

Epigenetyczne modyfikacje chromatyny w komórkach męskiego gametofitu *Hyacinthus orientalis* L. w okresie od dojrzałości pyłku do powstania komórek plemnikowych

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Modyfikacje epigenetyczne są mechanizmem umożliwiającym regulację struktury chromatyny oraz jej aktywność transkrypcyjną. Wśród znaczników epigenetycznych wyróżnia się markery aktywnej euchromatyny, w tym acetylowane histony, histon H3 metylowany w pozycji lizyny 4 (H3K4) oraz markery nieaktywnej heterochromatyny takie jak m. in. metylacja DNA, deacetylacja histonów i metylacja histonu H3 w pozycji lizyny 27 (H3K27). Równowaga między znacznikami eu- oraz heterochromatynowymi w danym obszarze chromatyny skutkuje utrzymaniem jej odpowiedniej struktury i aktywności.

W męskim gametoficie roślin kwiatowych jądro wegetatywne i komórki linii płciowej (komórka generatywna/komórki plemnikowe) zorganizowane są w jednostkę strukturalną tzw. MGU (z ang. male germ unit), która obecna jest także u *Hyacinthus orientalis*. Wcześniejsze badania prowadzone u tego gatunku wykazały, że podczas wzrostu łagiewki pyłkowej w jądrze wegetatywnym i jądrze komórki generatywnej dochodzi do uruchomienia czasowej i zróżnicowanej aktywności transkrypcyjnej (Zienkiewicz i wsp. 2008b). Krótkotrwałą, niską aktywność transkrypcyjną stwierdzono również w jądrach męskich gamet (Zienkiewicz i wsp. 2011).

Celem niniejszej pracy była: (1) analiza wzorca oraz poziomu wybranych modyfikacji epigenetycznych w komórkach męskiego gametofitu *H. orientalis* w okresie od dojrzałych ziaren pyłku do wytworzenia gamet w hodowanych *in vitro* łagiewkach pyłkowych, (2) poznanie wpływu metylacji DNA oraz acetylacji histonów na kiełkowanie pyłku oraz wzrost łagiewki pyłkowej. Technika immunocytochemiczna określono dystrybucję i poziom znaczników heterochromatyny – 5mC i H3K27me³, znaczników euchromatyny - acH4, H3K4me³ i H3K36me¹ oraz enzymów uczestniczących w regulacji acetylacji histonów - HDT1 i HDT3. Dodatkowo dokonano analizy kiełkowania pyłku oraz wzrostu łagiewek pyłkowych w pożywkach z dodatkiem inhibitorów metylacji DNA - 5-azacytydyny oraz deacetylaz histonowych - maślanu sodu.

Wyniki badań ujawniły, że jądro wegetatywne/łagiewkowe i jądra komórek linii płciowej różnią się poziomem metylacji DNA oraz wzorcem modyfikacji białek histonowych. Poziom metylacji DNA w jądrze wegetatywnym przez cały badany okres był niższy aniżeli w jądrze generatywnym/jądrach gamet. Podstawową różnicą wzorca modyfikacji histonów była obecność znacznika heterochromatyny H3K27me³ tylko w jądrze wegetatywnym i jego brak w chromatynie komórek linii płciowej.

W jądrze wegetatywnym już we wczesnym etapie kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych stwierdzono obniżenie poziomu znaczników heterochromatyny (5mC, H3K27me³) i gromadzenie znaczników euchromatyny (acH4, H3K4me³) oraz deacetylaz histonowych. Zmiany te towarzyszyły rozluźnieniu struktury chromatyny, co wskazuje na przygotowanie jądra wegetatywnego do uruchomienia aktywności transkrypcyjnej. W późniejszym okresie wzrostu łagiewek pyłkowych obserwowano dalsze obniżanie poziomu znaczników euchromatynowych (acH3, H3K4me³) oraz deacetylaz histonowych, wzrastał natomiast poziom H3K27me³.

W jądrze komórki generatywnej, także we wczesnym etapie wzrostu łagiewek, ale później niż w jądrze wegetatywnym, dochodziło do obniżenia poziomu metylacji DNA oraz gromadzenia, aczkolwiek na niższym poziomie, znaczników euchromatynowych i deacetylaz. Z kolei na krótko przed jej podziałem następował wzrost metylacji DNA oraz obniżanie poziomu acH4, H3K4me³ i deacetylaz histonowych. Wysoki poziom metylacji DNA oraz niski poziom lub eliminację znaczników euchromatynowych obserwowano w jądrach plemnikowych.

Przez cały okres wzrostu łagiewki pyłkowej w jądrach męskiego gametofitu nie obserwowano większych zmian w poziomie oraz wzorcu H3K36me¹.

Szczególne uwagę zwrócono na obszar bliskiego sąsiedztwa jąder wegetatywnego oraz jądra komórki generatywnej tworzących MGU. W trakcie wzrostu łagiewek pyłkowych w chromatynie tego regionu dochodziło do obniżenia metylacji DNA, gromadzenia acH4 oraz H3K4me³, a w jądrze wegetatywnym dodatkowo do obniżenia poziomu H3K27me³. Obszar ten był także miejscem dynamicznych zmian poziomu HDT1. Wskazuje to iż MGU obecna w rosnącej łagiewce pyłkowej hiacynta, poza funkcją strukturalną, prawdopodobnie uczestniczy także w „genetycznej” interakcji między jądrem wegetatywnym a jądrem komórki generatywnej.

Uzyskane wyniki przedyskutowano na tle wcześniej poznanej aktywności transkrypcyjnej jądra wegetatywnego i jąder komórek linii płciowej podczas powypyleniowego rozwoju męskiego gametofitu hiacynta (Zienkiewicz i wsp. 2008b, Zienkiewicz i wsp. 2011). Pozwoliło to na stwierdzenie, że zmiany wzorca metylacji DNA i znaczników białek histonowych są pozytywnie skorelowane z okresem i intensywnością transkrypcji w jądrach badanych komórek. Jednakże brak w jądrze generatywnym i jądrach gamet hiacynta H3K27me³ oraz stwierdzona wcześniej u innych gatunków obecność płciowych wariantów histonów (Ingouf i Berger 2010) wskazuje, że precyzyjne mechanizmy regulacji epigenetycznych mogą być w tych komórkach odmienne.

Słowa kluczowe: *epigenetyka, ziarno pyłku i lagiewka pyłkowa, męska jednostka rozrodcza (MGU), hiacynt*

12.06.2014 r.

Monika Kozłowska