksem SWR1. Do kompleksu SWR1 dimer H2A.Z-H2B doprowadzany jest *in vivo* przez białka opiekuńcze (ang. *chaperones*) histonów. Są nimi: Nap1 (znany chaperon dla dimerów H2A-H2B; ang. *nucleosome assembly protein 1*) i Chz1 (wykazujący preferencję do Htz1-H2B; ang. *chaperone for H2AZ-H2B*), przy ich braku *in vitro* FACT (ang. *facilitates chromatin transcription*) (Luk i in., 2007). Pomagają one też w samym transporcie dimeru do jądra (Straube i in., 2010). Co ciekawe, u *A. thaliana* występują homologii wszystkich tych trzech drożdżowych białek opiekuńczych (podsumowane przez Zhou i in., 2015).

Proces wymiany przebiega etapowo. Usunięcie kanonicznego dimeru H2A-H2B z nukleosomu wymaga hydrolizy ATP przez domenę ATPazową białka Swr1. Badania przeprowadzone *in vitro* przez Luka i wsp. (2010) dowodzą, że do tego konieczna jest zarówno obecność nukleosomu z histonem kanonicznym H2A, jak i związanie dimeru H2A.Z-H2B (lub ewentualnie H2A-H2B); stymulują one katalityczne właściwości domeny ATPazowej. Bardziej szczegółowe analizy pokazały, że w wiązonym dimerze H2A.Z-H2B kluczowe jest rozpoznanie określonych reszt helisy α C H2A.Z (Clarkson i in., 1999; Wu i in., 2005), a w obrębie nukleosomu określonych reszt helisy α 2 histonu H2A i nukleosomowego DNA w tzw. położeniu 2 superhelisy (ang. *superhelix location 2*, SHL2; Ranjan i in., 2015). Następnie wprowadzany jest dimer H2A.Z-H2B związany przez białko Swc2 i być może częściowo Swr1. Powstaje nukleosom

heterotypowy, a więc zawierający jeden dimer z kanonicznym H2A i jeden z wariantem H2A.Z. Taki nukleosom może być dalej przekształcony do homotypowego pod względem obecności H2A.Z (Luk i in., 2010).

Kompleks nie przeprowadza natomiast reakcji odwrotnej, tj. wymiany H2A.Z na H2A. Przynajmniej tak do niedawna uważano. Grupie Petersona (Watanabe i in., 2013) udało się pokazać *in vitro* na rekonstruowanych nukleosomach, że w środowisku specyficznej modyfikacji potranslacyjnej histonu H3, a mianowicie H3K56ac (lub naśladującej jej mutacji H3K56Q), może dochodzić do reakcji przeciwnej - wprowadzania dimeru H2A-H2B przez kompleks SWR1 (oraz INO80) w miejsce H2A.Z-H2B w nukleosomie. Wyniki te spotkały się z krytyką ze strony zespołu Carla Wu, któremu nie udało się ich powtórzyć (Wang i in., 2016). Jednak Watanabe i in. (2016) dodali kolejne badania, potwierdzające ich wcześniejsze obserwacje. Oprócz niejako odwrócenia aktywności SWR1 przez specyficzną acetylację, badacze pokazali, że wyizolowany ze szczepu *swc2Δ* kompleks SWR1, w rezultacie pozbawiony też Swc3, Swc6 i Arp6, również usuwa H2A.Z z nukleosomu, wprowadzając na jego miejsce histon kanoniczny. Autorzy zasugerowali, że białko Swc2 po inkorporacji H2A.Z do nukleosomu jeszcze przez jakiś czas z nim oddziałuje, zapobiegając reakcji przeciwnej. Efekt zaś H3K56Ac tłumaczyli jako zawadę steryczną do interakcji Swc2 z H2A.Z w nukleosomie. Jako argument za tą hipotezą pokazali zmniejszone wzbogacenie w H2A.Z w promotorach genów w szczepie H3K56Q i szczepie o zwiększonym poziomie H3K56Ac, a także deregulację genów częściowo pokrywającą się z deregulacją w *htz1Δ*. Wyniki te uzmysławiają kolejne mechanizmy regulacji poziomu H2A.Z w chromatynie.

Co ciekawe, SWR1 jako jedyny ze zbadanych pod tym względem kompleksów remodelujących chromatynę nie wykazuje właściwości przesuwania nukleosomów (Ranjan i in., 2015).

Preferencja wiązania kompleksu SWR1 (i INO80) do rejonów ubogich w nukleosomy (ang. *NDRs*)

Badania całogenomowe potwierdzają przewidywaną kolokalizację podjednostek kompleksu SWR1 i białka H2A.Z w chromatynie. Według Ventersa i Pugh (2009) wzbogacenie w białko Swr1 rejonów +1 i -1 nukleosomu jest nawet proporcjonalne do wzbogacenia w H2A.Z.

Inna, interesująca cecha występowania kompleksów SWR1 i INO80 w chromatynie drożdży wyłania się z badań Yena i in. (2013). Analizy rozmieszczenia większości ich podjednostek techniką ChIP-exo wskazują, że wiele z nich wzbogaca rejony NDR na 5' końcach genów (Yen i in., 2013). Za tę szczególną selektywność kompleksu SWR1 w stosunku do nukleosomu +1 wydaje się odpowiadać głównie podjednostka Swc2, konieczna zresztą do oddziaływania z chromatyną (Wu i in., 2009; Morillo-Huesca i in., 2010). W szczepie drożdży *swc2Δ* znacznie bowiem spada wzbogacenie rejonów około +1 nukleosomu zarówno w białko platformowe Swr1, jak i w H2A.Z (Yen i in., 2013).

Z kolei Ranjan i in. (2013) pokazali *in vitro* preferencyjne przyłączanie się kompleksu SWR1 do rejonów pozbawionych nukleosomów. Do rekonstruowanego dinukleosomu kompleks SWR1 tym wydajniej się przyłączał, im dłuższy był odcinek linkerowego DNA (w kolejności od najwydajniejszego wiązania – 120, 60 i 20 pz). Obserwacja ta miała odzwierciedlenie także w warunkach *in vivo* – ilość związanego białka Swr1 na przestrzeni całego chromosomu była proporcjonalna do długości NDR. Tu badacze również zasugerowali kluczową rolę Swc2 w przyłączaniu się kompleksu SWR1 do NDR. Zarówno bowiem w warunkach *in vitro* kompleks wyizolowany ze szczepu *swc2Δ* nie wiązał się prawie w ogóle do dinukleosomów, jak i *in vivo* w szczepie *swc2Δ* znacząco zmniejszone było występowanie Swr1 na przestrzeni całego chromosomu. Co istotne, również kompleks wyizolowany ze szczepu *arp6Δ* miał znacznie zredukowaną zdolność do wiązania dinukleosomu (choć w mniejszym stopniu) (Ranjan i in., 2013).

1.4.5. Kompleks INO80 w usuwaniu H2A.Z z chromatyny

Wpływ kompleksu INO80 na poziom nukleosomowego H2A.Z po raz pierwszy pokazał Papamichos-Chronakis i in. (2011). INO80 okazał się usuwać *in vitro* dimery H2A.Z-H2B z nukleosomów, zastępując je dimerami H2A-H2B, zużywając do tego energię ATP. W mutancie drożdżowym *ino80Δ* na przebadanym mikromacierzowo fragmencie genomu (chromosom III z 230 dodatkowymi promotorami) nie dochodziło jednak do prostego zwiększenia ilości H2A.Z w chromatynie, ale raczej do globalnego zaburzenia jego normalnej

dystrybucji (zwłaszcza do zmniejszenia dynamicznego zakresu poziomów Htz1). Mimo to negatywne skutki fenotypowe *ino80Δ* (niestabilność genomu) badacze przypisali nie tyle zaburzonej lokalizacji Htz1, co niemożności usuwania jego niezacetylowanej formy. W mutancie bowiem znacznie spadała ogólna ilość Htz1 zacetylowanego na K14, a wprowadzenie do niego formy imitującej zacetylowany na N-końcu H2A.Z znosiło ten fenotyp (Papamichos-Chronakis i in., 2011) (por. 1.4.6. Związek H2A.Z z acetylacją histonów).

Zupełnie innych wyników dostarczyły całogenomowe analizy Yena i in. (2013). W mutancie *arp5Δ* (jest to gen niezbędny do aktywności kompleksu INO80 - Shen i in., 2003) dochodziło do aż 20-krotnego zwiększenia poziomu H2A.Z w chromatynie, głównie w nukleosomie +1. Przeprowadzana zaś reakcja usuwania dimeru H2A.Z-H2B przez INO80 zdawała się promować rozpad całego nukleosomu - w miejscach działania INO80 autorzy zaobserwowali wzrost obrotu (ang. *turnover*) histonu H3, który zanikał w *arp5Δ* (Yen i in., 2013).

Z kolei najnowsze doniesienia Tramantano i in. (2016) pokazują brak jakiegokolwiek wpływu usunięcia (techniką *anchor away*) Ino80 z jądra komórkowego na poziom chromatynowego Htz1. Jak więc widać, wpływ kompleksu INO80 na kształtowanie dystrybucji i poziomu H2A.Z w chromatynie wciąż nie jest jasny.

Poza wymianą dimerów H2A.Z-H2B na H2A-H2B w nukleosomie kompleks INO80 posiada aktywność przesuwania nukleosomów (Shen i in., 2003; Udugama i in., 2011). Nie jest jednak w tym zbyt efektywny, jako że przesuwa nukleosomy około 80 razy wolniej niż inny znany kompleks remodelujący chromatynę ISW2 (Brahma i in., 2017). Najnowsze badania pokazują, że zarówno przesuwanie nukleosomów, jak i wymiana dimerów histonowych zachodzi poprzez przesuwanie przez INO80 DNA na powierzchni dimeru H2A-H2B, co wytwarza odpowiednie naprężenie skręcające (ang. *torsional strain*) i powoduje odwiniecie DNA z dimeru. Jest to mechanizm całkowicie odmienny od innych znanych kompleksów remodelujących nukleosomy, z rodzin ISWI bądź SWI/SNF (Brahma i in., 2017). Po związaniu ATP, kompleks dziewięć razy częściej przeprowadza wymianę H2A.Z na H2A niż odwrotny proces i najprawdopodobniej wiąże się to z obserwowanym czterokrotnie szybszym przesuwaniem nukleosomów z H2A.Z niż z H2A przez INO80. Nie jest znana

przyczyna tego szybszego przesuwania, jednak autorzy wykluczają większą preferencję kompleksu do nukleosomów z H2A.Z czy większą mobilność takich nukleosomów. Dodatkowo zwracają uwagę, że mechanizm działania INO80 jest na tyle powolny, że w promotorach genów większy wpływ na usuwanie H2A.Z mogłaby mieć polimeraza DNA; tłumaczyłoby to stosunkowo niewielki wpływ INO80 na poziom chromatynowego H2A.Z w niektórych badaniach (Brahma i in., 2017).

Roślinny homolog Ino80

U *Arabidopsis thaliana* również zidentyfikowano homologa katalitycznej podjednostki kompleksu INO80 – AtINO80. Mutant insercyjny wykazuje się mniejszymi rozmiarami, późnym kwitnieniem (w odróżnieniu od mutantów kompleksu SWR1, które charakteryzuje wcześniejsze kwitnienie), a także mniejszą ilością wytwarzanego pyłku oraz krótszymi łuszczynekami z mniejszą liczbą nasion. Poza tym wykazuje nadwrażliwość na stres genotoksyczny, co może być spowodowane zaburzeniem udziału H2A.Z w odpowiedzi na tego typu stres (Zhang i in., 2015). W genach deregulowanych w mutancie nadreprezentowane są geny odpowiedzi na różne czynniki, o których wiadomo z innych prac, że ulegają nadmiernej ekspresji przy niedoborze H2A.Z w chromatynie rośliny. Jednak wykonana analiza poziomu H2A.Z w trzech genach – negatywnych regulatorach kwitnienia, których ekspresja wzrasta w genotypie *atino80* - nie wykazała akumulacji H2A.Z w tych genach. Możliwe więc, że nie są one bezpośrednio regulowane przez H2A.Z (Zhang i in., 2015).

Nie wiadomo, czy INO80 usuwa H2A.Z u zwierząt. U człowieka aktywność taką posiada natomiast białko opiekuńcze ANP32E (Obri i in., 2014)

1.4.6. Związek H2A.Z z acetylacją histonów

H2A.Z wykazuje szerokie zależności z acetylacją histonów. U drożdży razem z kompleksem SWR1 oczyszcza się białko Bdf1 (ang. *bromodomain factor1*) (Krogan i in., 2003; Kobor i in., 2004). Jest to luźno związany bromodomenowy komponent czynnika transkrypcyjnego TFIID, który u bardziej złożonych eukariotów zawiera się w C-końcowej części czynnika TAF1 (Matangkasombut i in., 2000). Niemniej Bdf1 dzięki obecności dwóch bromodomen rozpoznaje acetylację histonu H3 i H4 (Matangkasombut i Buratowski, 2003). Z kolei

Raisner i in. (2005) pokazali, że mutacje acetylotransferaz histonowych *eafl* (ang. *Esa1-associated factor 1*) oraz *elp3* (ang. *Elongator complex protein 3*) powodują redukcję poziomu Htz1 w promotorach kilkunastu badanych genów u drożdży. Podobny skutek odnosiło uniemożliwienie acetylacji niektórych lizyn H3 (K9, K14) i H4 (K5, K12) przez użycie mutantów z lizynami podmienionymi przez argininy, jak również usunięcie Bdf1 z jednoczesnym obniżeniem ekspresji (ang. *knockdown*) jej homologa Bdf2 (Raisner i in., 2005).

Uzyskaną przez siebie dystrybucję Htz1 u drożdży Zhang i in. (2005) porównali z dystrybucjami 11 acetylacji histonów, opisanymi przez Kurdistaniego i in. (2004). Według nich Htz1 silnie pozytywnie koreluje z H3K14ac i negatywnie z H3K27ac, aczkolwiek prezentowane przez nich współczynniki korelacji wcale nie są duże (odpowiednio 0,28 i -0,35). Badacze twierdzili również (ale nie pokazali odpowiednich wyników w pracy), że podmiana pewnych lizyn w Htz1 na aminokwasy nieacetylowane nie skutkowałą drastyczną zmianą ogólnej dystrybucji H2A.Z, ale jej zmianą w poszczególnych genach. Autorzy pokazali natomiast, że w mutancie acetylotransferazy odpowiedzialnej za acetylację H3K14 *gcn5Δ* (ang. *general control of amino acid synthesis protein 5*) i mutancie *bdf1Δ* globalnie obniżał się poziom Htz1, zwłaszcza w promotorach genów najbardziej nim obsadzonych (w innych mutantach - acetylotransferazy *sas3Δ* i *bdf2Δ* - zmiany były znacznie mniejsze).

Kolejne badania pokazywały, że H2A.Z wprowadzany jest w rejonach około-telomerowych chromosomów drożdży zależnie od występowania acetylacji H4K16, wprowadzanej przez kompleks SAS (ang. *something about silencing*). Działanie tego kompleksu przeciwdziała wyciszającemu wpływowi deacetylazy Sir2 (ang. *sirtuin 2*), wyznaczając granice telomerowej heterochromatyny (Shia i in., 2006). Jako że dystrybucja Htz1 nie wydaje się globalnie korelować z poziomem H4K16ac (Zhang i in., 2005), możliwe, że ta zależność istnieje tylko w tym, określonym miejscu. Faktycznie, 30% genów znajdujących się w zasięgu 20 kbp od końców chromosomu ulegało znaczącej represji w podwójnym mutancie *sas2Δ htz1Δ* w porównaniu nawet do pojedynczych mutantów *sas2Δ* i *htz1Δ* (Shia i in., 2006). Również grupa Côté obserwowała kilkukrotny wzrost poziomu Htz1 w telomerach drożdży po nadekspresji białka Sas2 (Altaf i in., 2007).

H2A.Z jest powiązany funkcjonalnie z kompleksem HAT NuA4

Szczególny związek wykazuje H2A.Z z kompleksem acetylotransferazy histonowej NuA4 (ang. *nucleosomal acetyltransferase of histone H4*). Jest to wielopodjednostkowy kompleks, mający wpływ na transkrypcję i naprawę DNA. Wiąże się do promotorów wielu silnie transkrybowanych genów (Robert i in., 2004), w tym genów białek rybosomalnych (Reid i in., 2000), gdzie hiperacetyluje chromatynę, ułatwiając transkrypcję, jak to szczegółowiej opisano w przypadku genu *PHO5* (Nourani i in., 2004). Jego katalityczna podjednostka, Esa1 (ang. *essential Sas2-related acetyltransferase 1*), jest jedynym białkiem typu HAT (ang. *histone acetyltransferase*) niezbędnym dla żywotności drożdży *S. cerevisiae* (Smith et al., 1998). Cztery podjednostki tego kompleksu, tj. Esa1, Epl1, Yng2 i Eaf6, tworzą subkompleks o nazwie Piccolo NuA4 (picNuA4), który występuje również samodzielnie i odpowiada za globalną, nieukierunkowaną acetylację histonów H2A i H4 (Boudreault i in., 2003; Doyon i Côté, 2004), w odróżnieniu od bardziej specyficznego działania pełnego NuA4. Kompleks ten u drożdży dzieli cztery podjednostki z kompleksem SWR1: Arp4, Act1, Swc4 i Yaf9 (Doyon i Côté, 2004). Co więcej, u ludzi (i drozofili) oba kompleksy połączone są w jeden Tip60/p400, wykazujący obie aktywności – acetylacji histonów i inkorporacji wariantu H2A.Z do chromatyny (Doyon i Côté, 2004; Kusch i in., 2004). Ponadto pokazano, że podjednostka Bdf1 kompleksu SWR1 genetycznie oddziałuje z Esa1 i w istocie wiąże acetylowany H4 (Matangkasombut i Buratowski, 2003). W mutancie drożdży posiadającym skrócone białko Epl1, nie dochodzi do utworzenia pełnego kompleksu NuA4; szczep taki jest żywotny (wciąż funkcjonuje w nim picNuA4), ale jednoczesne usunięcie Htz1 lub Swr1 skutkuje syntetyczną letalnością (Auger i in., 2008). W „modelowym” genie *PHO5*, w którego promotorze w czasie jego aktywacji dochodzi do związania NuA4 i acetylacji tamtejszych histonów, brak NuA4 powoduje obniżenie poziomu zwiazanego tam Htz1, jednak tylko do pewnego stopnia (z kolei brak Htz1 nie wpływa na poziom tamtejszej acetylacji histonów). Dochodzi wtedy też do silnej redukcji nie tylko acetylacji H4, ale również acetylacji samego Htz1 (Auger i in., 2008).

Kolejne, drozbiągowe badania pokazały, że uprzednia acetylacja histonów H2A i H4 przez kompleks acetylotransferazy NuA4 *in vitro* promuje inkorporację H2A.Z do nukleosomów. Autorzy pokazali, że dla promotorów

dwóch genów zarówno uniemożliwienie acetylacji ogona N histonu H2A, jak i histonu H4 skutkowało obniżeniem poziomu związanego Htz1 (mutacja obu ogonów naraz była letalna). Podjednostka SWR1 Bdf1 okazała się konieczna do wzmocnienia efektywności inkorporacji H2A.Z do nukleosomów przez acetylowane H2A i H4 *in vitro* (Altaf i in., 2010). Również w późniejszych badaniach *in vitro* Ranjan i in. (2013) ponownie zaobserwowali, że SWR1 efektywniej przyłącza się i działa na nukleosomach wcześniej zacetylowanych przez kompleks NuA4.

Warto zwrócić uwagę, iż z powyższych badań wynika, że białkiem łączącym acetylację histonów i wprowadzanie wariantu H2A.Z miałyby być białko Bdf1. U drożdży pozbawionych Bdf1 w badanych loci zmniejszony jest poziom Htz1. Jednak Bdf1 w mutancie częściowo może być zastępowany przez swojego homologa Bdf2, a podwójny mutant *bdf1/bdf2* jest letalny (Matangkasombut i in., 2000; Durant i Pugh, 2007), co utrudnia bezpośrednio badania nad odczytywaniem acetylacji histonów przez kompleks SWR1. Co więcej, możliwe, że kompleks SWR1 występuje również bez Bdf1, jako że zarówno Mizuguchi i in. (2004), jak i Auger i in. (2008) w wyizolowanym kompleksie nie znaleźli stechiometrycznych ilości tego białka. W komórkach ludzkich natomiast, gdzie funkcjonują dwa osobne kompleksy o aktywności inkorporacji H2A.Z do chromatyny – Tip60/p400 i SRCAP, tylko ten pierwszy zawiera homologa Bdf1 (za: Altaf i in., 2010).

Dotychczas zaprezentowane badania pokazywały zależności między H2A.Z (właściwie drożdżowym Htz1) a acetylacją histonów głównie dla pojedynczych loci. Szerszej analizy dostarczyły mikromacierzowe eksperymenty Durant i Pugh (2007). Zbadali oni zmiany w poziomie związanych do promotorów genów Bdf1, Taf1 (TFIID), Swr1 i Htz1 w mutancie drożdżowym posiadającym wrażliwy na temperaturę allel *esa1-414*, w którym zaindukowano utratę Esa1. Okazało się, że dla wielu genów zmiany w obecności tych białek były zbliżone – np. w klastrach pierwszym i drugim (z czterech utworzonych na podstawie podobieństwa zmian w poziomie białek) jednocześnie spadała ilość Bdf1, Taf1 i Swr1, trochę mniej podobnie Htz1. Promotory genów, w których najbardziej spadała ilość powyższych białek, okazały się mieć w typie dzikim najwyższe poziomy acetylacji H4, co również wskazuje na powiązanie NuA4-zależnej acetylacji z deponowaniem Htz1 i formowaniem kompleksu

preinicjacyjnego polimerazy (PIC) przynajmniej dla pewnej grupy genów (Durant i Pugh, 2007).

Acetylacja H2A.Z

Sam H2A.Z jest również acetylowany – u *S. cerevisiae* przez kompleksy NuA4 i SAGA już po wprowadzeniu do nukleosomu na K3, K8, K10 i K14 (Keogh i in., 2006; Millar i in., 2006; Babiarz i in., 2006). Htz1K14ac pozytywnie koreluje z promotorami aktywnych genów (w przeciwieństwie do ogólnej puli Htz1, który z nimi antykoreluje; Millar i in., 2006). Zmiana Htz1 na formę z nieacetylowanymi lizynami nie powoduje jednak zmiany ekspresji genów, a prowadzi przede wszystkim do zaburzenia roli H2A.Z w utrzymywaniu granic heterochromatyny (Babiarz i in., 2006) i propagacji chromosomów (Keogh i in., 2006; podobne efekty obserwowano u *S. pombe* - Kim i in., 2009). Jako że niemożność acetylacji Htz1 skutkuje zmniejszoną jego depozycją w transkrypcyjnie wyciszonym genie *PHO5*, zasugerowano, że acetylowany Htz1 może być sygnałem do wprowadzenia Htz1 po skończonej rundzie transkrypcji (Millar i in., 2006).

Podobnie jak H2A.Z, tak i jego modyfikacje są ewolucyjnie zakonserwowane. U *Tetrahymena* brak acetylacji na ogonie aminowym jest letalny (Hu i in., 2013). W komórkach ludzkich acetylotransferazowa podjednostka TIP60 również asocjuje z H2A.Z i prawdopodobnie go acetyluje (Li i in., 2012; Dalvai i in., 2013). Z kolei w drożdżowych mutantach kompleksu INO80 H2A.Z ma nie tylko zaburzoną lokalizację, ale też zredukowany poziom acetylacji, co według badaczy razem przyczynia się do niestabilności genomu. Zarówno bowiem usunięcie deacetylazy, jak i wprowadzenie formy H2A.Z udającej zacetylowany histon redukowało ten fenotyp. Możliwe więc, że H2A.Z w chromatynie zostaje albo zacetylowany, albo z niej usunięty (Papamichos-Chronakis i in., 2011).

1.5. Rola H2A.Z w regulacji ekspresji genów u różnych organizmów

1.5.1. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u *Saccharomyces cerevisiae*

Gen kodujący H2A.Z u *S. cerevisiae*

W organizmie tym występuje jeden gen H2A.Z – *Htz1*. Jego wyłączenie nie jest letalne, jednak skutkuje spowolnionym wzrostem komórek (Santisteban i in.,

2000; Jackson i Gorovsky, 2000), niestabilnością chromosomową (Krogan i in., 2004) oraz wrażliwością na stesy: genotoksyczny i środowiskowe (Santisteban i in., 2000; Jackson i Gorovsky, 2000; Kobor i in., 2004; Mizuguchi i in., 2004), a także niezdolnością do życia na pożywce z galaktozą jako jedynym źródłem węgla (Adam i in., 2001).

H2A.Z w promotorach pojedynczych genów i całogenomowo

Pierwszymi badaniami wiążącymi Htz1 z ekspresją genów były badania Santistebana i in. (2000), pokazujące, że razem z indukcją genów *PHO5* i *GALI*, spada poziom Htz1 wiążącego ich promotory. Podobny spadek poziomu Htz1 w promotorach genów *GALI* i *GALI0* podczas ich indukcji zaobserwowali Adam i in. (2001). Dodatkowo przy braku Htz1 nie dochodziło do wydajnej indukcji obu genów, prawdopodobnie dlatego, że zredukowane było wiązanie podjednostki polimerazy II RNA oraz czynnika transkrypcyjnego TBP do ich promotorów (Adam i in., 2001). Kolejne badania pokazały, że obecność Htz1 jest konieczna do wydajnego wiązania także innych czynników zaangażowanych w transkrypcję – Swi1 (z kompleksu SWI/SNF), Srb4 (z kompleksu Mediator) i Gcn5 (z kompleksu SAGA) - do promotora genu *GALI* (Lemieux i in., 2008).

Z kolei danych na temat całogenomowego występowania Htz1 dostarczyły badania typu ChIP-on-chip (immunoprecypitacja chromatyny z analizą mikromacierzową uzyskanych fragmentów genomowego DNA) na liniach drożdży ekspresujących endogenny bądź znakowany Htz1. Zarówno Zhang i in. (2005) badając rozmieszczenie Htz1 w całym genomie, jak i Raisner i in. (2005) w chromosomie III, zauważyli, że generalnie wzbogaca on promotory genów niezależnie od poziomu transkrypcji kontrolowanych przez nie genów. Równocześnie Zhang i in. stwierdzili większą preferencję H2A.Z do okolic TSS promotorów pozbawionych kasety TATA (które u drożdży stanowią zdecydowaną większość, bo 75-80% - Basehoar i in., 2004). Z kolei Raisner i in. (2005) zauważyli, że Htz1 lokuje się zwłaszcza w nukleosomach okalających NDR.

Obserwacje te okazują się spójne, jeżeli weźmie się pod uwagę charakterystyczną architekturę drożdżowych promotorów, opisaną przez Tirosha i Barkai'ego (2008). Wyróżnili oni bowiem dwa skrajne typy promotorów: tzw. „otwarte” (ang. *open*) i „przykryte” (ang. *covered*). Promotory otwarte cechuje

obecność zaraz powyżej TSS 150-nukleotydowego traktu poli-dA:dT, jednak najczęściej bez sekwencji TATA, ubogiego w nukleosomy (NDR). Region ten flankują silnie pozycjonowane nukleosomy -1 i +1, zawierające Htz1. Promotory takie są u drożdży bardziej powszechne (większość genów), leżą przed genami o konstytutywnej ekspresji i zakłada się, że NDR jest miejscem wiązania czynników transkrypcyjnych. Nukleosom +1 nachodzi w nich na TSS i prawdopodobnie musi zostać usunięty, aby doszło do rozpoczęcia transkrypcji (Albert i in., 2007). Jeżeli więc zawiera on H2A.Z, podczas transkrypcji będzie dochodziło do spadku jego poziomu w tym miejscu, co się w istocie obserwuje.

Promotory „przykryte” z kolei charakteryzuje częstsze występowanie kasety TATA i większej liczby sekwencji rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne. W stanie represji są one jednak w większości przysłonięte nukleosomami niezawierającymi H2A.Z. Promotory przykryte często poprzedzają geny silnie regulowane (Tirosch i Barkai, 2008; Cairns, 2009). Htz1 niekoniecznie musi być jednak istotniejszy dla ekspresji genów konstytutywnych, ponieważ większość promotorów drożdżowych ma cechy pośrednie między otwartymi a zamkniętymi promotorami (Cairns, 2009). Niedawne badania Tramantano i in. (2016) potwierdziły, że najwięcej H2A.Z występuje w nukleosomie +1, jednak geny pozbawione kasety TATA (ściślej wiązane przez czynnik transkrypcyjny TFIID) mają wyższy jego poziom.

H2A.Z u *S. cerevisiae* (i *S. pombe*) wzbogaca też nukleosom -1. Jak już wspomniałam, może to wynikać z faktu, że w niektórych promotorach nukleosom -1 jednego genu może być nukleosomem +1 dla drugiego genu. Istotnie, w przypadku tzw. dywergentnych promotorów, gdzie dwa geny sąsiadują ze sobą głowa do głowy, wzbogacenie nukleosomu -1 w H2A.Z jest większe (Tramantano i in., 2016).

Zależności między występowaniem H2A.Z a ekspresją genów

Raisner i in. nie zaobserwowali żadnej korelacji między obecnością Htz1 w chromatynie a poziomem transkrypcji. Z kolei Zhang i jego współpracownicy wykazali, że obecność Htz1 w promotorach genów była negatywnie skorelowana z poziomem transkrypcji leżących za nimi ORF, oznaczonymi przez Holstege i in. (1998). Dodatkowo poddali oni drożdże dwóm różnym stresom i zbadali globalnie, jak ma się zmiana ekspresji genów do zmian w ilości Htz1 w ich

promotorach. Zaobserwowali, że geny aktywowane znacząco (w porównaniu do H2A czy H3) traciły, a represjonowane zyskiwały H2A.Z. Mimo to określili wpływ H2A.Z na ekspresję jako pozytywny, gdyż w linii mutantu $\Delta htz1$ globalnie zaburzona została aktywacja, a nie represja genów. Bazując na tym oraz na obserwacji, że z drożdżowej chromatyny Htz1 jest łatwiej wymywany niż H2A czy H3 (co sugeruje mniejszą stabilność nukleosomów z H2A.Z), zasugerowali, że H2A.Z w promotorze nie tyle powoduje represję genu, co przygotowuje go do aktywacji (Zhang i in., 2005a).

Do podobnych wniosków doszła grupa Workmana. Zaobserwowała ona negatywną korelację między obecnością Htz1 w promotorze genów a ich poziomem transkrypcji, ale po przestudiowaniu jego poziomu w genach deregulowanych w mutancie *htz1* okazało się, że tylko geny, których ekspresja spadła, mają w linii typu dzikiego wyższy poziom H2A.Z. Wskazywałoby to, że Htz1 nie powoduje bezpośrednio represji genów, których ekspresja w mutancie wzrasta (Li i in., 2005).

Z kolei interesujące korelacje między poziomem Htz1 tym razem w ciałach genów a ich aktywnością transkrypcyjną w skali całego genomu zaobserwowali u drożdży poddanych stresowi ciepła Hardy i in. (2009). W ciałach aktywnych genów wraz ze wzrostem poziomu związanej polimerazy II RNA spadał poziom Htz1, w wyciszonych – ze spadkiem polimerazy rósł poziom Htz1 (Hardy i in., 2009).

Kotranskrypcyjne usuwanie Htz1 z chromatyny

Przyczyną wyżej opisanej zależności może być kotranskrypcyjne uwalnianie dimerów H2A.Z-H2B z nukleosomów i uzupełnianie tych nukleosomów dimerami H2A-H2B. Polimerazie podczas procesu transkrypcji towarzyszą białka opiekuńcze histonów, ułatwiające „przetrwanie” nukleosomu. Brak kompleksu FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) - ściślej jego podjednostki Spt16 - i białka Spt6 okazały się globalnie zmieniać depozycję Htz1 w genach (Jeronimo i in., 2015). Jego poziom w promotorach spadł, a na przestrzeni ciał genów znacznie się podniósł. Jednocześnie pokazano, że FACT i Spt6 *in vitro* potrafią wymieniać w nukleosomie dimer H2A.Z-H2B na H2A-H2B, ale nie na odwrót. Dlatego według badaczy dimery H2A-H2B i H2A.Z-H2B, które oddysocjują w trakcie transkrypcji, są uzupełniane przez FACT i Spt6 wyłącznie dimerami

zawierającymi kanoniczny H2A. Dodatkowo również lokalizacja białka Swr1, katalitycznej podjednostki kompleksu SWR1 deponującego H2A.Z w chromatynie, w mutantach *spt16* i *spt6* jest podobnie zaburzona jak lokalizacja Htz1 – obniżona w promotorach, a zwiększona w ciałach genów. Fenomen ten tłumaczą preferencją SWR1 do NDR (Ranjan i in., 2013; Yen i in., 2013), jako że w badanych mutantach dochodzi do redukcji nukleosomów w genach (mierzonych jako poziom związanego z DNA H4). Według badaczy więc brak tych białek opiekuńczych histonów powoduje nieprawidłowe rozmieszczenie Htz1 dwiema drogami – przez zanik ich aktywności uzupełniania dimerów i zmianę lokalizacji kompleksu SWR1 (Jeronimo i in., 2015).

Jak dowodzą Tramantano i in. (2016), poziom H2A.Z w chromatynie jest wypadkową dwóch przeciwstawnych procesów – jego wprowadzania i usuwania. Za wprowadzanie odpowiada głównie (jeśli nie wyłącznie) kompleks SWR1, gdyż usunięcie jego niezbędnej podjednostki Swc5 z jądra drastycznie redukuje poziom H2A.Z całogenomowo. Za usuwanie mogą odpowiadać odpowiednie kompleksy, takie jak INO80, chociaż w ich badaniach usunięcie z jądra kluczowej podjednostki – Ino80 – jeszcze po 90 minutach nie miało żadnego wpływu na poziom H2A.Z w genach (również na przestrzeni całego genomu). Zamiast tego zatrzymanie transkrypcji przez indukowane „wyprowadzenie” z jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego TBP czy podjednostki polimerazy II RNA Rpb1 prowadziło do pewnej (aczkolwiek niedużej, mniej niż 50%) akumulacji Htz1, zwłaszcza w nukleosomie +1. Co więcej równoczesne usunięcie TBP z jądra minimalizowało efekt usunięcia Swc5 – pewien poziom Htz1 pozostawał związany z nukleosomami w genach (Tramantano i in., 2016).

Przy analizie zależności pomiędzy obecnością H2A.Z a aktywnością transkrypcyjną genów w genomie drożdżowym i innych genomach warto mieć na uwadze fakt, że najpowszechniej występujący drożdżowy histon H3 ma cechy wariantu H3.3 (Malik i Henikoff, 2003). W świetle badań o mniejszej stabilności nukleosomów zawierających jednocześnie H2A.Z i H3.3 (Jin i Felsenfeld, 2007; Jin i in., 2009), wpływ nukleosomowej obecności H2A.Z na transkrypcję u drożdży może być odmienny u innych organizmów.

Htz1 w ekspresji antysensownych transkryptów

U drożdży rozszczepkowych *Shizosaccharomyces pombe* H2A.Z bierze udział w supresji antysensownych transkryptów powstających przez tzw. *read-through transcription* konwergentnych genów (Zofall i in., 2009). W mutancie *pht1Δ* (Pht1 to H2A.Z u *S. pombe*) dochodziło do zwiększenia ekspresji ok. 5% takich antysensownych transkryptów. Liczba ta specyficznie wzrastała do 20-30% w przypadku podwójnych mutantów *pht1Δ* i kilku białek (*clr4Δ*, *rik1Δ*, *ago1Δ*) zaangażowanych w supresję antysensownych transkryptów, wskazując na ich synergistyczne działanie. Na czym ta synergia miałaby polegać jednak nie wiadomo (Zofall i in., 2009).

Co ciekawe, zupełnie inny wpływ na powstawanie antysensownych transkryptów zdaje się mieć Htz1 w drożdżach pączkujących *S. cerevisiae* (Gu i in., 2015). Może to wynikać z faktu, że większość tych transkryptów powstaje inaczej niż w *S. pombe* - na genach tandemowych (promotor drugiego genu w parze pełni rolę promotora dla transkryptu antysensownego w stosunku do pierwszego genu). U *S. cerevisiae* wykazano, że pewne wzbogacenie w Htz1 3' końców genów w skali całogenomowej jest pozytywnie skorelowane z antysensowną transkrypcją. Htz1 (oraz inne „aktywne” modyfikacje jak H3K4me3, H3K18ac, H3K9ac czy H4K12ac) wzbogacają te antysensowne promotory podobnie jak promotory sensowne, a transkrypcja z antysensownych promotorów wzbogaconych w Htz1 zmniejsza się w przypadku jego braku w mutancie (Gu i in., 2015).

1.5.2. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u *Caenorhabditis elegans*

Nicień ten posiada jeden gen *HTZ-1*, którego wyciszenie z użyciem RNAi powoduje embrionalną letalność (Updike i Mango, 2006). Jednocześnie wykazano, że HTZ1 jest rekrutowany do promotorów genów zaangażowanych w rozwój przedniej części prajelita (ang. *foregut*) w czasie ich aktywacji (Updike i Mango, 2006). Badania z udziałem delecyjnego allelu *htz-1* typu *null* pokazały, że potomstwo heterozygoty *htz-1/+* może dożywać wieku dojrzałego, wykorzystując zapas tego białka pochodzącego z komórki jajowej. Jednak osobniki takie są sterylne bądź okazjonalnie wytwarzają potomstwo, których rozwój zatrzymuje się na etapie pierwszej larwy. Stąd konkluzja, że H2A.Z jest niezbędny zarówno w embriogenezie, jak i późniejszym rozwoju (Whittle i in., 2008).

Całogenomowe badania lokalizacji H2A.Z u *C. elegans* pokazują, że jego większość znajduje się w promotorach genów, korelując z obecnością Pol II RNA, ale w znacznie mniejszym stopniu z aktywnością transkrypcyjną genów (Whittle i in., 2008). Dla niektórych genów HTZ-1 wydaje się negatywnym regulatorem i jednocześnie czynnikiem koniecznym do utrzymania przeznaczenia komórkowego (*cell fate*; Shibata i in., 2014), dla innych jest potrzebny do ich aktywacji (Meneghini i in., 2003; Updike i Mango, 2006). Dlatego badacze zaproponowali model, w którym obecność HTZ-1 sprzyja pauzowaniu polimerazy II RNA jako stanowi, w którym transkrypcja nie zachodzi, ale łatwo ją uaktywnić (Whittle i in., 2008; Shibata i Nishiwaki, 2014).

Interesujących wyników dostarczyli Latorre i in. (2015). Badali oni całogenomowo lokalizację i wpływ na ekspresję genów zakonserwowanego u zwierząt (od nicieni po człowieka) kompleksu DREAM (ang. *DP, Retinoblastoma [Rb]-like, E2F, and MuvB*), wyciszającego m. in. geny progresji cyklu komórkowego. Lokalizacja tego kompleksu w genomie okazała się być zbieżna z wysokim obsadzeniem HTZ-1 w promotorach i ciałach genów. Poza tym geny bezpośrednio wiązane przez kompleks DREAM, których ekspresja wzrastała w jego mutancie (*lin-35*), okazały się mieć o wiele wyższy normalny (tj. w typie dzikim) poziom H2A.Z w swoich promotorach i ciałach niż średni poziom. Co więcej, w mutancie tym w tych właśnie genach dochodziło do utraty HTZ-1 przede wszystkim z ciał genów (Latorre i in., 2015). Badacze zaproponowali więc, że kompleks wyciszający DREAM promuje wysoki poziom H2A.Z zwłaszcza w ciałach genów progresji cyklu komórkowego, co sprzyja ich represji. Również dane transkryptomyczne sugerowały, że kompleks DREAM i wariant H2A.Z działają razem w regulacji ekspresji tych genów, jako że 28% genów deregulowanych w mutancie *htz-1* było również deregulowanych w mutancie *lin-35* (i praktycznie wszystkie w tę samą stronę). Jednak to nie była jedyna rola HTZ-1, jako że wariant ten generalnie wzbogacał promotory również szeroko eksprymowanych genów. Genami pozbawionymi H2A.Z okazały się za to geny specyficzne tkankowo (Latorre i in., 2015).

1.5.3. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u *Drosophila melanogaster*

Dwa warianty histonowe w jednym białku

Dla tego organizmu wariant H2A.Z, zwany H2AvD, jest niezbędny do życia (van Daal i Elgin, 1992). Co niezwykle, to samo białko równocześnie pełni rolę wariantu H2A.X. Histon H2A.X podobnie jak H2A.Z jest uniwersalnym wariantem histonowym. Charakteryzuje go obecność motywu SQ[E/D] Φ na C-końcu, który umożliwia pełnienie głównej roli H2A.X, jaką jest sygnalizacja pęknięć dwuniciowych DNA (ang. *double strand breaks*, DSB). W odpowiedzi na DSB seryna w tym motywie ulega fosforylacji (powstaje tzw. forma γ H2A.X), co powoduje gromadzenie białek naprawczych w obrębie uszkodzenia (Ismail i Hendzel, 2008). Według Talberta i Henikoffa (2010) w ewolucji kanoniczny H2A powstał z H2A.X przez utratę owego motywu, jako że niektóre organizmy (grzyby) posiadają H2A.X, ale nie mają kanonicznej wersji H2A.

U *D. melanogaster* z kolei nie ma oddzielnego wariantu H2A.X, jednak podobny motyw SQAY zyskał na swoim C-końcu H2A.Z. Seryna z tego motywu (S137) faktycznie jest fosforylowana podczas wczesnego etapu rozpoznania pęknięcia dwuniciowego DNA (Madigan i in., 2002; Joyce i in., 2011).

Zależności z ekspresją genów

H2AvD występuje zarówno w genach ulegających konstytutywnej ekspresji, jak i genach wyciszonych rozwojowo (Leach i in., 2000). H2AvD wzbogaca przede wszystkim początki genów, począwszy jednak od nukleosomu +1 (nie -1). Jednocześnie H2AvD lokuje się zwłaszcza w genach pozbawionych dobrze zdefiniowanych elementów promotorowych, takich jak np. TATA (podobnie do sytuacji w promotorach drożdżowych) (Mavrich i in., 2008). Poziom tego wariantu poniżej TSS pozytywnie koreluje z poziomem transkrypcji (aż do poziomu, którego H2AvD już nie przekracza) (Mavrich i in., 2008; Weber i in., 2010).

Pauzowanie polimerazy II RNA w pobliżu promotora a nukleosomy homo- i heterotypowe pod względem H2A.Z

U *D. melanogaster*, jak i u innych tkankowców, nukleosom +1 zlokalizowany jest trochę dalej poniżej TSS (+135 pz w porównaniu do +65 pz u drożdży),

pozostawiając TSS w NDR. Nukleosom +1 nie stanowi więc prawdopodobnie zawady dla składania kompleksu preinicjacyjnego, jednak może stanowić przeszkodę dla przejścia polimerazy II RNA z inicjacji do efektywnej elongacji (Schones i in., 2008; Weber i in., 2014). W istocie obserwuje się tu zjawisko pauzowania polimerazy RNA w pobliżu promotora (ang. *promoter-proximal RNA polymerase pausing*), gdzie przejście polimerazy do efektywnej elongacji jest momentem krytycznym, podlegającym dodatkowej regulacji i decydującym o poziomie transkrypcji części genów.

Weber i in. (2010) postanowili prześledzić lokalizację H2AvD w chromatynie drozofili z rozróżnieniem na nukleosomy homo- i heterotypowe pod względem obecności tego wariantu. Okazało się, że aktywnie transkrybowane geny są wzbogacone w nukleosomy homotypowe pod względem H2AvD (i ubogie w nukleosomy heterotypowe). Według autorów wzbogacanie nukleosomów w H2A.Z przez SWR1 mogło postępować z kolejnymi rundami przejścia polimerazy (dla przypomnienia: u drożdży wraz z transkrypcją Htz1 z genów znikał). Z kolei geny z zatrzymaną polimerazą RNA były ubogie w homotypowe nukleosomy. Mogłoby to sugerować, że homotypowe nukleosomy sprzyjają aktywnej transkrypcji (Weber i in., 2010). Z innych badań wiadomo, że nukleosomy poniżej TSS aktywnych genów są wzbogacone w H3.3 (Mito i in., 2005). Razem oba warianty histonowe mogą więc czynić nukleosomy bardziej labilne (Jin i Felsenfeld, 2007) i tym samym ułatwiać proces transkrypcji.

Rola H2A.Z w formowaniu heterochromatyny

Jednocześnie wykazano zaangażowanie H2AvD w tworzenie wyciszonej chromatyny. Owady heterozygotyczne pod względem zmutowanego H2AvD wykazywały pogłębienie anomalii rozwojowych wynikających z heterozygotycznej mutacji genu należącego do grupy *Polycomb* (*Polycomb Group*, *PcG*), *Pc*, do tego stopnia, że autorzy niemalże zaklasyfikowali gen H2AvD do grupy *PcG*. Mutacja H2AvD skutkowała również obniżonym poziomem metylacji H3K9 i wiązania białka HP1 (*heterochromatin protein 1*), czynników koniecznych do formowania heterochromatyny (Swaminathan i in., 2005). W jaki sposób możliwe jest pełnienie przez H2AvD przeciwstawnych funkcji, wciąż nie wiadomo.

Inne role H2A.Z?

Co ciekawe, u drozofili homotypowe nukleosomy z H2A.Z wzbogacają sekwencje zaraz poniżej granicy intron/egzon (Weber i in., 2010). Białko to zostało wyłonione także w screeningu regulatorów obróbki mRNA histonów, gdzie bez H2AvD nie dochodziło do prawidłowej lokalizacji U7 snRNP (Wagner i in., 2007). Może to wskazywać na dotąd nieznanne funkcje H2A.Z w innych niż transkrypcja procesach zachodzących na DNA (i RNA).

1.5.4. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u kręgowców

U badanych kręgowców (kury, myszy, człowieka) występują dwa geny H2A.Z – *H2A.Z.1* (znany też jako *H2AFZ*) i *H2A.Z.2* (*H2AFV*), z których ten drugi zidentyfikowano dopiero w 2009 roku (wcześniejsze badania odnosiły się do *H2A.Z.1*). Posiadają one aż pięć intronów (kanoniczne H2A nie mają intronów w ogóle). Ich sekwencje aminokwasowe różnią się tylko trzema aminokwasami (Eirín-López i in., 2009; Dryhurst i in., 2009). W komórkach HeLa ulegają one ekspresji na podobnym poziomie, a kompleks SRCAP wprowadza do nukleosomów obie izoformy. Fenotyp linii komórkowych pozbawiony *H2A.Z.1* albo *H2A.Z.2* wskazuje jednak ich ograniczoną redundancję (Matsuda i in., 2010). Niedawno w różnych tkankach ludzkich potwierdzono ekspresję formy splicingowej *H2A.Z.2.2*, która tylko w niewielkich ilościach jest wprowadzana do chromatyny, a ze względu na unikalną budowę domeny C-końcowej mocno destabilizuje nukleosom (Bönisch i Hake, 2012).

H2A.Z we wczesnych etapach rozwoju kręgowców

Na tylko częściową redundancję wskazuje fakt, że wyłączenie tylko *H2A.Z.1* prowadzi do śmierci na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego myszy – w stadium przedimplantacyjnym blastocysty (Faast i in., 2001). Wskazuje to również na znaczący udział H2A.Z w rozwoju organizmu. Mierzalna ekspresja H2A.Z rozpoczyna się wraz z różnicowaniem komórek i jest on w pierwszej kolejności wprowadzany do perycentrycznej chromatyny (Rangasamy i in., 2003), gdzie jest on konieczny do prawidłowej segregacji chromosomów i wiązania białka HP1 (Rangasamy i in., 2004).

Wglądu w rolę H2A.Z we wczesny rozwój organizmu ssaków dostarczają badania na embrionalnych komórkach macierzystych (ESC, ang. *embryonic stem*

cells). W mysich ESC H2A.Z okazał się wzbogacać rejony promotorowe ok. 8% genów, w których nadreprezentowane były geny zaangażowane w rozwój narządów i ich systemów, różnicowanie komórek i regulację ekspresji genów (Creyghton i in., 2008). Zaskakujące, że prawie wszystkie regiony wzbogacone w H2A.Z (93%) były też wzbogacone w obecność podjednostki kompleksu PRC2 (ang. *Polycomb repressive complex 2*) – Suz2 (ang. *suppressor of Zeste 2*), sugerując ich wspólny udział w wyciszaniu tych genów. W istocie geny normalnie wzbogacone w H2A.Z w linii z częściowym jego wyciszeniem ulegały derepresji; dochodziło w nich też do znacznej redukcji wiązania Suz2 i Rnf2 (podjednostki PRC1, ang. *ring finger protein 2*). Jednakże w linii mutantka *suz2* również gwałtownie spadał poziom związanego H2A.Z, wskazując na ich wzajemne uzależnienie. Obniżenie poziomu ekspresji H2A.Z nie wydawało się wpływać na odnawianie się i pluripotencję ESC. Zupełnie odwrotnie było w przypadku próby różnicowania tej linii w komórki neuronalne czy krwiotwórcze – nie dochodziło do zróżnicowania, a komórki utrzymywały podwyższony poziom ekspresji genów pluripotencji *Oct4* (ang. *octamer-binding transcription factor 4*) i *Nanog*. Co ciekawe, w zróżnicowanych komórkach – tzw. neural precursors - H2A.Z wzbogacał rejony promotorowe podobnej liczby, lecz zupełnie innych genów – przeważnie genów o wysokiej ekspresji (Creyghton i in., 2008). Znaczyłyby to, że wzór dystrybucji tego wariantu histonowego zmienia się podczas rozwoju organizmu i różnicowania komórek, oraz że może on być związany zarówno z aktywną transkrypcją, jak i wyciszeniem transkrypcyjnym.

Kolejne badania w ssaczych komórkach macierzystych poparły tę hipotezę, chociaż kilka obserwacji różniło się od tych z pracy Creyghtona i in (2008). H2A.Z i jego acetylowana forma najbardziej wzbogacał rejony TSS genów o najwyższej ekspresji i aktywne sekwencje wzmacniające w ESC, kolokalizując z H3K4me3 (Hu i in., 2013). Okazał się w nich niezbędny przede wszystkim do różnicowania, ale i odnawiania się. Obniżenie poziomu H2A.Z.1 w ESC skutkowało zmniejszeniem wiązania czynnika Oct4 do jego docelowych genów. Poza tym ulegało redukcji wiązanie kompleksów: MLL (ang. *mixed-lineage leukemia*) i PRC2 do odpowiednio aktywnych i wyciszanych genów, a co za tym idzie także wprowadzanych przez nie modyfikacji – odpowiednio H3K4me3 i H3K27me3. Według badaczy ułatwianie wiązania kompleksów wykazujących różny wpływ na ekspresję genów miałyby tłumaczyć deregulację

(zaburzenia zarówno w aktywacji, jak i represji) genów biorących udział w różnicowaniu się komórek (Hu i in., 2013).

Korelację wzbogacenia w H2A.Z ze wzbogaceniem w metylację H3K4 w promotorach, sekwencjach wzmacniających i innych sekwencjach regulatorowych potwierdziły także badania Ku i in. (2012). Wzbogacone w H2A.Z okazały się być też rejony tzw. biwalentnej chromatyny. W jej obrębie, charakteryzującej się jednoczesnym występowaniem znacznika aktywnej chromatyny H3K4me3 i znacznika nieaktywnej chromatyny H3K27me3, leżą geny rozwojowe (ang. *developmental genes*), które są przejściowo wyciszone, ale utrzymują potencjał do szybkiej aktywacji. W trakcie różnicowania się komórek ich część zostaje trwale wyciszona (traci wtedy H3K4me3), a druga część aktywowana (traci wtedy H3K27me3). H2A.Z związany z domenami biwalentnymi okazał się być ponadto wzbogacony jednocześnie w dwie modyfikacje – acetylację i monoubikwitynację (Ku i in., 2012). Pozwoliło to na wyciągnięcie hipotezy, że ostateczny bilans tych modyfikacji H2A.Z może decydować o przyłączaniu czynników odpowiednio aktywujących bądź wyciszających geny (np. PRC2) (Subramanian i in., 2015).

H2A.Z w przejściu epitelialno-mezenchymalnym

Niedawno opublikowano wyniki, które pokazują, że H2A.Z zaangażowany jest w regulację przejścia epitelialno-mezenchymalnego u kręgowców, co jeszcze dokładniej wyjaśniałoby zamieranie na wczesnym etapie embrionów pozbawionych H2A.Z. Przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) jest to proces, w którym komórki nabłonkowe tracą charakterystyczne dla siebie cechy jak ścisłe przyleganie czy polarność komórki, przekształcając się w komórki mezenchymalne mające zdolność przemieszczania się i inwazji (Thiery i in., 2009). Jest to proces zachodzący wielokrotnie podczas rozwoju zarodka, kluczowy dla różnicowania tkanek i organów, ale także występujący podczas regeneracji tkanek. Z drugiej strony odpowiedzialny jest za patologiczne zwłóknienia organów oraz metastazę licznych nowotworów (Thiery i in., 2009). Przejściu temu towarzyszą zmiany w ekspresji genów – wyciszane zostają markery komórek nabłonkowych, a aktywowane geny charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych. Czynnikiem, który potrafi zaindukować EMT w różnych liniach komórek nabłonkowych jest TGF- β (ang. *transforming growth factor β*); pod wpływem

tego czynnika linia psich komórek MDCK (ang. *Madin-Darby Canine Kidney*) całkowicie przekształca się w komórki mezenchymalne. Zespół D. Tremethicka zaobserwował, że podobne przejście (choć powolniejsze) indukuje wyciszenie ekspresji H2A.Z do około 40% za pomocą shRNA. Manifestowało się ono nie tylko charakterystycznymi dla tego procesu zmianami fenotypowymi; w zbliżony sposób zmieniał się transkryptom komórek. Podobnie jak po zadziałaniu TGF- β przy zredukowanym poziomie H2A.Z dochodziło do represji markerów epitelialnych i aktywowania markerów mezenchymalnych. Co więcej, analiza zmian dystrybucji H2A.Z w komórkach poddanych działaniu TGF- β ze zmianami ekspresji 189 genów markerowych dla EMT ujawniła pewne zależności. Dla części genów epitelialnych hamowanie ekspresji korelowało z utratą H2A.Z powyżej TSS (zwłaszcza w nukleosomie -2), a dla części genów mezenchymalnych ich aktywacja związana była z utratą H2A.Z w nukleosomie +1 (Domaschitz i in., 2017).

Ogólna dystrybucja H2A.Z i jego wpływ na transkrypcję

Poza ESC w innych komórkach H2A.Z jest również lokowany przede wszystkim na 5'końcach genów, w sekwencjach wzmacniających i izolatorowych (Barski i in., 2007; Hardy i in., 2009) oraz w perycentrycznej heterochromatynie (Greaves i in., 2007; Hardy i in., 2009).

Według badań Barskiego i in. obecność H2A.Z w nukleosomach wokół TSS/NDR genów pozytywnie koreluje z ich aktywnością (opartą o badania transkryptomowe innej grupy, Barski i in., 2007). Z kolei Hardy i in. pokazują, że poziom H2A.Z w tym miejscu pozytywnie koreluje z poziomem związanej polimerazy II, ale już nie z samą aktywnością genów (oznaczoną na podstawie poziomu samej polimerazy oraz jej fosforylowanej na serynie 2 formie). Sama obecność polimerazy nie implikuje bowiem wydajnej transkrypcji ze względu na zjawisko pauzowania polimerazy – i według badaczy nie ma różnicy w poziomie H2A.Z pomiędzy genami aktywnie transkrybowanymi a tymi z zatrzymaną polimerazą (Hardy i in., 2009). Co ważne, w tych samych badaniach można było zaobserwować niedużą antykorelację tej aktywności z poziomem H2A.Z w ciałach genów (Barski i in., 2007; Hardy i in., 2009). Poza tym badania pokazały, że redukcja ekspresji H2A.Z uzyskana przez zastosowanie shRNA rzeczywiście skutkowałą spadkiem wiązania polimerazy II RNA do genów w skali

całogenomowej. Hardy i in. przyjrzeni się bliżej temu, co dzieje się z poziomem H2A.Z i polimerazy II RNA w promotorze dwóch genów podczas ich indukcji daunorubicyną. W obu przypadkach najpierw wzrastał poziom H2A.Z, który następnie obniżał się wraz ze wzrostem poziomu polimerazy. Gdy poziom polimerazy spadał, ponownie podnosił się poziom H2A.Z. Wyniki te wskazywały, że po indukcji H2A.Z był rekrutowany do promotorów obu genów przed polimerazą, co według autorów mogło świadczyć o jego udziale w rekrutacji polimerazy i innych czynników do promotora (jak u drożdży). I rzeczywiście – po wyciszeniu ekspresji H2A.Z przez zastosowanie shRNA zaobserwowano o wiele niższy poziom transkryptu zaindukowanego genu IL8, do jego promotora wiązało się też znacznie mniej polimerazy II RNA. W trakcie transkrypcji H2A.Z był tracony – po przejściu polimerazy odłączone dimery H2A.Z-H2B miały być zastępowane kanonicznymi dimerami. Podobnie zaobserwowano ubytek H2A.Z z ciał transkrybowanych genów, do których wariant „powracał” wraz z ich ponowną represją. Zgodnie z hipotezą wysoki poziom H2A.Z odnotowywano w ciałach genów w heterochromatynie (Hardy i in., 2009). Według autorów u drożdży Htz1 był wprowadzany do większości promotorów jeszcze w czasie represji genu, przygotowując gen na ewentualną aktywację. Zaproponowali, że drożdże jako organizmy prowadzące ekspresję dużej części genomu mają geny stale znakowane na 5' końcu Htz1. Z kolei w komórkach ludzkich H2A.Z był elementem procesu aktywacji genu – rekrutowany do promotora (w każdej rundzie transkrypcji od nowa) i pomagający rekrutacji pol II RNA i innych czynników. Enhancery natomiast były bardziej podobne do drożdżowych genów – wiążące H2A.Z niezależnie od statusu transkrypcyjnego (Hardy i in., 2009).

Niedawno przeprowadzono badania nad obecnością H2A.Z w chromatynie komórek raka odbytu HCT 116. Wariant ten wzbogaca nukleosomy +1 i -1 genów, ale tylko tych, które ulegają transkrypcji. Wyniki uzyskane przez Lashgari i in. (2017) mają potwierdzać, że aktywna transkrypcja zapobiega depozycji H2A.Z w nukleosomie +1 i ciele genów. Z kolei jej inhibicja ma skutkować gromadzeniem H2A.Z w tych miejscach. Zablockowanie transkrypcji przez użycie α -amanityny (blokującej translokację polimerazy II RNA i doprowadzającej do jej dysocjacji) powodowało akumulację H2A.Z zarówno w TSS, jak i ciałach genów, ale znów wyłącznie tych normalnie ulegających ekspresji. Sugerowało to, że poziom H2A.Z w genach wzrasta w konsekwencji zaprzestania ich transkrypcji.

Dla TSS kilku genów grupie tej udało się pokazać, że wraz z zastosowaniem α -amanityny wzrastał poziom związanego białka p400, głównej podjednostki kompleksu p400 odpowiedzialnego za acetylację H4/H2A oraz inkorporację H2A.Z do chromatyny. Zatem możliwe, że wraz z inhibicją transkrypcji do genu rekrutowany jest kompleks p400, który wprowadza H2A.Z. Również dla kilku genów zastosowanie innego inhibitora – flawopiridolu (uniemożliwia przejście polimerazy II RNA z fazy inicjacji do elongacji transkrypcji) skutkowało wzrostem poziomu H2A.Z. Obecność H2A.Z w genach miałaby więc tu być konsekwencją, a nie przyczyną represji genów. Wnioski wydają się jednak wyciągnięte nieco na wyrost, jako że brakuje dobrych kontroli, a także powierzchowne – autorzy nie wykorzystują wiedzy o mechanizmie działania inhibitorów, by dokładnie prześledzić, jak kształtują się zależności między polimerazą II RNA, procesem transkrypcji i depozycji H2A.Z.

H2A.Z w nowotworach

Oba ludzkie geny H2A.Z uwikłane są w proces nowotworzenia - przypisuje się im rolę onkogenów. Ulegają one nadekspresji w różnych rodzajach nowotworów (m. in. skóry, piersi, prostaty, pęcherza moczowego), a w przypadku raka skóry, piersi i raka wątrobowokomórkowego jest to złym prognostykiem. W niektórych nowotworach nadekspresji ulegają też p400 i SRCAP, dwa kompleksy deponujące H2A.Z w chromatynie (zebrane przez Zink i Hake, 2016; Buschbeck i Hake, 2017).

1.5.5. Wariant H2A.Z a ekspresja genów u roślin

Ogólny rozkład H2A.Z w chromatynie rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*

Już pierwsze badania immunolokalizacyjne H2A.Z u *Arabidopsis* pokazały, że występuje on w całej chromatynie poza centromerami i rejonami perycentrycznymi, również w czasie podziałów komórkowych (Deal i in., 2007). Z kolei badania ChIP-on-chip zespołu Henikoffa pokazały, że tak jak i w przypadku innych eukariotów, H2A.Z wzbogaca przede wszystkim sekwencje zaraz poniżej TSS genów (nukleosom +1), i to niezależnie od ich aktywności transkrypcyjnej (Zilberman i in., 2008). Co więcej zauważono silną antykorelację

między występowaniem H2A.Z i metylacją DNA – H2A.Z nie występował w silnie zmetylowanych centromerach, transpozonach i ciałach bardzo aktywnych genów. Na zależność tę nie miały wpływu sekwencja DNA, poziom transkrypcji ani potencjał transkrypcyjny genu. Chociaż początkowo wyniki wskazywały, że może to być relacja obustronna, kolejne badania wykazały, że to metylacja CG wyklucza wprowadzanie H2A.Z, nie na odwrót (Coleman-Derr i Zilberman, 2012). Podobną negatywną korelację zaobserwowano u najeżki, co wskazuje na pojawienie się tego zjawiska jeszcze przed rozdzieleniem linii ewolucyjnych roślin i zwierząt (Zemach i in., 2010).

Geny H2A.Z u *A. thaliana*

Jak już wspomniano, u *A. thaliana* występują trzy geny H2A.Z ulegające ekspresji – *HTA8* (AT2G38810), *HTA9* (AT1G52740) i *HTA11* (AT3G54560) – oraz jeden skrócony, stanowiący prawdopodobnie pseudogen – *HTA4* (AT4G13570). Geny *HTA8*, *HTA9* i *HTA11* prezentują 80-90% identyczności sekwencji aminokwasowej między sobą i tylko 52% identyczności z kanonicznym H2A, jakim jest *HTA1*. Jednocześnie wykazują ok. 80% identyczność sekwencji aminokwasowej z histonami typu H2A.Z z innych organizmów, co potwierdza bardzo wysoką zachowawczość sekwencji aminokwasowej H2A.Z (Yi i in., 2006). Z nich trzech tylko *HTA9* ulega ekspresji niezależnie od fazy cyklu komórkowego. Mimo to, ze względu na duże podobieństwo, poszczególne białka H2A.Z najpewniej się zastępują, na co wskazuje też fakt, że pojedyncze mutanty insercyjne *hta9* czy *hta11* nie wykazują żadnych zmian w fenotypie (March-Díaz i in., 2008).

Dotąd nie uzyskano potrójnego mutantu *h2a.z* typu null, chociaż podejmowano takie próby (Coleman-Derr i Zilberman, 2012).

Udział H2A.Z w regulacji kwitnienia

Już w 2003 roku Noh i Amasino zidentyfikowali linię mutantu *piel* jako linię zakwitającą wcześniej w warunkach dnia krótkiego, czyli warunkach nieindukujących kwitnienie. Pokazali ponadto, że mutacja *piel* znosi fenotyp późnego kwitnienia wynikający z obecności czynnika FRI (FRIGIDA) lub mutacji genów tzw. autonomicznej ścieżki kwitnienia. Wytłumaczyli to obserwowanym spadkiem poziomu negatywnego regulatora kwitnienia FLC (ang.

flowering locus C) w linii *pie1*. Tą samą metodą „od fenotypu do genotypu” Choi i in. (2005b) zidentyfikowali mutantą *suf3* (ang. *suppressor of frigida 3*). *SUF3* okazał się kodować homolog drożdżowego ARP6 i regulować poziom *FLC* niezależnie od *FRI*, genów ścieżki wernalizacyjnej i autonomicznej. Jednakże obniżenie poziomu transkryptu *FLC* wydawało się autorom niewspółmierne (tj. za małe) do obserwowanego przyspieszenia kwitnienia, dlatego sugerowali, że również inne represory kwitnienia muszą być deregulowane w tej linii. Równocześnie odnotowywali wzrost ekspresji pozytywnych regulatorów kwitnienia – *FT* (ang. *Flowering locus T*) i *SOC1* (ang. *Suppressor of overexpression of CONSTANS 1*), ale uznali to za konsekwencję represji *FLC*. Wyniki te potwierdzili równocześnie Deal i in. (2005), wykazując w linii *arp6* spadek ekspresji zarówno *FLC*, jak i jego paralogów *MAF6* (ang. *MADS - affecting flowering 4*) i *MAF5*, a także zwiększoną ekspresję *FT* i *SOC1*. Mutacja *arp6* redukowała również efekt późnego kwitnienia spowodowanego przez ekspresję transgenicznego *FRI*. Podobny fenotyp oraz zmiany poziomu transkryptów *FLC*, *MAF4*, *FT* i *SOC1* March-Díaz i in. (2007) zanotowali w linii mutantą *sef* (ang. *serrated leaves and early flowering*), homologa drożdżowego Swc6, kolejnej podjednostki SWR1. Zgodność fenotypów mutantów *swc6*, *arp6* (*suf3*) i *pie1* deklarowali też Choi i in. (2007). Jednocześnie zespół Reyesa postulował istnienie roślinnego kompleksu homologicznego do drożdżowego SWR1, przedstawiając dowody na genetyczne (analiza mutantą *sef pie1*) oraz fizyczne (eksperymenty typu pull-down oraz z użyciem dwuhybrydowego systemu drożdżowego) oddziaływanie SEF, ARP6 i PIE1 (March-Díaz i in., 2007). Podobnie grupa pod przewodnictwem Lee pokazała oddziaływania białkowe pomiędzy roślinnymi PIE1, *SUF3* (ARP6), SWC6 i SWC2 oraz PIE1 i SWC2 z H2A.Z, a także asocjację SWC6 i *SUF3* (ARP6) do sekwencji *FLC*. Dodatkowo, powodując częściowe wyciszenie H2A.Z za pomocą konstruktów amiRNA i RNAi, uzyskali oni fenotyp podobny do fenotypu mutantów podjednostek kompleksu SWR1, wskazując po raz pierwszy, że zaburzenia w tych mutantach wynikają z niemożności wprowadzania H2A.Z do chromatyny przez ten kompleks (Choi i in., 2007). Niedługo potem ponownie March-Díaz ze współpracownikami potwierdziła ten wniosek przez pokazanie fenotypu mutantą podwójnego *hta9 hta11* oraz porównanie deregulowanych genów podwójnego mutantą i *pie1*, z których 65% się pokrywało. Zademonstrowali oni również

oddziaływania PIE1 z HTA8, HTA9 i HTA11 (dwuhybrydowym systemem drożdżowym, a oddziaływanie z HTA9 potwierdzone techniką pull-down; March-Díaz i in., 2008). Ten sam zespół postulował istnienie podobnego do drożdżowego kompleksu SWR1 u *Arabidopsis*, znajdując ortologi zdecydowanej większości (11) jego podjednostek (March-Díaz i Reyes, 2009). Z kolei Deal i in., wyławiając fragmenty DNA związane z H2A.Z za pomocą przeciwciała na H2A.Z, pokazali, że wyłączenie *piel* i *arp6* u *Arabidopsis* skutkuje silną redukcją poziomu H2A.Z na przestrzeni represjonowanych w tym układzie genów: *FLC*, *MAF4* i *MAF5*. Szczególnie duża redukcja widoczna była zwłaszcza na początku i końcu genu, gdzie normalnie występowało wyższe wzbogacenie H2A.Z (Deal i in., 2007). Jednakże przeanalizowanie obecności H2A.Z w genie *FLC* w tkankach o różnej jego ekspresji wskazywało negatywną korelację między tym poziomem ekspresji a obecnością H2A.Z. Skłoniło to autorów do wniosku, że H2A.Z jest konieczny do wysokiej ekspresji *FLC*, ale jego obecność prawdopodobnie bezpośrednio nie indukuje transkrypcji tego genu, a raczej przygotowuje go na aktywację przez inne czynniki (Deal i in., 2007).

H2A.Z reguluje geny odporności na patogeny związanej z kwasem salicylowym (SAR, ang. *salicylic acid response*)

March-Díaz i jej współpracownicy (2008), analizując dane mikromacierzowe na temat transkryptomu mutantu *piel-5*, wśród 622 genów zmieniających swój poziom ekspresji co najmniej dwukrotnie w stosunku do typu dzikiego, zauważyli szczególną nadreprezentację genów związanych ze stresem biotycznym i obroną przed patogenami, w tym z odpowiedzią zależną od kwasu salicylowego (SAR). Konstytutywną nadaktywność kilku genów szlaku biosyntezy kwasu salicylowego i kilku genów odpowiedzi (tzw. *PR*, ang. *Pathogen Resistance*) za pomocą ilościowego RT-PCR potwierdzili w linii *piel-5*, a także, choć w mniejszym stopniu, w linii *sef-2* i *hta9-1 hta11-2*. Ponadto we wszystkich tych liniach dochodziło do zjawiska śmierci komórkowej, która jest naturalnym objawem reakcji nadwrażliwości (HR, ang. *hypersensitivity response*), towarzyszącej SAR. Wykazali także zdecydowany wzrost odporności zmutowanych linii (najbardziej *piel-5*) na infekcję *Pseudomonas syringae*, co jest charakterystyczne przy aktywacji szlaku SAR. Tym samym grupa pokazała, że w warunkach, których

roślinie nie zagraża infekcja, H2A.Z najprawdopodobniej utrzymuje geny ścieżki SAR w stanie represji.

Jednak wyniki niedawnych badań Berriri i in. (2016) komplikują ten obraz. Przeprowadzając eksperymenty analogiczne do tych opublikowanych przez March-Díaz i in. (2008), nie tylko nie potwierdzili obserwacji śmierci komórkowej, ale zanotowali również zmniejszoną odporność linii mutantów *pie1*, *swc6* i *hta9 hta11* względem *Pseudomonas syringae*. Za to zwiększoną odporność wykazywała linia *arp6*, co według autorów świadczy o odmiennym wpływie różnych podjednostek roślinnego kompleksu SWR1 na odporność roślin. Co więcej, różnice w odporności związanej z kwasem salicylowym występowały, mimo że wszystkie linie wykazywały większą akumulację kwasu salicylowego po infekcji w stosunku do linii typu dzikiego (WT). Dodatkowo mutanty *pie1*, *swc6* i *hta9 hta11* wykazywały też mniejszą odporność na nekrotroficzny patogen *Botrytis cineria*, aktywujący odporność zależną od kwasu jasmonowego, mimo że obie ścieżki (tj. kwasu salicylowego i kwasu jasmonowego) działają na siebie antagonistycznie.

Przeprowadzone całogenomowe analizy transkryptomyczne RNA-seq wykazały, że tylko część genów deregulowanych w mutantach *pie1*, *arp6*, *swc6* i *hta9 hta11* była wspólna dla nich wszystkich (odpowiednio 20%, 22%, 32% i 27% wszystkich feregulowanych genów). Analiza GO (ang. *gene ontology*) wskazała jako nadreprezentowane kategorie m. in. odpowiedź na kwas salicylowy (*SA response*) i obronę (*defense*). Poza tym deregulowane geny wykazywały zróżnicowaną korelację między mutantami - tylko $r^2=0,16$ między *pie1* i *arp6*, $r^2=0,11$ między *pie1* i *hta9 hta11*, $r^2=0,38$ między *arp6* i *hta9 hta11*, $r^2=0,42$ między *arp6* i *swc6*, dochodząc do $r^2=0,75$ między *swc6* i *hta9 hta11*. Sugeruje to, że brak różnych podjednostek kompleksu SWR1 może mieć różny wpływ na ekspresję genów. Szczególnie wyraźne wydaje się to w przypadku *pie1*, którego aż 55% genów o zwiększonej ekspresji oraz 50% genów o zmniejszonej ekspresji deregulowanych jest wyłącznie u niego (u *arp6* 20% i 25%, u *swc6* 4% i 4,5% oraz u *hta9 hta11* 13% i 18%) (Berriri i in., 2016).

H2A.Z reguluje geny odpowiedzi na głód fosforanowy

Do podobnych wniosków, ale dotyczących genów reakcji na niedobór fosforanów, doszli Smith i jego współpracownicy (2010). U siewek linii *arp6*

zaobserwowali oni cechy charakterystyczne dla roślin cierpiących na brak fosforanów – krótsze korzonki, większą liczbę i długość włóśników korzeniowych, wzmożone gromadzenie skrobi i zwiększoną aktywność fosfataz w pędzie. Ponadto geny, których ekspresja wzrasta w odpowiedzi na ten rodzaj głodu (PSR ang. *Pi starvation response*), ulegały derepresji w linii *arp6* (autorzy przetestowali 10 takich genów). Wszystkie one w warunkach nieindukujących wiązane były przez histon H2A.Z, co wykazano za pomocą techniki ChIP-qPCR (w linii *arp6* jego wzbogacenie spadało kilkukrotnie). W roślinach typu dzikiego pod wpływem niedoboru Pi zawartość H2A.Z przynajmniej dla niektórych z nich spadała (aczkolwiek niestety nie podano, jakie regiony genów badano) (Smith i in., 2010).

Niejasna rola H2A.Z w regulacji genów odpowiedzi na etylen

Hu i in. (2011) prześledzili proces indukcji prekursora etylenu ACC (ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*) i ekspresji trzech genów: *ERF1*, *AtERF14* i *ChiB* oraz jednoczesne zmiany w poziomie H3K4me3, H3K27me3 i H2A.Z w ich obrębie. Sprawdzali za pomocą ChIP-qPCR trzy ich rejony – promotor, rejon zaraz powyżej TSS oraz ciało genu. W warunkach nieindukujących najwyższe wzbogacenie w H2A.Z stwierdzili w ciele genu; trudno powiedzieć, dlaczego nie w pobliżu TSS – możliwe, że przypadkowo amplikon pokrywał się częściowo z NDR. Po indukcji genów obserwowali nieduży spadek wzbogacenia H2A.Z we wszystkich badanych rejonach, ale dopiero po kilku godzinach od zadziałania bodźca. Wskazywałoby to, że usunięcie H2A.Z nie jest kluczowe do uruchomienia ich transkrypcji. Hu i in. (2011) badali również reakcję tych genów na ACC w linii mutantu podwójnego *hta9 hta11*. Poziom *ERF1* był znacząco obniżony, *AtERF14* w zasadzie nieznacznie, a *ChiB* obniżony dopiero po kilku godzinach w porównaniu do roślin typu dzikiego (Hu i in., 2011). Pamiętać należy jednak, że linia podwójnego mutantu *hta9 hta11* ma stosunkowo najmniej zaburzony fenotyp wynikający z ekspresji trzeciego genu H2A.Z – *HTA8*.

H2A.Z jako roślinny sensor temperatury? Czy przełącznik między różnymi odpowiedziami transkrypcyjnymi?

W 2010 roku Kumar i Wigge opublikowali w Cell głośną pracę, w której postulowali H2A.Z jako czujnik zmiany temperatury, warunkujący właściwą

odpowieź transkryptomoczną (Kumar i Wigge, 2010). Zainteresowani odczuwaniem temperatury przez rośliny zauważyli, że jej podniesienie z 12 do 27°C nie jest jeszcze wprawdzie stresem (brak typowych markerów stresu), ale już wywołuje szerokie zmiany transkryptomocne – blisko 2 tys. 500 genów ulega zwiększonej (co najmniej dwukrotnie) ekspresji i prawie 3 tys. genów ulega zmniejszonej ekspresji. Jednocześnie zidentyfikowali gen *HSP70* (ang. *heat shock protein 70*) jako swoisty wskaźnik wzrostu ciepła, gdyż jego ekspresja wzrastała proporcjonalnie do wzrostu temperatury. Następnie drogą od fenotypu do genotypu wyselekcjonowali mutanty, które charakteryzowały się konstytutywnie podwyższoną aktywnością *HSP70* nawet mimo niskiej temperatury – okazały się one być mutantami *arp6*. Ich wydłużony hipokotyl oraz wcześniejsze kwitnienie, które częściowo jest zależne od odczuwanej przez roślinę temperatury, miały przypominać fenotyp rośliny rosnącej w wysokiej temperaturze (sytuacja podobna do fenotypu głodu fosforanowego – por. wyżej). Poza tym geny deregulowane w linii *arp6* w dużej mierze pokrywały się z genami zmieniającymi ekspresję pod wpływem zmiany temperatury. Podobieństwo fenotypu linii *hta9 hta11* sugerowało, że może to być związane z rolą ARP6 w depozycji wariantu H2A.Z. Dlatego autorzy dokładniej przyjrzeni się obecności nukleosomów i H2A.Z po zmianie temperatury, jak i w liniach WT i *arp6*, najpierw wokół TSS genu *HSP70*.

TSS genu *HSP70* otaczają dwa dobrze pozycjonowane nukleosomy: -1 (ok. 250 pz powyżej TSS) oraz +1 (ok. 130 pz poniżej TSS), jednak tylko nukleosom +1 jest bogaty w H2A.Z. Co ważne, w podwyższonej temperaturze nie tylko poziom H2A.Z, ale też poziom całego nukleosomu +1 (reprezentowanego przez H3) spada, w przeciwieństwie do niezmiennego swego poziomu nukleosomu -1 (przy czym poziom tego nukleosomu szacowany z użyciem MNazy też częściowo spadał). Wynik ten sugerował, że tylko nukleosom z H2A.Z „reaguje” na zmianę temperatury, a badacze proponowali, że „znikając”, ułatwia on polimerazie II przejście przez barierę pierwszego nukleosomu, pozwalając na wydajną ekspresję *HSP70* w tych warunkach. Nadekspresja *HSP70* w linii *arp6* (w której w nukleosomie +1 H2A.Z nie jest obecny) w warunkach nieindukujących zdawała się potwierdzać ten tok rozumowania (choć nie pokazano, czy w linii *arp6* również cały nukleosom zniknął). Co ciekawe jednak, przebadawszy techniką ChIP-qPCR poziom H2A.Z w domniemanych miejscach

ulokowania nukleosomu +1 w genach o różnym kierunku odpowiedzi transkrypcyjnej na wzrost temperatury (czyli zwiększających, zmniejszających bądź niezmiennych swojej ekspresji), Kumar i Wigge wywnioskowali, że poziom H2A.Z spada w nich niezależnie od tego kierunku. Autorzy nie wzięli jednak pod uwagę innych możliwości – np. że nukleosom ten może ulec przesunięciu, czego, stosując jedną parę starterów dla domniemanego miejsca nukleosomu +1, nie byli w stanie zweryfikować. Dodatkowo badacze pokazali wprawdzie, że w obrębie *HSP70* poziom przyłączonej polimerazy II w linii *arp6* jest wyższy, oraz w wyższej temperaturze miejsce największego wiązania polimerazy w obu liniach (WT i *arp6*) przesuwa się w stronę ciała genu, jednak twierdzenie, że to miałyby wskazywać na uwolnienie polimerazy ze stanu zatrzymania do elongacji, do czego walenie przyczynia się H2A.Z, wydaje się przesadzone. Tym bardziej, że w linii *arp6* w niższej temperaturze tego przesunięcia nie widać. Podobnie jest z wyizolowanym fragmentem chromatyny wokół TSS *HSP70* – nukleosom +1 z H2A.Z okazał się w eksperymencie *in vitro* znacznie mocniej chronić DNA przed enzymem restrykcyjnym niż nukleosom z H2A (co według autorów miałyby wskazywać na silniejsze kontakty nukleosomu zawierającego H2A.Z z DNA), ale w bardzo niewielkim stopniu zniknął wraz ze wzrostem temperatury, kiedy to przecież dochodzi do zwiększonej ekspresji genu (i *in vivo* utraty stąd nukleosomu). Ponadto pozostaje pytanie, co dzieje się z genami zmniejszającymi ekspresję w odpowiedzi na skok temperatury, również tracącymi H2A.Z? Według autorów znikający nukleosom udostępnia miejsce do związania represorów transkrypcji. A jak jest w przypadku genów niezmiennych swojej aktywności, a również tracących H2A.Z? To pytanie pozostaje bez odpowiedzi. Dlatego bezpośrednie łączenie zmian w obecności H2A.Z w nukleosomie +1 ze zmianami w procesie transkrypcji wydaje się być nie do końca uprawnione. Nie można wykluczyć możliwości, że za znikaniem nukleosomu +1 z H2A.Z w podwyższonej temperaturze stoi po prostu jednak mniejsza stabilność nukleosomów zawierających równocześnie H2A.Z i H3.3, które wzbogacają rejony TSS w innych gatunkach (Jin i in., 2009). Poza tym jak dotąd brakuje dowodów na występowanie u roślin zjawiska pauzowania polimerazy II w pobliżu promotora, do którego miałyby się według badaczy przyczynić obecność H2A.Z (Hetzl i in., 2016).

Praca Kumara i Wigge'a (2010) po siedmiu latach doczekała się kontynuacji (Cortijo i in., 2017). W kolejnych badaniach zespół P. Wigge'a przebadał transkryptom roślin w kilku punktach czasowych po zmianie temperatury i znalazłszy liczne geny (1035), których aktywność się zmieniała, podzielił je na grupy ze względu na profil zmian w ekspresji. Swoją dalszą uwagę skupił głównie na grupie nr 6, złożonej ze 147 genów zwiększających gwałtownie swoją ekspresję po zmianie warunków (odpowieź w ciągu 15 minut) i wracających do stanu wyjściowego po 4 godzinach. Grupa ta okazała się też wzbogacona w kategorie GO związane z odpowiedzią na ciepło i światło. Szczególnie nadreprezentowane są w niej sekwencje HSE (ang. *heat shock elements*), rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne w czasie stresu ciepła, zwłaszcza przez czynnik szybkiej odpowiedzi na ciepło HSF1A (ang. *heat shock factor 1 a*), wiążący się w ciągu 15 min od podwyższenia temperatury. Geny z tej grupy okazały się mieć w warunkach nieindukujących o wiele wyższy poziom H2A.Z na całej swej długości, łącznie z TSS, niż pozostałe geny. Po zadziałaniu wyższej temperatury, gdy geny zwiększały swoją ekspresję, odnotowywano w nich znaczny spadek poziomu H2A.Z, co wskazuje na represyjny wpływ obecności H2A.Z w genach responsywnych w warunkach nieindukujących. Spadek poziomu H2A.Z był specyficzny, gdyż równocześnie nie obserwowano spadku obsadzenia H3 (w poprzedniej pracy w genie *HSP70* zniknął cały nukleosom +1). Co więcej geny charakteryzujące się największym spadkiem poziomu H2A.Z okazały się być tymi, które też najbardziej zmieniały swoją ekspresję, wskazując niejako, że obecność H2A.Z może być prekwizytem gwałtownych i diametralnych zmian w transkrypcji w odpowiedzi na bodziec. Według autorów zarówno usunięcie H2A.Z i aktywacja transkrypcyjna genów z grupy 6 poprzedzona jest związaniem czynnika HSFA1A. Swój wniosek opierają na badaniach *in vitro*, w których sam wzrost temperatury do 27°C nie powodował reakcji nukleosomu z H2A.Z, a także na obserwacji, że nie dochodzi do utraty H2A.Z z nukleosomu +1 genu *HSP70* w mutancie *hsfa1a/b/d/e*. Z drugiej strony nie są oni jednak już w stanie stwierdzić, co zachodzi najpierw – aktywacja transkrypcji czy utrata H2A.Z. Widać tu jednak, że autorzy ostatecznie porzucili model, w którym H2A.Z był „czujnikiem” temperatury. Rolę H2A.Z widzą bardziej jako rolę przełącznika (ang. *switch*) między odpowiedziami na bodźce (Cortijo i in., 2017).

1.6. Inne funkcje H2A.Z

Udział H2A.Z w sygnalizacji i naprawie pęknięć dwuniciowych

Poza udziałem H2A.Z w regulacji transkrypcji jego najszerzej dyskutowaną rolą jest udział w naprawie poważnych uszkodzeń DNA jakimi są pęknięcia dwuniciowe DNA (ang. *double-strand breaks*, DSBs). Są one bardzo toksycznymi uszkodzeniami materiału genetycznego, ponieważ prowadzą do niestabilności genomu, stąd muszą być przez komórkę szybko rozpoznane i naprawione. Udział H2A.Z w tych procesach został dowiedziony u *S. cerevisiae* (Kalocsay i in., 2009), *D. melanogaster* (Kusch i in., 2004) i w komórkach ssaczych (liczne doniesienia, zreferowane m.in. przez Gursoy-Yuzugullu i in., 2015).

Drożdżowy mutant delecyjny *htz1* wykazuje zwiększoną wrażliwość na czynniki powodujące DSB. H2A.Z wprowadzany jest w miejsce uszkodzenia i jest potrzebny do aktywacji punktu kontrolnego (ang. *checkpoint activation*) w cyklu komórkowym. U drożdży dominuje naprawa DSB przez rekombinację homologiczną, ale przy braku homologicznej matrycy do naprawy, miejsce uporczywie trwającego DSB jest przenoszone na peryferie jądra komórkowego i brak H2A.Z również to uniemożliwia (Kalocsay i in., 2009).

W komórkach ludzkich kaskadę zdarzeń prowadzącą do naprawy uruchamia fosforylacja wariantu histonowego H2A.X w miejscu uszkodzenia przez kinazę ATM (ang. *ataxia-telangiectasia mutated*). Do γ -H2A.X przyłącza się MDC1 (ang. *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*), który promuje rozprzestrzenianie się γ -H2A.X na setki kpz w obu kierunkach od miejsca DSB (Bonner i in., 2008). Następnie ligazy ubikwitynowe dołączają ubikwitynę do histonów (zwłaszcza H2A i H2A.X), przez co stają się one miejscem wiązania kolejnych białek naprawczych takich jak 53BPI i BRCA1 (Xu i in., 2010; Mattioli i in., 2012). Dochodzi również do metylacji H3K36 (według badań Pai i in., 2015, metylacja w tym miejscu promuje naprawę przez NHEJ, a acetylacja przez HR) oraz metylację H3K9, która z kolei stymuluje aktywność acetylotransferazową Tip60 (podjednostki kompleksu Tip60/p400) i kinazową ATM (Ayrapetov i in., 2014). Obie aktywności kompleksu Tip60/p400 pełnią kluczową rolę w adaptacji chromatyny do naprawy pęknięcia dwuniciowego DNA. p400 wprowadza H2A.Z do chromatyny w pobliżu uszkodzenia (Xu i in.,

2012), a to stymuluje Tip60 do acetylacji H2A i H4, również rozprzestrzeniającej się wokół miejsca DSB, tworząc domeny otwartej chromatyny (Xu i in., 2010), dostępnej dla maszynerii naprawczej.

Według najnowszych badań chromatyna w pobliżu DSB początkowo ulega kondensacji (być może aby wstrzymać transkrypcję lub utrzymać końce DNA blisko siebie), aby dopiero później ulec rozluźnieniu i umożliwić związanie maszynerii naprawczej. Przejście między tymi stanami reguluje w komórkach ssaczych właśnie kompleks NuA4-Tip60 z obiema jego aktywnościami – inkorporacji H2A.Z oraz acetylacji H2A/H2A.X i H4. Wariant H2A.Z gromadzi się w miejscu uszkodzenia w ciągu kilku minut od jego zaistnienia. Tworząc z H2B wydłużoną w stosunku do H2A kieszeń kwasową silniej oddziałuje z histonem H4 kolejnego nukleosomu, zarówno promując bardziej zwartą strukturę chromatyny, jak i zapobiegając acetylacji H4 przez NuA4. Jednak obecność H2A.Z w pobliżu DSB jest przejściowa i jego usunięcie przez białko opiekuńcze Anp32e (ang. *acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E*) uwalnia ogon aminowy H4, umożliwiając jego acetylację i dekondensację chromatyny. Wprowadzenie H2A na miejsce H2A.Z prowadzi też do ubikwitynacji wolnej w przypadku H2A kieszeni kwasowej, która jest kolejnym etapem w sygnalizacji pęknięć do naprawy (Gursoy-Yuzugullu i in., 2015).

Xu i in. (2012) pokazali, że wyciszenie H2A.Z za pomocą shRNA (ang. *short hairpin RNA*), jak również wyłączenie aktywności ATP-azowej p400 w komórkach ludzkich hodowanych *in vitro* skutkowało znacząco obniżoną acetylacją histonu H4, ubikwitynacją chromatyny oraz zredukowanym wiązaniem białka BRCA1 w odpowiedzi na DSB. Białko BRCA1 jest kluczowe dla naprawy DNA na drodze rekombinacji homologicznej (ang. *homologous recombination*) i komórki mogą rekompensować zaburzenie tej ścieżki przez wzmocnienie alternatywnej ścieżki naprawy – przez niehomologiczne łączenie końców (ang. *nonhomologous end-joining, NHEJ*). Jednakże okazuje się, że przy braku H2A.Z dochodzi również do obniżenia poziomu NHEJ – wariant ten potrzebny jest m. in. do ładowania w miejsce uszkodzenia podstawowego dla tej ścieżki kompleksu Ku70/Ku80 (Xu i in., 2012).

Badania sugerują, że H2A.Z ma udział również w rekombinacji mejozycznej (Choi i in., 2013; Rosa i in., 2013; Qin i in., 2014; Yamada i in., 2017), jednak nie jest on jeszcze przekonująco wyjaśniony..

H2A.Z w splicingu

Pojawiają się również doniesienia na temat wpływu H2A.Z na proces splicingu. Neves i in. (2017) pokazują w analizie całogenomowej, że u *S. cerevisiae* delekcja *htz1* skutkuje obniżeniem wydajności wycinania intronów głównie z genów z niekonsensusowym (a więc słabszym) miejscem rozgałęzienia (ang. *branching point*, BR). H2A.Z nie wpływa jednak na ekspresję białek zaangażowanych w splicing ani nie oddziałuje bezpośrednio z szeregiem sprawdzonych czynników splicingowych. Mimo to jest dobrze pozycjonowany w pobliżu miejsca rozgałęzienia (BR) i 3' miejsca splicingu (ang. *3' splice site*, 3' SS), a jego brak w kilku badanych genach powoduje wzrost wiązania U2 snRNP (ang. *U2 small nuclear ribonucleoprotein*) oraz wzrost wiązania U5 snRNP. Autorzy uważają, że wpływ Htz1 na splicing wynika z jego dowiedzionego wpływu na proces elongacji transkrypcji (Santisteban i in., 2011; Rudnizky i in., 2016), gdyż wycinanie intronów zachodzi kotranskrypcyjnie. Sami również pokazują w kilku genach obniżenie wiązania dużej podjednostki polimerazy II RNA Rbp3 (redukcja o 11-31%) (Neves i in., 2017).

Równoległe badania na innych drożdżach – *S. pombe* – dostarczyły podobnych obserwacji. H2A.Z wzbogacał okolice granic egzon – intron, był istotny dla wycinania intronów o niekonsensusowym BR i wykazywał silne genetyczne związki z U2 snRNP (Nissen i in., 2017).

2. ZAŁOŻENIA I CELE

Uniwersalność i silna ewolucyjna zachowawczość wariantu histonowego H2A.Z wraz z jego ewidentnym wzbogaceniem w pobliżu TSS we wszystkich analizowanych genomach od początku sugerowała badaczom jego zaangażowanie w proces transkrypcji. Jednak mimo wysiłków wielu grup badawczych, rola H2A.Z w regulacji transkrypcji pozostaje niejasna; sprzeczne informacje na ten temat pojawiają się w literaturze. Ponadto zasugerowano, że H2A.Z u *A. thaliana* może być szczególnie istotny do kontroli ekspresji genów odpowiedzi na różne bodźce. Dlatego głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu wariantu histonowego H2A.Z na ekspresję genów u *A. thaliana* w odpowiedzi na stres suszy.

Ze względu na brak dostępnej linii mutantu insercyjnego jednego z trzech genów H2A.Z – *HTA8* w tle genetycznym Col-0 i tym samym mutantu z całkowicie wyłączoną ekspresją H2A.Z, do eksperymentów użyto linii *arp6* (*suf3*), *pie1-5* oraz podwójnego mutantu *hta9-1 hta11-1*. Jak już opisano we WSTĘPIE, Arp6 i Pie1 są homologami niezbędnych podjednostek drożdżowego kompleksu SWR1, uważanego za jedyny kompleks deponujący H2A.Z w chromatynie (Billon i Côté, 2011). W roślinach w linii mutantu *arp6* pokazano dotychczas dramatyczny spadek poziomu H2A.Z dla kilku loci (*FLC*, *MAF4*, *MAF5*). Dlatego na potrzeby tej pracy założono, że fenotyp mutantu delecyjnego *arp6* jest najbliższy fenotypowi roślin nieposiadających H2A.Z w swojej chromatynie.

Szczegółowymi celami pracy były:

1. Określenie, czy rośliny z obniżonym poziomem H2A.Z w chromatynie w odmienny sposób reagują na stres oraz jakie geny wykazują u nich zaburzoną regulację.
2. Ustalenie, co dzieje się z H2A.Z w genach zmieniających swoją ekspresję w odpowiedzi na stres.
3. Scharakteryzowanie zależności pomiędzy obecnością H2A.Z (i jej zmianami) a poziomem ekspresji genów (i jej zmianami).
4. Zaproponowanie roli H2A.Z w regulacji transkrypcji genów u *Arabidopsis thaliana*.

3. MATERIAŁY

3.1. Materiał roślinny

Stosowano następujące linie *A. thaliana*:

- Col-0 uzyskaną z The Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio, USA)
- linię 5D Col-0 zawierającą dodatkową kopię genu *HTA11* z przyłączoną sekwencją BLRP (ang. *biotin ligase recognition peptide*) na 5' końcu genu, kontrolowaną przez natywny promotor, oraz linię K3F zawierającą sekwencję BLRP pod promotorem genu *HTA11*, uzyskane drogą transformacji z *Agrobacterium tumefaciens* w Zakładzie Biotechnologii UAM przez mgr Łukasza Pawełoszyka (2010)
- *arp6 (suf3)* otrzymaną od Dr. Kyuha Choi (National Research Laboratory of Plant Developmental Genetics, Department of Biological Sciences, Seoul National University, Korea) (Choi i in., 2005b)
- 5D-*arp6* powstałą ze skrzyżowania obu linii
- *hta9-1 hta11-1* typu *knock-out* - z insercją T-DNA w tych genach, otrzymaną od Dr Rosany March-Díaz (March-Díaz i in., 2008)
- *pie1-5* uzyskaną z Nottingham Arabidopsis Stock Centre, SALK_096434

3.2. Odczynniki do hodowli roślin

3.2.1. Odczynniki do sterylizacji nasion

- a) 70% etanol
- b) ACE (zawierający <5% podchlorynu sodu)
- c) HCl

3.2.2. Pożywka stała do hodowli *Arabidopsis* na szalkach

Używano pożywkę stałą 1/2 MS (Murashige i Skoog) z dodatkiem MES (0,5% w/v) w celu stabilizacji pH 5,7 (do którego doprowadzano roztworem 0,1M KOH).

Pożywka MS:

- a) Składniki mineralne:
 - Azotan (V) amonu - NH_4NO_3 - 1,650 mg/l

- Kwas borowy (III) - H_3BO_3 - 6,2 mg/l
- Chlorek wapnia - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 440 mg/l
- Chlorek kobaltu - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,025 mg/l
- Siarczan (VI) magnezu - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 370 mg/l
- Siarczan (VI) miedzi (II) - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,025 mg/l
- Fosforan (V) potasu - KH_2PO_4 - 170 mg/l
- Siarczan (VI) żelaza (II) - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 27,8 mg/l
- Azotan (V) potasu - KNO_3 - 1,900 mg/l
- Siarczan (VI) manganu (II) - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 22,3 mg/l
- Jodek potasu - KI - 0,83 mg/l
- Molibdenian (VI) sodu - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,25 mg/l
- Siarczan (VI) cynku - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 8,6 mg/l
- Wersenian sodu - $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 37,2 mg/l

b) Składniki organiczne:

- Inozytol - 100 mg/l
- Niacyna - 0,5 mg/l
- Pirydoksyna · HCl - 0,5 mg/l
- Tiamina · HCl - 0,1 mg/l
- Kwas indoliloctowy (IAA) - 1-30 mg/l
- Kinetyna - 0,04 – 10 mg/l
- Glicyna - 2,0 g/l
- Etylenodiamina - 1,0 g/l
- Sacharoza - 20 g/l
- Agar - 8 g/l

3.2.3. Odżywka do podlewania roślin

Rośliny rosące na torfach podlewano co dwa-trzy dni, w tym raz w tygodniu pożywką o następującym składzie:

2 mM MgSO_4

5 mM KNO_3

2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

2,5 mM KH_2PO_4 pH 5,6

Fe-EDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,39%, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,865%)

Mikroelementy:

70 H₃BO₃

14 MgCl₂ x 6 H₂O

0,5 CuSO₄ x 5 H₂O

1 ZnSO₄ x 7 H₂O

0,2 Na₂MO₄

10 NaCl

0,01 CaCl₂ x 6 H₂O

3.3. Odczynniki do amplifikacji fragmentów DNA

3.3.1. Reakcja PCR

Polimeraza DreamTaq (Thermo Scientific)

Bufor 10 × DreamTaq (Thermo Scientific)

Roztwór 1 mM dNTPs (Thermo Scientific)

3.3.2. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Maxima Sybr Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific)

3.4. Startery do reakcji PCR

3.4.1. Startery do genotypowania roślin

a) roślin linii 5D

Act: Bir_A: CACACGAACTTTATCTGCAC

Act: Bir_B: TGTAAGAGATAAACCCGCCTAT

b) linii mutantów *hta9-1 hta11-1*

HTA9_LP AATCCTTCCCAATGAATTTGC

HTA9_RP GGGAAAGGTGCTAAAGGTTTG

HTA11_LP GAAAAATTTAACCGCCAAAGC

LBb1.3: ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

c) linii mutantów *arp6*

arp6_gen0_F GTGATCCCACCACCGTAATC

arp6_gen0_R GCGTGAGTGAAGGAGAAACC

3.4.2. Startery do mapowania pozycji nukleosomów i H2A.Z

Nazwa startera	Sekwencja	Gen
FLC-1a	GCCACGTGTACCGCATGAC	AT5G10140.1
FLC-1s	ATTTAGCAACGAAAGTGAAAATAAGG	AT5G10140.1
FLC-2a	CGTTGCGACGTTTGGAGAA	AT5G10140.1
FLC-2s	AGAAATCAAGCGAATTGAGAACAA	AT5G10140.1
FLC-6a	TCGGCAGATTGAAAATGACATT	AT5G10140.1
FLC-6s	AAGCCAGCGCTATCACTAAACTTT	AT5G10140.1
FLC-7a	GGCTTTAAGATCATCAGCATGCT	AT5G10140.1
FLC-7s	CATCTCTCCAGCCTGGTCAAG	AT5G10140.1
FLC-9a	CGGAAGATTGTCCGAGATTTG	AT5G10140.1
FLC-9s	CATCATGTGGGAGCAGAAGCT	AT5G10140.1
(Deal i in., 2007)		
PZ013	TCGAACTTTAGGAATTCTTGACATGT	AT5G47590.1
PZ014	AGAGAGAGATGGGTGAGACAA	AT5G47590.1
PZ015	ATGTCCACTGCAAAGTGAGC	AT5G47590.1
PZ016	TCGCAAGGGAGCACTAATTG	AT5G47590.1
PZ017	TCACTTGATTTCGATAGCAAACACA	AT5G47590.1
PZ018	TGAGACATTGTGTGTGTGAGAGA	AT5G47590.1
PZ019	GAGAGGCTTGAGCTCTCGTG	AT3G03480.1
PZ020	AAGGTGCATCGCCAGCAG	AT3G03480.1
PZ021	TCCCTGATGCCACAAACATAGG	AT3G03480.1
PZ022	ACTACGTCCGTTTCAGTGACC	AT3G03480.1
PZ023	TCTGCTACGAACGTCTCCATC	AT3G03480.1
PZ024	AGGTGAGACAGGTACAGTTGTG	AT3G03480.1
PZ025	CGTGATGTAGAGTGTGATTGCAG	AT5G05060.1
PZ026	GAAC TTGTCAAGGTTTTGAGAGC	AT5G05060.1
PZ027	AACCCTGTTTTCCGGCAAAG	AT5G16410.1
PZ028	CACGAGGAAGGAGGTCGTTG	AT5G16410.1

PZ029	TCGGAGTTCCACGTCAGCAG	AT5G16410.1
PZ030	ACGAGATTCTCTGCAGTAACGG	AT5G16410.1
PZ031	GTCGTGGCTTTAAGAGGGATC	AT5G16410.1
PZ032	CTCGATCCGATATAACGATTTTCG	AT5G16410.1
PZ033	GGAGCCACCGTTTTCCAC	AT5G16410.1
PZ034	ACCCGGGAGCAGAGCTG	AT5G16410.1
PZ035	TTCAGATCATCACCCTGTAATGG	AT1G72620.1
PZ036	ATCGACGGAGAATATGAACGAAGC	AT1G72620.1
PZ037	AAACACGGCGGAGATGTATC	AT1G72620.1
PZ038	CAACCGTAGATCTCTCGGATTAC	AT1G72620.1
PZ039	TTCTGCGATCTCCGTCCAATC	AT1G72620.1
PZ040	TGGCCGGAGATCCAGAAATG	AT1G72620.1
PZ041	AGCTTGTACCAACACCATCCTC	AT5G58310.1
PZ042	TGAGCATCATTTTTGTGTTTGTGC	AT5G58310.1
PZ043	AGAGTTGGTAATAAAGGACACACC	AT5G58310.1
PZ044	ACCTGAGTATGTTTCGGGACAAG	AT5G58310.1
PZ045	TTGATCGTTGGGAAGTTGGG	AT5G58310.1
PZ046	CTTCTTTGGATGACTACGACGAG	AT5G58310.1
PZ049	CCGGTACAACCTTCACCTAAC	AT1G19320.1
PZ050	GTTTGCGGTGAGGATTCAG	AT1G19320.1
PZ051	AAGCCGGAGTATTGTTGCAC	AT1G19320.1
PZ052	TAATTCGTGGGCGGACAAGTC	AT1G19320.1
PZ053	TGTTCCCTTCGATTCTGTTTTGGAC	AT2G47770.1
PZ054	CCGCGGTATCTGATGTCCTG	AT2G47770.1
PZ055	CACCTCTGTGGCTCCTACAC	AT2G47770.1
PZ056	GCAGCCAAACCCATCAGAC	AT2G47770.1
PZ057	ACCATAAAAGATGTCTTTGCGATCC	AT2G47770.1
PZ058	GTTTCATGTCTATTACTCCACAATGAC	AT2G47770.1
PZ059	CCTTATTAGTTTGTGACAACCTTCGG	AT5G13210.1
PZ060	ATGTGAAATAAGCCGACTACCTTAGC	AT5G13210.1
PZ061	AGTGGCCGTACAAGAGAAGC	AT5G13210.1

PZ062	CACTGAACACAAACACCCTCTTG	AT5G13210.1
PZ063	CAATCGATGCTCTCTCTACACG	AT5G13210.1
PZ064	AGTGATTGTTTCCGGCGAAC	AT5G13210.1
PZ065	TCTCAGATTGGTTCAAGAGGTT	AT3G27870.1
PZ066	AGCTTCAGGATTATCAGGATCATT	AT3G27870.1
PZ067	TGAACAGAGGAGAACAGAACGG	AT3G27870.1
PZ068	AACTCAACTTGCACCGGAAG	AT3G27870.1
PZ069	CACGCTGTTTTGGTATGAAGC	AT3G27870.1
PZ070	AGCACGACATGTACCAATCG	AT3G27870.1
PZ071	CACCAGGGAAAAATGTTGCAG	AT3G25740.1
PZ072	AGCTCCGGCGAGGTATATTAAC	AT3G25740.1
PZ073	AGCAAAGTTCCAGAGATATCAAGTG	AT3G25740.1
PZ074	GCTCACACGCTTTCTTCATTTTC	AT3G25740.1
PZ075	ACATGGCCTGACAAATGGAC	AT3G25740.1
PZ076	AAGAATTGTATGCTCAAACGTGC	AT3G25740.1
PZ077	CCACCGTCCGATCTCTGAAC	AT5G05760.1
PZ078	GCCGGTGACTTTAGTTCAATTCC	AT5G05760.1
PZ079	AGCCTCGTGATCTTCTGTGAC	AT5G05760.1
PZ080	AATAAGAAGGCTTCCCGGATCG	AT5G05760.1
PZ081	GCTTAGTAGCTCCATAAGTCTG	AT5G05760.1
PZ082	CCAAGTTGGTCATTACACTGCTG	AT5G05760.1
PZ083	TTGATTAGATTTTCATCGACATTGGC	AT1G54450.1
PZ084	ACGTTAGATATAGAGCTGTTGCAG	AT1G54450.1
PZ085	AGAAAGAGGAGGCCATTGC	AT1G54450.1
PZ086	GCACGAATTCAGGGTCGAATAG	AT1G54450.1
PZ087	GCGCCATGCATTCCATTCTATG	AT1G54450.1
PZ088	ATGGAGTTTTGACGCGGAAC	AT1G54450.1
PZ089	AGCATCTTCGACATCTTCTTCC	AT1G54450.1
PZ090	GTGGGATCGTTTTGCTCATAGAG	AT1G54450.1
PZ091	TAACCTGTAAAACAAGGTGTCCAC	AT1G77960.1
PZ092	TCTTATGGTACCTGTGATTTCTCG	AT1G77960.1

PZ093	TGGGGGTATGATTGCGTTTG	AT1G77960.1
PZ094	CCATTGAGGTTTAGGTTACCCAAC	AT1G77960.1
PZ095	TGGGAGGTTCATTTTGCCTACG	AT1G77960.1
PZ096	TGGCATGTATCCACAGCAAC	AT1G77960.1
PZ097	GGGTGATCGAGAAAGAACTCATC	AT5G10800.1
PZ098	TTGGTGCCGTGCTATTATCG	AT5G10800.1
PZ099	GCCTCCAGTTCTACTAGATGAAGC	AT5G10800.1
PZ100	AGCTCAAGCCTGATTCTCAAGG	AT5G10800.1
PZ101	CTCGCTCTCTGCTTCTATCATG	AT5G10800.1
PZ102	GGACCGAAAACGAAGAGCAAAG	AT5G10800.1
PZ103	AACCTCCTTTCGATCTGTCAGC	AT3G30720.1
PZ104	TCAATGGCTGACCGTGTGAG	AT3G30720.1
PZ105	CCAGGTTATAGAAGATCTGGGTTG	AT3G30720.1
PZ106	AGGATGAAAAGAATATTACCTGTGGAG	AT3G30720.1
PZ107	TGCCTCCTTTGAGATCGAAG	AT1G68260.1
PZ108	TTCCTCTCCGGAGCGTAAAAAC	AT1G68260.1
PZ109	GTCAACTCTGAAATTGCTAAGGC	AT1G68260.1
PZ110	TCGGTATCAACTGCGACGAAG	AT1G68260.1
PZ111	AGGACGGTACTTGTGTGTCGAG	AT1G68260.1
PZ112	CCTATATTGGAGGCCAAAAGGAATAGC	AT1G68260.1
PZ113	TACCGGAGAGCCAATCAGCAG	AT2G18100.1
PZ114	ACCCAGAGATCCGCCTCATC	AT2G18100.1
PZ115	ATCCTGGAAAGACTCGAACTCG	AT2G18100.1
PZ116	TGGGTTTAGTTAGAGAGTGTTTCG	AT2G18100.1
PZ117	TTCATCGGCCGTTGCATTTTC	AT1G49240.1
PZ118	ACGATGAAGATCTGGCTCACTC	AT1G49240.1
PZ119	CGAGTTTTAGAACAAATCAGTAAGC	AT1G49240.1
PZ120	AACTTGGTGCACCGATGTAC	AT1G49240.1
PZ121	CGAATCGGGCAATTTTCGTC	AT1G20760.1
PZ122	ACTGAGATTAGAGCTTAGAAATCG	AT1G20760.1
PZ123	AGGATTTCAAGTGGTAGCCATGG	AT1G20760.1

PZ124	AAGGGACCTGTGGAACCAAAC	AT1G20760.1
PZ125	ATGGCACTGCGTTGACTCTC	AT3G63270.1
PZ126	CTGGATAAGGCGAAGAAGTTGG	AT3G63270.1
PZ127	TGACGAGCGAGCAAATGTAG	AT3G63270.1
PZ128	GACGAAGACTATGCGTTCAAGC	AT3G63270.1
PZ129	GACGATCAAAGGCGTCGATC	AT3G14960.1
PZ130	TTCTCCCAAGCTGTTTCACG	AT3G14960.1
PZ131	CGGTTGAGAGAAGGTTGAATCAG	AT3G14960.1
PZ132	CTCAGGAACACATGGATGCC	AT3G14960.1
PZ133	GCAAGATTATCAGTCCGACCAC	AT5G10070.2
PZ134	CGGGAAGCATAATCGATCTAAAGG	AT5G10070.2
PZ135	GCAGATCACATAACCACCACAC	AT5G10070.2
PZ136	CGCTTCCTCTTGATCAAGGTAC	AT5G10070.2
PZ137	ATCAAATAGGATTTCTCCAATGGC	AT5G10070.2
PZ138	ATTAGAAGACAGTGAGGAGGAAG	AT5G10070.2
PZ139	GAGCAACTCAAAGTCATACTGGAG	AT1G79420.1
PZ140	TAACGGTGTTAGGGCTTGTGG	AT1G79420.1
PZ141	GGTCCAACCACTTTGCAACAG	AT1G79420.1
PZ142	CAAGAGCCTCAAGTCTTGTC	AT1G79420.1
PZ143	GAGCTTGTTCTCGGTGGAAC	AT1G79420.1
PZ144	TGGCGCCAAACTGTTTTACC	AT1G79420.1
PZ145	GAGGCGGTTTACTGGGAGAC	AT1G79420.1
PZ146	CGTCAACGTCACGGTAATCTC	AT1G79420.1
PZ147	CGATCAGATTCAAAAAGTATCAACG	AT1G13440.1
PZ148	TCTCGCTCTTGTTGATCTGC	AT1G13440.1
PZ149	CGAAGAGAAGAAGAAACGAACC	AT1G13440.1
PZ150	CGTCGCTGTTAACGATCCTTTC	AT1G13440.1
PZ151	TTAAGAGAAAGCAAAAAGACAAAAGC	AT1G13440.1
PZ152	TCACTGATTCCATGCGCAGTC	AT1G13440.1
PZ155	AAAAGGACGAAGCTTGTTGC	AT5G15710.1
PZ156	GAGTTGGAGCAAAGATTCGAAC	AT5G15710.1

PZ157	CGAGCAAGAACAAGAACAAGAAC	AT5G49520.1
PZ158	TGACGTAAGTAGATTCGCCATG	AT5G49520.1
PZ159	AGCTAGGTTTGCCTTTCTGAC	AT5G49520.1
PZ160	TCCACCTATAACCGTCGTCAAG	AT5G49520.1

3.5. Elektroforeza w żelu agarozowym

- Agaroza (BioShop, 9012-36-6)
- Bufor TAE: 40 mM Tris, 20 mM kwas octowy, 1mM EDTA
- Bufor 10 x TBE: 108 g Tris, 55 g H₃BO₃, 40 ml 0,5 M EDTA
- Bromek etydyny 5 mg/ml
- Markery masy cząsteczkowej: Gene Ruler 1 kb oraz GR 100 bp plus (Thermo Scientific)
- Bufor obciążający do prób (6×): 30% glicerol, 0,25% bromofenol, 0,25% ksylencjanol

3.6. Izolacja chromatyny z liści Arabidopsis

- Bufor do cross-linkingu: 0,4 M sacharoza, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, dodawane bezpośrednio przed użyciem: 1 mM PMSF, 1% formaldehyd (Sigma, Poch)
- Bufor Honda: 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,44 M sacharoza, 10 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, dodawane przed użyciem: 10 mM β-merkaptioetanol, 2 mM spermina
- 2 M glicyna
- TNE: 10 mM Tris, pH 8,0, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA
- ciekły azot

3.7. Trawienie chromatyny MNazą

- 1 M CaCl₂
- 0,5 M EGTA
- nukleaza mikrokokalna (MNaza; 300u/ul, Fermentas)

3.8. Crosslinking reversal i izolacja DNA z chromatyny

- Bufor elucyjny: 0,5% SDS i 0,1 M NaHCO₃

- b) Bufor TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (doprowadzony HCl)
- c) enzymy: RNaza A (Sigma-Aldrich; R4642, 10 mg/ml), proteinaza K (21,4 mg/ml; 1000u/ μ l, Fermentas)
- d) Inne odczynniki:
 - 1 M TrisHCl pH 6,8
 - 3 M CH₃COONa pH 5,2
 - glikogen (20 mg/ml) (Thermo Scientific)
 - fenol
 - chloroform
 - alkohol izoamylowy
 - etanol

3.9. Precypitacja chromatyny i izolacja DNA z Chelexem

- a) Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen)
- b) Binding/Washing Buffer: 150mM NaCl, 20mM Tris HCl pH8, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 1mM PMSF
- c) ChIP Dilution Buffer: 1,1% Triton X-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris-HCl pH8, 167mM NaCl
- d) Bufor TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (doprowadzony HCl)
- e) Chelex (Biorad)
- f) Koktajl inhibitorów proteaz (P 8465; Sigma-Aldrich)
- g) PMSF

4. METODY

4.1. Sterylizacja nasion *A. thaliana* przed wysianiem na torfy

- 1) Nasiona umieszczano w probówce i zalewano 1 ml 70% etanolu.
- 2) Wytrząsano na wortexie przez 5 min.
- 3) Wirowano krótko i usuwano alkohol.
- 4) Zalewano 1 ml 20% ACE, wytrząsano przez 10 min, wirowano i usuwano ACE.
- 5) Przepłukiwano 5 razy po 1 ml wody.

4.2. Hodowla roślin

Nasiona wysiewano na namoczone torfianki umieszczone w kuwetach, a następnie przez trzy do pięciu dni stratyfikowano w chłodzie (4°C) i ciemności. Następnie przenoszono je do fitotronów Sanyo lub pomieszczeń hodowlanych Conviron, gdzie panowały stałe warunki wzrostu – temperatura 22°C, wilgotność 70%. Stosowano fotoperiod dnia długiego (16 h światła, 8 h ciemności) lub dnia krótkiego (8 h światła, 16 h ciemności). Rośliny podlewano co dwa - trzy dni, raz w tygodniu z odżywką (punkt 3.2.3).

4.3. Genotypowanie roślin

4.3.1. Szybka metoda izolacji DNA z liści

- 1) W probówce rozgniatano tipsem fragment liścia (ok. 3 mm²).
- 2) Zalewano 500 µl buforu ekstrakcyjnego (0,2 M Tris-HCl pH=9, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) i wytrząsano na wortexie przez ok. 5 minut.
- 3) Wirowano przez 5 min przy 12000 rcf.
- 4) 350 µl supernatantu przenoszono do nowej probówki i dodawano taką samą objętość izopropanolu. Mieszano przez kilkukrotne odwrócenie probówki i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
- 5) Wirowano przez 10 minut przy 12000 g.
- 6) Supernatant usuwano, a pelet pozostawiano do wysuszenia.
- 7) Do peletu dodawano 200 µl sterylnej wody i pozostawiano do rozpuszczenia przez noc w lodówce.

4.3.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR

Do reakcji używano bufor odpowiedni dla polimerazy, startery w stężeniu 0,3-0,5 μ M, dNTPs w stężeniu 0,5 mM, różną ilość matrycy.

Najczęściej stosowano następujące warunki reakcji:

- 1) Początkowa denaturacja 95°C 2 minuty
- 2) Denaturacja 95°C 15 sekund
- 3) Przyłączanie starterów (ang. anealing) 56-60°C 15 sekund
- 4) Elongacja 72°C, czas zależny od długości namnażanego fragmentu DNA
- 5) 35 – 40 cykli obejmujących kroki 2-4
- 6) Końcowa elongacja 72°C 3 minuty
- 7) 4°C

4.4. Testy kielkowania *A. thaliana* na szalkach

- 1) Nasiona sterylizowano przez 5 godzin w oparach kwasu solnego i ACE (w eksykatorze ze zlewką z roztworem zawierającym 3% HCl i 5 % ACE).
- 2) Nasiona wysiewano w warunkach sterylnych na szalki z pożywką stałą 1/2 MS, ewentualnie z dodatkiem NaCl (100 – 200 mM) czy mannitolu (200 – 300 mM).
- 3) Oklejone parafilmem szalki umieszczano na trzy - cztery dni w chłodzie (4°C) i ciemności w celu stratyfikacji.
- 4) Następnie wykładano je na półki w pomieszczeniu hodowlanym Conviron.
- 5) W równych odstępach czasowych liczone kielkujące nasiona, jako kryterium biorąc pojawienie się korzonka (ang. *radicle emergence*) lub zielonych liścieni (ang. *green cotyledons*).

4.5. Eksperymenty stresu suszy

4.5.1. Przeprowadzenie stresu suszy

Rośliny linii 5D, niosące konstrukt do ekspresji H2A.Z z przyłączonym znacznikiem, były hodowane w warunkach dnia długiego aż do wejścia w generatywną fazę wzrostu. 37-dniowe rośliny były losowo dzielone na grupę poddaną stresowi suszy i grupę kontrolną. Dla każdego warunków za każdym razem uzyskano co najmniej trzy powtórzenia biologiczne, na które składało się

od 8 do 16 roślin. Stres suszy uzyskiwano przez zaprzestanie podlewania na czas około 8 dni, po którym rośliny zwiędły całkowicie, ale nie były jeszcze martwe (przeprowadzono test ich przeżywalności), i charakteryzowano za pomocą względnej zawartości wody (ang. *relative water content*, *RWC*).

Ze względu na fenotyp wcześniejszego kwitnienia roślin linii *arp6*, by móc porównać je z roślinami typu dzikiego, eksperymenty z jej udziałem przeprowadzono w warunkach dnia krótkiego na 30-dniowych roślinach.

4.5.2. Zbieranie materiału roślinnego

Z tych samych roślin materiał był zbierany do następujących celów:

- izolacji RNA (i dalszych analiz typu RT-qPCR lub RNA-seq): na jedno powtórzenie biologiczne zbierano 100-120 mg liści rozety, z co najmniej 7 osobników
- pomiaru względnej zawartości wody (*RWC*) – 8 całych liści z różnych osobników
- izolacji chromatyny - 2 g z roślin poddanych stresowi, 4 g z roślin hodowanych w warunkach kontrolnych (więcej niż 8 roślin)

Zawsze zbierano więcej niż trzy powtórzenia biologiczne do każdego typu eksperymentu.

4.5.3. Pomiar względnej zawartości wody (ang. *relative water content*, *RWC*)

Pomiar *RWC* wykonywano w celu określenia intensywności stresu suszy oraz kontroli powtarzalności powtórzeń biologicznych. Na każde powtórzenie biologiczne składało się 8 liści z różnych osobników, powtórzeń było co najmniej pięć. Od razu po zebraniu materiał był ważony w celu określenia świeżej masy (ang. *fresh weight*, *FW*). Następnie liście umieszczano w falkonach wypełnionych wodą i następnego dnia wysycone wodą liście ważono, uzyskując tzw. *turgid weight* (*TW*). Dalej przez kilkanaście godzin materiał roślinny suszono w temperaturze powyżej 50 °C i ponownie ważono, uzyskując suchą masę (*dry weight*, *DW*). *RWC* wyliczano według wzoru:

$$\mathbf{RWC = (FW-DW)/(TW-DW)}$$

4.6. Techniki transkryptyczne

4.6.1. Izolacja RNA

- 1) Ok. 100 mg liści zawijano w folię aluminiową i zamrażano w ciekłym azocie, przechowywano w ultrazamrażalce (-80°C).
- 2) Materiał rozcierano dokładnie w moździerzu w ciekłym azocie.
- 3) Roztarty materiał roślinny przenoszono do probówek o objętości 2 ml i dodawano 1 ml Trizolu.
- 4) Probówki dokładnie worteksowano (ok. 10 min w RT).
- 5) Wirowano przez 15 min w 4°C, przy 12.000 rcf.
- 6) Supernatant przenoszono do nowych probówek, dodawano 500 µl chloroformu, worteksowano przez ok. 15 sekund, inkubowano w lodzie przez 3 minuty.
- 7) Wirowano przez 5 min, 4°C, 12.000 rcf.
- 8) Fazę wodną przenoszono do nowych probówek (≥ 560 µl) i dodawano równą objętość chloroformu.
- 9) Probówki worteksowano przez 3 min w RT, a następnie wirowano przez 5 min w 4°C, 12.000 rcf.
- 10) Fazę wodną przenoszono do nowych probówek i dodawano równą objętość izopropanolu. Inkubowano przez 10 min w RT.
- 11) Probówki wirowano przez 40 min w 4°C przy 14.000 rcf. Pelety przepłukiwano dwukrotnie 75% EtOH w lodzie.
- 12) Ostrożnie pozbywano się supernatantu. Osad RNA suszono na powietrzu, a następnie rozpuszczano w 20 µl DEPCowanej H₂O.
- 13) Mierzono stężenie RNA na nanodropie i przygotowywano rozcieńczenia o stężeniu 1 µg/ml (po ~20 µl).
- 14) 1 µg RNA inkubowano przez 6-8 minut w 65°C celem sprawdzenia degradacji, a następnie nanoszono na 1.2% żel agarozowy i rozdzielano w buforze TBE.

- DNase 1 μ l
- H₂O do 10 μ l

- 1) Próby inkubowano w termocyklerze w 37°C przez 30 min.
- 2) Dodawano 1 μ l RQ1 DNase Reaction Buffer Stop Solution.
- 3) Próby inkubowano w termocyklerze w 65°C przez 10 min.

Odwrotna transkrypcja (zgodnie z protokołem zestawu Thermo Scientific)

- Matryca 5,5 μ l
- Primer Oligo (dT) 1 μ l
- H₂O 5,5 μ l

- 1) Próby inkubowano w termocyklerze w 65°C przez 5 min.
- 2) Dodawano 8 μ l podanej poniżej mieszaniny do każdej próby:

- 5x Reaction buffer 4 μ l
- Ribolock 1 μ l
- 10mM dNTP Mix 2 μ l
- RT 1 μ l

- 3) Inkubowano w termocyklerze: 60 min 42°C; 5 min 70°C, hold 4°C.
- 4) cDNA rozcieńczano 10-krotnie

4.7. Izolacja chromatyny z liści *Arabidopsis* i uzyskanie mononukleosomowego DNA

4.7.1. Sieciowanie DNA i białek (ang. *cross-linking*)

- 1) Z roślin poddanych stresowi suszy zbierano 2 g liści, a z roślin hodowanych w warunkach kontrolnych 4 g liści z rozet *A. thaliana* i umieszczano je w 50ml-falkonie; wierzch zabezpieczano kawałkiem nylonowej tkaniny.
- 2) Każdą próbę zalewano 37 ml buforu do cross-linkingu i przez 10 min poddawano reakcji sieciowania w podciśnieniu uzyskanym przez wypompowywanie powietrza w eksykatorze.
- 3) Reakcję zatrzymywano przez dodanie 2,5 ml 2M roztworu glicyny (do końcowego stężenia 100 mM) i całość poddawano działaniu podciśnienia przez kolejne 5 minut.

- 4) Materiał roślinny płukano pięciokrotnie wodą dejonizowaną, a następnie rozcierano dokładnie w ciekłym azocie. Roztarty materiał najczęściej był zamrażany i przechowywany w -80°C

4.7.2. Izolacja chromatyny

(adaptacja z Mito i in., 2005, ze zmianami)

- 5) W celu dalszej izolacji próby zawieszano w 20 ml lodowatego buforu Honda.
- 6) Inkubowano na lodzie przez 30 minut z delikatnym mieszaniem.
- 7) Po tym czasie filtrowano przez 2 warstwy Miracloth.
- 8) Filtrat wirowano w falkonie przez 15 minut przy 2 000 g w 4°C .
- 9) Osad ponownie delikatnie zawieszano w buforze Honda (20ml) i wirowano. Czynność powtarzano w miarę potrzeby w celu otrzymania białego peletu jąder komórkowych i pozbycia się innych elementów tkanki roślinnej.
- 10) Ostatnie płukanie osadu jąder komórkowych przeprowadzano jak w punkcie 9, ale w buforze bez sperminy.
- 11) Ostatecznie osad zawieszano w 1ml zimnego TNE i przenoszono do dwóch 1,5ml probówek.

4.7.3. Trawienie MNazą

(adaptacja z Mito i in., 2005, ze zmianami)

- 12) Do każdej z probówek dodawano CaCl_2 do stężenia 4mM i 8 u MNazy i od razu przenoszono je na 20 minut do termomiksera o temp. 37°C z wytrząsaniem 1400 rpm w celu uwolnienia nukleosomów.
- 13) Reakcję zatrzymywano przez dodanie EGTA do finalnego stężenia 25 mM i umieszczenie prób na lodzie
- 14) Schłodzone próby wirowano przy 14 000 rcf przez 5 minut w 4°C , a supernatant przenoszono do niskoretencyjnych probówek.
- 15) Do kolejnych etapów próby przechowywano w ciekłym azocie.

4.7.4. Odwrócenie sieciowania (ang. cross-linking reversal) i izolacja DNA z nukleosomów

Z niewielkiej ilości izolatu chromatyny izolowano DNA i rozdzielano elektroforetycznie, by sprawdzić wydajność uzyskiwania mononukleosomowego DNA.

- 16) Do 70 μl izolatu chromatyny podawano 430 μl buforu elucyjnego (końcowe stężenia: 0,5% SDS i 0,1 M NaHCO_3) a następnie 20 μl 5 M NaCl i inkubowano przez noc w 65°C w celu zerwania wiązań powstałych w wyniku sieciowania formaldehydem.
- 17) Po tym czasie dodawano 10 μl 0,5 M EDTA, 20 μl 1 M TrisHCl pH 6,8 oraz 5 μl RNazy A (10mg/ml) i trawiono RNA przez 0,5h w 37°C z intensywnym mieszaniem (900 rpm).
- 18) Białka trawiono przez dodanie 1 μl proteiny K o stężeniu 20 mg/ml i 1,5 h inkubację w 45°C .
- 19) Po tym czasie przeprowadzano szybką ekstrakcję fenolowo-chloroformową DNA: dodawano równą objętość mieszaniny (zazwyczaj ok. 530 μl) fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25/24/1) i krótko wortexowano.
- 20) Mieszaninę wirowano przy 14 000 rcf przez 15 minut w 4°C i warstwę wodną przenoszono do nowej probówki o pojemności 2 ml.
- 21) Dodawano 1/10 objętości 3 M CH_3COONa pH 5,2, 4 μl glikogenu (20 mg/ml) oraz 2,5 objętości 100% EtOH, kilkakrotnie mieszano przez odwrócenie probówek i precypitowano DNA w temp. -80°C przez przynajmniej 40 min.
- 22) Wirowano przez 15 minut 14 000 rcf w 4°C .
- 23) Wylewano supernatant, a osad przepłukiwano 500 μl lodowatego 70% EtOH; wirowano ponownie przez 5 minut w 4°C .
- 24) Dokładnie odpipetowywano supernatant, a osad DNA pozostawiono do wyschnięcia.
- 25) DNA rozpuszczano w 15 μl TE i rozdzielano elektroforetycznie w 1,2% żelu agarozowym w celu sprawdzenia jakości i ilości mononukleosomowego DNA.

4.8. Izolacja mononukleosomowego DNA w celu mapowania pozycji nukleosomów (input)

- 1) Do 20 µl potraktowanej MNazą chromatyny dodawano 10% Chelex (200-400 µl) i inkubowano przez 10 min w termobloku nagrzanym do 99°C.
- 2) Próby schładzano, a następnie wirowano na maksymalnych obrotach przez 1 min, po czym supernatant przenoszono do nowej silikonizowanej probówki i zamrażano w -20°C.
- 3) Do reakcji ilościowego PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) używano 2 µl.

4.9. Precypitacja chromatyny z linii ekspresyjnej HTA11 z dołączoną biotyną (ChAP, ang. chromatin affinity purification)

- 1) 25 µl równomiernie zawieszonego złoża Streptavidin-DynaBeads przenoszono do niskoretencyjnej probówki, trzy razy płukano 1ml Binding/Washing Buffer z użyciem statywu magnetycznego i finalnie zawieszano w 100 µl Binding/Washing Buffer.
- 2) 100 µl chromatyny po trawieniu MNazą rozcieńczano 10-krotnie roztworem ChIP Dilution; dodawano 1/100 objętości koktajlu inhibitorów proteaz i PMSF.
- 3) Wirowano przy maksymalnych obrotach przez 10 min. w 4° C, a supernatant przenoszono do probówki ze złożem. Eliminowało to możliwość elucji ewentualnych fragmentów DNA niespecyficznie związanych z wewnętrzną powierzchnią probówki.
- 4) Inkubowano całą noc z mieszaniem w 4°C.
- 5) Kolejnego dnia złoże z przyłączonymi nukleosomami płukano według poniższego schematu:
 - 5 x 5 min 1 ml Binding/Washing Buffer z PMSF
 - 2 x 5 min 1 ml buforu TEPrzed ostatnim płukaniem złoże przenoszono do nowej, niskoretencyjnej probówki.
- 6) Dodawano 100 µl 10% roztworu Chelexu.
- 7) 10% roztwór Chelexu (200-400 µl) dodawano również do tzw. inputu, czyli niedużej ilości (10-20 µl) traktowanej MNazą chromatyny.

- 8) Próby z Chelexem inkubowano przez 10 min w termobloku nagrzanym do 99°C w celu elucji DNA.
- 9) Po schłodzeniu próby zwirowywano przy maksymalnej prędkości przez 1 min, po czym supernatant przenoszono do nowej niskoretencyjnej probówki i zamrażano.
- 10) Do reakcji real-time qPCR używano 2 µl.

4.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time qPCR)

Używano zestawu z fluorochromem interkalującym do dwuniciowego DNA SybrGreen i referencyjnym ROX. Każdą próbę analizowano w trzech powtórzeniach technicznych, a negatywną próbę kontrolną stanowiła próba z wodą zamiast matrycy. Reakcję przeprowadzano w urządzeniu Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Odczytu i analizy wyników dokonywano z użyciem programu SDS 2.4 oraz programu Microsoft Excel. Ilość produktu określano za pomocą absolutnej kwantyfikacji (ang. *absolute quantification*) z wykorzystaniem krzywej standardowej. Specyficzność produktu była kontrolowana przez oznaczenie jego krzywej topnienia.

W przypadku prób po ChAP poziom wzbogacenia w badane białko danego fragmentu DNA określano przez wyliczenie tzw. procentu inputu, zgodnie z równaniem:

$$100 \times 2^{(Ct_{\text{adjusted Input}} - Ct_{\text{Enriched}})}$$

Program do ChAP-qPCR

Mieszanina reakcyjna o objętości 10 µl zawierała:

- a. matrycę – 2 µl
- b. startery – 0,2 µl każdego o stęż. 10 mM
- c. SybrGreen MasterMix 2x – 5 µl
- d. wodę

Program termocyklera:

1. 95°C 10 minut
2. 95°C 15 sekund
3. 60°C 1 minuta
4. 40-50 cykli 2-3

5. krzywa topnienia: 95°C 15 sekund, 60°C 15 sekund --> (z szybkością 2%)
95°C 15 sekund

4.11. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe i analiza jego wyników

4.11.1. RNA-seq i analiza jego wyników

RNA przesyłano w suchym lodzie do firmy BGI Hongkong, która przygotowywała biblioteki i przeprowadzała sekwencjonowanie z użyciem chemii Illuminy według protokołu tzw. pojedynczych końców (single-end). Surowe dane po wstępnej analizie jakości odczytów (FastQC, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) i ich przycięciu (ang. *trimming*, fastx, http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html) mapowano do referencyjnego genomu TAIR10, używając programu TopHat2 aligner (Kim i in., 2013) z domyślnymi ustawieniami. Następnie odczyty odnoszące się do poszczególnych genów zostały zliczone z użyciem narzędzia HTseq (Anders i in., 2015) i przy wybranej opcji „union”. Odczyty te służyły do oszacowania genów ulegających różnicowej ekspresji przez program DESeq2 (Love i in., 2014). Istotne różnice w ekspresji zostały wybrane na podstawie wartości padj (wartość P skorygowana procedurą Benjamini-Hochberga) niższej niż 0,05. Analiza GO została przeprowadzona z użyciem platformy VirtualPlant 1.3 z klasyfikacją GO TAIR10 (Katari i in., 2010), a do określenia wartości p kategorii funkcjonalnych użyto testu dokładnego Fischera.

Do utworzenia diagramów Venna użyto narzędzie *Venny* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

4.11.2. MNase-seq i ChAP-seq oraz analiza ich wyników

DNA przesyłano w suchym lodzie do firmy BGI Hongkong, która przygotowywała biblioteki DNA oraz przeprowadzała sekwencjonowanie na platformie Illumina HiSeq2000. Surowe dane były następnie pobierane i mapowane do genomu referencyjnego TAIR10 za pomocą programu Bowtie2 (Langmead i Salzberg, 2013). Wzbogacenie H2A.Z określano, po normalizacji do wielkości biblioteki, przez podzielenie odczytów ChAP-seq przez odczyty MNase-seq (który był dla nich inputem). Program DANPOS2 (Chen i in., 2013) był używany do normalizacji sygnałów, rysowania profili i różnicowej analizy

danych z ChAP-seq i MNase-seq. Różnicowe wiązanie H2A.Z w próbkach traktowanych stresem i kontrolnych określano z użyciem algorytmu Dpeak, natomiast algorytm Dpos służył do analiz różnego typu zmian dotyczących nukleosomów, takich jak zmiana obsadzenia (ang. *occupancy*), zmiana pozycji bądź „rozmycia” nukleosomu (ang. *fuzziness*). We wszystkich analizach używano progu FDR na poziomie 0.01. Do adnotacji znalezionych różnicowych miejsc wiązania i nukleosomów, analiz GO i szlaków molekularnych oraz domen białkowych nadreprezentowanych w danych zestawach genów używano oprogramowania HOMER (Heinz i in., 2010). Przeglądarkę prezentującą opracowane dane utworzono używając oprogramowania JBrowser (Skinner i in., 2009).

Korelacja rang Spearmana dla wzbogacenia H2A.Z

Wzorowano się na podejściu zastosowanym przez Zilbermana i in. (2007).

Dla każdego genu ulegającego ekspresji, w którym pojawiał się H2A.Z (n=16332), zsumowano wszystkie wartości wzbogacenia H2A.Z osobno dla TSS (sumując wzbogacenie w H2A.Z fragment 50 do 180 pz poniżej TSS), ESS (40 – 170 pz poniżej ESS, średnia wartość była brana pod uwagę, gdy gen zawierał więcej niż jeden egzon) i TTS (360 – 230 pz powyżej TTS). Następnie geny te były dzielone na percentyle np. ze względu na poziom ekspresji (wielkość zmiany w poziomie ekspresji etc.) i obliczano sumę wzbogacenia H2A.Z wszystkich genów w danym percentylu, po czym wartości te dzielono na rangi. Następnie obliczano współczynniki korelacji rang Spearmana.

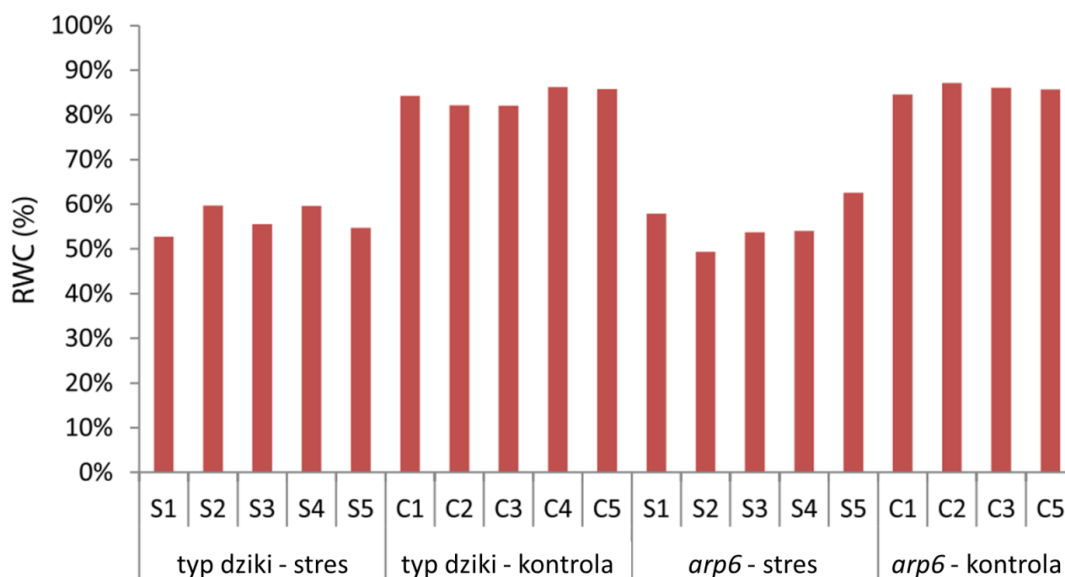
Mapowanie odczytów uzyskanych w wyniku eksperymentów RNA-seq i ChAP-seq oraz wstępne analizy transkryptomyczne przeprowadzał prof. dr hab. Wojciech Karłowski, analizy ChAP-seq i MNase-seq - dr Michał Kabza, a analizy statystyczne (w tym obliczenie współczynników korelacji rang Spearmana) – dr hab. Piotr Ziółkowski.

5. WYNIKI

5.1. Porównanie wpływu wybranych stresów abiotycznych na rośliny z normalnym oraz obniżonym poziomem H2A.Z w chromatynie

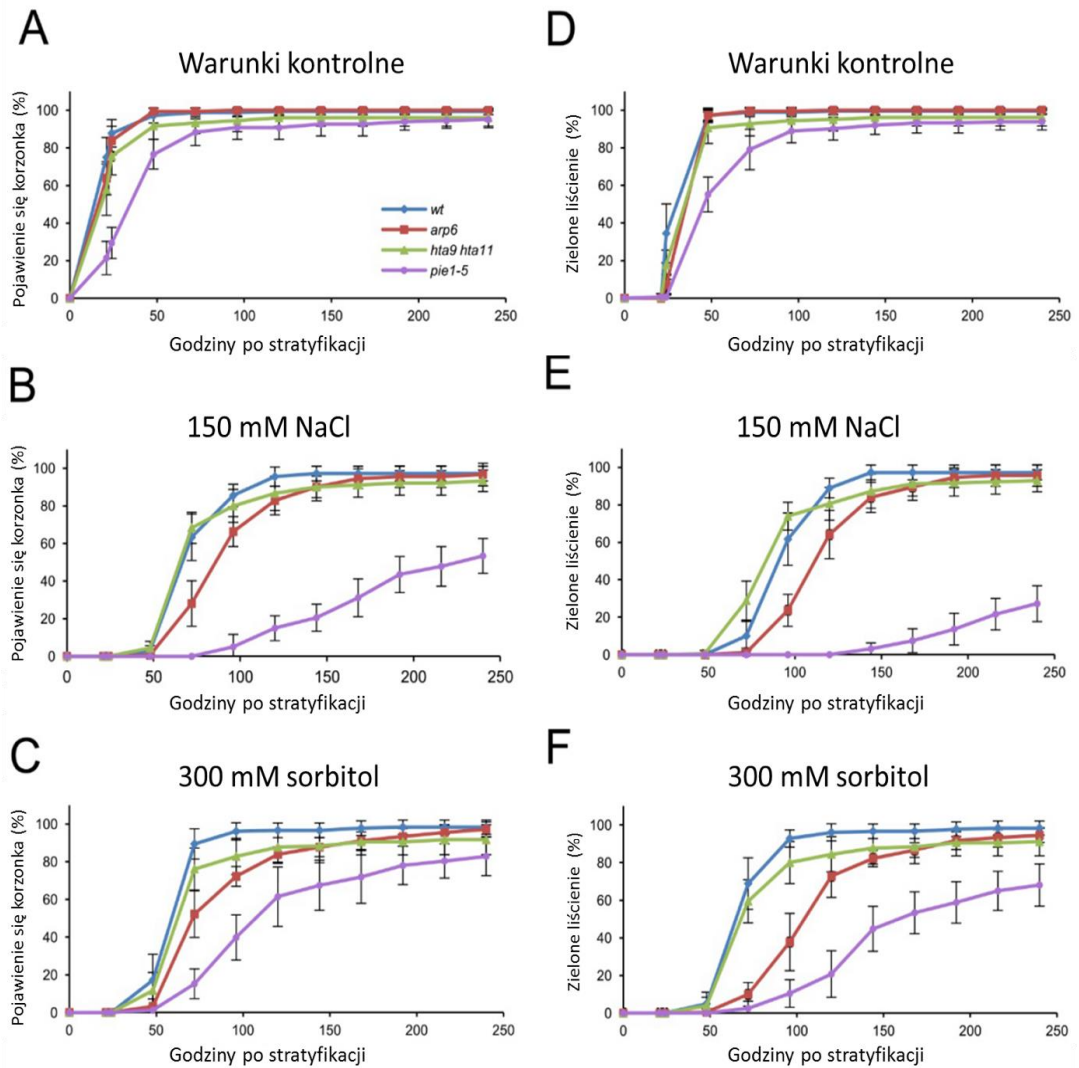
Jako że rośliny linii *arp6* zakwitają wcześniej niż rośliny typu dzikiego (WT), żeby porównywać obie linie na podobnym etapie rozwoju i jednocześnie zebrać wystarczająco materiału do analiz, zdecydowaliśmy się hodować rośliny w fotoperiodzie krótkiego dnia (8 h światła i 16 h ciemności) i stres rozpoczynać na 30-dniowych roślinach (żadne rośliny wtedy jeszcze nie kwitły). Jednakże zaprzestanie podlewania nie wydawało się odmiennie wpływać na rośliny typu dzikiego i rośliny *arp6*; obserwacja ta była weryfikowana przez wyznaczenie względnej zawartości wody w tkance (RWC). Najczęściej rośliny kontrolne wykazywały RWC na poziomie około 85%, a rośliny poddane stresowi – około 55%, niezależnie od genotypu (**Ryc. 3**). Próbowano porównywać również inne parametry, które są wskaźnikami stresu, jak zmiany w poziomie chlorofilu a i b. Jednakże w stresie suszy tkanka miała zupełnie inny skład od tkanki kontrolnej i podejmowane próby normalizacji wydawały się wprowadzać duży błąd. Dodatkowo warunki techniczne, w których stres był prowadzony (konstrukcja fitotronów, kierunek nawiewu powietrza czy regulacja wilgotności), uniemożliwiały uzyskanie równego obsychania doniczek torfowych z roślinami, wprowadzając pewne zróżnicowanie w próbie. Dlatego postanowiliśmy poddać rośliny innym rodzajom stresu osmotycznego na szalkach, gdzie ujednoczenie warunków stresowych jest łatwiejsze do uzyskania.

W tym celu przeprowadzono eksperymenty kiełkowania nasion na pożywce z dodatkiem 150 mM NaCl lub 300 mM sorbitolu. Choć obie substancje wywołują stres osmotyczny, nie jest to działanie jednakowe. W przypadku soli występuje dodatkowo toksyczny nadmiar jonów. Przed przystąpieniem do eksperymentów z kiełkowaniem, nasiona wszystkich zastosowanych linii jednocześnie namnożono, aby wykluczyć wpływ wieku nasion czy warunków ich przechowywania na przebieg doświadczenia. Na szalkach wysiewano równe ilości nasion wszystkich linii. Mniejsze wymagania przestrzenne tych eksperymentów umożliwiły użycie dodatkowych linii mutantów *pie1-5* oraz *hta9-1 hta11-1* do porównania efektów stresu.



Ryc. 3. Względna zawartość wody w tkance (RWC) uzyskiwana przez rośliny typu dzikiego i *arp6* poddane stresowi suszy (S) i kontrolne (C). Numery wskazują powtórzenia biologiczne. Za: Sura i in., 2017

Dodatek zarówno 150 mM NaCl, jak i 300 mM sorbitolu znacznie opóźnił kiełkowanie nasion wszystkich linii, obserwowane jako pojawienie się korzonka (ang. *radicle emergence*) oraz wykształcenie zielonych liścieni (**Ryc. 4**, odpowiednio **A-C** i **D-F**). Najbardziej hamująco czynniki te działały na nasiona linii *pie1-5*, ale należy zauważyć, że nasiona te już w warunkach kontrolnych wykazywały opóźnione kiełkowanie w stosunku do linii WT (**Ryc. 4 A i D**). Podobnie, choć w mniejszym stopniu, opóźnione stresorami było kiełkowanie linii *arp6*. Jednak i w tym wypadku w warunkach kontrolnych obserwowano bardziej zaawansowany proces kiełkowania nasion WT w porównaniu do nasion *arp6*, co widać w przypadku pojawiania się zielonych liścieni (**Ryc. 4 D**). Kiełkowanie linii *hta9-1 hta11-1* w warunkach kontrolnych również jest nieco opóźnione w stosunku do linii WT, ale nie w warunkach stresowych.

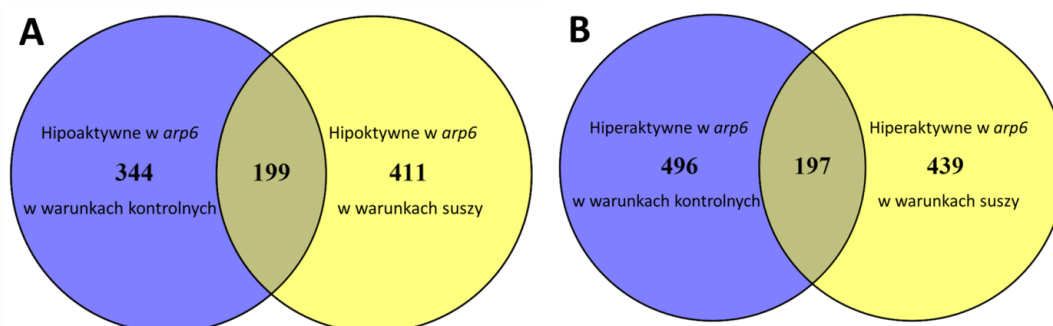


Ryc. 4. Kiełkowanie nasion linii typu dzikiego (WT), *arp6*, *pie1-5* i *hta9 hta11* na standardowej pożywce (**A** i **D**), na pożywce z dodatkiem 150 mM NaCl (**B** i **E**) oraz z dodatkiem 300 mM sorbitolu (**C** i **F**). Lewy panel przedstawia dynamikę pojawiania się korzonka (**A-C**), prawy panel – pojawiania się zielonych liści (**D-F**). Za: Sura i in., 2017

Podsumowując, kiełkowanie linii z upośledzonym wprowadzaniem H2A.Z do chromatyny *pie1-5* i *arp6* już w warunkach kontrolnych jest opóźnione w stosunku do kiełkowania linii WT, a stres wywołany przez dodanie 150 mM NaCl lub 300 mM sorbitolu jeszcze tę różnicę pogłębia.

5.2. Deregulacja genów w linii mutantu *arp6* w warunkach kontrolnych i stresu suszy

Brak widocznych różnic w reagowaniu na suszę pomiędzy linią *arp6* a linią WT nie oznacza, że różnic tych nie ma na poziomie molekularnym. W celu zbadania tych różnic całogenomowo przeprowadzono analizę transkryptomoczną z użyciem metody RNA-seq. Odtąd geny, które ulegają w linii *arp6* podwyższonej bądź obniżonej ekspresji w stosunku do linii WT, będą określane jako odpowiednio hiper- i hipoaktywne, w celu odróżnienia od genów zmieniających poziom ekspresji w odpowiedzi na stres suszy. Wspomniana analiza przeprowadzona przy przyjęciu wartości współczynnika fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*, *FDR*) na poziomie 5% ujawniła 1235 genów ulegających odmiennej ekspresji (\log_2 z krotności zmiany ekspresji pomiędzy linią *arp6* a WT większy od 0,5) w warunkach kontrolnych (543 hipoaktywne i 693 hiperaktywne w *arp6*) oraz 1246 genów w warunkach suszy (610 hipoaktywnych i 636 hiperaktywnych). Co ciekawe, pomimo podobnej liczby deregulowanych genów w obu warunkach, tylko część z nich się pokrywa, co pokazują diagramy Venna (**Ryc. 5**).



Ryc. 5. Geny hipoaktywne (A) i hiperaktywne (B) w linii *arp6* w warunkach kontrolnych (niebieski) i stresu suszy (żółty). Za: Sura i in., 2017

Analiza GO ujawniła, że w obu warunkach geny hipoaktywne w *arp6* były znacząco wzbogacone w kategorię *Proces związany z metabolizmem DNA* (*DNA metabolic process*, $P < 2,3E-04$ dla warunków kontrolnych i $P < 4,4E-05$ dla warunków stresu). Dodatkowo w warunkach kontrolnych geny hipoaktywne były wzbogacone w *Odpowiedź na uszkodzenie DNA* (*Response to DNA damage stimulus*, $P < 2,79E-05$) oraz *Naprawę DNA* (*DNA repair*, $P < 3,09E-05$). Z kolei w warunkach stresu suszy geny te wzbogaca kategoria *Proces związany z*

metabolizmem związków azotowych (Nitrogen compound metabolic process, $P < 7,8E-04$). Wskazuje to na faktyczny udział H2A.Z w sygnalizacji i naprawie uszkodzeń DNA (**Tab. 1**).

Z kolei analiza GO dla genów hiperaktywnych w warunkach kontrolnych wskazała zdecydowanie kategorie związane z odpowiedzią na bodźce i stesy: *Odpowiedź na bodziec (Response to stimulus, $P < 2,12E-09$)*, *Odpowiedź na bodziec chemiczny (Response to chemical stimulus, $P < 1,02E-06$)*, *Odpowiedź na stres (Response to stress, $P < 7,76E-04$)* i *Odpowiedź na bodziec abiotyczny (Response to abiotic stimulus, $P < 7,76E-04$)* (**Tab. 1**). Sugeruje to udział H2A.Z w represji tych genów w przypadku braku bodźców/stresów. W grupie genów hiperaktywnych w stresie suszy żadna kategoria GO nie była istotnie nadreprezentowana.

Tab. 2. Klasy *Gene Ontology* nadreprezentowane przez geny hipo- i hiperaktywne w linii *arp6* w warunkach kontrolnych i stresu suszy. Za: Sura i in., 2017

Identyfikator GO	Klasa GO	Obserwowana częstość	Spodziewana częstość	Wartość <i>p</i>
Geny hipoaktywne w linii <i>arp6</i> w warunkach kontrolnych				
GO:0006974	<i>Odpowiedź na uszkodzenie DNA (Response to DNA damage stimulus)</i>	3,8%	0,7%	2,79E-05
GO:0006281	<i>Naprawa DNA (DNA repair)</i>	3,6%	0,7%	3,09E-05
GO:0006259	<i>Proces związany z metabolizmem DNA (DNA metabolic process)</i>	4,7%	1,3%	0,00023
Geny hipoaktywne w linii <i>arp6</i> w warunkach stresu suszy				
GO:0006259	<i>Proces związany z metabolizmem DNA (DNA metabolic process)</i>	4,8%	1,3%	4,40E-05
GO:0034641	<i>Proces związany z metabolizmem komórkowych związków azotowych (Cellular nitrogen compound metabolic process)</i>	11,9%	6,8%	0,00787

GO:0006807	<i>Proces związany z metabolizmem związków azotowych (Nitrogen compound metabolic process)</i>	12,1%	7,1%	0,00846
Geny hiperaktywne w linii arp6 w warunkach kontrolnych				
GO:0050896	<i>Odpowiedź na bodziec (Response to stimulus)</i>	25.8%	14.8%	2,12E-09
GO:0042221	<i>Odpowiedź na bodziec chemiczny (Response to chemical stimulus)</i>	14.8%	7.6%	1,02E-06
GO:0006950	<i>Odpowiedź na stres (Response to stress)</i>	14.1%	8.4%	0,000776
GO:0009628	<i>Odpowiedź na bodziec abiotyczny (Response to abiotic stimulus)</i>	10.2%	5.4%	0,000776
GO:0006855	<i>Transport przez błonowy leków (Drug transmembrane transport)</i>	1.6%	0.3%	0,00134
GO:0080167	<i>Odpowiedź na karrikiny (Response to karrikin)</i>	2.3%	0.5%	0,00134
GO:0015893	<i>Transport leków (Drug transport)</i>	1.6%	0.3%	0,00147
GO:0010033	<i>Odpowiedź na substancje organiczne (Response to organic substance)</i>	8.7%	4.6%	0,00148
GO:0009607	<i>Odpowiedź na bodziec biotyczny (Response to biotic stimulus)</i>	5.6%	2.4%	0,00153
GO:0009719	<i>Odpowiedź na bodziec endogenny (Response to endogenous stimulus)</i>	7.2%	3.7%	0,003
GO:0009733	<i>Odpowiedź na bodziec auksynowy (Response to auxin stimulus)</i>	3.3%	1.1%	0,00445
GO:0009692	<i>Proces związany z metabolizmem etylenu (Ethylene metabolic process)</i>	1%	0.1%	0,00669
GO:0009693	<i>Proces biosyntezy etylenu</i>	1%	0.1%	0,00669

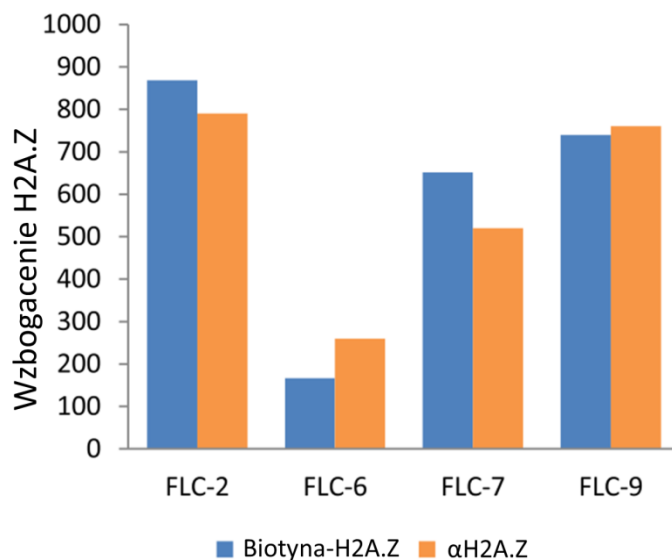
	(Ethylene biosynthetic process)			
GO:0043449	Proces związany z metabolizmem komórkowych alkenów (Cellular alkene metabolic process)	1%	0.1%	0,00694
GO:0043450	Proces biosyntezy alkenów (Alkene biosynthetic process)	1%	0.1%	0,00694
GO:0019748	Proces związany z metabolizmem drugorzędowym (Secondary metabolic process)	3.6%	1.5%	0,00939

5.3. Linia Arabidopsis do badania rozmieszczenia H2A.Z w chromatynie w warunkach kontrolnych i stresu suszy

Aby zbadać rozmieszczenie H2A.Z w chromatynie *A. thaliana*, możliwe były dwa podejścia – wyłowienie go za pomocą przeciwciał (ang. *chromatin immunoprecipitation, ChIP*) lub wytworzenie linii prowadzącej ekspresję H2A.Z z dołączonym znacznikiem, za który można by go wyłowić (ang. *chromatin affinity purification, ChAP*). Niestety, mimo podjętej współpracy z firmą biotechnologiczną Agrisera w celu wytworzenia przeciwciał rozpoznających HTA9 lub HTA8/11, nie udało się uzyskać specyficznych przeciwciał. W Zakładzie Biotechnologii wyprowadzono natomiast linię *A. thaliana* (zwaną dalej 5D), w której ekspresji ulegała wersja *HTA11* z dodatkiem niedużej sekwencji ulegającej biotynylacji *in vivo* (BLRP, ang. *biotin ligase recognition peptide*); Pawełoszek, (2010). Izolowana chromatyna była najpierw trawiona nukleazą mikrokokalną, co pozwalało na identyfikację położenia nukleosomów. Następnie biotynylowany HTA11 można było oczyścić z fragmentami chromatyny na złożu ze streptawidyną. Uzyskane fragmenty DNA analizowano z użyciem techniki qPCR bądź sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Optymalizacja procedury od zebrania materiału do analizy związanych fragmentów DNA za pomocą techniki qPCR stanowiły cel mojej pracy magisterskiej (Sura, 2012) i zostały szczegółowo opisane w Sura i Ziolkowski (2018).

W celu kontroli wszystkich eksperymentów typu ChAP, które wykonywano, porównywano otrzymany profil wzbogacenia w H2A.Z różnych

fragmentów genu *FLC* z profilem opublikowanym dla natywnego H2A.Z przez Deala i in. (2007). Profile te były zawsze zbliżone (**Ryc. 6**).



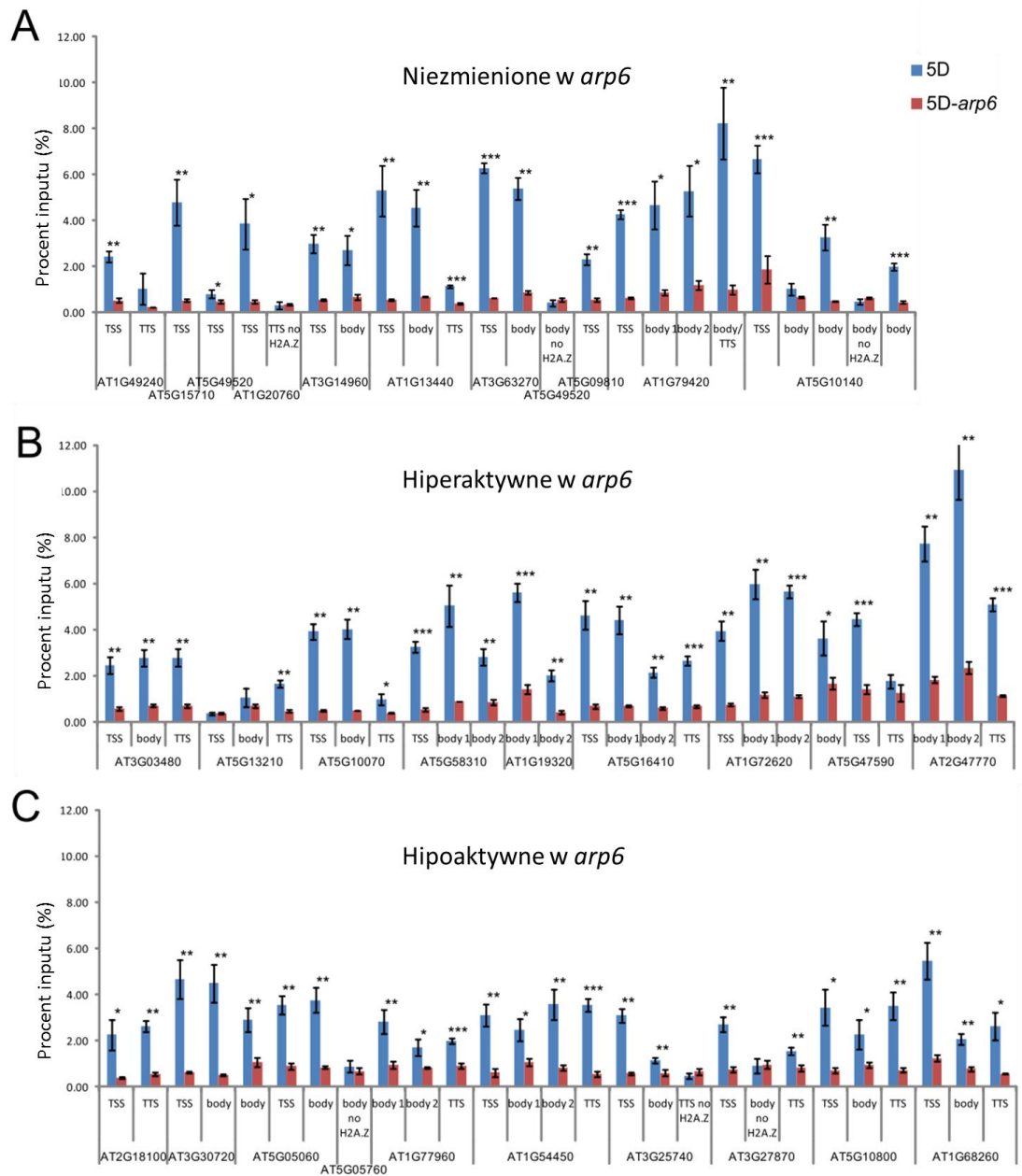
Ryc. 6. Porównanie profilu wzbogacenia biotynylowanego HTA11 z profilem wzbogacenia natywnych białek H2A.Z uzyskanym przez Deala i in. (2007) w kilku amplikonach genu *FLC*. Za: Sura i in., 2017

5.4. Znacznie obniżony poziom H2A.Z w genach aktywnych transkrypcyjnie w linii mutantu *arp6*

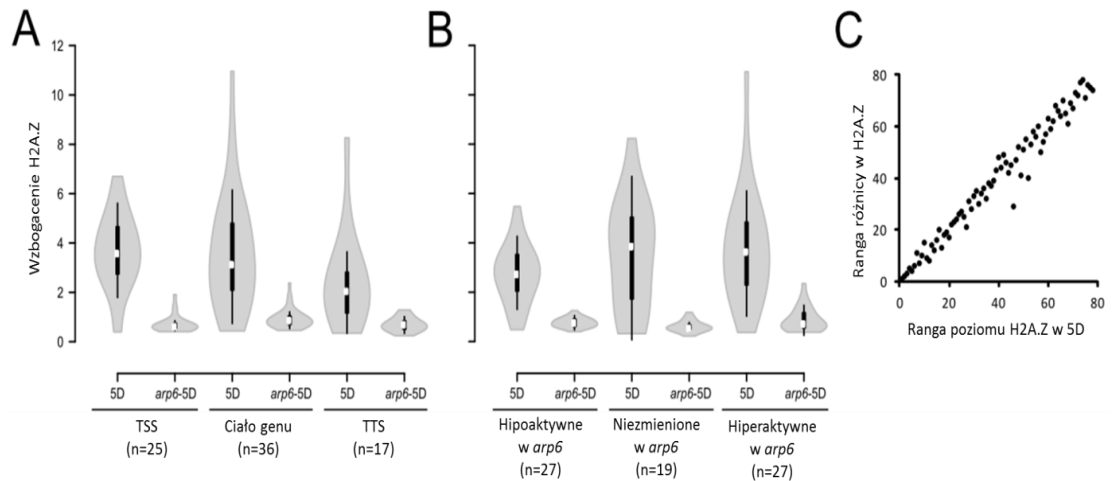
By móc zweryfikować efekt braku ARP6 dla obecności H2A.Z w chromatynie, uzyskaną linię 5D skrzyżowano z linią *arp6*. Wzbogacenie w H2A.Z w kilkudziesięciu loci w linii 5D oraz linii 5D w tle genetycznym mutantu *arp6* porównano za pomocą techniki ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Należały one do różnych rejonów (nukleosomy TSS, TTS i w ciałach genów) 30 genów, które można podzielić na „Hiperaktywne w *arp6*”, „Hipoaktywne w *arp6*” i „Niezmienione w *arp6*”. Dla 69 z 78 analizowanych amplikonów wzbogacenie H2A.Z było znacząco niższe w linii *arp6*-5D niż w linii 5D (test t-Studenta), średnio o 76,5% (**Ryc. 7** i **Ryc. 8**). Redukcja poziomu H2A.Z była wysoka we wszystkich trzech grupach genów: hiperaktywnych (75,98%, $P=3,38E-08$, Test Manna-Whitney’a), hipoaktywnych (71,78%, $P=1,27E-08$) i niezmiennych w *arp6* (82,53%, $P=2,18E-05$) (**Ryc. 7B**). Różnica była statystycznie istotna również dla wszystkich trzech badanych rejonów genowych, tj. dla TSS ($P=2,0E-8$, Test Manna-Whitney’a), ciała genu ($P=2,45E-9$) i TTS ($P=1,6E-4$, **Ryc. 8A**). Delecja *arp6* powodowała więc globalną redukcję poziomu H2A.Z w chromatynie. Nie

wynikała ona z niższej ekspresji HTA11-BLRP, ponieważ poziom jego transkryptu (zmierzony za pomocą RT-qPCR) w linii *arp6-5D* był 3,3 razy wyższy niż w linii 5D. Ponadto im bardziej loci były wzbogacone w H2A.Z w linii 5D, tym więcej traciły go w linii *arp6-5D* (korelacja rang Spearmana $\rho=0.985$, $P=1,20E-59$, **Ryc. 8C**). Wskazuje to, że jeśli przy braku ARP6 dochodzi do śladowej inkorporacji H2A.Z do chromatyny, jest ona bardziej wyrównana w stosunku do różnych loci niż regularna inkorporacja w linii WT.

Dla kilku loci z najwyższym i najniższym wzbogaceniem w H2A.Z, które różniły się istotnie od siebie w linii *arp6-5D* (według Testu Manna-Whitney'a, $P=0,017$) wykonano negatywne kontrole ChAP w linii *arp6* (bez HTA11-BLRP). Pomędzy negatywnymi kontrolami dla tych loci nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic ($P=0,362$). Potwierdza to hipotezę, że w linii *arp6-5D* dochodzi do pewnej niezależnej od ARP6 inkorporacji H2A.Z.



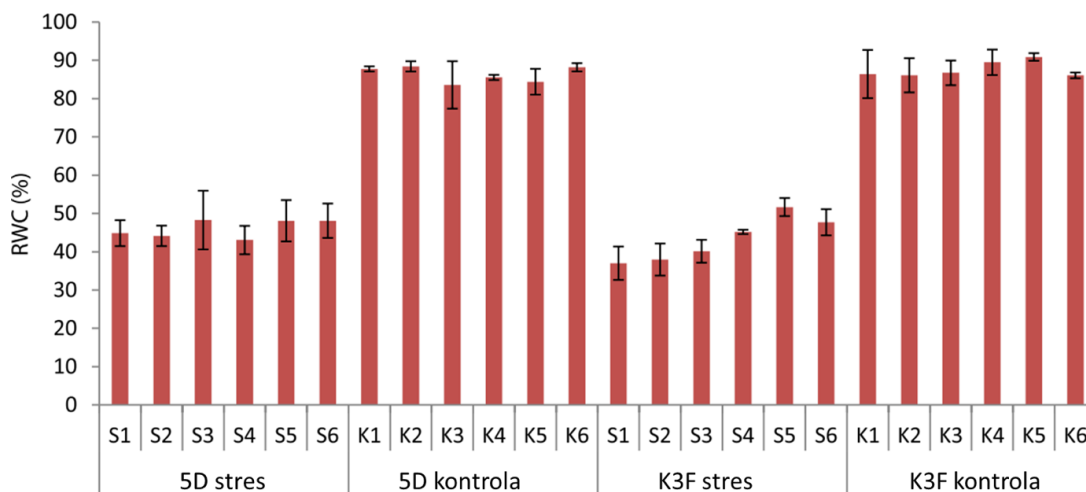
Ryc. 7. Obsadzenie H2A.Z wybranych loci genów: niezmiennych w *arp6* (A), hiperaktywnych w *arp6* (B) oraz hipoaktywnych w *arp6* (C), obliczone jako procent inputu w linii 5D (niebieski) oraz w linii *arp6*-5D (czerwony). Słupki błędów prezentują odchylenie standardowe. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Za: Sura i in., 2017



Ryc. 8. Porównanie obsadzenia H2A.Z w linii 5D i *arp6-5D*: w różnych rejonach (A) i różnych grupach genów (B). (C) Korelacja rang Spearmana między ubytkiem H2A.Z w linii *arp6* a jego normalnym poziomem w WT. Za: Sura i in., 2017

5.5. Szeroka odpowiedź transkryptomyczna *Arabidopsis* na stres suszy

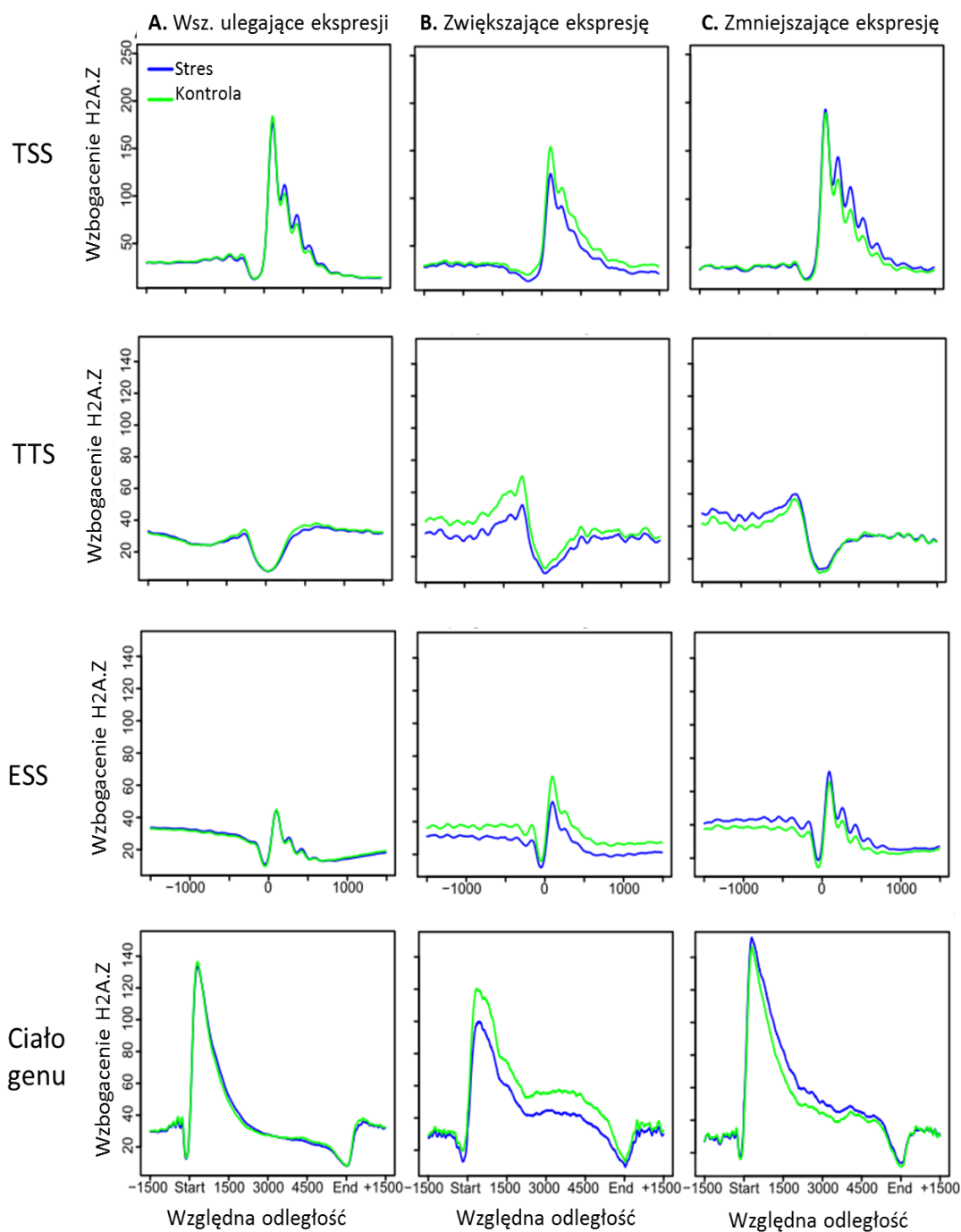
W celu ustalenia związku między występowaniem H2A.Z w chromatynie i regulacją ekspresji genów odpowiedzi na stres, poddano stresowi suszy linię 5D. Eksperymenty na tej linii prowadzone były w długim dniu (16 h światła i 8 h ciemności), na już kwitnących, czterotygodniowych roślinach, przy czym materiał zbierano zawsze z liści rozety. Początkowo jako kontroli używano również linię K3F niosącą pusty wektor (konstrukt pozbawiony fragmentu $P_{HTA11}::HTA11$), później ze względu na brak różnic pomiędzy tą linią a linią WT zaniechano jej użycia. Rośliny, podobnie jak w innych eksperymentach stresu suszy, przestawano podlewać, doprowadzając do RWC na poziomie ok. 50% w porównaniu do RWC roślin kontrolnych na poziomie 85% (Ryc. 9). Zgodnie ze wstępnym założeniem, zastosowane warunki stresowe wywoływały szeroką odpowiedź transkryptomyczną – 3344 geny zmieniły swoją ekspresję (mierzoną jako poziom transkryptu), w tym 1276 genów zwiększyło, a 2068 genów zmniejszyło swój poziom ekspresji co najmniej dwukrotnie. Wśród genów zwiększających ekspresję aż 18 pierwszych nadreprezentowanych klas GO było klasyfikowanych jako geny odpowiedzi na różne bodźce. Z kolei wśród genów zmniejszających ekspresję kategoryzacja GO wskazała przede wszystkim grupę *Fotosynteza (Photosynthesis)* ($P < 1,14E-16$).



Ryc. 9. Relatywna zawartość wody w tkankach roślin linii 5D i K3F w warunkach kontrolnych i stresu suszy. Słupki błędów pokazują odchylenie standardowe z trzech powtórzeń technicznych. Za: Sura i in., 2017

5.6. Zmiana dystrybucji H2A.Z w genach pod wpływem stresu suszy

Chromatyna pozyskana z tego samego materiału, dla którego wykonano analizy transkryptomowe, została użyta do całogenomowej analizy dystrybucji oznakowanego H2A.Z za pomocą techniki ChAP-seq. Aby umożliwić analizy statystyczne, dla wszystkich genów określono poziomy H2A.Z w trzech punktach: miejscu startu transkrypcji TSS (sumując wzbogacenie w H2A.Z fragment 50 do 180 pb poniżej TSS), miejscu zakończenia transkrypcji TTS (360 – 230 pb powyżej TTS) oraz początku egzonu ESS (40 – 170 pb poniżej ESS, średnia wartość była brana pod uwagę, gdy gen zawierał więcej niż jeden egzon); następnie obliczano średnią wartość dla każdego punktu dla danej grupy genów. Gdy porównano dystrybucję H2A.Z w warunkach kontrolnych i stresowych dla wszystkich genów, nie było różnic (**Ryc. 10A**). Kiedy jednak te same wykresy zostały sporządzone osobno dla genów, których ekspresja wzrastała lub spadała na skutek stresu, dało się zauważyć, że geny zwiększające ekspresję w czasie suszy traciły H2A.Z (**Ryc. 10B**) – zarówno w TSS, jak i w ciele genów. W mniejszym stopniu zaobserwowano również, że geny, których ekspresja spadała w stresie, zyskiwały H2A.Z; efekt ten był widoczny jednak tylko w ciele genu (**Ryc. 10C**).

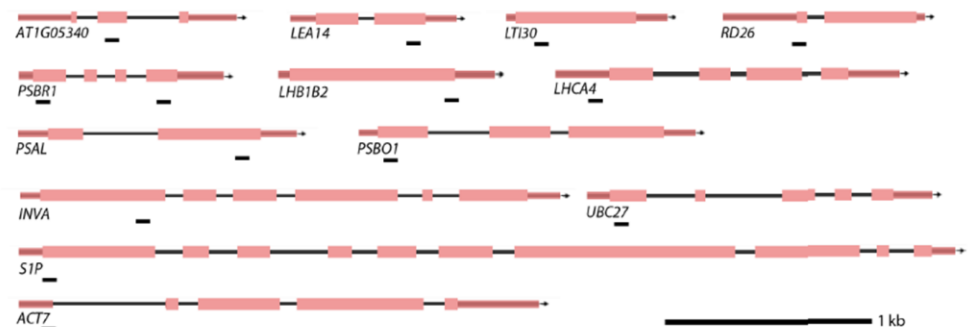


Ryc. 10. Wzbogacenie H2A.Z w TSS, TTS, ESS i ciałach genów określone dla: wszystkich genów (A), genów zwiększających ekspresję w stresie suszy (B) oraz genów zmniejszających ekspresję w tym stresie (C). Za: Sura i in., 2017

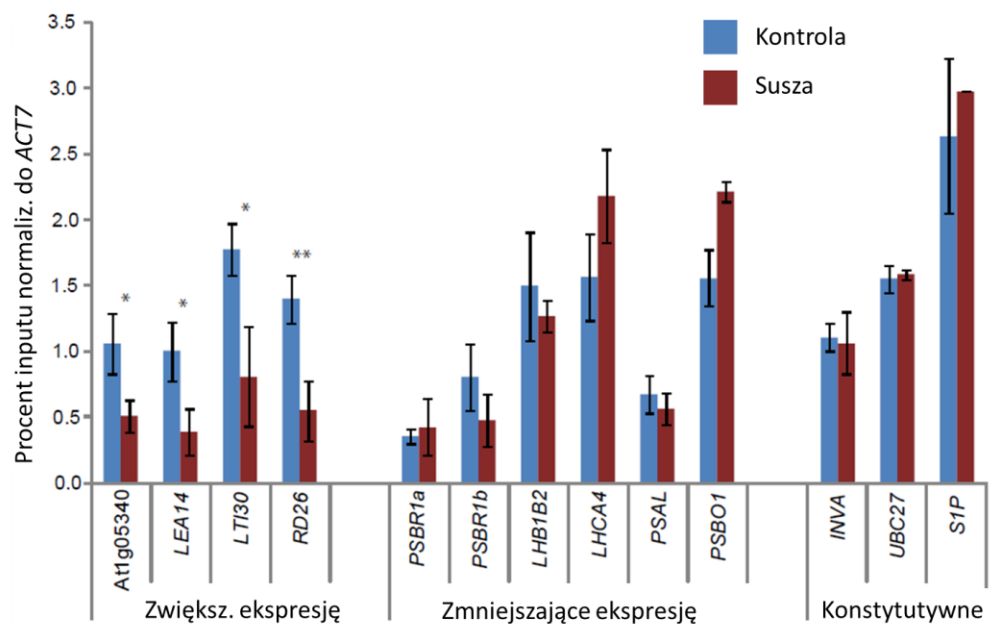
Wyniki te zweryfikowano w osobnym eksperymencie stresu suszy, analizując przez ChAP-qPCR poziom H2A.Z w loci znajdujących się w genach zwiększających, zmniejszających bądź niezmiwiających swojej ekspresji w odpowiedzi na stres (Ryc. 11). W tym podejściu badawczym, prawdopodobnie ze

względem na jego mniejszą czułość, udało się wykazać statystycznie istotne zmiany w obecności H2A.Z tylko dla genów indukowanych – traciły one H2A.Z.

A



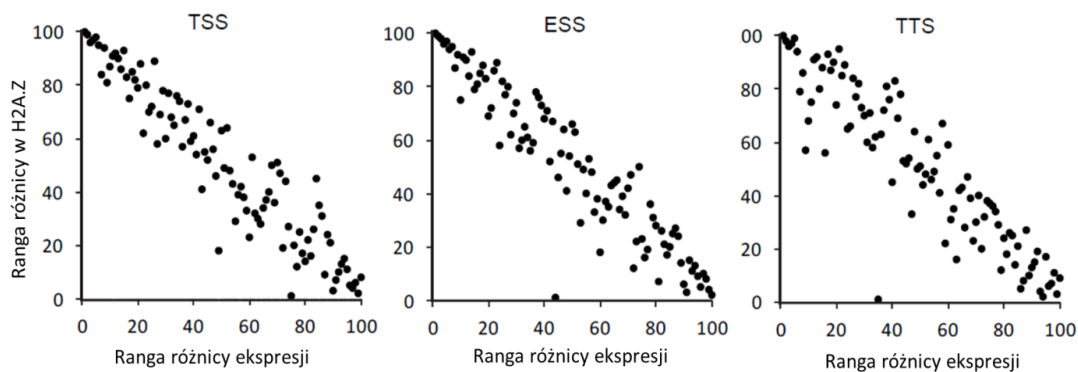
B



Ryc. 11. (A) Loci, dla których sprawdzono wzbogacenie H2A.Z za pomocą ChAP-qPCR. (B) Wzbogacenie H2A.Z dla niektórych genów zwiększających, zmniejszających i niezmiennych ekspresji w stresie suszy w porównaniu do warunków kontrolnych, znormalizowane do genu *ACT7*. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe trzech powtórzeń biologicznych. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Za: Sura i in., 2017

Kiedy jednak posortowaliśmy wszystkie geny ulegające ekspresji, w których pojawiał się H2A.Z ($n = 16332$), ze względu na różnicę ekspresji między kontrolnymi a stresowymi warunkami, i podzieliliśmy je na percentyle, a następnie dla każdego percentyla określiliśmy ilość H2A.Z (w TSS, ESS czy TTS), które to ilości również podzieliliśmy na percentyle, mogliśmy wyznaczyć współczynnik korelacji rang Spearmana i statystycznie ocenić, czy faktycznie istnieje postulowana zależność. Dla wszystkich trzech punktów otrzymaliśmy

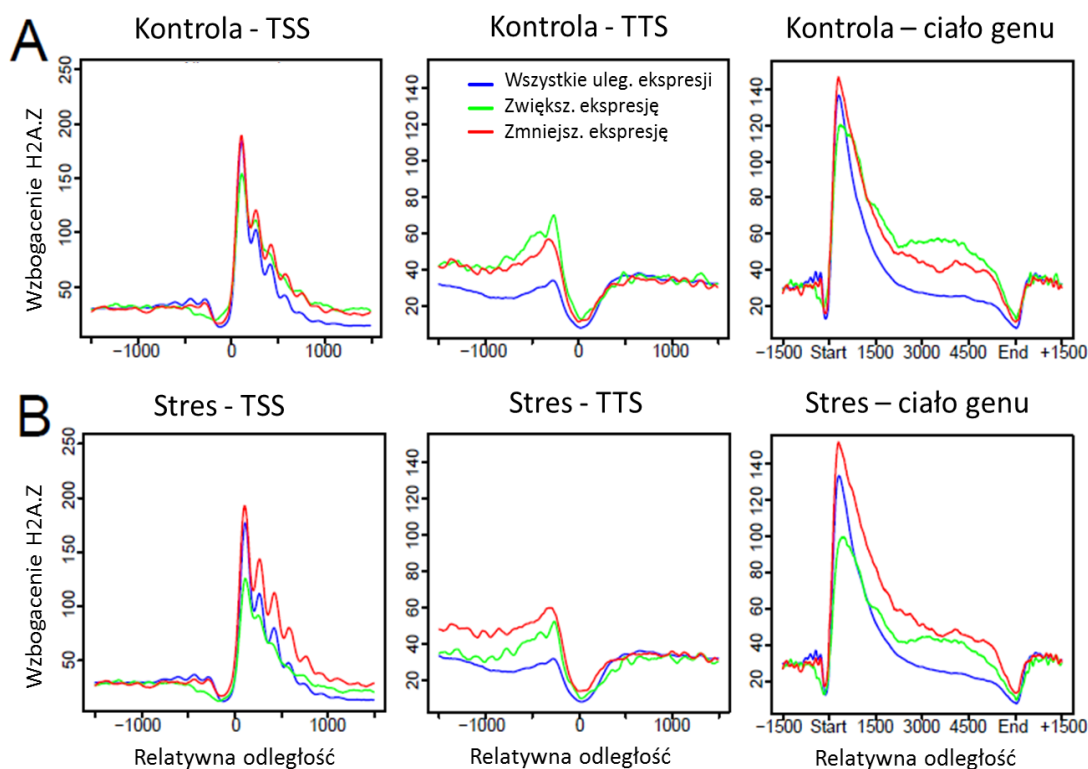
wysokie negatywne wartości tego współczynnika ($\rho = -0,944$ i $P = 6,96E-49$ dla TSS, $\rho = -0,937$ i $P = 1,55E-46$ dla ESS, $\rho = -0,907$ i $P = 1,16E-38$ dla TTS), wskazujące, że wzrost ekspresji genów jest skorelowany z ubytkiem H2A.Z nie tylko w ciele genów, ale też w TSS (**Ryc. 12**).



Ryc. 12. Korelacja rang Spearmana między różnicą w obecności H2A.Z w genach a różnicą w ich ekspresji w warunkach kontrolnych i stresu suszy. Za: Sura i in., 2017

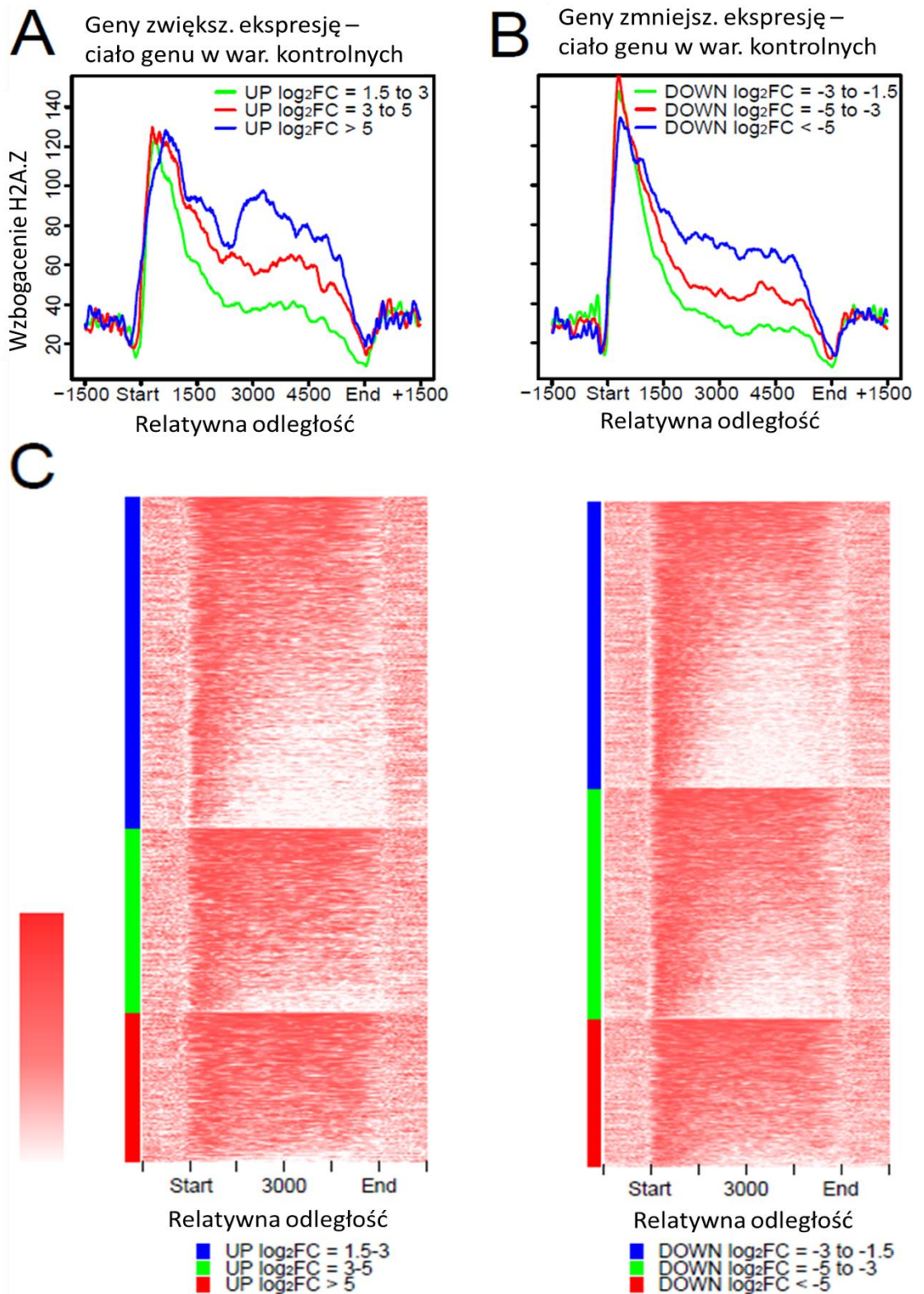
5.7. Dystrybucja H2A.Z w genach odpowiadających na stres

Różnice w zawartości H2A.Z w genach reagujących na stres zachęciły nas do sprawdzenia, czy zasadniczo genów tych nie charakteryzuje specyficzny profil dystrybucji H2A.Z lub poziom wzbogacenia w ten wariant. Okazało się, że faktycznie geny obu grup mają wyższą zawartość H2A.Z, zwłaszcza w ciele genu (**Ryc. 13**).



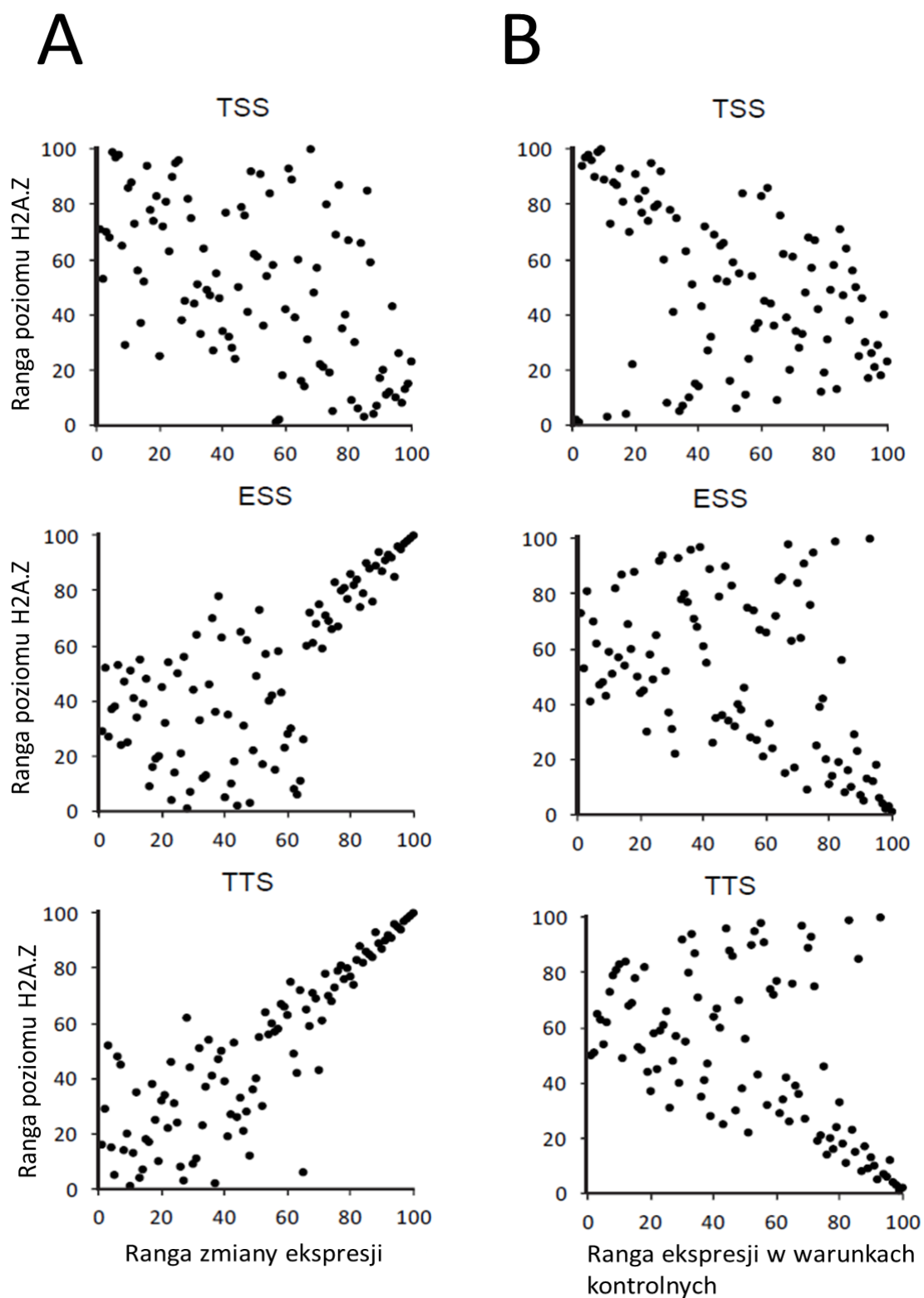
Ryc. 13. Profile dystrybucji H2A.Z w TSS, TTS i ciele genów podzielonych ze względu na ich transkryptyczną odpowiedź na stres suszy – w warunkach kontrolnych (**A**) i warunkach stresu suszy (**B**). Za: Sura i in., 2017

Następnie podzieliliśmy geny ze względu na poziom zmiany ich ekspresji w odpowiedzi na stres suszy na trzy grupy: w pierwszej \log_2 ze zmiany wynosił od 1,5 do 3 ($n=644$), w drugiej od 3 do 5 ($n=358$), a w trzeciej powyżej 5 ($n=291$) dla genów zwiększających ekspresję, oraz od -3 do -1,5 ($n=896$), od -5 do -3 ($n=722$), i poniżej <-5 ($n=463$) dla genów zmniejszających ekspresję. Podział ten ujawnił, że poziom odpowiedzi genu, niezależnie od kierunku tej zmiany, był pozytywnie skorelowany z obecnością H2A.Z w ciele genu (ale nie w TSS) (**Ryc. 14A i B**).



Ryc. 14. Wykresy (A, B) i mapy ciepłne (*heatmaps*) (C) prezentujące wz bogacenie H2A.Z w warunkach kontrolnych dla genów zmieniających swoją ekspresję w odpowiedzi na stres suszy, zgrupowanych w zależności od krotności tej zmiany (FC, *fold change*). UP – geny zwiększające ekspresję, DOWN – geny zmniejszające ekspresję. Za: Sura i in., 2017

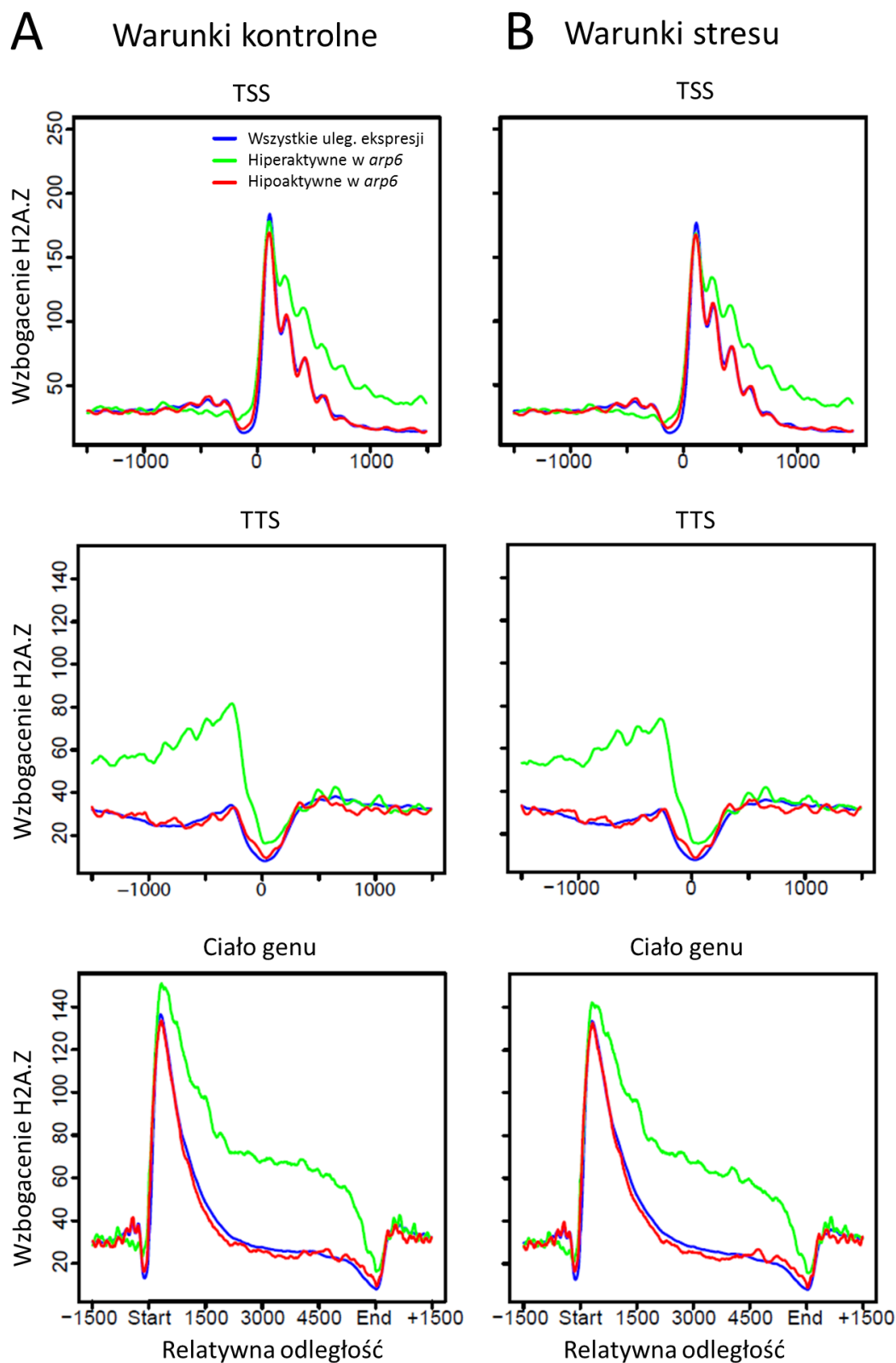
Obserwację tę dodatkowo zweryfikowaliśmy dzieląc wszystkie geny ulegające ekspresji, w których pojawiał się H2A.Z ($n = 16332$), ze względu na wielkość zmiany ekspresji i określając dla nich ilość H2A.Z w różnych ich rejonach (oddzielnie dla TSS, ESS i TTS). Posłużyło to do wyznaczenia współczynnika korelacji rang Spearmana, który dla ESS wyniósł 0,673 ($P=2,29E-29$), a dla TTS 0,852 ($P=1,68E-14$), wskazując na pozytywną korelację poziomu H2A.Z z „responsywnością” genów w tych miejscach, czyli ich zdolnością do zmiany poziomu ekspresji w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe. Natomiast dla TSS obserwowaliśmy słabą negatywną korelację ($\rho=-0.539$, $P=7.01E-9$) (**Ryc. 15A**). Podobnie słabą antykorelację odnotowaliśmy między poziomem H2A.Z a zwykłym poziomem ekspresji genów w warunkach kontrolnych dla wszystkich trzech miejsc (dla TSS $\rho = -0,401$, $P=3,61E-5$, dla ESS $\rho = -0,446$, $P=3,29E-6$, i dla TTS $\rho = -0,492$, $P=2,01E-7$) (**Ryc. 15B**). Wskazuje to, że dla ogółu genów obecność H2A.Z może mieć represyjny wpływ na ich transkrypcję.



Ryc. 15. Korelacja rang Spearmana dla poziomu H2A.Z w genach i zmiany ich ekspresji (A) oraz dla poziomu H2A.Z i poziomu ich ekspresji w warunkach kontrolnych (B), wyznaczona dla punktów TSS, ESS i TTS. Za: Sura i in., 2017

5.8. Dystrybucja H2A.Z w genach, których ekspresja zależy od obecności H2A.Z w chromatynie (hiper- i hipoaktywnych w linii *arp6*)

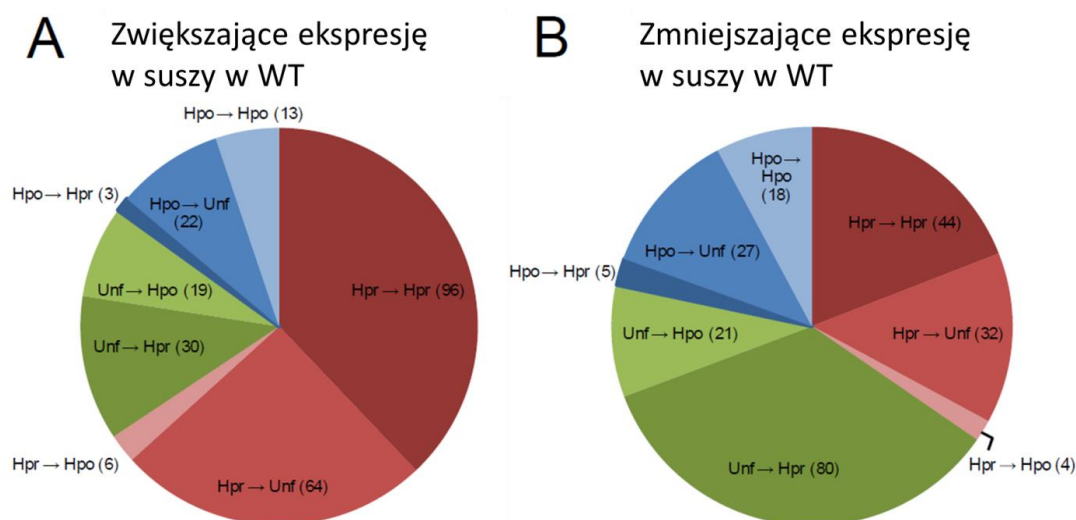
Poznawszy geny, na których ekspresję wpływał niedobór H2A.Z w chromatynie, postanowiliśmy prześledzić w nich jego dystrybucję w warunkach kontrolnych i stresu suszy, wykorzystując wyniki transkryptomocne dla linii *arp6* i wyniki ChAP-seq dla linii 5D. Założyliśmy, że geny bezpośrednio zależne od H2A.Z powinna wyróżniać dystrybucja tego histonu odmienna od dystrybucji w innych genach, których ekspresja nie ulega zmianie w mutancie *arp6*. Dlatego porównaliśmy dystrybucję H2A.Z w genach zwiększających ekspresję pod nieobecność chromatynowego H2A.Z (geny hiperaktywne w *arp6*, n=693), zmniejszających ekspresję (hipoaktywne w *arp6*, n=542) z dystrybucją wszystkich genów ulegających ekspresji (n=15558.). Rozkład H2A.Z w genach hipoaktywnych nie różnił się od ogółu genów (ani w warunkach kontrolnych, ani w warunkach stresu – odpowiednio **Ryc. 16A** i **Ryc. 16B**), co może wskazywać, że geny te są tylko pośrednio zależne od H2A.Z. Z kolei geny hiperaktywne charakteryzował zdecydowanie wyższy poziom H2A.Z w ich ciałach, niezależnie od warunków (**Ryc. 16**). Sugeruje to, że wysoka zawartość H2A.Z w ciałach tych genów bezpośrednio wpływa na ich represję. Za to wszystkie trzy grupy nie różniły się pod względem zawartości H2A.Z w TSS – histon ten w tym miejscu nie wydaje się mieć decydującego wpływu na poziom ich ekspresji.



Ryc. 16. Wzbogacenie H2A.Z w linii 5D dla wszystkich genów ulegających ekspresji oraz hiperaktywnych i hipoaktywnych w linii *arp6* w warunkach kontrolnych (A) i stresu suszy (B). Za: Sura i in., 2017

5.9. Analiza genów reagujących na stres suszy i zależnych od H2A.Z

Następnie postanowiliśmy prześledzić wśród genów odpowiadających na stres i jednocześnie zależnych od obecności ARP6, jakiego typu jest ta zależność. Znaleźliśmy 253 geny, których ekspresja wzrastała w odpowiedzi na stres suszy i które jednocześnie były deregulowane w linii mutantu *arp6* (w jakąkolwiek stronę). Co ciekawe, wśród nich największą grupę (n=96, 37,9%) stanowiły geny hiperaktywne w *arp6* zarówno w warunkach kontrolnych, jak i stresu suszy, kolejną (n=64, 25,3%) geny hiperaktywne tylko w warunkach kontrolnych (a niezmiennie w stresie), a jeszcze następną (n=30, 11,9%) hiperaktywne tylko w warunkach stresowych (**Ryc. 17A**). Z kolei wśród 230 genów o obniżonej na skutek stresu ekspresji największe grupy stanowiły: hiperaktywne w *arp6* tylko w stresie (n=80, 34,6%), hiperaktywne w obu warunkach (n=44, 19%) i hiperaktywne tylko w warunkach kontrolnych (n=32, 13,9%) (**Ryc. 17B**). Analiza ta wskazuje, że brak ARP6 skutkuje głównie hiperaktywnością genów niezależnie od kierunku ich odpowiedzi na stres.

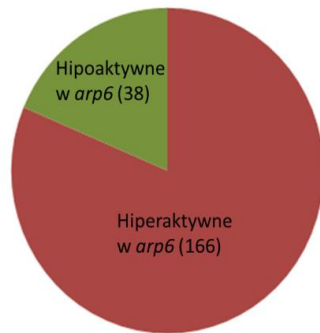


Ryc. 17. Wykresy uwzględniają: **(A)** geny zwiększające ekspresję w suszy w WT i jednocześnie deregulowane przynajmniej w jednym warunkach w linii *arp6*, **(B)** geny zmniejszające ekspresję w suszy w WT i jednocześnie deregulowane przynajmniej w jednym warunkach w linii *arp6*, oraz stan ich deregulacji w warunkach kontrolnych (przed strzałką) oraz w stresie suszy (za strzałką). Hpo – hipoaktywny, Hpr – hiperaktywny, Unf – niezmiennona ekspresja. W nawiasach podano liczbę genów. Za: Sura i in., 2017

5.10. Zmiana stanu transkrypcyjnego genów zależnych od ARP6/H2A.Z

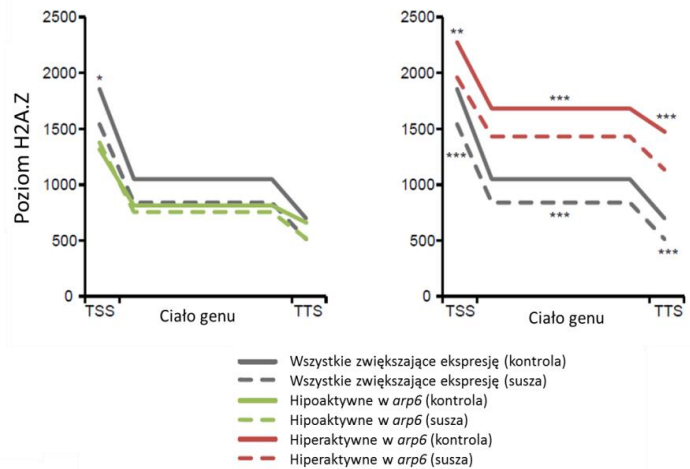
Geny deregulowane w linii *arp6* są zależne od H2A.Z. Chcieliśmy więc zobaczyć, jak będzie zmieniał się w nich poziom H2A.Z w czasie aktywacji lub represji transkrypcyjnej. W tym celu porównaliśmy jego poziom (z danych ChAP-seq dla linii 5D) dla TSS, TTS i ciała genu w różnych zestawieniach genów. Wśród 1844 genów zwiększających ekspresję w stresie suszy w WT, 204 są deregulowane w warunkach kontrolnych w mutancie *arp6*. Z nich 166 (81,4%) jest hiperaktywnych w *arp6* w warunkach kontrolnych, a 38 (18,6%) hipoaktywnych (**Ryc. 18A**). Na **Ryc. 18B** widać, że geny hipoaktywne w *arp6* mają znacząco niższy poziom H2A.Z w TSS w roślinach typu dzikiego, a co więcej nie tracą go stamtąd podczas swojej aktywacji transkrypcyjnej, w przeciwieństwie do reszty genów zwiększających ekspresję w odpowiedzi na stres. Możliwe więc, że te właśnie geny wymagają pewnej obecności H2A.Z w TSS do utrzymania swojej aktywności, a jego niedobór w linii *arp6* skutkuje ich obniżoną ekspresją. Za to geny hiperaktywne w warunkach kontrolnych charakteryzuje znacząco wyższy poziom H2A.Z na całej ich długości, wskazując na represyjny charakter tego histonu dla nich.

A Geny zwiększające ekspresję w stresie w WT i deregulowane w *arp6*

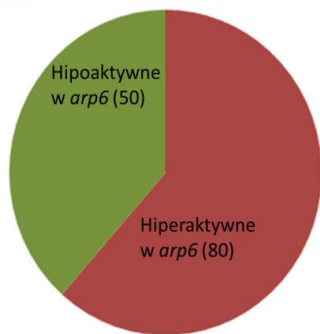


B

Geny zwiększające ekspresję w stresie w WT

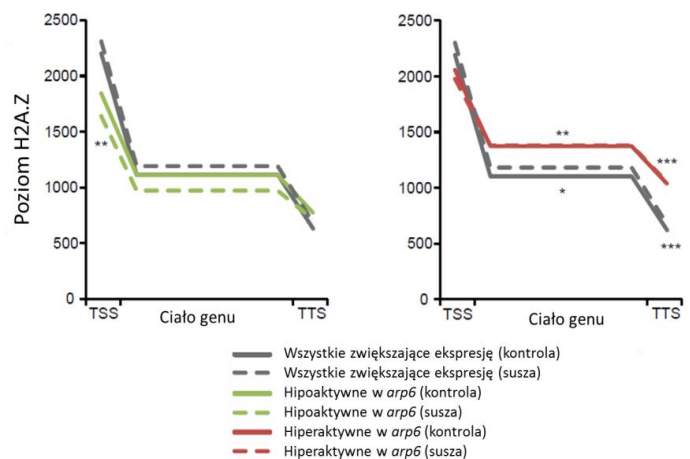


C Geny zmniejszające ekspresję w stresie w WT i deregulowane w *arp6*



D

Geny zmniejszające ekspresję w stresie w WT



Ryc. 18. (A) Geny deregulowane w *arp6* (w warunkach kontrolnych) wśród genów zwiększających ekspresję w WT w odpowiedzi na stres suszy. (B) Poziom H2A.Z i jego zmiany w TSS, ciele genu i TTS w genach zwiększających ekspresję w odpowiedzi na stres. (C) Geny deregulowane w *arp6* (w warunkach kontrolnych) wśród genów zmniejszających ekspresję w WT w odpowiedzi na stres suszy. (D) Poziom H2A.Z i jego zmiany w TSS, ciele genu i TTS w genach zmniejszających ekspresję w odpowiedzi na stres. Statystycznie istotne różnice między poziomami H2A.Z zaznaczone są gwiazdkami nad wykresami dla warunków kontrolnych i pod wykresami dla warunków suszy (Test Manna-Whitney'a, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Za: Sura i in., 2017

Sytuacja ta ma swoje odzwierciedlenie w genach zmniejszających ekspresję na skutek stresu, z których 80 (61,5% deregulowanych w *arp6* warunkach

kontrolnych) jest hiperaktywnych, a 50 genów (38,5%) jest hipoaktywnych (**Ryc. 18C**). Znowu geny hipoaktywne mają znacząco mniej H2A.Z w TSS w warunkach stresowych niż pozostałe geny o obniżonej ekspresji (**Ryc. 18D**). Co więcej, tracą one H2A.Z podczas represji, w przeciwieństwie do reszty, która go zyskuje. To znowu sugeruje, że geny te mogą potrzebować pewnej ilości H2A.Z w TSS do swojej aktywności. Z kolei geny hiperaktywne w warunkach kontrolnych mają zdecydowanie więcej H2A.Z w swoich ciałach i w TTS, co sugeruje represyjny wpływ H2A.Z.

6. DYSKUSJA

6.1. Linie mutantów *Arabidopsis* używane do badania roli H2A.Z

A. thaliana posiada trzy, przynajmniej częściowo redundantne geny H2A.Z (*HTA9*, *HTA11* i *HTA8*). Z powodu tej redundancji oraz braku dostępnego mutantu insercyjnego *HTA8* w tym samym ekotypie trudno o linię z całkowicie wyłączoną ekspresją H2A.Z. Najbardziej do niej zbliżyli się Coleman-Derr i Zilberman (2012), prezentując w swojej pracy potrójnego mutantu *h2a.z* (*hta8 hta9 hta11*). W linii tej dochodziło jednak do znaczącej ekspresji genu *HTA9* (26% normalnego poziomu), co przekładało się na 10% normalnej puli H2A.Z. Mimo że mutacje we wszystkich trzech genach miały charakter insercji T-DNA, rośliny były w stanie częściowo odtworzyć poprawne transkrypty genu *HTA9*, prawdopodobnie wycinając intron z insercją. Rozwój tego mutantu był silnie zaburzony i niewykluczone, że całkowite wyłączenie ekspresji H2A.Z skutkowałoby letalnością, jak to dzieje się w przypadku innych złożonych eukariotów. Co ciekawe, po jakimś czasie od publikacji tej pracy udało się nam otrzymać nasiona linii *h2a.z*, ale uzyskane z nasion rośliny nie wykazywały praktycznie żadnych cech fenotypowych demonstrowanych w publikacji. Prawdopodobnie w kolejnych pokoleniach potrójnego mutantu dochodziło do stopniowego kompensacyjnego zwiększania ekspresji genu *HTA9*, a może również *HTA8* i *HTA11*, których insercje zlokalizowane są odpowiednio w promotorze i intronie. Co więcej, pewnych trudności w analizie opublikowanego fenotypu może też nastroczać fakt, że w celu uzyskania potrójnego mutantu skrzyżowano rośliny z dwóch różnych ekotypów – Wassilewskija (*hta8*) i Col-0 (*hta9 hta11*) (Coleman-Derr i Zilberman, 2012).

Do badań nad funkcją wariantu H2A.Z u *Arabidopsis* powszechnie stosowano i nadal stosuje się linie podwójnego mutantu *hta9 hta11* lub linie mutantów homologów niezbędnych podjednostek drożdżowego kompleksu SWR1, a więc *pie1* lub *arp6*. Wykazują one jednakowe zaburzenia fenotypowe, choć o różnym nasileniu. Należą do nich: skrócone międzywęzła, ząbkowanie brzegów liści, nieco mniejsze kwiaty z niektórymi odkształconymi płatkami, niekiedy z dodatkowymi płatkami, krótsze pręciki, słupki i łuszczyнки (słupki i łuszczyнки również grubsze), wcześniejsze kwitnienie oraz zaburzenia płodności (Noh i Amasino, 2003; Choi i in., 2005a; Deal i in., 2005; March-Díaz i in.,

2007). Z danych literaturowych oraz moich obserwacji podczas pracy z liniami *hta9-1 hta11-1*, *arp6* i *pie1-5* wynika, że nasilenie zaburzeń fenotypowych w tym szeregu roślin, u *pie1-5* dochodząc do znacznego ograniczenia płodności. Niewielkie nasilenie zaburzeń fenotypowych w linii *hta9-1 hta11-1* można uzasadnić ekspresją trzeciego genu – *HTA8*. Z dostępnych mutantów homologów podjednostek kompleksu SWR1 wybierano *arp6* i *pie1*, ponieważ u drożdży tylko ich odpowiedniki nie wchodzi w skład innych kompleksów białkowych; taka sytuacja utrudniałaby interpretację wyników. Jednocześnie zakłada się, że roślinny SWR1, podobnie jak jego drożdżowy odpowiednik, jest jedynym kompleksem wprowadzającym H2A.Z do nukleosomów i bez PIE1 czy ARP6 kompleks ten nie działa. Jednakże dotąd nie zostało to wystarczająco udowodnione. Zazwyczaj grupy badawcze pokazywały utratę wzbogacenia w H2A.Z w pojedynczych genach w liniach mutantów za pomocą techniki ChIP-qPCR.

Jeżeli oba te białka są niezbędne do inkorporacji H2A.Z do roślinnej chromatyny, zastanawia fakt znacznej różnicy w nasileniu fenotypu między *arp6* i *pie1*. Dotąd nie wyjaśniono przyczyny tego stanu rzeczy, ale sugerowano, że może to świadczyć o dodatkowych funkcjach PIE1 poza kompleksem SWR1 (March-Díaz i in., 2008). Wobec powyższych, w momencie planowania i przeprowadzania eksperymentów opisanych w niniejszej pracy, wybór linii *arp6* do badania funkcji H2A.Z wydawał się najlepszy.

Niedawne badania Berriri i in. (2016) pokazały, że deregulowane geny w mutantach *pie1*, *arp6* (opisany przez Deal i in., 2005), *swc6* i *hta9 hta11* tylko częściowo się pokrywały (por. punkt 1.5.5). Poza tym poszczególne podjednostki kompleksu, jak twierdzą badacze, mają różny wpływ na odpowiadającą odpornościową *Arabidopsis*, jednak część z tych wyników jest w sprzeczności z wcześniejszymi wynikami March-Díaz i in. (2008). Z kolei Dai i in. (2017) zbadali całogenomowo wzbogacenie H2A.Z w tym samym mutancie *arp6* (Deal i in., 2005). Okazało się, że dochodziło w nim tylko do ograniczonej redukcji poziomu H2A.Z w chromatynie, a w niektórych miejscach nawet do zwiększenia jego poziomu (w przypadku aż 24,4% pików H2A.Z). Sugerowałoby to ograniczoną przydatność mutantu *arp6* w badaniu funkcji H2A.Z.

Jednakże wiele genów prezentowanych w pracy Berririego i in. (2016) jako geny o niezmienionej ekspresji w *arp6*, a zmienionej w *pie1*, w naszej linii

również wykazywało zmiany w stosunku do WT. Co więcej, my także przebadaliśmy używaną przez nas linię mutantu *arp6* (Choi i in., 2005b) pod kątem wzbogacenia H2A.Z. W celu śledzenia zawartości H2A.Z w chromatynie, skrzyżowaliśmy ją z linią 5D. Jako że spodziewaliśmy się niskiego wzbogacenia, zdecydowaliśmy się na użycie techniki ChAP-qPCR, ale z użyciem możliwie dużej liczby loci. Wybraliśmy do tego celu zarówno geny zależne, jak i niezależne od ARP6, oraz loci w różnych rejonach tych genów (TSS, ESS, TTS). W 69 z 78 przebadanych amplikonów dochodziło do znaczącej redukcji poziomu H2A.Z, średnio o 76,5%. W żadnym z amplikonów nie zanotowaliśmy istotnego wzrostu poziomu H2A.Z. W 9 loci nie zachodziły istotne statystycznie zmiany poziomu H2A.Z, przy czym były to miejsca naturalnie ubogie w H2A.Z. (por. **Ryc. 7**). Największe różnice w poziomie H2A.Z między linią typu dzikiego a *arp6* zachodziły w loci bogatych w H2A.Z (korelacja $\rho=0.985$, $P=1,20E-59$). Wskazuje to na dwie możliwości: albo uzyskane wzbogacenie H2A.Z w linii *arp6* 5D jest w istocie szumem, albo dochodzi do niewielkiej, niezależnej od ARP6 inkorporacji H2A.Z, jednak bez zachowania naturalnego zróżnicowania jego poziomów w różnych loci, co wydaje się kluczowe w mechanizmie regulacji ekspresji genów przez H2A.Z. Dlatego używana przez nas linia *arp6* w naszym przekonaniu wydawała się odpowiednią do badania udziału H2A.Z w regulacji ekspresji genów u *A. thaliana*.

Trudno natomiast określić przyczynę rozbieżności w uzyskanym wzbogaceniu H2A.Z w naszym mutancie *arp6* i mutancie stosowanym przez Dai i in. (2017). Grupa ta wprawdzie szerzej przebadła pod tym kątem mutantu *arp6-1*, ale skoro dla 24,4% pików H2A.Z odnotowała znaczący wzrost poziomu H2A.Z, to wśród 78 przeanalizowanych przez nas loci powinniśmy znaleźć kilkanaście takich miejsc. Zastanawia również stosunkowo nieduży ogólny ubytek H2A.Z w *arp6-1*. Możliwe więc, że używany przez nas mutant delecyjny *arp6* (*suf3*) (Choi i in., 2005b) i mutant insercyjny *arp6-1* (Deal i in., 2005) nie są jednakowe w kontekście redukcji zależnego od SWR1 wprowadzania H2A.Z do chromatyny. Inną przyczyną rozbieżności może być sposób normalizacji i analizy danych całogenomowych przez Dai i in. (2017).

6.2. Odpowiedź na stres u roślin o obniżonym poziomie chromatynowego H2A.Z

Początkowo spodziewaliśmy się, że rośliny *A. thaliana* o zredukowanym poziomie H2A.Z w chromatynie będą inaczej reagowały na stres niż rośliny typu dzikiego. Wskazywało na to wzbogacenie H2A.Z w genach odpowiedzi na różne bodźce (Coleman-Derr i Zilberman, 2012) oraz faktyczna deregulacja kilku grup genów odpowiedzi na różne stesy w liniach mutantów (March-Díaz i in., 2008; Kumar i Wigge, 2010; Smith i in., 2010). Jednakże eksperymenty stresu suszy nie ujawniły różnic w odporności na ten stres. Postanowiliśmy przeprowadzić inne stesy osmotyczne, które pozwalały na ilościowe opisanie bardziej subtelnych różnic w reakcji na stres. W istocie, wszystkie linie mutantów wykazywały zwiększone opóźnienie kiełkowania zarówno w obecności NaCl, jak i sorbitolu, w stosunku do WT. Opóźnienie to zwiększało się w szeregu *hta9 hta11, arp6, piel*, czyli w tej samej kolejności, w której rosną zaburzenia fenotypowe. Jednakże linie te wykazywały również opóźnione kiełkowanie w stosunku do WT bez wpływu czynnika stresowego. Możliwe więc, że mutanty o zaburzonym wprowadzaniu H2A.Z do chromatyny wykazują też zaburzenie kiełkowania, spotęgowane przez działanie stresu. Nie sposób jednak oddzielić w przeprowadzonych eksperymentach wpływu tych dwóch czynników – zaburzeń rozwojowych i reakcji na stres. Pokazuje to też, jak trudno porównywać ze sobą mutanty o zaburzeniach funkcjonalnych i rozwojowych.

6.3. Deregulacja genów w linii mutantu *arp6*

Całogenomowe analizy transkryptomyczne ujawniły, które geny są deregulowane w przypadku braku ARP6 i co za tym idzie, zredukowanym poziomie H2A.Z w chromatynie, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i stresu suszy. Co ciekawe, dwie grupy tylko częściowo się pokrywają. Może to wskazywać, że H2A.Z reguluje różne geny w zależności od warunków fizjologicznych organizmu. W warunkach kontrolnych hiperaktywacji w mutancie szczególnie ulegają geny odpowiedzi na różne bodźce i czynniki stresowe, co jest w zgodzie z wcześniejszymi wynikami dla mutantu *h2a.z* (Coleman-Derr i Zilberman, 2012). H2A.Z może być konieczny do blokowania ekspresji genów odpowiedzi w warunkach nieindukujących. Zgadzałoby się to z poprzednimi obserwacjami, że rośliny mutantów *arp6* cechuje fenotyp odpowiedzi na głód fosforanowy mimo

braku tego głodu (Smith i in., 2010, używali mutanty opisane przez Deala i in., 2005) oraz aktywacja genów odpowiedzi na podwyższoną temperaturę mimo niskiej temperatury (Kumar i Wigge, 2010, mutanty uzyskane z użyciem promieniowania neutronowego w tzw. podejściu *forward genetics*). Jednakże w warunkach stresowych ta kategoria genów nie jest nadreprezentowana w *arp6*, mimo że podobna liczba genów jest hiperaktywowana; zapewne wynika to z faktu, że geny te również ulegają aktywacji w WT podczas stresu. Z kolei wśród hipoaktywnych genów, i to w obu warunkach, dominują geny związane z DNA i procesami z udziałem DNA. Prawdopodobnie jest to rezultatem stwierdzonego udziału H2A.Z w sygnalizacji i naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (Kusch i in., 2004; Kalocsay i in., 2009; Xu i in., 2012; Gursoy-Yuzugullu i in., 2015).

6.4. Linia 5D do śledzenia zmian w obecności H2A.Z w chromatynie

Ze względu na brak przeciwciał rozpoznających H2A.Z u *A. thaliana*, użyto linię z zaadaptowanym systemem biotynylacji *in vivo* (Mito i in., 2005) jednego z genów H2A.Z – HTA11, zwaną 5D, wyprowadzoną przez mgra Łukasza Pawełoszyka w Zakładzie Biotechnologii UAM. Linia ta zawiera dodatkową kopię genu *HTA11* pod natywnym promotorem, z dodaną krótką sekwencją na 5' końcu, kodującą peptyd (BLRP) rozpoznawany przez prokariotyczną ligazę biotynową BirA, której gen pod roślinnym promotorem *Act2* wprowadzono w tym samym konstrukcie. Ulegająca ekspresji ligaza rozpoznaje BLRP i przyłącza do niego biotynę. Biotynylowany HTA11 można następnie oczyszczać na złożu z awidyną/streptawidyną. Co ważne, peptyd BLRP jest niewielki, co jest istotne dla zachowania naturalnych oddziaływań z innymi białkami, a bardzo silne oddziaływanie biotyna/streptawidyna pozwala na specyficzne wiązanieżądanego białka.

Pewnym minusem użytej linii jest fakt dodatkowej kopii *HTA11* w genomie, nie jest to jednak gen H2A.Z ulegający najwyższej ekspresji (którym jest *HTA9*). Poza tym nie wiemy, czy poszczególne izoformy mają pewne specyficzne lokalizacje i role, jak to np. wydaje się być u ludzi, gdzie mimo tylko 3 aminokwasów różnicy białka H2A.Z-1 i H2A.Z-2 prezentują tylko częściową redundancję (por. punkt 1.5.4). W takim wypadku moglibyśmy tu wnioskować o

roli tylko jednego z białek H2A.Z, HTA11. Jednakże brak zmian fenotypowych u pojedynczych mutantów *hta9* i *hta11*, z jednoczesnym występowaniem zmian u podwójnych mutantów (March-Díaz i in., 2008) wskazuje na znaczącą redundancję białek H2A.Z u *Arabidopsis* (u ssaków wyłączenie tylko *H2A.Z.1* powoduje śmierć na etapie blastocysty, Faast i in., 2001). Możliwe też, że białka te mogą całkowicie się zastępować, ale w podwójnym mutancie *hta9 hta11* dochodzi do niewystarczającej ekspresji H2A.Z, gdyż tylko jeden gen pozostaje aktywny.

6.5. Zmiany poziomu ekspresji genów i poziomu H2A.Z w tych genach w odpowiedzi *Arabidopsis* na stres suszy

Stres suszy powoduje u *A. thaliana* szeroką odpowiedź transkryptomyczną w celu przystosowania się do niekorzystnych warunków. Najbardziej zainteresowani byliśmy kwestią zależności zmian w poziomie transkryptów i zmian w obecności H2A.Z w genach, z których te transkrypty pochodziły, gdyż zależało nam na ujawnieniu wpływu H2A.Z na transkrypcję genów. Stąd w naszych analizach skupiliśmy się na analizie różnych obszarów genów – rejonu wokół miejsca startu transkrypcji, miejsca końca transkrypcji, wokół początku egzonu, na przestrzeni całego genu. Co ciekawe, dla ogółu genów dystrybucja H2A.Z w warunkach stresu w zasadzie nie różniła się od dystrybucji w warunkach kontrolnych w żadnym z tych miejsc (**Ryc. 8**). Może to wskazywać na generalnie stały wzór dystrybucji H2A.Z w genomie *Arabidopsis*. Różnice w dystrybucji H2A.Z były natomiast widoczne dla genów reagujących zmianą poziomu transkrypcji, świadcząc o powiązaniu obecności H2A.Z z ekspresją genów. Zwłaszcza w przypadku genów zwiększających ekspresję zaobserwowano częściową utratę H2A.Z w stresie suszy, potwierdzoną również dla kilku genów z użyciem techniki ChAP-qPCR. W mniejszym stopniu geny, których aktywność w odpowiedzi na stres spadała, zyskiwały H2A.Z. Efekt ten był obserwowany tylko w ciałach genów, a nie był wykrywany dla TSS. Sugerowałoby to powiązanie zwiększonego poziomu H2A.Z (zwłaszcza w ciele genu) z represją genów. Jednocześnie test korelacji rang Spearmana dla poziomu H2A.Z i poziomu ekspresji ogółu genów w warunkach kontrolnych pokazał tylko słabą antykorelację tych dwóch czynników ($\rho = -0.401$, $P = 3.61E-5$ dla TSS, $\rho = -0.446$, $P = 3.29E-6$ dla ESS i $\rho = -0.492$, $P = 2.01E-7$ dla TTS; Sura i in., 2017). Określenie H2A.Z jako negatywnego

czynnika ekspresji genów mogłoby być zatem zbytnim uogólnieniem i uproszczeniem.

Tym bardziej, że z badań nad innymi gatunkami rysuje się bardziej złożony obraz. U nicienia *C. elegans* Latorre i in. (2015) pokazali, że nakierowywana przez kompleks DREAM akumulacja H2A.Z w ciałach pewnych genów jest związana z ich represją. Z kolei u *D. melanogaster* H2A.Z jak u drożdży bardziej wzbogaca promotory pozbawione kasety TATA, ale w przeciwieństwie do drożdży poziom H2A.Z poniżej TSS pozytywnie koreluje z aktywnością genów (Mavrich i in., 2008; Weber i in., 2010); trzeba jednak pamiętać, że H2AvD w istocie pełni funkcje dwóch wariantów – H2A.Z i H2A.X. Co więcej, geny aktywnie transkrybowane są wzbogacone w nukleosomy homotypowe pod względem H2AvD, a Weber i in. (2010) sugerowali stopniowe wzbogacanie genów w H2A.Z przez SWR1 w kolejnych rundach transkrypcji. Badania na ssaczych liniach komórkowych pokazały, że obecność H2A.Z może być współzależna z występowaniem kompleksów wyciszających bądź aktywujących ekspresję genów (Creyghton i in., 2008) oraz z modyfikacjami histonów o różnym charakterze (tj. sprzyjającym aktywacji bądź represji), oraz że może się ona zmieniać z rozwojem (Ku i in., 2012).

6.6. Nadreprezentacja HTA11 w ciałach genów odpowiadających na stres

Uderzające natomiast okazało się wzbogacenie w H2A.Z ciał genów reagujących na stres, i to niezależnie od tego, czy geny te zwiększały, czy zmniejszały swoją aktywność (**Ryc. 9-10**). Co więcej, im bardziej „responsywny” gen (w rozumieniu krotności zmiany względem warunków kontrolnych), tym więcej H2A.Z posiadał w swoim ciele (ale nie w TSS) (**Ryc. 11A**). H2A.Z wydaje się więc niejako markerem responsywnych genów, przy czym należy pamiętać, że wraz ze wzrostem ekspresji geny te mają tendencję do utraty wariantu, a wraz ze spadkiem – do gromadzenia go, zwłaszcza w ciele genu. Również dodatkowa analiza techniką ChAP-qPCR kilku genów aktywowanych w stresie pokazała ubytek HTA11 z ich ciał (**Ryc. 7**).

Pierwszymi, którzy zauważyli, że H2A.Z u *Arabidopsis* szczególnie wzbogaca ciała genów odpowiedzi na różne stesy, byli Coleman-Derr i Zilberman (2012) – jednak ich wnioski wynikały wyłącznie z identyfikacji i analizy statystycznej genów szczególnie bogatych w ten wariant. Nasze

obserwacje bazowały natomiast na analizie poziomu H2A.Z i jego zmian w obliczu zmian ekspresji wielu genów wywołanych realnym stresem suszy.

Jeśli H2A.Z specyficznie wzbogaca ciała responsywnych genów u *A. thaliana*, to czy podobnie jest u innych gatunków? Brakuje na ten temat danych. Dotychczas skupiano się głównie na obecności H2A.Z w promotorze oraz wokół TSS genów.

I tak u *S. cerevisiae* Htz1 bardziej wzbogaca promotory genów pozbawionych sekwencji TATA, które przede wszystkim występują przed konstytutywnie aktywnymi genami (Zhang i in., 2005a). Jest też jednak obecny w promotorach genów indukowanych *PHO5*, *GAL1* i *GAL10*, skąd znika podczas indukcji, ale jednocześnie jego obecność jest niezbędna dla prawidłowego poziomu aktywacji tych genów (Santisteban i in., 2000; Adam i in., 2001). Co więcej, mimo że ogólnie Htz1 antykoreluje u drożdży z poziomem transkrypcji, w mutancie *htz1* zaburzona jest głównie aktywacja genów (Zhang i in., 2005a), a sam wariant okazał się konieczny do wydajnego wiązania pewnych czynników transkrypcyjnych (Adam i in., 2001; Lemieux i in., 2008). Pewnych informacji na temat Htz1 w ciałach genów dostarczyli Hardy i in. (2009), pokazując, że w genach aktywowanych stresem ciepła wraz ze wzrostem poziomu wiązanej tam polimerazy II RNA następował ubytek Htz1, a w genach wyciszanych – wraz ze spadkiem polimerazy rosła ilość związanego H2A.Z. Jednakże za tę obserwację przynajmniej w pewnym stopniu może odpowiadać kotranskrypcyjne usuwanie dimerów typu H2A-H2B (w tym Htz1-H2B) z genów, przez które przechodzi polimeraza. Tramantano i in. (2016) postulują, że za polimerazą w miejsce usuniętych dimerów Htz1-H2B wprowadzane są dimery składające się z kanonicznych histonów.

W jakim stopniu w naszych wynikach obserwujemy to zjawisko, tego nie wiemy. Nie notujemy jednak silnej antykorelacji poziomu H2A.Z z poziomem ekspresji genów. Na pewno w tym kontekście warto byłoby porównać zmiany poziomu H2A.Z ze zmianami poziomu H2B i H2A.

6.7. Trudności w interpretacji zależności między ekspresją genów a poziomem H2A.Z

Powyższe obserwacje ukazują powszechne problemy, który zawsze pojawiają się w próbie poznawania wpływu czynników chromatynowych na regulację ekspresji

genów: czy korelacja danego czynnika z aktywacją bądź represją transkrypcji jest faktycznie zależnością przyczynowo-skutkową? Jeśli tak, to czy czynnik chromatynowy jest przyczyną, a zmiana poziomu ekspresji skutkiem, a może na odwrót? Lashgari i in. (2017) pokazali, że w komórkach ludzkich poziom H2A.Z w nukleosomie +1 i ciele genów wzrasta po zaprzestaniu ich transkrypcji i zwrócili uwagę, że badania korelacji poziomu ekspresji genów i poziomu H2A.Z niekoniecznie determinują, co zachodzi jako pierwsze. Wprowadzanie H2A.Z po zaprzestaniu transkrypcji genu mogłoby być np. elementem pamięci o “historii” i statusie transkrypcyjnym genu.

Dalej, jeżeli dane wskazują, że czynnik chromatynowy jest faktycznie przyczyną w obserwowanej zależności, to czy zmiana poziomu transkrypcji jest bezpośrednim efektem działania tego czynnika? Zawiera tu się pytanie o sposób działania czynnika – czy jest to wpływ na stabilność nukleosomów, wiązanie innych białek efektorowych, a może deregulacja pewnych genów jest tylko wtórnym skutkiem deregulacji innych genów? Niestety, bardzo trudno odpowiedzieć na te pytania. Brakuje technik pozwalających na prześledzenie krok po kroku zmian zachodzących podczas aktywacji bądź represji genu. W naszych analizach także natknęliśmy się na te ograniczenia. Dlatego postanowiliśmy bliżej przyjrzeć się genom deregulowanym w linii *arp6*, zakładając, że ich deregulacja spowodowana jest (bezpośrednio bądź pośrednio) redukcją chromatynowego H2A.Z. Następnie założyliśmy, że geny bezpośrednio zależne od H2A.Z to będą te spośród deregulowanych w mutancie *arp6*, które wyróżnia szczególny wzór rozmieszczenia H2A.Z, odmienny od wzoru dla ogółu genów. Aby znaleźć takie geny, porównaliśmy dane transkryptomomiczne dla linii *arp6* z danymi o dystrybucji HTA11 w linii 5D. Niestety, na początku nie planowaliśmy takiego powiązania i kierowaliśmy się innymi przesłankami co do wyboru warunków eksperymentu (eksperyment z *arp6* w warunkach dnia krótkiego ze względu na wcześniejsze kwitnienie mutanta, eksperyment z 5D w warunkach dnia długiego w celu uzyskania stosunkowo szybko dużej ilości materiału). Nie były więc to eksperymenty całkowicie kompatybilne; z drugiej jednak strony nawet w przypadku dotkliwego stresu suszy dystrybucja H2A.Z pozostaje taka sama dla ogółu genów (**Ryc. 8**), my zaś nie byliśmy skupieni na analizie genów reakcji na fotoperiod.

Uzyskane dane pokazały, że w linii mutantu *arp6* dochodzi do deregulacji ekspresji części genów i to zarówno w górę, jak i w dół. Wskazywałoby to na zróżnicowany wpływ H2A.Z u *Arabidopsis* na ekspresję genów. Wśród genów hipoaktywnych statystycznie nadreprezentowane są geny związane z naprawą DNA, niezależnie od warunków eksperymentu (warunki kontrolne/stresu), co sugeruje ważną rolę wariantu w tym procesie i zgadza się z doniesieniami innych grup na ten temat (m. in. Kusch i in., 2004; Kalocsay i in., 2009; Xu i in., 2012; Gursoy-Yuzugullu i in., 2015). Natomiast wśród genów hiperaktywnych w warunkach kontrolnych nadreprezentowane były geny odpowiedzi na różne stresy i bodźce, co wskazuje, że H2A.Z może pełnić szczególną rolę w kontroli także tych genów (**Tab. 1**). Brak nadreprezentowanych kategorii wśród genów hiperaktywnych w warunkach stresu suszy może wynikać z tego, że znaczna część z tych genów jest naturalnie aktywowanych w tych warunkach.

6.8. Dystrybucja H2A.Z w genach od niego zależnych – i co nam ona „mówi” o wpływie tego wariantu na poziom ich transkrypcji

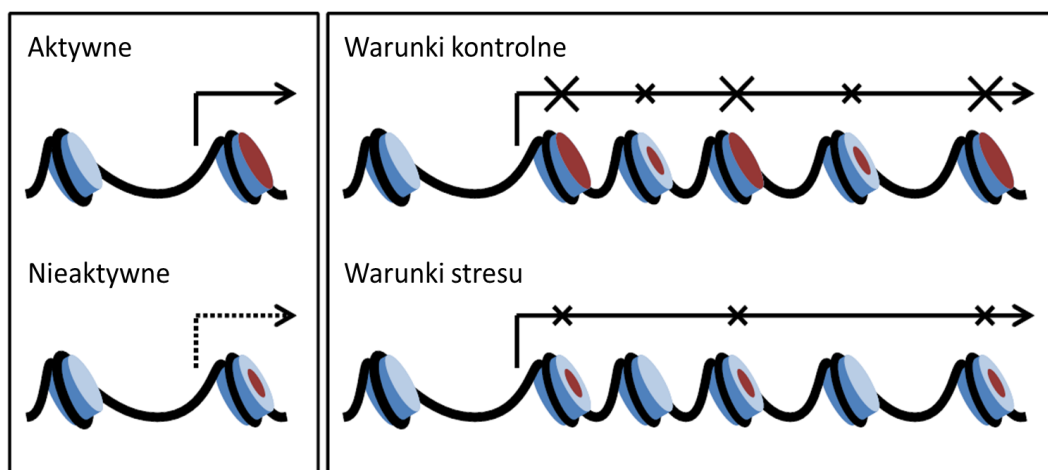
Geny hipoaktywne w *arp6* nie różniły się dystrybucją HTA11 od ogółu genów ulegających ekspresji, co może świadczyć o tym, że są raczej pośrednio regulowane przez ten wariant. Za to geny hiperaktywne w linii 5D charakteryzował zdecydowanie wyższy poziom H2A.Z w ich ciałach (ale nie w TSS), zarówno w warunkach kontrolnych, jak i stresu suszy (**Ryc. 12**). Możliwe więc, że wysoki poziom H2A.Z w ciałach tych genów bezpośrednio hamuje ich transkrypcję – wszakże przy braku H2A.Z ich ekspresja rośnie. Nadal jednak nie znamy mechanizmu tego działania. Wielu badaczy wciąż dopatruje się go w większej lub mniejszej stabilności nukleosomów z H2A.Z (zależnie od badań, na które się powołują). Ostatnio Osakabe i in. (2018) pokazali, że dimery HTA9-H2B szybciej oddysocjują od nukleosomów homotypowych pod wpływem ciepła niż dimery z innymi wariantami H2A, trudno mi jednak ocenić, jakie to ma przełożenie na cechy takich nukleosomów w warunkach *in vivo*. Ta sama grupa stwierdziła, że u *A. thaliana* dominują nukleosomy homotypowe pod względem białek H2A – jednak według mnie w wynikach brakuje koniecznych kontroli.

Z kolei Dai i in. (2017) również przebadali dystrybucję H2A.Z w genach *A. thaliana* i także zaobserwowali negatywną korelację obecności H2A.Z w ciałach genów i TSS z ich aktywnością transkrypcyjną. Podobnie zidentyfikowali

geny odpowiedzi na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne jako negatywnie regulowane przez H2A.Z. Jednak mechanizmu dopatrują się znowu w tym, co dzieje się w nukleosomach przy TSS.

Dai i in. (2017) utrzymują, że obecność H2A.Z w TSS jest negatywnie skorelowana z ekspresją genów, chociaż wynik ten nie jest zbyt przekonujący. W naszych analizach widzieliśmy niewielką negatywną korelację poziomu ekspresji genu w warunkach kontrolnych i poziomu HTA11 w TSS, ESS i TTS (**Ryc. 11B**). Dai i in. sugerują, że H2A.Z powoduje większą stabilizację nukleosomu +1, który jest największą barierą dla polimerazy RNA i według badaczy również u *Arabidopsis* prowadzi do jej pauzowania, i zmniejszoną stabilizację nukleosomu +1, co miałyby promować wiązanie represorów. Jednak wyjaśnienia te są czysto spekulatywne, a przyczyna odmiennego wpływu H2A.Z na nukleosomy w różnych miejscach niejasna. Trzeba pamiętać, że u *D. melanogaster* nukleosomy homotypowe pod względem H2A.Z sprzyjają przejściu polimerazy do aktywnej transkrypcji, a nie jej zatrzymywaniu. Poza tym w niedawno przeprowadzonych badaniach Hetzel i in. (2016) nie znaleźli śladów zjawiska pauzowania polimerazy w pobliżu promotora u *A. thaliana*. Z kolei głębsza analiza naszych wyników pokazała, że mimo iż obecność H2A.Z (zwłaszcza w ciele genu) częściej powstrzymuje geny przed nadmierną ekspresją, to pewna jego ilość w TSS może być niezbędna do utrzymania aktywności części genów (i obniżony poziom H2A.Z w TSS w linii *arp6* może skutkować ich zmniejszoną ekspresją). Ich liczba zresztą może być znacznie większa, zjawisko to może dotyczyć nawet wszystkich genów zależnych od polimerazy II RNA; jednak, jako że w mutancie *arp6* prawdopodobnie dochodzi do śladowej, ARP6-niezależnej inkorporacji H2A.Z, która może być wystarczająca do prawidłowej aktywacji transkrypcji, nie identyfikujemy tego zjawiska w szerszej skali w naszej analizie. Na taki scenariusz wskazuje fakt, że geny hipoaktywne w mutancie *arp6*, które są deregulowane stresem suszy, wykazują znacznie niższy niż pozostałe geny poziom H2A.Z w nukleosomie +1, mierzony w linii 5D (**Ryc. 14**). Taki wpływ H2A.Z jest zgodny z licznymi obserwacjami u innych gatunków, wskazującymi, że obecność H2A.Z w pobliżu TSS niektórych genów jest niezbędna do uzyskania wysokiej ekspresji w wyniku indukcji (Santisteban i in., 2000; Adam i in., 2001), wydajnego wiązania czynników transkrypcyjnych (Adam i in., 2001; Lemieux i in., 2008) i „przygotowania” genu do szybkiej odpowiedzi transkrypcyjnej (Zhang

i in., 2005a). Proponujemy więc model dwoistego wpływu H2A.Z na ekspresję genów u *A. thaliana*: duże ilości H2A.Z w ciałach genów wpływają represyjnie na transkrypcję genów, których ekspresja w zwykłych warunkach jest niepotrzebna; jednocześnie pewna ilość tego wariantu jest niezbędna dla aktywności przynajmniej części genów (**Ryc. 15**) – a ostateczny wpływ może zależeć od współwystępowania innych modyfikacji chromatyny czy oddziaływań ze specyficznymi białkami. Trudno jednak określić, w jaki sposób wariant histonowy H2A.Z znajdując się w różnych miejscach genów w tak zróżnicowany sposób wpływa na ich transkrypcję. Możliwe, że ostateczny efekt jest wypadkową współwystępowania innych modyfikacji chromatyny i wiązanych w danym miejscu białek. Kwestia ta pozostaje wciąż do zbadania.



Ryc. 15. Model wpływu wariantu histonowego H2A.Z na transkrypcję u *A. thaliana*. Lewy panel przedstawia nukleosomy wokół TSS – podczas niewystarczającej ilości H2A.Z (czerwony kolor) w nukleosomie +1 nie dochodzi do ekspresji pewnych genów. Prawy panel pokazuje, że wysoki poziom H2A.Z w nukleosomach w ciałach genów inhibuje transkrypcję genów, których produkty nie są potrzebne w danych warunkach (np. geny odpowiedzi na stres w warunkach, gdy stres ten nie występuje).

7. WNIOSKI

Niniejsza praca doktorska była próbą wyjaśnienia roli, jaką wariant histonowy H2A.Z pełni w regulacji aktywności transkrypcyjnej genów u *A. thaliana*, w szczególności w odpowiedzi na stres suszy. Dzięki wykonanym badaniom wyciągnięto następujące wnioski:

1. Mutanty, których wspólną cechą jest upośledzone wprowadzanie H2A.Z do chromatyny, wykazują opóźnione kiełkowanie w obecności stresorów osmotycznych – wysokich stężeń NaCl i sorbitolu. Prawdopodobnie fenotyp ten jest wypadkową nakładania się nadwrażliwości na stres osmotyczny i zaburzeń rozwoju występujących u tych mutantów. Jednocześnie wielkość tego opóźnienia jest zróżnicowana i rośnie w szeregu *hta9 hta11*, *arp6*, *pie1-5*. Może to wynikać z różnych poziomów redukcji H2A.Z w chromatynie u poszczególnych mutantów (zwłaszcza w mutancie *hta9 hta11*, w którym ekspresji ulega HTA8), jak i dodatkowych funkcji pełnionych przez białka ARP6 i PIE1 (poza wprowadzaniem H2A.Z do nukleosomów).
2. W użytej linii *arp6* dochodzi w większości przebadanych genów do znaczącej redukcji zawartości H2A.Z w ich obrębie. Jednocześnie dotąd w literaturze nie wykazano, by część zmian fenotypowych obserwowanych w tym mutancie była niezależna od depozycji H2A.Z, dlatego mutant *arp6* uznano za wartościową linię w badaniu znaczącego obniżenia poziomu H2A.Z w chromatynie.
3. Użyte techniki nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, czy brak ARP6 prowadzi do całkowitej utraty H2A.Z przynajmniej w pewnych loci; nie sposób bowiem odróżnić prawdziwy, niewysoki poziom histonu od poziomu tła.
4. Znacząca utrata H2A.Z w różnych rodzajach loci wskazuje, że brak ARP6 skutkuje globalną redukcją poziomu H2A.Z w chromatynie.
5. W mutancie *arp6* dochodzi do deregulacji części genów. Wśród genów hipoaktywnych nadreprezentowane kategorie zarówno w warunkach kontrolnych, jak i stresowych to kategorie związane z DNA – może to potwierdzać udział H2A.Z w sygnalizacji i naprawie uszkodzeń DNA u *A. thaliana*. Nadreprezentowanymi kategoriami w genach hiperaktywnych w warunkach kontrolnych są odpowiedzi na różne bodźce i stesy. Sugeruje to,

że H2A.Z może mieć udział w represji tych genów w warunkach nieindukujących.

6. Trudno odróżnić, czy deregulacja ekspresji poszczególnych genów w linii *arp6* jest bezpośrednim czy pośrednim skutkiem utraty H2A.Z. Założono, że geny bezpośrednio regulowane przez H2A.Z powinny odróżniać się jego dystrybucją od innych genów. Kryterium to spełniają geny hiperaktywne, co wskazuje, że wariant może je bezpośrednio utrzymywać w stanie represji. Wśród nich dominują geny odpowiedzi na bodźce i stresy.
7. Dystrybucja H2A.Z w skali genomowej jest względnie stała – mimo drastycznie innych warunków w stresie suszy dla ogółu genów pozostaje taka sama. Zmienia się jednak w genach zmieniających ekspresję pod wpływem stresu.
8. W genach zwiększających swoją ekspresję w odpowiedzi na stres dochodzi do utraty H2A.Z w ciałach i na 5' końcach genów, a w genach zmniejszających ekspresję – do akumulacji tego wariantu w ciałach genów. Analizy statystyczne potwierdzają korelację wzrostu ekspresji genów i ubytku H2A.Z w ciałach i 5' końcach genów. Nie można jednak z całą pewnością stwierdzić, że to utrata H2A.Z powoduje wzrost ich transkrypcji, a nie odwrotnie.
9. Geny mocno zmieniające ekspresję w odpowiedzi na stres suszy (niezależnie od kierunku tej zmiany) wyróżniają się wysoką zawartością H2A.Z w swoich ciałach. Im większa zmiana ekspresji, tym wyższa zawartość H2A.Z. Znowu wskazuje to, że wariant ten może pełnić szczególną rolę w regulacji genów odpowiedzi na bodźce i stresy.
10. Analiza genów reagujących na stres suszy i jednocześnie zależnych od H2A.Z wskazuje, że brak ARP6 skutkuje głównie hiperaktywnością genów niezależnie od kierunku ich odpowiedzi na stres.
11. Te spośród genów zwiększających ekspresję w odpowiedzi na stres, które jednocześnie są hipoaktywne w mutancie *arp6*, w roślinach typu WT nie tracą H2A.Z ze swoich TSS - w przeciwieństwie do pozostałych genów zwiększających ekspresję. Z kolei te spośród genów zmniejszających ekspresję w odpowiedzi na stres, które jednocześnie są hiperaktywne w mutancie *arp6*, w roślinach typu WT tracą H2A.Z ze swoich TSS - w przeciwieństwie do pozostałych genów zmniejszających ekspresję, które go

tam kumulują. Może to wskazywać, że pewna ilość H2A.Z jest konieczna do transkrypcji tych dwóch grup genów.

12. H2A.Z może mieć represyjny bądź stymulujący wpływ na transkrypcję w zależności od swojej lokalizacji w genie.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adam, M., Robert, F., Laroche, M., i Gaudreau, L.** (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6270–9.
- Adelman, K. i Lis, J.T.** (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 720–731.
- Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C., i Pugh, B.F.** (2007). Translational and rotational settings of H2A . Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **446**: 572–577.
- Altaf, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., i Côté, J.** (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J. Biol. Chem.* **285**: 15966–77.
- Altaf, M., Utley, R.T., Lacoste, N., Tan, S., Briggs, S.D., i Côté, J.** (2007). Interplay of Chromatin Modifiers on a Short Basic Patch of Histone H4 Tail Defines the Boundary of Telomeric Heterochromatin. *Mol. Cell* **28**: 1002–1014.
- Anders, S., Pyl, P.T., i Huber, W.** (2015). HTSeq - a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166–169.
- Anderson, J.D. i Widom, J.** (2001). Poly (dA-dT) Promoter Elements Increase the Equilibrium Accessibility of Nucleosomal DNA Target Sites Poly (dA-dT) Promoter Elements Increase the Equilibrium Accessibility of Nucleosomal DNA Target Sites. **21**: 3830–3839.
- Auger, A., Galarneau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R.T., Cronier, D., Allard, S., i Côté, J.** (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 2257–70.
- Ayrappetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., i Price, B.D.** (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 9169–9174.
- Babiarz, J.E., Halley, J.E., i Rine, J.** (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **20**: 700–710.
- Baldi, S. i Becker, P.B.** (2013). The variant histone H2A.V of *Drosophila* - Three roles, two guises. *Chromosoma* **122**: 245–258.
- Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J., i Luger, K.** (2004). Nucleosomes containing the histone

- variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.* **23**: 3314–24.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., i Zhao, K.** (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823–37.
- Basehoar, A.D., Zanton, S.J., i Pugh, B.F.** (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* **116**: 699–709.
- Bernstein, B.E. i in.** (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* **125**: 315–326.
- Berriri, S., Gangappa, S.N., i Kumar, S.V.** (2016). SWR1 Chromatin-Remodeling Complex Subunits and H2A.Z Have Non-overlapping Functions in Immunity and Gene Regulation in Arabidopsis. *Mol. Plant* **9**: 1051–1065.
- Bhutani, N., Brady, J.J., Damian, M., Sacco, A., Stéphane, Y., i Blau, H.M.** (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* **463**: 1042–1047.
- Bieluszewski, T., Galganski, L., Sura, W., Bieluszewska, A., Abram, M., Ludwikow, A., Ziolkowski, P.A., i Sadowski, J.** (2015). AtEAF1 is a potential platform protein for Arabidopsis NuA4 acetyltransferase complex. *BMC Plant Biol.* **15**: 1–15.
- Billon, P. i Côté, J.** (2011). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**: 290–302.
- Binda, O., Sevilla, A., LeRoy, G., Lemischka, I.R., Garcia, B.A., i Richard, S.** (2013). SETD6 monomethylates H2AZ on lysine 7 and is required for the maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *Epigenetics* **8**: 177–183.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J.S., i Kornberg, R.D.** (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol. Cell* **11**: 1587–1598.
- Bondarenko, V.A., Steele, L.M., Újvári, A., Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Polikanov, Y.S., Luse, D.S., i Studitsky, V.M.** (2006). Nucleosomes Can Form a Polar Barrier to Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell* **24**: 469–479.
- Bönisch, C. i Hake, S.B.** (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res.:* 1–23.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Olga, A., Solier, S., i Pommier, Y.** (2008). γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. cancer* **8**: 957–967.
- Boudreault, A. a., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S., i Côté, J.** (2003). Yeast Enhancer of Polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev.* **17**: 1415–1428.
- Bowerman, S. i Wereszczynski, J.** (2016). Effects of MacroH2A and H2A.Z on

- Nucleosome Dynamics as Elucidated by Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **110**: 327–337.
- Brahma, S., Udugama, M.I., Kim, J., Hada, A., Bhardwaj, S.K., Hailu, S.G., Lee, T.-H., i Bartholomew, B.** (2017). INO80 exchanges H2A.Z for H2A by translocating on DNA proximal to histone dimers. *Nat. Commun.* **8**: 15616.
- Brower-Toland, B., Wacker, D.A., Fulbright, R.M., Lis, J.T., Kraus, W.L., i Wang, M.D.** (2005). Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J. Mol. Biol.* **346**: 135–146.
- Buschbeck, M. i Hake, S.B.** (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**: 299–314.
- Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Kusch, T., Li, B., Workman, J.L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., i Conaway, J.W.** (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J. Biol. Chem.* **280**: 13665–13670.
- Cairns, B.R.** (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**: 193–8.
- Cao, X. i Jacobsen, S.E.** (2002). Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99 Suppl 4**: 16491–8.
- Capuano, F., Mülleder, M., Kok, R., Blom, H.J., i Ralser, M.** (2014). Cytosine DNA Methylation Is Found in *Drosophila melanogaster* but Absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and Other Yeast Species. *Anal. Chem.* **86**: 3697–3702.
- Carr, A.M., Dorrington, S.M., Hindley, J., Phear, G.A., Aves, S.J., i Nurse, P.** (1994). Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. *MGG Mol. Gen. Genet.* **245**: 628–635.
- Changolkar, L.N., Costanzi, C., Leu, N.A., Chen, D., McLaughlin, K.J., i Pehrson, J.R.** (2007). Developmental changes in histone macroH2A1-mediated gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 2758–2764.
- Chen, K., Xi, Y., Pan, X., Li, Z., Tyler, J., Dent, S., He, X., i Li, W.** (2013). DANPOS: Dynamic Analysis of Nucleosome Position and Occupancy by Sequencing. *Genome Res.* **23**: 341–351.
- Chen, Y., Chen, Q., McEachin, R.C., Cavalcoli, J.D., i Yu, X.** (2014). H2A.B facilitates transcription elongation at methylated CpG loci. *Genome Res.* **24**: 570–579.
- Cheung, A.C.M. i Cramer, P.** (2011). Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. *Nature* **471**: 249–53.

- Choi, E.S., Shin, J. a, Kim, H.S., i Jang, Y.K.** (2005a). Dynamic regulation of replication independent deposition of histone H3 in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* **33**: 7102–10.
- Choi, J., Heo, K., i An, W.** (2009). Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A. *Nucleic Acids Res.* **37**: 5993–6007.
- Choi, K., Kim, J., Müller, S.Y., Oh, M., Underwood, C., Henderson, I., i Lee, I.** (2016). Regulation of microRNA-mediated developmental changes by the SWR1 chromatin remodeling complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **171**: pp.00332.2016.
- Choi, K., Kim, S., Kim, S.Y., Kim, M., Hyun, Y., Lee, H., Choe, S., Kim, S.-G., Michaels, S., i Lee, I.** (2005b). SUPPRESSOR OF FRIGIDA3 encodes a nuclear ACTIN-RELATED PROTEIN6 required for floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2647–2660.
- Choi, K., Park, C., Lee, J., Oh, M., Noh, B., i Lee, I.** (2007). *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* **134**: 1931–41.
- Choi, K., Zhao, X., Kelly, K. a, Venn, O., Higgins, J.D., Yelina, N.E., Hardcastle, T.J., Ziolkowski, P. a, Copenhaver, G.P., Franklin, F.C.H., McVean, G., i Henderson, I.R.** (2013). *Arabidopsis* meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.*
- Churchman, L.S. i Weissman, J.S.** (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* **469**: 368–73.
- Clapier, C.R. i Cairns, B.R.** (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 273–304.
- Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R., i Tremethick, D.J.** (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* **399**: 694–7.
- Coleman-Derr, D. i Zilberman, D.** (2012). Deposition of Histone Variant H2A.Z within Gene Bodies Regulates Responsive Genes. *PLoS Genet.* **8**: e1002988.
- Cortijo, S., Charoensawan, V., Brestovitsky, A., Buning, R., Ravarani, C., Rhodes, D., van Noort, J., Jaeger, K.E., i Wigge, P.A.** (2017). Transcriptional regulation of the ambient temperature response by H2A.Z-nucleosomes and HSF1 transcription factors in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.*
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., i Wolberger, C.** (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 1037–43.
- Costanzi, C. i Pehrson, J.R.** (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive

X chromosome of female mammals. *Nature* **393**: 599–601.

- Creyghton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M. a., Sha, K., Young, R. a., Jaenisch, R., i Boyer, L. a.** (2008). H2AZ Is Enriched at Polycomb Complex Target Genes in ES Cells and Is Necessary for Lineage Commitment. *Cell* **135**: 649–661.
- van Daal, a i Elgin, S.C.** (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* **3**: 593–602.
- Dai, X., Bai, Y., Zhao, L., Dou, X., Liu, Y., Wang, L., Li, Y., Li, W., Hui, Y., Huang, X., Wang, Z., i Qin, Y.** (2017). H2A.Z represses gene expression by modulating promoter nucleosome structure and enhancer histone modifications in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*: doi: 10.1016/j.molp.2017.09.007.
- Dalvai, M., Fleury, L., Bellucci, L., Kocanova, S., i Bystricky, K.** (2013). TIP48/Reptin and H2A.Z Requirement for Initiating Chromatin Remodeling in Estrogen-Activated Transcription. *PLoS Genet.* **9**: e1003387.
- Dangkulwanich, M., Ishibashi, T., Liu, S., Kireeva, M.L., Lubkowska, L., Kashlev, M., i Bustamante, C.J.** (2013). Complete dissection of transcription elongation reveals slow translocation of RNA polymerase II in a linear ratchet mechanism. *Elife* **2013**: 1–22.
- Deal, R.B., Kandasamy, M.K., Mckinney, E.C., i Meagher, R.B.** (2005). The Nuclear Actin-Related Protein ARP6 Is a Pleiotropic Developmental Regulator Required for the Maintenance of FLOWERING LOCUS C Expression and Repression of Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2633–2646.
- Deal, R.B., Topp, C.N., McKinney, E.C., i Meagher, R.B.** (2007). Repression of flowering in *Arabidopsis* requires activation of FLOWERING LOCUS C expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell* **19**: 74–83.
- Domaschitz, R., Kurscheid, S., Nekrasov, M., Han, S., Correspondence, D.J.T., i Tremethick, D.J.** (2017). The Histone Variant H2A.Z Is a Master Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition Data and Software Availability The Histone Variant H2A.Z Is a Master Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* **21**: 943–952.
- Doyen, C., An, W., Angelov, D., Mietton, F., Studitsky, V.M., Roeder, R.G., Bouvet, P., Bondarenko, V., Hamiche, A., i Dimitrov, S.** (2006a). Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 1156–1164.
- Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Bouvet, P., i**

- Dimitrov, S.** (2006b). Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *Embo J* **25**: 4234–4244.
- Doyon, Y. i Côté, J.** (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 147–54.
- Dryhurst, D., Ishibashi, T., Rose, K.L., Eirín-López, J.M., McDonald, D., Silva-Moreno, B., Veldhoen, N., Helbing, C.C., Hendzel, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., i Ausió, J.** (2009). Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC Biol.* **7**: 86.
- Dudek, S.M. i in.** (2010). Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function. *Mol. Biol. Cell* **21**: 4042–4056.
- Durant, M. i Pugh, B.F.** (2007). NuA4-Directed Chromatin Transactions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 5327–5335.
- Eirín-López, J.M., González-Romero, R., Dryhurst, D., Ishibashi, T., i Ausió, J.** (2009). The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. *BMC Evol. Biol.* **9**: 31.
- Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R.E., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., i Lyons, I.** (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.* **11**: 1183–1187.
- Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C., i Tremethick, D.J.** (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 172–177.
- Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K., i Tremethick, D.J.** (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell* **16**: 655–61.
- Feil, R. i Berger, F.** (2007). Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet.* **23**: 192–199.
- Felsenfeld, G. i Groudine, M.** (2003). Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448–453.
- Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., i van Steensel, B.** (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* **143**: 212–24.
- Filipescu, D., Szenker, E., i Almouzni, G.** (2013). Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet.* **29**: 630–640.
- Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., i Bazett-Jones, D.P.** (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured

- as 10-nm chromatin fibres. *EMBO Rep.* **13**: 992–996.
- Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Yang, C., Krishnakumar, R., i Kraus, W.L.** (2010). The histone variant macroH2A1 marks repressed autosomal chromatin , but protects a subset of its target genes from silencing. *Genes Dev.* **24**: 21–32.
- Gaykalova, D.A., Kulaeva, O.I., Volokh, O., Shaytan, A.K., Hsieh, F.-K., Kirpichnikov, M.P., Sokolova, O.S., i Studitsky, V.M.** (2015). Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E5787-95.
- Goldberg, A.D. i in.** (2010). Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell* **140**: 678–691.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P., i Tremethick, D.J.** (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 525–530.
- Gu, M., Naiyachit, Y., Wood, T.J., i Millar, C.B.** (2015). H2A.Z marks antisense promoters and has positive effects on antisense transcript levels in budding yeast. *BMC Genomics* **16**: 99.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gévry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., i Gaudreau, L.** (2005). Variant histone H2A.z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.* **3**: 1–11.
- Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M.K., i Price, B.D.** (2015). Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.:* 201504868.
- Hardy, S., Jacques, P.-E., Gévry, N., Forest, A., Fortin, M.-E., Laflamme, L., Gaudreau, L., i Robert, F.** (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet.* **5**: e1000687.
- Hartley, P.D. i Madhani, H.D.** (2009). Mechanisms that Specify Promoter Nucleosome Location and Identity. *Cell* **137**: 445–458.
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., i Glass, C.K.** (2010). Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol. Cell* **38**: 576–589.
- Hellman, A. i Chess, A.** (2007). Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* **315**: 1141–3.
- Henikoff, S.** (2007). Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.*
- Henikoff, S. i Shilatifard, A.** (2011a). Histone modification: Cause or cog? *Trends Genet.* **27**: 389–396.

- Henikoff, S. i Shilatifard, A.** (2011b). Histone modification: Cause or cog? *Trends Genet.* **27**: 389–396.
- Hetzl, J., Duttke, S.H., Benner, C., i Chory, J.** (2016). Nascent RNA sequencing reveals distinct features in plant transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 12316–12321.
- Hoch, D. a, Stratton, J.J., i Gloss, L.M.** (2007). Protein-protein Förster resonance energy transfer analysis of nucleosome core particles containing H2A and H2A.Z. *J. Mol. Biol.* **371**: 971–88.
- Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., i Young, R.A.** (1998). Dissecting the Regulatory Circuitry of a Eukaryotic Genome. *Cell* **95**: 717–728.
- Horikoshi, N., Arimura, Y., Taguchi, H., i Kurumizaka, H.** (2016a). Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones.
- Horikoshi, N., Arimura, Y., Taguchi, H., i Kurumizaka, H.** (2016b). Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A. *Open Biol.* **6**: 160127.
- Hu, G., Cui, K., Northrup, D., Liu, C., Wang, C., Tang, Q., Ge, K., Levens, D., Crane-Robinson, C., i Zhao, K.** (2013). H2A.Z facilitates access of active and repressive complexes to chromatin in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **12**: 180–92.
- Hu, Y., Shen, Y., Conde E Silva, N., i Zhou, D.-X.** (2011). The role of histone methylation and H2A.Z occupancy during rapid activation of ethylene responsive genes. *PLoS One* **6**: e28224.
- Huebert, D.J., Kuan, P.-F., Keleş, S., i Gasch, A.P.** (2012). Dynamic changes in nucleosome occupancy are not predictive of gene expression dynamics but are linked to transcription and chromatin regulators. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 1645–53.
- Iouzalén, N., Moreau, J., i Méchali, M.** (1996). H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3947–52.
- Ismail, I.H. i Hendzel, M.J.** (2008). The gamma-H2A.X: Is It Just a Surrogate Marker of Double-Strand Breaks or Much More? *Environ. Mol. Mutagen.* **49**: 73–82.
- Iyer, L.M., Abhiman, S., i Aravind, L.** (2011). Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **101**: 25–104.
- Izban, M.G. i Luse, D.S.** (1991). Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev.* **5**: 683–696.
- Jackson, J.D. i Gorovsky, M.A.** (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is

- distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3811–6.
- Jenuwein, T. i Allis, C.D.** (2001). Translating the Histone Code. *Science* (80-.). **293**: 1074–1080.
- Jeronimo, C., Watanabe, S., Kaplan, C.D., Peterson, C.L., i Robert, F.** (2015). The Histone Chaperones FACT and Spt6 Restrict H2A.Z from Intragenic Locations. *Mol. Cell* **58**: 1113–1123.
- Jin, C. i Felsenfeld, G.** (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* **21**: 1519–29.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., i Felsenfeld, G.** (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark „nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* **41**: 941–5.
- Jones, P. a i Laird, P.W.** (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* **21**: 163–167.
- Jones, P. a i Liang, G.** (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 805–11.
- Jones, P.A.** (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 484–492.
- Joyce, E.F., Pedersen, M., Tiong, S., White-brown, S.K., Paul, A., Campbell, S.D., i Mckim, K.S.** (2011). ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair. *J. Cell Biol.* **195**: 359–368.
- Kalocsay, M., Hiller, N.J., i Jentsch, S.** (2009). Article SUMO-H2A . Z-Dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-Strand Break. *Mol. Cell* **33**: 335–343.
- Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-mittendorf, Y., Gossett, A.J., Tillo, D., Field, Y., Leproust, E.M., Hughes, T.R., Lieb, J.D., Widom, J., i Segal, E.** (2009). *Genome. DNA Seq.* **458**: 362–366.
- Katari, M.S., Nowicki, S.D., Aceituno, F.F., Nero, D., Kelfer, J., Thompson, L.P., Cabello, J.M., Davidson, R.S., Goldberg, A.P., Shasha, D.E., Coruzzi, G.M., i Gutierrez, R.A.** (2010). VirtualPlant: A Software Platform to Support Systems Biology Research. *Plant Physiol.* **152**: 500–515.
- Keogh, M.-C., Mennella, T. a, Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N.J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L.R., Greenblatt, J.F., Baetz, K., i Buratowski, S.** (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4 The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev.* **20**: 660–665.
- Kharchenko, P. V i in.** (2011). Comprehensive analysis of the chromatin landscape in

- Drosophila*. *Nature* **471**: 480–485.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., i Salzberg, S.L.** (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**: R36.
- Kim, H. i in.** (2009). An acetylated form of histone H2A.Z regulates chromosome architecture in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 1286–1293.
- Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M., i Kashlev, M.** (2005). Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol. Cell* **18**: 97–108.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., i Studitsky, V.M.** (2002). Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: Loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* **9**: 541–552.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., i Rine, J.** (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* **2**: E131.
- Korber, P. i Barbaric, S.** (2014). The yeast PHO5 promoter: From single locus to systems biology of a paradigm for gene regulation through chromatin. *Nucleic Acids Res.* **42**: 10888–10902.
- Kornberg, R.D.** (1974). *Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA*
Published by : American Association for the Advancement of Science
Linked references are available on JSTOR for this article : *Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin. Science* **184**: 868–871.
- Kornberg, R.D. i Lorch, Y.** (1999). Twenty-Five Years of the Nucleosome ,
Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell* **98**: 285–294.
- Kristjuhan, A. i Svejstrup, J.Q.** (2004). Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *EMBO J.* **23**: 4243–52.
- Krogan, N.J. i in.** (2003). A Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1. *Mol. Cell* **12**: 1565–1576.
- Krogan, N.J. i in.** (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *PNAS* **101**: 13513–13518.
- Ku, M., Jaffe, J.D., Koche, R.P., Rheinbay, E., Endoh, M., Koseki, H., Carr, S. a, i Bernstein, B.E.** (2012). H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome Biol.* **13**: R85.
- Kubik, S., Bruzzone, M.J., Jacquet, P., Falcone, J.L., Rougemont, J., i Shore, D.**

- (2015). Nucleosome Stability Distinguishes Two Different Promoter Types at All Protein-Coding Genes in Yeast. *Mol. Cell* **60**: 422–434.
- Kulaeva, O.I., Hsieh, F.-K., i Studitsky, V.M.** (2010). RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 11325–30.
- Kumar, S.V. i Wigge, P. a** (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell* **140**: 136–47.
- Kurdistani, S.K., Tavazoie, S., i Grunstein, M.** (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* **117**: 721–733.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Iii, J.R.Y., Abmayr, S.M., Washburn, M.P., i Workman, J.L.** (2004). Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions. *Science* (80-.). **306**: 2084–2087.
- Lang, J., Smetana, O., Sanchez-Calderon, L., Lincker, F., Genestier, J., Schmit, A.C., Houlné, G., i Chabouté, M.E.** (2012). Plant γ H2AX foci are required for proper DNA DSB repair responses and colocalize with E2F factors. *New Phytol.* **194**: 353–363.
- Langmead, B. i Salzberg, S.L.** (2013). Bowtie2. *Nat. Methods* **9**: 357–359.
- Lashgari, A., Millau, J.-F., Jacques, P.-É., i Gaudreau, L.** (2017). Global inhibition of transcription causes an increase in histone H2A.Z incorporation within gene bodies. *Nucleic Acids Res.* **8000**: 1–8.
- Latorre, I., Chesney, M.A., Garrigues, J.M., Stempor, P., Appert, A., Francesconi, M., Strome, S., i Ahringer, J.** (2015). The DREAM complex promotes gene body H2A.Z for target repression. *Genes Dev.* **29**: 495–500.
- Leach, T.J., Mazzeo, M., Chotkowski, H.L., Madigan, J.P., Wotring, M.G., i Glaser, R.L.** (2000). Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**: 23267–72.
- Leenen, F.A.D., Muller, C.P., i Turner, J.D.** (2016). DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? *Clin. Epigenetics* **8**: 92.
- Lemieux, K., Larochelle, M., i Gaudreau, L.** (2008). Variant histone H2A.Z, but not the HMG proteins Nhp6a/b, is essential for the recruitment of Swi/Snf, Mediator, and SAGA to the yeast GAL1 UASG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**: 1103–1107.
- Lenhard, B., Sandelin, A., i Carninci, P.** (2012). Regulatory elements: Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Publ. Gr.* **13**: 233–245.
- Levenson, V. V** (2010). DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev. Mol.*

- Diagn. **10**: 481–8.
- Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., i Workman, J.L.** (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 18385–18390.
- Li, Z., Gadue, P., Chen, K., Jiao, Y., Tuteja, G., Schug, J., Li, W., i Kaestner, K.H.** (2012). Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell* **151**: 1608–16.
- Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., i Friedman, N.** (2005). Single-Nucleosome Mapping of Histone Modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* **3**: 1753–1769.
- Liu, X., Li, B., i GorovskyMA** (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4305–4311.
- Lorch, Y. i Kornberg, R.D.** (2015). Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Q. Rev. Biophys.* **48**: 465–470.
- Love, M.I., Huber, W., i Anders, S.** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**: 550.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., i Richmond, T.J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **389**: 251–260.
- Luk, E., Ranjan, A., FitzGerald, P.C., Mizuguchi, G., Huang, Y., Wei, D., i Wu, C.** (2010). Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell* **143**: 725–736.
- Luk, E., Vu, N.-D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.-H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., i Wu, C.** (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol. Cell* **25**: 357–68.
- Madigan, J.P., Chotkowski, H.L., i Glaser, R.L.** (2002). DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3698–3705.
- Malik, H.S. i Henikoff, S.** (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 882–91.
- March-Díaz, R., García-Domínguez, M., Florencio, F.J., i Reyes, J.C.** (2007). SEF, a new protein required for flowering repression in *Arabidopsis*, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol.* **143**: 893–901.
- March-Díaz, R., García-Domínguez, M., Lozano-Juste, J., León, J., Florencio, F.J., i Reyes, J.C.** (2008). Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*. *Plant J.* **53**: 475–87.
- March-Díaz, R. i Reyes, J.C.** (2009). The beauty of being a variant: H2A.Z and the

- SWR1 complex in plants. *Mol. Plant* **2**: 565–77.
- Matangkasombut, O., Buratowski, R.M., Swilling, N.W., i Buratowski, S.** (2000). Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* **14**: 951–962.
- Matangkasombut, O. i Buratowski, S.** (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol. Cell* **11**: 353–363.
- Matsuda, R., Hori, T., Kitamura, H., Takeuchi, K., Fukagawa, T., i Harata, M.** (2010). Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Res.* **38**: 4263–4273.
- Mattioli, F., Vissers, J.H.A., Van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Martejn, J.A., i Sixma, T.K.** (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* **150**: 1182–1195.
- Maunakea, A.K. i in.** (2010). Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters. *Nature* **466**: 253–257.
- Mavrich, T.N. i in.** (2008). Nucleosome organization in the Drosophila genome. *Nature* **453**: 358–364.
- Meneghini, M.D., Wu, M., i Madhani, H.D.** (2003). Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* **112**: 725–736.
- Millar, C.B., Xu, F., Zhang, K., i Grunstein, M.** (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.* **20**: 711–722.
- Mito, Y., Henikoff, J.G., i Henikoff, S.** (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* **37**: 1090–1097.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., i Wu, C.** (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**: 343–8.
- Morillo-Huesca, M., Clemente-Ruiz, M., Andújar, E., i Prado, F.** (2010). The SWR1 histone replacement complex causes genetic instability and genome-wide transcription misregulation in the absence of H2A.Z. *PLoS One* **5**: e12143.
- Morrison, A.J. i Shen, X.** (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 373–84.
- Neves, L.T., Douglass, S., Spreafico, R., Venkataramanan, S., Kress, T.L., i Johnson, T.L.** (2017). The histone variant H2A.Z promotes efficient cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **31**: 702–717.
- Nissen, K.E., Homer, C.M., Ryan, C.J., Shales, M., Krogan, N.J., Patrick, K.L., i Guthrie, C.** (2017). The histone variant H2A.Z promotes splicing of weak introns. *Genes Dev.* **31**: 688–701.

- Noh, Y.S. i Amasino, R.M.** (2003). PIE1, an ISWI family gene, is required for FLC activation and floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1671–1682.
- Nourani, A., Utley, R.T., Allard, S., i Côté, J.** (2004). Recruitment of the NuA4 complex poises the PHO5 promoter for chromatin remodeling and activation. *EMBO J.* **23**: 2597–2607.
- Obri, A. i in.** (2014). ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* **505**: 648–53.
- Ooi, S.K.T., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.-P., Allis, C.D., Cheng, X., i Bestor, T.H.** (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**: 714–717.
- Osakabe, A., Lorković, Z.J., Kobayashi, W., Tachiwana, H., Yelagandula, R., Kurumizaka, H., i Berger, F.** (2018). Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility. *Nucleic Acids Res.* **gky540**.
- Pai, C., Deegan, R.S., Subramanian, L., Gal, C., Sarkar, S., Allshire, R., Whitehall, S., i Humphrey, T.C.** (2015). Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice.
- Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J., i Peterson, C.L.** (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* **144**: 200–13.
- Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., i Luger, K.** (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J. Biol. Chem.* **279**: 24274–24282.
- Paweloszyk, Ł.** (2010). Utworzenie systemu ekspresyjnego opartego na rekombinacji Cre-lox dla potrzeb immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) u *Arabidopsis thaliana* (praca magisterska)
- Pereira, S.L., Grayling, R.A., Lurz, R., Reeve, J.N., i Paquette, L.A.** (1997). Archaeal nucleosomes. *Microbiology* **94**: 12633–12637.
- Polach, K.J. i Widom, J.** (1995). Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: A dynamic equilibrium model for gene regulation. *J. Mol. Biol.* **254**: 130–149.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., i Reik, W.** (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by Aid deficiency. *Nature* **463**: 1101–1105.

- Qin, Y., Zhao, L., Skaggs, M.I., Andreuzza, S., Tsukamoto, T., Panoli, A., Wallace, K.N., Smith, S., Siddiqi, I., Yang, Z., Yadegari, R., i Palanivelu, R.** (2014). ACTIN-RELATED PROTEIN6 Regulates Female Meiosis by Modulating Meiotic Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 1612–1628.
- Rach, E.A., Winter, D.R., Benjamin, A.M., Corcoran, D.L., Ni, T., Zhu, J., i Ohler, U.** (2011). Transcription initiation patterns indicate divergent strategies for gene regulation at the chromatin level. *PLoS Genet.* **7**: e1001274.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., Madhani, H.D., i Francisco, S.** (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**: 233–48.
- Raisner, R.M. i Madhani, H.D.** (2006). Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 119–24.
- Rana, A.K. i Ankri, S.** (2016). Reviving the RNA world: An insight into the appearance of RNA methyltransferases. *Front. Genet.* **7**: 1–9.
- Rando, O.J.** (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**: 148–55.
- Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., i Tremethick, D.J.** (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J.* **22**: 1599–607.
- Rangasamy, D., Greaves, I., i Tremethick, D.J.** (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 650–5.
- Ranjan, A., Mizuguchi, G., Fitzgerald, P.C., Wei, D., Wang, F., Huang, Y., Luk, E., Woodcock, C.L., i Wu, C.** (2013). Nucleosome-free Region Dominates Histone Acetylation in Targeting SWR1 to Promoters for H2A.Z Replacement. *Cell* **154**: 1232–45.
- Ranjan, A., Wang, F., Mizuguchi, G., Wei, D., Huang, Y., i Wu, C.** (2015). H2A histone-fold and DNA elements in nucleosome activate SWR1-mediated H2A.Z replacement in budding yeast. *Elife* **4**: 1–11.
- Razin, S. V. i Gavrilov, A.A.** (2018). Structural–Functional Domains of the Eukaryotic Genome. *Biochem.* **83**: 302–312.
- Razin, S. V i Gavrilov, A.A.** (2014). Chromatin without the 30-nm fiber. *Epigenetics* **9**: 653–657.
- Reid, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., i Struhl, K.** (2000). Coordinate Regulation of Yeast Ribosomal Protein Genes Is Associated with Targeted Recruitment of Esa1 Histone Acetylase. *Mol. Cell* **6**: 1297–1307.

- Ridgway, P., Brown, K.D., Rangasamy, D., Svensson, U., i Tremethick, D.J.** (2004). Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *J. Biol. Chem.* **279**: 43815–43820.
- Robert, F., Pokholok, D.K., Hannett, N.M., Rinaldi, N.J., Chandy, M., Rolfe, A., Workman, J.L., Gifford, D.K., i Young, R.A.** (2004). Global Position and Recruitment of HATs and HDACs in the Yeast Genome. *Mol. Cell* **16**: 199–209.
- Rosa, M., Von Harder, M., Aiese Cigliano, R., Schlogelhofer, P., i Mittelsten Scheid, O.** (2013). The Arabidopsis SWR1 Chromatin-Remodeling Complex Is Important for DNA Repair, Somatic Recombination, and Meiosis. *Plant Cell* **25**: 1990–2001.
- Rothbart, S.B. i Strahl, B.D.** (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**: 627–643.
- Roudier, F. i in.** (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J.* **30**: 1928–1938.
- Rudnizky, S., Bavly, A., Malik, O., Pnueli, L., Melamed, P., i Kaplan, A.** (2016). H2A.Z controls the stability and mobility of nucleosomes to regulate expression of the LH genes. *Nat. Commun.* **7**: 12958.
- Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., i Chrivia, J.C.** (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* **45**: 5671–5677.
- Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., i Hume, D.A.** (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 424–436.
- Sandman, K., Pereira, S.L., i Reeve, J.N.** (1998). Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *C. Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 1350–1364.
- Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., i Torres-Padilla, M.E.** (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol* **12**: 853–862.
- Santisteban, M.S., Hang, M., i Smith, M.M.** (2011). Histone variant H2A.Z and RNA polymerase II transcription elongation. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 1848–60.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., i Smith, M.M.** (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* **103**: 411–422.
- Sarcinella, E., Zuzarte, P.C., Lau, P.N.I., Draker, R., i Cheung, P.** (2007). Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 6457–68.
- Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., i Zhao,**

- K.** (2008). Dynamic Regulation of Nucleosome Positioning in the Human Genome. *Cell* **132**: 887–898.
- Schwabish, M.A. i Struhl, K.** (2004). Evidence for Eviction and Rapid Deposition of Histones upon Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II Evidence for Eviction and Rapid Deposition of Histones upon Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 10111–10117.
- Segal, E. i Widom, J.** (2009). Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**: 65–71.
- Semenza, G.L.** (1994). Transcriptional regulation of gene expression: mechanisms and pathophysiology. *Hum Mutat* **3**: 180–199.
- Sevilla, A. i Binda, O.** (2013). Post-translational modifications of the histone variant h2az. *Stem Cell Res.* **12**: 289–295.
- Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., i Wu, C.** (2003). Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol. Cell* **12**: 147–155.
- Shia, W., Li, B., i Workman, J.L.** (2006). SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **20**: 2507–2512.
- Shibata, Y. i Nishiwaki, K.** (2014). Maintenance of cell fates through acetylated histone and the histone variant H2A.z in *C. elegans*. *Worm* **3**: e29048.
- Shibata, Y., Sawa, H., i Nishiwaki, K.** (2014). HTZ-1/H2A.z and MYS-1/MYST HAT act redundantly to maintain cell fates in somatic gonadal cells through repression of *ceh-22* in *C. elegans*. *Development* **141**: 209–18.
- Sieber, O.M., Tomlinson, S.R., i Tomlinson, I.P.M.** (2005). Tissue, cell and stage specificity of (epi)mutations in cancers. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 649–655.
- Simpson, V.J., Johnson, T.E., i Hammen, R.F.** (1986). *Caenorhabditis elegans* DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Res.* **14**: 6711–6719.
- Skinner, M.E., Uzilov, A. V., Stein, L.D., Mungall, C.J., i Holmes, I.H.** (2009). JBrowse: A next-generation genome browser. *Genome Res.* **19**: 1630–1638.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V., i Boon, T.** (1999). DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7327–7335.
- Smith, A.P., Jain, A., Deal, R.B., Nagarajan, V.K., Poling, M.D., Ragothama, K.G., i Meagher, R.B.** (2010). Histone H2A.Z regulates the expression of several classes of phosphate starvation response genes but not as a transcriptional activator. *Plant Physiol.* **152**: 217–225.
- Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G.,**

- Lucchesi, J.C., i Allis, C.D.** (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 3561–3565.
- Soboleva, T. a, Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G. a, i Tremethick, D.J.** (2012). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 25–30.
- Straube, K., Blackwell, J.S., i Pemberton, L.F.** (2010). Nap1 and Chz1 have separate Htz1 nuclear import and assembly functions. *Traffic* **11**: 185–97.
- Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-parra, E., i Jacobsen, S.E.** (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 5370–5375.
- Struhl, K. i Segal, E.** (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**: 267–73.
- Subramanian, V., Fields, P.A., i Boyer, L.A.** (2015). H2A . Z : a molecular rheostat for transcriptional control. **10**.
- Sura, W., Kabza, M., Karlowski, W.M., Bieluszewski, T., Kuś-Slowinska, M., Paweloszek, Ł., Sadowski, J., i Ziolkowski, P.A.** (2017). Dual role of the histone variant H2A.Z in transcriptional regulation of stress-response genes. *Plant Cell*: tpc.00573.2016.
- Sura, W. i Ziolkowski, P.A.** (2018). Chromatin Affinity Purification (ChAP) from *Arabidopsis thaliana* Rosette Leaves Using in vivo Biotinylation System. *Bio-Protocol* **8**: e2677.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., i Luger, K.** (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1121–1125.
- Swaminathan, J., Baxter, E.M., i Corces, V.G.** (2005). The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev.* **19**: 65–76.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W. a, Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., David, R., Aravind, L., i Rao, A.** (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* (80-.). **324**: 930–935.
- Talbert, P.B. i Henikoff, S.** (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 264–75.
- Teves, S.S., Weber, C.M., i Henikoff, S.** (2014). Transcribing through the nucleosome. *Trends Biochem. Sci.* **39**: 577–586.
- Thatcher, T.H. i Gorovsky, M. a** (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res.* **22**: 174–9.

- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., i Nieto, M.A.** (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**: 871–890.
- Tirosh, I. i Barkai, N.** (2008). Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res.* **18**: 1084–1091.
- Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E., i Park, P.J.** (2012). Histone Variant H2A.Bbd Is Associated with Active Transcription and mRNA Processing in Human Cells. *Mol. Cell* **47**: 596–607.
- Torres, E.S. i Deal, R.B.** (2018). The histone variant H2A.Z and chromatin remodeler BRAHMA act coordinately and antagonistically to regulate transcription and nucleosome dynamics in Arabidopsis.: doi: <https://doi.org/10.1101/243790>.
- Tramantano, M., Sun, L., Au, C., Labuz, D., Liu, Z., Chou, M., Shen, C., i Luk, E.** (2016). Constitutive turnover of histone H2A.Z at yeast promoters requires the preinitiation complex. *Elife* **5**: 1–30.
- Trzyna, E., Duleba, M., Faryna, M., i Majka, M.** (2012). Regulation of transcription in cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **17**: 316–330.
- Turner, B.M.** (2014). Nucleosome signalling; An evolving concept. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**: 623–626.
- Udugama, M., Sabri, A., i Bartholomew, B.** (2011). The INO80 ATP-dependent chromatin remodeling complex is a nucleosome spacing factor. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 662–673.
- Updike, D.L. i Mango, S.E.** (2006). Temporal regulation of foregut development by HTZ-1/H2A.Z and PHA-4/FoxA. *PLoS Genet.* **2**: 1500–1510.
- Venkatesh, S. i Workman, J.L.** (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 178–189.
- Venters, B.J. i Pugh, B.F.** (2009). A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the *Saccharomyces* genome.: 360–371.
- Voigt, P. i in.** (2012). Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell* **151**: 181–93.
- Voigt, P., Tee, W.W., i Reinberg, D.** (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* **27**: 1318–1338.
- Wagner, E.J., Burch, B.D., Godfrey, A.C., Salzler, H.R., Duronio, R.J., i Marzluff, W.F.** (2007). A Genome-wide RNA Interference Screen Reveals that Variant Histones Are Necessary for Replication-Dependent Histone Pre-mRNA Processing. *Mol. Cell* **28**: 692–699.
- Wang, F., Ranjan, A., Wei, D., i Wu, C.** (2016). Comment on „A histone acetylation switch regulates H2A.Z deposition by the SWR-C remodeling enzyme”. *Science* (80-.). **353**: 358a.
- Watanabe, S., Radman-Livaja, M., Rando, O.J., i Peterson, C.L.** (2013). A Histone

- Acetylation Switch Regulates H2A.Z Deposition by the SWR-C Remodeling Enzyme. *Science* (80-.). **340**: 195–199.
- Watanabe, S., Tan, D., Lakshminarasimhan, M., Washburn, M.P., Erica Hong, E.-J., Walz, T., i Peterson, C.L.** (2015). Structural analyses of the chromatin remodelling enzymes INO80-C and SWR-C. *Nat. Commun.* **6**: 7108.
- Waterborg, J.H. i Robertson, A.J.** (1996). Common features of analogous replacement histone H3 genes in animals and plants. *J Mol Evol* **43**: 194–206.
- Watt, F. i Molloy, P.L.** (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* **2**: 1136–1143.
- Weake, V.M. i Workman, J.L.** (2010). Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 426–437.
- Weber, C.M., Henikoff, J.G., i Henikoff, S.** (2010). H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 1500–7.
- Weber, C.M. i Henikoff, S.** (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev* **28**: 672–682.
- Weber, C.M., Ramachandran, S., i Henikoff, S.** (2014). Nucleosomes Are Context-Specific, H2A.Z-Modulated Barriers to RNA Polymerase. *Mol. Cell* **53**: 819–30.
- West, M.H.P. i Bonner, W.M.** (1980). a Heteromorphous. *Biochemistry* **19**: 3238–3245.
- Whitehouse, I., Rando, O.J., Delrow, J., i Tsukiyama, T.** (2007). Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* **450**: 1031–1035.
- Whittle, C.M., McClinic, K.N., Ercan, S., Zhang, X., Green, R.D., Kelly, W.G., i Lieb, J.D.** (2008). The genomic distribution and function of histone variant HTZ-1 during *C. elegans* embryogenesis. *PLoS Genet.* **4**.
- Wong, L.H., Ren, H., Williams, E., McGhie, J., Ann, S., Sim, M., Tam, A., Earle, E., Anderson, M.A., Mann, J., i Choo, K.H.A.** (2009). Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. *Genome Res.* **19**: 404–414.
- Workman, J.L. i Kingston, R.E.** (1998). Alteration of Nucleosome Structure As a Mechanism of Transcriptional Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 545–579.
- Wu, T.P., Wang, T., Seetin, M.G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., i Liu, Y.** (2016). DNA methylation on N6 -adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* **532**: 329–333.
- Wu, W.-H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.-H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., i Wu, C.** (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 1064–71.

- Wu, W.-H., Wu, C.-H., Ladurner, A., Mizuguchi, G., Wei, D., Xiao, H., Luk, E., Ranjan, A., i Wu, C.** (2009). N terminus of Swr1 binds to histone H2AZ and provides a platform for subunit assembly in the chromatin remodeling complex. *J. Biol. Chem.* **284**: 6200–7.
- Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., i Price, B.D.** (2012). Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell* **48**: 723–33.
- Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M.K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D.M., i Price, B.D.** (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J. Cell Biol.* **191**: 31–43.
- Yamada, S., Kugou, K., Ding, D.-Q., Fujita, Y., Hiraoka, Y., Murakami, H., Ohta, K., i Yamada, T.** (2017). The histone variant H2A.Z promotes initiation of meiotic recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res.:* 1–12.
- Yelagandula, R. i in.** (2014). The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in arabidopsis. *Cell* **158**: 98–109.
- Yen, K., Vinayachandran, V., i Pugh, B.F.** (2013). SWR-C and INO80 Chromatin Remodelers Recognize Nucleosome-free Regions Near +1 Nucleosomes. *Cell* **154**: 1246–56.
- Yi, H., Sardesai, N., Fujinuma, T., Chan, C., i Gelvin, S.B.** (2006). Constitutive Expression Exposes Functional Redundancy between the Arabidopsis Histone H2A Gene HTA1 and Other H2A Gene Family Members. *Gene* **18**: 1575–1589.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., i Bestor, T.H.** (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**: 335–340.
- Yoshida, T., Shimada, K., Oma, Y., Kalck, V., Akimura, K., Taddel, A., Iwahashi, H., Kugou, K., Ohta, K., Gasser, S.M., i Harata, M.** (2010). Actin-Related Protein Arp6 Influences H2A . Z-Dependent and -Independent Gene Expression and Links Ribosomal Protein Genes to Nuclear Pores. *PLoS Genet.* **6**: e1000910.
- Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., i Zilberman, D.** (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* **328**: 916–9.
- Zhang, C., Cao, L., Rong, L., An, Z., Zhou, W., Ma, J., Shen, W.-H., Zhu, Y., i Dong, A.** (2015). The chromatin-remodeling factor AtINO80 plays crucial roles in genome stability maintenance and in plant development. *Plant J.* **80**: n/a-n/a.
- Zhang, H., Roberts, D.N., i Cairns, B.R.** (2005a). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**: 219–31.
- Zhang, R. i in.** (2005b). Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* **8**: 19–

- Zhou, J., Fan, J.Y., Rangasamy, D., i Tremethick, D.J.** (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 1070–1077.
- Zhou, V.W., Goren, A., i Bernstein, B.E.** (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**: 7–18.
- Zhou, W., Zhu, Y., Dong, A., i Shen, W.H.** (2015). Histone H2A/H2B chaperones: From molecules to chromatin-based functions in plant growth and development. *Plant J.* **83**: 78–95.
- Zilberman, D., Coleman-derr, D., Ballinger, T., i Henikoff, S.** (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**: 125–129.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., i Henikoff, S.** (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **39**: 61–69.
- Zink, L.M. i Hake, S.B.** (2016). Histone variants: Nuclear function and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **37**: 82–89.
- Zofall, M., Fischer, T., Zhang, K., Zhou, M., Cui, B., Veenstra, T.D., Grewal, S.I.S., i Zofall, M.** (2009). Histone H2A.Z cooperates with RNAi and heterochromatin factors to suppress antisense RNAs. *Nature* **461**: 419–22.