

Received: 2009.03.09
Accepted: 2009.04.15
Published: 2009.04.27

Drugi kod, czyli co determinuje regiony aktywności transkrypcyjnej oraz miejsca inicjacji replikacji

Second code, or what determines actively transcribed regions and replication origins

Konrad Winnicki

Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Komórki poszczególnych tkanek, chociaż zawierają identyczny materiał genetyczny, różnią się jednak kodami epigenetycznymi odpowiedzialnymi za odmienne wzorce ekspresji genów. Kody takie, poprzez wpływ na strukturę chromaty, wyznaczają regiony aktywne transkrypcyjnie oraz mają pośredni wpływ na czas replikacji poszczególnych sekwencji. Metylacja cytozyny oraz modyfikacje histonów, np. deacetylacja oraz metylacja Lys9 w histonie H3 odgrywają rolę podczas tworzenia i przekazywania kodów epigenetycznych komórkom potomnym. Poprawne dziedziczenie takich modyfikacji jest ważne dla rozwoju embrionalnego, histogenezy oraz funkcji całego organizmu, a każde zaburzenie tego dziedziczenia może prowadzić do niewłaściwego rozwoju oraz chorób, takich jak np. nowotwory.

Słowa kluczowe:

kod epigenetyczny • metylacja DNA • modyfikacje histonów H3 i H4

Summary

Although each cell of a complex organism is governed by the same genome, cells which form different tissues vary in epigenetic codes that are responsible for various gene expression. These codes, through their influence on chromatin structure, determine actively transcribed regions and have indirect impact on replication timing. Cytosine methylation and histone modifications, for example the deacetylation and methylation of Lys9 in histone H3, play important roles in forming and transferring epigenetic codes to the next cell generation. The correct copying of such modifications is important for embryonic development, histogenesis, and future functions of the whole organism, and any disturbance can cause abnormal development or disease, such as cancer.

Key words:

epigenetic code • DNA methylation • H3 and H4 histone modifications

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=883993>

Word count:

3073

Tables:

–

Figures:

2

References:

43

Adres autora:

mgr Konrad Winnicki, Katedra Cytofizjologii, Instytutu Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Piłarskiego 14, 90-231 Łódź; e-mail: winnicki@biol.uni.lodz.pl

WSTĘP

W procesie ewolucji życia istotne znaczenie miało początkowo szybkie tempo replikacji. Ze względu na ograniczone zasoby dostępnych substratów, dobór naturalny faworyzował te z samopowielających się kompleksów makrocząsteczek, które charakteryzowały się dużą dynamiką reprodukcji. Założenie to potwierdziły badania w warunkach *in vitro*, wskazujące na istnienie presji selekcyjnej prowadzącej do powstawania krótszych, a co za tym idzie szybciej replikujących cząsteczek kwasów nukleinowych [30,32]. Nieustannie postępujące zmiany środowiska oraz konieczność zasiedlenia nowych nisz ekologicznych prowadziły jednocześnie do tworzenia bardziej zorganizowanych struktur, lepiej przystosowanych do niekorzystnych warunków. Kamieniem milowym na szlaku ewolucji coraz bardziej złożonych form materii ożywionej było pojawienie się komórek pro- i eukariotycznych, umożliwiających kolonizację nowych środowisk [6,26]. Jeszcze bardziej efektywną ekspansję umożliwiło powstanie organizmów wielokomórkowych. Dzięki temu wykształciły się różnorodne formy, odznaczające się odmiennymi strategiami przetrwania – szybkim bądź wolnym tempem namnażania, w zależności od stopnia złożoności struktury oraz działającej presji środowiska.

Organizmy wielokomórkowe charakteryzują się zróżnicowanymi fenotypowo komórkami, mimo obecności tego samego genotypu. Wydaje się jednak, że już we wczesnych etapach ewolucji informacja zapisana w sekwencji nukleotydów okazała się niewystarczająca do realizacji skomplikowanych procesów morfogenetycznych. W wytworzeniu grup komórek, wykazujących wspólne pochodzenie, lecz różniących się budową oraz funkcją, uczestniczyć musiały zatem dodatkowe mechanizmy, różnicujące możliwości wykorzystania informacji zapisanej w identycznych sekwencjach nukleotydów.

Za powstanie morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania komórek w obrębie organizmu odpowiadają różne wzorce ekspresji genów, które leżą u podstaw morfogenezy. Zróżnicowana ekspresja informacji genetycznej jest wynikiem funkcjonowania różnych kodów epigenetycznych pojawiających się w trakcie rozwoju [18].

DEFINICJA KODU EPIGENETYCZNEGO

Jenuwein i Allis [19] źródeł różnych stanów epigenetycznych dopatrują się w informacji zapisanej w postaci kodu histonowego. Sugerują oni, że kod taki tworzą modyfikacje aminokwasów w N-terminalnych końcach histonów H3 i H4, do których zalicza się m.in. acetylację, metylację oraz fosforylację. Odczyt kodu histonowego w tym przypadku możliwy jest dzięki obecności białek, które zawierają bromodomeny (sekwencje rozpoznające acetylowane lizyny) oraz chromodomeny (chromodomain – CD; sekwencje rozpoznające metylowane lizyny). Tworzenie miejsc aktywnych transkrypcyjnie oraz nieaktywnych regionów heterochromatynowych determinowane jest zatem przez przyłączanie określonych grup chemicznych do aminokwasów histonowych.

Turner [38] uważa jednak, że modyfikacje histonów, mimo wpływu na strukturę chromatyny, a przez to na aktywność transkrypcyjną, nie powinny być określane mianem „kodu epigenetycznego”. Sugeruje on, że termin ten definiuje po-

tencjał przyszłej ekspresji genów, zapewniony przez modyfikacje w obrębie chromatyny, który pozwala na włączanie lub wyłączanie aktywności transkrypcyjnej w poszczególnych fazach morfogenezy. W określonym typie komórek modyfikacje takie ustanawiane są podczas wcześniejszego etapu różnicowania i prowadzą w efekcie do zmiany stopnia upakowania chromatyny. Modyfikacje histonów same w sobie nie tworzą jednak kodu epigenetycznego, a są jedynie częścią złożonego aparatu biochemicznego, który razem z metylacją DNA oraz innymi mechanizmami wpływającymi na strukturę chromatyny uczestniczą w tworzeniu kodu charakterystycznego dla danego typu komórek [38]. Kody epigenetyczne reprezentują więc różne epigenotypy, które nie tylko charakteryzują się odmienną ekspresją genów, ale co najważniejsze, dziedziczone są podczas mitozy i mejozy [18].

Niezależnie od dywagacji Turnera [38] dotyczących znaczenia słowa „kod”, w niniejszej pracy pojęcie zmian epigenetycznych równoznaczne jest z terminem „kodu epigenetycznego”, rozumianego jako źródło zróżnicowanej ekspresji genów oraz zmian w organizacji struktury chromatyny interfazowej.

Chromatynę dzielimy na heterochromatynę (określaną niekiedy mianem heterochromatyny konstytutywnej) oraz euchromatynę. Heterochromatyna, która wykazuje znaczny stopień kondensacji, występuje głównie w centromerowych oraz telomerowych obszarach chromosomów i przeważnie charakteryzuje się niemal całkowitym brakiem sekwencji genowych. Większość genów znajduje się w regionach euchromatynowych, odznaczających się zdolnością do przyjmowania luźnej struktury. W euchromatynie, ze względu na występowanie regionów wyciszonych genetycznie, obecne są także obszary o znacznym stopniu kondensacji [31]. Zmiana struktury chromatyny interfazowej pociąga za sobą określoną sekwencję zdarzeń w przebiegu replikacji DNA podczas fazy S. Regiony aktywne transkrypcyjnie (euchromatyna) replikują bowiem wcześniej w porównaniu z regionami nieaktywnymi – heterochromatyną konstytutywną i fakultatywną [por. 4,31].

Skoro niski stopień upakowania DNA jest strukturalnym czynnikiem warunkującym aktywność transkrypcyjną, nasuwa się pytanie: w jaki sposób determinowane są zmiany w stopniu kondensacji chromatyny interfazowej oraz jaki jest mechanizm ich przekazywania z pokolenia na pokolenie. Wydaje się, że niektóre z nich mogą być dziedziczone m.in. dzięki metylacji cytozyny. Taka modyfikacja w obrębie nukleotydów DNA pozwala nie tylko na zróżnicowanie stopnia upakowania nici polinukleotydowych w określonych obszarach, ale także na przekazywanie powstałego wzorca komórkom potomnym [18]. Jednak sama metylacja, mimo że u pewnych organizmów może uczestniczyć w dziedziczeniu powstałych kodów epigenetycznych, nie jest wystarczająca do tworzenia regionów heterochromatynowych oraz wyciszania genów. Zmiany o charakterze strukturalnym wymagają zaangażowania zarówno białek histonowych jak i niehistonowych, wiążących się z helisą DNA [28].

METYLACJA CYTOZYN JAKO JEDEN Z MECHANIZMÓW TWORZENIA KODÓW EPIGENETYCZNYCH

Wydaje się, że podczas replikacji DNA dochodzi nie tylko do wiernego powielenia sekwencji nukleotydów,



ale także do przekazania kolejnym pokoleniom zmian epigenetycznych, związanych z metylacją cytozyny. Modyfikacji takiej podlegają najczęściej dinukleotydy CpG, a jej dziedziczenie zapewnia obecność metylotransferaz wykazujących duże powinowactwo do hemimetylowanego DNA, kumulujących się w pobliżu widełek replikacyjnych dzięki interakcji z PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – białkiem wspomagającym funkcję polimeraz DNA δ oraz ϵ [35,36]. Właściwości takie u ssaków wykazuje metylotransferaza DNMT1 (DNA methyltransferase 1), która ma także zdolność metylacji *de novo*. U ssaków zidentyfikowano jak dotąd jeszcze 3 inne metylotransferazy: DNMT2 – kontrolującą regiony centromerowe oraz DNMT3A i DNMT3B metylujące cytozyny, które nie podlegały wcześniej takiej modyfikacji [29]. Metylacja cytozyny następuje nie tylko w krótkich symetrycznych sekwencjach (CpG: GpC). U myszy DNMT3A zaangażowana jest np. w przyłączenie grup metylowych do asymetrycznych miejsc podatnych na metylację [35].

Okazuje się, że metylacja DNA ma istotne znaczenie dla wszelkich przemian zachodzących w organizmach wielokomórkowych. Prawidłowe dziedziczenie wzoru kodów epigenetycznych jest niezbędne do właściwego przebiegu embriogenezy oraz późniejszego funkcjonowania organizmów. Zmniejszenie poziomu ekspresji metylotransferazy DNMT1 u myszy, *Xenopus* oraz *Danio rerio* (danio pręgowany) prowadzi do śmierci już we wczesnym stadium rozwoju embrionalnego [5,10]. Dowodem świadczącym o korelacji między metylacją DNA i aktywnością transkrypcyjną mogą być doświadczenia polegające na zastępowaniu cytozyny jej analogiem – 5-azacytydyną. Takie podstawienie uniemożliwia przyłączenie grupy metylowej i prowadzi do aktywacji wyciszonych genów, nawet w nieaktywnym chromosomie X [17].

U *Drosophila melanogaster* metylacja cytozyny prawdopodobnie nie odgrywa istotnej roli podczas rozwoju embrionalnego [25]. Weissmann i wsp. [40] wskazują jednak na obecność u *Drosophila* potencjalnej zależności metylacji Lys9 w histonie H3 od metylacji DNA. Nadekspresja metylotransferazy DNMT3A (pochodzącej od myszy) prowadzi bowiem do hipermetylacji DNA, zwiększając w konsekwencji poziom metylacji Lys9. Wpływ metylacji cytozyny na strukturę chromatyny pozostaje jednak do wyjaśnienia. Gilbert i wsp. [14] dowodzą, że utrata metylacji DNA w pierwotnych komórkach zarodkowych u myszy, prowadząca do redukcji metylacji oraz wzrostu acetylacji Lys9 w histonie H3, nie powoduje zmian stopnia upakowania chromatyny, a zwłaszcza obszarów heterochromatyny. Do wyjaśnienia pozostaje również mechanizm działania samych metylotransferaz. Chociaż u myszy biologiczna funkcja metylotransferazy DNMT1 (pośrednio związana z regulacją ekspresji genów) wymaga jej aktywności katalitycznej [5], to wyciszenie transkrypcji u *Xenopus*, przed stadium środkowej blastuli (midblastula transition – MBT), wydaje się niezależne od enzymatycznej aktywności, natomiast warunkowane samą obecnością DNMT1. W tym przypadku metylotransferaza lokalizuje się w regionach promotorowych, funkcjonując jako bezpośredni represor aktywności transkrypcyjnej [10].

ROLA MODYFIKACJI AMINOKWASÓW HISTONOWYCH W REGULACJI EKSPRESJI GENETYCZNEJ I W TWORZENIU DOMEN HETEROCHROMATYNY KONSTYTUTYWNEJ

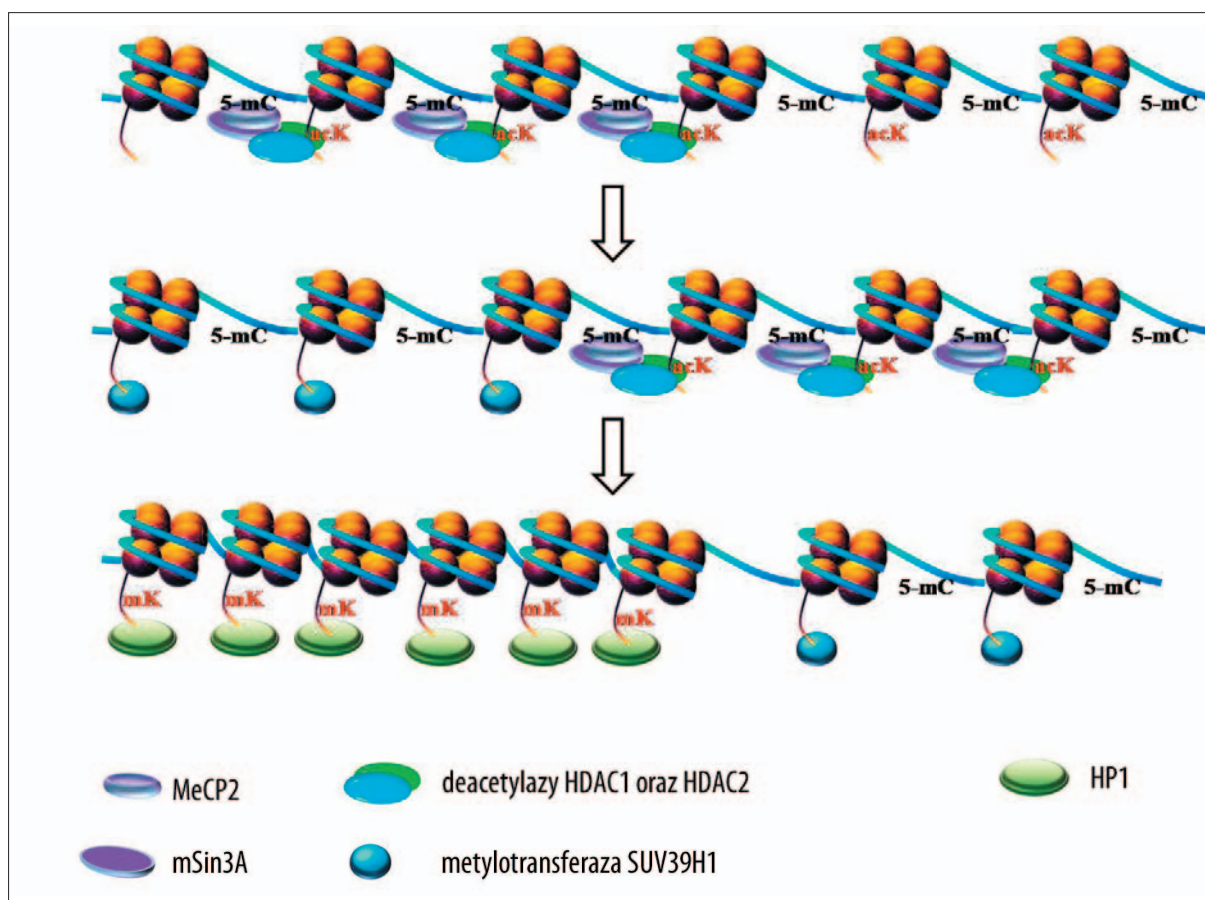
Sama modyfikacja cytozyny prawdopodobnie nie jest czynnikiem bezpośrednio wpływającym na strukturę chromatyny i funkcjonuje raczej jako znacznik miejsc jej przyszłej rearanżacji. Mechanizmy odgrywające istotną rolę w tworzeniu domen heterochromatyny konstytutywnej zaangażowane są także w proces wyciszania genów w eukromatynie. Obejmują one przyłączenie do DNA różnych białek uczestniczących w późniejszej modyfikacji określonych aminokwasów histonowych. U kręgowców odkryto dwa niezależne mechanizmy łączące metylację cytozyny z modyfikacjami histonów [35]. Pierwszy z nich zakłada rekrutację do miejsc metylacji DNA białka MeCP2 (methylcytosine-binding protein), które zawiera domenę TRD (transcriptional repressor domain). Oddziałuje ona bezpośrednio z korepresorem mSin3A, do którego przyłączone są dwie deacetylazy histonowe: HDAC1 oraz HDAC2 (histone deacetylase 1,2), biorące udział w procesie rearanżacji chromatyny (ryc. 1) [34,42]. Drugi mechanizm, odkryty u ssaków, wiąże się z bezpośrednim oddziaływaniem między metylotransferazą DNMT1 oraz histonowymi deacetylazami [35].

Podczas tworzenia struktur heterochromatynowych oraz w procesie wyciszania genów istotną rolę pełni metylacja Lys9 w N-terminalnym ogonie histonu H3, możliwa jedynie po wcześniejszej deacetylacji Lys9 oraz Lys14. U ssaków metylację histonu H3 w pozycji Lys9 prowadzi swoista metylotransferaza SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homolog 1) (ryc. 1). Dowodem ogromnego znaczenia metylacji w tej pozycji mogą być mutanty *Sacharomyces pombe* pozbawione aktywności genu *clr4* (homolog SUV39H1 u *S. pombe*), które wykazują:

- (i) nieprawidłowości podczas tworzenia heterochromatyny w rejonach okołocentromerowych,
- (ii) wzrost liczby pogubionych chromosomów,
- (iii) ograniczenie wyciszenia pewnych genów [35].

Ponadto, geny reporterowe wstawiane w rejony telomero- we u drożdży ulegają wyciszeniu, a stan taki utrzymuje się przez wiele pokoleń komórek [27]. Dla domen heterochromatynowych oraz regionów nieaktywnych transkrypcyjnie charakterystyczna jest także deacetylacja Lys16 i metylacja Lys20 w histonie H4. Przyłączenie grupy metylowej do aminokwasów histonowych może wyznaczać również miejsca aktywne transkrypcyjnie, czego przykładem jest metylacja Lys4 w histonie H3. Innym rodzajem potranslacyjnej modyfikacji decydującej o aktywności transkrypcyjnej jest fosforylacja Ser10 w histonie H3, która uniemożliwia metylację Lys9 [35,31].

Podczas formowania heterochromatyny u *Metazoa* istotną rolę odgrywa białko HP1 (heterochromatin protein 1). Zawiera ono w aminoterminalnym końcu motyw CD, wiążący się swoiście z metylowaną Lys9 w histonie H3. Z kolei w karboksyloterminalnym końcu znajduje się motyw CSD (chromo shadow domain), który może oddziaływać z różnymi białkami, np. metylotransferazą SUV39H1. Białko HP1 skoncentrowane jest w heterochromatynie okołocentromerowej i telomerach, a także uczestniczy w wycisz-



Ryc. 1. Etapy jednego z potencjalnych mechanizmów tworzenia skondensowanych regionów heterochromatynowych, bogatych w sekwencje zmetylowanego DNA; metylacja Lys9 w histonie H3 jest efektem działania metylotransferazy SUV39H1, po wcześniejszym usunięciu reszt acetylowych przez deacetylazy histonowe HDAC1/HDAC2. Obecność zmetylowanej Lys9 umożliwia przyłączenie białka HP1 [na podstawie: 34,35,42 – zmodyfikowano]; acK – acetylacja Lys9, mK – metylacja Lys9

niu pewnych genów umiejscowionych w euchromatynie. Dzięki HP1 deacetylacja i metylacja rozprzestrzenia się na kolejne nukleosomy [35].

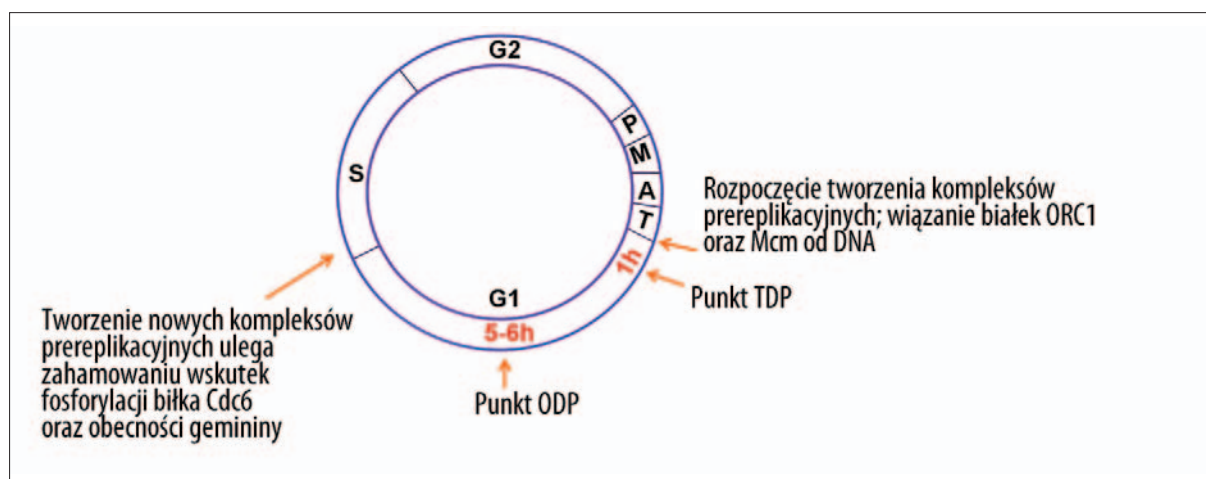
W tworzeniu heterochromatyny oraz wyciszaniu genów u drożdży pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*) uczestniczy kompleks SIR zawierający białka: Sir2, Sir3 i Sir4. Do telomerów kompleks Sir2/Sir4 rekrutowany jest przez białko Rap1 oraz białka Ku70 i Ku80. Dochodzi wówczas do lokalnej deacetylacji histonu H3 prowadzonej przez Sir2, która w konsekwencji umożliwia przyłączenie do nukleosomów białka Sir3. Multimeryzacja białek Sir3 i Sir4 oraz enzymatyczna aktywność Sir2 pozwala na rozprzestrzenienie się fali modyfikacji wzdłuż nukleosomów [27]. Mimo że u poszczególnych grup organizmów w rearanżacji chromatyny mogą uczestniczyć odmienne białka, to ogólny mechanizm wydaje się konserwatywny.

Nadal do wyjaśnienia pozostaje jednak kwestia, czy podczas tworzenia kodów epigenetycznych informacja przepływa z 5mC na histony, czy odwrotnie. „Przepisywanie” informacji zapisanych w modyfikacjach histonów na metylację cytozyny możliwe jest u roślin kwiatowych dzięki obecności metylotransferaz DNA, które zawierają chromodomeny mogące łączyć się z metylowaną Lys9 w histonie H3, tzw. CMTs („chromo methyltransferases”). Dowodem

na taki kierunek transferu informacji może być mutacja w genie *dim-5* u *Nerospora crassa* (odpowiadającym za syntezę metylotransferazy histonu H3), która prowadzi do zablokowania metylacji wszystkich cytozyn. Mało prawdopodobne wydaje się jednak, aby same CMTs uczestniczyły w tłumaczeniu kodów histonowych na kod reprezentowany przez modyfikacje w obrębie cytozyny. [35]. Z kolei przepływ informacji w drugą stronę mógłby być zapewniony np. przez oddziaływanie kompleksu białek HP1 oraz SUV39H1 z białkiem MBD1. Podobnie jak MeCP2 należy ono do białek, które zawierają domeny wiążące metylowane regiony CpG (MBD proteins; methyl-CpG binding domain proteins) [13]. Mechanizm tworzenia regionów heterochromatynowych z udziałem białek zawierających domeny MBD nadal nie jest wyjaśniony. Chociaż pewne badania wskazują, że heterochromatynowa lokalizacja białka MBD1 jest zaburzona w komórkach wykazujących brak metylotransferazy DNMT1 [20], to inne sugerują, że białka MeCP2 oraz MBD1 mogą wiązać się zarówno z metylowanymi jak i niemetylowanymi wyspami CpG [21,42].

Ze względu na losową dystrybucję starych histonów do powstałych w czasie replikacji cząstek DNA [35] oraz acetylację nowo syntetyzowanych histonów [11], konieczne wydaje się rozważenie dwustronnego przepływu informacji oraz zaangażowania innych mechanizmów w tworzenie





Ryc. 2. Umiejscowienie punktów TDP i ODP w cyklu komórkowym u ssaków [na podstawie: 7,9 – zmodyfikowano]

różnych stanów epigenetycznych. Wydaje się mało prawdopodobne, aby kody epigenetyczne dziedziczone były jedynie na podstawie modyfikacji aminokwasów histonowych. Innym mechanizmem uczestniczącym w ich powstawaniu oraz dziedziczeniu wydaje się szlak zaangażowany w tworzenie małego interferującego RNA (siRNA). Hipotezę taką potwierdzają badania dotyczące mutacji genu *dicer-2* (kodującego endonukleazę odpowiedzialną za tworzenie siRNA u *D. melanogaster*), która prowadzi do utraty metylacji Lys9 histonu H3 w rDNA [33]. Okazuje się, że siRNA może powodować wyciszenie genów na poziomie transkrypcji przez regulację modyfikacji w obrębie DNA oraz histonów, powodując w konsekwencji wzrost poziomu upakowania chromatyny [39]. Badania na modelu *C. elegans* dowodzą z kolei, że zmiany ekspresji genów, w których uczestniczy szlak RNAi podlegają procesowi dziedziczenia [15]. Wpływ interferującego RNA na tworzenie heterochromatyny oraz przekazywanie zmian epigenetycznych opisano w wielu publikacjach [16,39,22].

W ustanawianiu oraz dziedziczeniu kodów epigenetycznych uczestniczy zatem wiele mechanizmów decydujących o strukturze chromatyny, które nie ograniczają się jedynie do modyfikacji w obrębie histonów oraz metylacji DNA (u organizmów, u których ona występuje), ale także angażują inne szlaki, których udział nadal pozostaje do wyjaśnienia.

KODY EPIGENETYCZNE JAKO DETERMINANTY MIEJSC INICJACJI ORAZ CZASU REPLIKACJI DNA

Czas replikacji poszczególnych sekwencji genomowego DNA zależy od lokalizacji wewnątrzjądrowej oraz struktury i aktywności chromatyny. Od dawna wiadomo, że miejsca aktywne transkrypcyjnie, o mniejszym stopniu kondensacji, replikują wcześniej, natomiast zwarte regiony heterochromatynowe – później. Ponieważ o strukturze chromatyny decydują określone kody epigenetyczne, wydaje się, że mogą one mieć pośredni wpływ na czas oraz miejsca inicjacji replikacji (OR lub ori; origins of replication). Zależność między stopniem kondensacji chromatyny a czasem replikacji pewnych obszarów potwierdzają badania dotyczące efektu mutacji w genie *Str3*. Prowadzi ona do wcześniejszej replikacji regionów telomerowych,

co zapewne jest związane z aktywnością niewykorzystywanych wcześniej miejsc inicjacji replikacji. Z kolei wstawienie sekwencji odpowiedzialnych za wyciszenie genów w miejsca wcześniej replikujące prowadzi do opóźnienia syntezy DNA [43].

Replikacja inicjowana jest w miejscu przyłączenia kompleksów prereplikacyjnych, tworzonych przez białka ORC, Cdc6, Cdt1 oraz Mcm (2-7), montowanych już podczas poprzedniego cyklu komórkowego. U ssaków ORC (origin recognition complex) składa się z 6 podjednostek, spośród których 5 – ORC (2-6) – pozostaje trwale związanych z chromatyną. Pod koniec mitozy do DNA wiąże się kompleks Orc1/Cdc6, co w konsekwencji pozwala na przyłączenie się białka Cdt1. Jego związanie z chromatyną umożliwia rekrutację kompleksu Mcm (2-7), funkcjonującego jako helikaza DNA. Po rozpoczęciu replikacji białko Cdc6 oddysocjuje w wyniku fosforylacji prowadzonej przez kompleksy Cdk2-cykлина A. Aktywność Cdt1 hamowana jest z kolei przez gemininę, pojawiającą się podczas fazy S. Zapobiega to stabilnemu wiązaniu się kompleksu Mcm (2-7) do chromatyny oraz uniemożliwia tworzenie nowych kompleksów prereplikacyjnych przed ukończeniem mitozy, gwarantując tylko jedną rundę replikacji na każdy cykl komórkowy [7].

Dimitrova i Gilbert [9] wyznaczają w fazie G1 dwa punkty determinujące przyszłą lokalizację miejsc inicjacji replikacji (ryc. 2). Pierwszym z nich jest punkt TDP (timing decision point), zlokalizowany we wczesnej fazie G1, decydujący o czasie w jakim będą replikowane określone sekwencje w nadchodzącej fazie S. Z kolei drugi punkt – ODP (origin decision point) – zlokalizowany w późnej fazie G1, wyznacza swoiste miejsca inicjacji replikacji. Wydaje się, że struktura chromatyny jest czynnikiem, który decyduje o czasie replikacji poszczególnych jej obszarów. Możliwe, że kompleksy prereplikacyjne w regionach heterochromatynowych są tylko częściowo zamontowane, ze względu na utrudniony dostęp białek do chromatyny, w przeciwnym razie do miejsc aktywnych transkrypcyjnie, gdzie kompleksy prereplikacyjne mogą być kompletnie zmontowane. Ponieważ białka kompleksów, w których nastąpi inicjacja replikacji wiążą się z chromatyną już na przełomie fazy M i G1 (ryc. 2) [7], bardziej prawdopodobne wydaje się

jednak, że struktura chromatyny utrudnia dostęp białkom bezpośrednio inicjującym replikację, np. dla kompleksów cykliny A oraz kinazy Cdk2. Też o roli struktury chromatyny wydają się potwierdzać badania, w których komórki drożdży pozbawione aktywności deacetylazy histonowej wykazują wczesną aktywację późno replikujących sekwencji *ori* znajdujących się w wewnętrznych *loci* chromosomowych. Z kolei ektopowa lokalizacja sekwencji HMR-E (pochodzącej z wyciszonego *locus* MAT) prowadzi do opóźnienia syntezy DNA w miejscach wczesnie replikujących, przy czym opóźnienie to wymaga obecności kompleksu białek SIR [2,37,43]. Pewne badania wskazują, że struktura chromatyny bezpośrednio determinuje jedynie czas replikacji poszczególnych jej domen, decydując tym samym w jakiej kolejności będą powielane poszczególne regiony genomu (punkt TDP) [23]. Jednym z możliwych mechanizmów łączących aktywność transkrypcyjną oraz replikację może być – wspomniany już – szlak związany z postaciami interferującego RNA [8,22].

Wyjaśnienia wymaga jednak sposób w jaki wyznaczone są swoiste miejsca inicjacji replikacji w punkcie ODP. Sugeruje się, że aktywność transkrypcyjna może być jednym z czynników decydującym o miejscu zapoczątkowania syntezy DNA [1,8]. Blokowanie transkrypcji uniemożliwia bowiem wyznaczenie tych miejsc w jądrach pre-ODP (replikacja inicjuje w miejscach przypadkowych), natomiast tylko nieznacznie zmienia ich lokalizację w jądrach post-ODP. Wskazuje to, że utrzymanie właściwych miejsc inicjacji replikacji podczas późnej fazy G1 jest w mniejszym stopniu uzależnione od przebiegu procesów transkrypcyjnych, niż proces ich wyznaczenia we wczesnej fazie G1 [8]. Okazuje się, że problem wyznaczenia swoistych miejsc startu replikacji jest bardziej złożony. U ssaków ustalony w określonym typie komórek miejsca inicjacji syntezy DNA nie ulegają zmianie w kolejnych rundach replikacji [24]. Z kolei najnowsze badania na modelu *Xenopus* sugerują, że swoiste miejsca inicjacji replikacji na poziomie replikonów wyznaczone są u tego gatunku w sposób przypadkowy [23]. Ponadto, nie do końca jest pewny wpływ samej transkrypcji na wyznaczenie miejsc inicjacji replikacji. Pewne obserwacje wskazują jednak, że wzorzec, według którego przebiega replikacja zależy raczej od sekwencji DNA i struktury chromatyny, a więc czynników wpływających także na transkrypcję, niż od transkrypcji jako takiej. Dowiedziono również, że na wyznaczenie swoistych miejsc inicjacji replikacji mogą mieć wpływ sekwencje, które są odpowiedzialne za regulację transkrypcji. Na przykład utrata promotora w genie DHFR u chomika chińskiego prowadzi do rozpoczęcia replikacji DNA w miejscach wewnątrzgenowych, w których ona nie zachodzi, gdy struktura genu jest prawidłowa. Zmiany miejsc inicjacji replikacji pojawiają się również w *locus* ludzkiej β -globiny w wyniku utraty regionu LCR (*locus control region*) [1].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aladjem M.I.: Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat. Rev. Genet.*, 2007; 8: 588–600
- [2] Aparicio J.G., Viggiani C.J., Gibson D.G., Aparicio O.M.: The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 4769–4780

Wydaje się, że transkrypcja może odgrywać rolę w wyznaczeniu wczesnie oraz późno replikujących regionów w punkcie TDP. Badania dotyczące czasu replikacji poszczególnych sekwencji ludzkiego genomu wykonane techniką mikromacierzy wskazują, że transkrypcja może wpływać na sekwencję zdarzeń podczas replikacji [41]. Z kolei rola transkrypcji w wyznaczeniu swoistych miejsc inicjacji replikacji w punkcie ODP nadal pozostaje do wyjaśnienia.

Możliwe, że zmiany epigenetyczne wpływają nie tylko na aktywność transkrypcyjną komórek, ale uczestniczą także w wyznaczeniu wczesnych i późnych miejsc inicjacji replikacji. Jednym z dowodów na taki związek może być wiązanie przez Orc1 białka Sir1 [3] lub białka HP1 [12], zaangażowanych w proces wyciszenia genów. Udokumentowano także bezpośrednie interakcje między białkiem Orc2 oraz białkami regulującymi transkrypcję [37]. Dokładny mechanizm składania kompleksów prereplikacyjnych oraz wybór swoistych miejsc inicjacji replikacji w zależności od stopnia kondensacji chromatyny i aktywności transkrypcyjnej nadal pozostają do wyjaśnienia.

WNIOSKI

W strukturze DNA zapisana jest nie tylko informacja o sekwencji aminokwasów w białkach, ale także informacja o ekspresji genów, co ma szczególne znaczenie dla procesów morfogenezy. Swoiste kody epigenetyczne prawdopodobnie nie tylko wyznaczają aktywne transkrypcyjnie regiony, ale także determinują czas replikacji określonych obszarów chromatyny. Dlatego informacja zapisana we wzorcu metylacji cytozyny, modyfikacje aminokwasów histonowych oraz inne mechanizmy uczestniczące w rearanżacji chromatyny, np. RNAi, mają istotne znaczenie dla funkcjonowania komórek. Wierne odtwarzanie określonych kodów epigenetycznych wydaje się podstawowe dla rozwoju całego organizmu. Zaburzenie dziedziczenia kodu epigenetycznego we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego może prowadzić do śmierci [5,10], natomiast w dalszych etapach ontogenezy może powodować wystąpienie chorób nowotworowych [29]. Dlatego istotne jest podejmowanie działań zmierzających do ustalenia wzorca metylacji w poszczególnych komórkach organizmu. W tym celu wprowadzony został projekt mający za zadanie rozszyfrowanie „kodu” zapisanego w metylacji cytozyny, który określono mianem HEP (*human epigenome project*) [29].

PODZIĘKOWANIA

Wyrazy podziękowania składam prof. dr hab. Januszowi Maszewskiemu za opiekę naukową, krytyczne uwagi oraz pomoc w nadaniu pracy ostatecznego kształtu.

- [3] Bose M.E., McConnell K.H., Gardner-Aukema K.A., Müller U., Weinreich M., Keck J.L., Fox C.A.: The origin recognition complex and Sir4 protein recruit Sir1p to yeast silent chromatin through independent interactions requiring a common Sir1p domain. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 774–786
- [4] Cimbora D.M., Groudine M.: The control of mammalian DNA replication: A brief history of space and timing. *Cell*, 2001; 104: 643–646



- [5] Damelin M., Bestor T.H.: Biological functions of DNA methyltransferase 1 require its methyltransferase activity. *Mol. Cell Biol.*, 2007; 27: 3891–3899
- [6] Dawkins R.: Samolubny gen. *Prószyński i S-ka*, 2007; 39–46
- [7] DePamphilis M.L.: The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene*, 2003; 310: 1–15
- [8] Dimitrova D.S.: Nuclear transcription is essential for specification of mammalian replication origins. *Genes Cells*, 2006; 11: 829–844
- [9] Dimitrova D.S., Gilbert D.M.: The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol. Cell*, 1999; 4: 983–993
- [10] Dunican D.S., Ruzov A., Hackett J.A., Meehan R.R.: xDnmt1 regulates transcriptional silencing in pre-MBT *Xenopus embryos* independently of its catalytic function. *Development*, 2008; 135: 1295–1302
- [11] Ehrenhofer-Murray A.E.: Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.*, 2004; 271: 2335–2349
- [12] Eissenberg J.C., Elgin S.C.: The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000; 10: 204–210
- [13] Fujita N., Watanabe S., Ichimura T., Tsuruzoe S., Shinkai Y., Tachibana M., Chiba T., Nakao M.: Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 24132–24138
- [14] Gilbert N., Thomson I., Boyle S., Allan J., Ramsahoye B., Bickmore W.A.: DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. *J. Cell Biol.*, 2007; 177: 401–411
- [15] Grishok A.: RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 5932–5939
- [16] Guil S., Esteller M.: DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 87–95
- [17] Holliday R.: Epigenetics. A historical overview. *Epigenetics*, 2006; 1: 76–80
- [18] Holliday R.: DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mosc.)*, 2005; 70: 500–504
- [19] Jenuwein T., Allis D.C.: Translating histone code. *Science*, 2001; 293: 1074–1080
- [20] Jørgensen H.F., Adie K., Chaubert P., Bird A.P.: Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: e96
- [21] Jørgensen H.F., Ben-Porath I., Bird A.P.: Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol. Cell Biol.*, 2004; 24: 3387–3395
- [22] Kloc A., Martienssen R.: RNAi, heterochromatin and the cell cycle. *Trends Genet.*, 2008; 24: 511–517
- [23] Labit H., Perewoska I., Germe T., Hyrien O., Marheineke K.: DNA replication timing is deterministic at the level of chromosomal domains but stochastic at the level of replicons in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res.*, 2008; 36: 5623–5634
- [24] Li F., Chen J., Solessio E., Gilbert D.M.: Spatial distribution and specification of mammalian replication origins during G1 phase. *J. Cell Biol.*, 2003; 161: 257–266
- [25] Mandrioli M.: A new synthesis in epigenetics: towards a unified function of DNA methylation from invertebrates to vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 2522–2524
- [26] Martin W., Russell M.J.: On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2003; 358: 59–83
- [27] Moazed D.: Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell*, 2001; 8: 489–498
- [28] Morales V., Giamarchi C., Chaillex C., Moro F., Marsaud V., Le Ricousse S., Richard-Foy H.: Chromatin structure and dynamics: Functional implications. *Biochimie*, 2001; 83: 1029–1039
- [29] Novik K.L., Nimmrich I., Genc B., Maier S., Piepenbrock C., Olek A., Beck S.: Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2002; 4: 111–128
- [30] Oehlschläger F., Eigen M.: 30 years later – A new approach to Sol Spiegelman's and Leslie Orgel's *in vitro* evolutionary studies. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 1997; 27: 437–457
- [31] Olszewska M.J.: Heterochromatyna i „heterochromatynizacja”. *Post. Biol. Kom.*, 2007; 34: 391–407
- [32] Orgel L.E.: Selection *in vitro*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1979; 205: 435–442
- [33] Peng J.C., Karpen G.H.: H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 25–35
- [34] Razin A.: CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three-way connection. *EMBO J.*, 1998; 17: 4905–4908
- [35] Richards E.J., Elgin S.C.: Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell*, 2002; 108: 489–500
- [36] Schermelleh L., Haemmer A., Spada F., Rösing N., Meilinger D., Rothbauer U., Cardoso M.C., Leonhardt H.: Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res.*, 2007; 35: 4301–4312
- [37] Schwaiger M., Schübeler D.: A question of timing: emerging links between transcription and replication. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2006; 16: 177–183
- [38] Turner B.M.: Defining an epigenetic code. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 2–6
- [39] Verdel A., Moazed D.: RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 5872–5878
- [40] Weissmann F., Muyrers-Chen I., Musch T., Stach D., Wiessler M., Paro R., Lyko F.: DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23: 2577–2586
- [41] Woodfine K., Fiegler H., Beare D.M., Collins J.E., McCann O.T., Young B.D., Debernardi S., Mott R., Dunham I., Carter N.P.: Replication timing of the human genome. *Hum. Mol. Genet.*, 2004; 13: 191–202
- [42] Yakabe S., Soejima H., Yatsuki H., Tominaga H., Zhao W., Higashimoto K., Joh K., Kudo S., Miyazaki K., Mukai T.: MeCP2 knockdown reveals DNA methylation-independent gene repression of target genes in living cells and a bias in the cellular location of target gene products. *Genes Genet. Syst.*, 2008; 83: 199–208
- [43] Zappulla D.C., Sternglanz R., Leatherwood J.: Control of replication timing by a transcriptional silencer. *Curr. Biol.*, 2002; 12: 869–875

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.