

mgr Marta Kilichowska^{1,2},

dr Maciej Kotliński¹✉

¹Zakład Biologii Systemów, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

²Zakład Krystalochemii i Krystalofizyki, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

https://doi.org/10.18388/pb.2021_466

✉ autor korespondujący: mkotl@ibb.waw.pl

Słowa kluczowe: H1, histon łącznikowy, chromatyna, chromatosomal, nukleosom, modyfikacje potranslacyjne

Wykaz skrótów: AA – aminokwas (ang. *amino acid*); CTD – domena C-końcowa (ang. *C-terminal domain*); FRAP – odzysk fluorescencji po fotobłaknięciu (ang. *fluorescence recovery after photobleaching*); GH1 – domena globularna histonu H1; HP1 – białko heterochromatynowe 1 (ang. *heterochromatin protein 1*); HMG – białka o wysokiej ruchliwości (ang. *high mobility group*); m⁷G – 7-metyloguanozyna; NTD – domena N-końcowa (ang. *N-terminal domain*); PAR – poli(ADP-ryboza) (ang. *poly(ADP-ribose)*); PTM – modyfikacja potranslacyjna (ang. *post-translational modification*)

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu Sonata (2018/31/D/NZ2/02974) finansowanego ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.

STRESZCZENIE

Histon łącznie (H1) są białkami występującymi w jądrze komórkowym większości eukariontów. Pełnią ważną rolę w ich życiu i rozwoju, uczestnicząc m.in. w kondensacji chromatyny, regulacji transkrypcji genów czy indukcji apoptozy. Mimo powszechnego występowania oraz istotnych funkcji H1, na wiele pytań nie znaleziono dotąd odpowiedzi. Zagadką pozostaje mechanizm odpowiedzialny za tryb wiązania tego histonu do nukleosomu oraz wpływ każdego z trybów na strukturę chromatyny. Pojawiają się również doniesienia na temat uczestnictwa H1 w procesach fizjologicznych, niezwiązanych bezpośrednio z organizacją materiału genetycznego. Postuluje się, że histon ten bierze udział w powstawaniu wrzeciona podziałowego u roślin, a jego fragmenty – w obronie ryb przed patogenami. Artykuł ten ma na celu przyjrzenie się histonowi H1 pod wieloma aspektami, zgromadzenie i uporządkowanie zdobytej już wiedzy oraz nakreślenie pytań, na które odpowiedzi należy szukać w przyszłości.

WPROWADZENIE

Histony są białkami odpowiedzialnymi za kondensację DNA eukariontów [1]. Histony rdzeniowe, tj. H2A, H2B, H3 oraz H4, tworzą heterooktamer, na który nawijają się lewoskrętnie 145-147 par zasad podwójnej helisy DNA [1]. Kompleks ten, zwany nukleosomem, stanowi pierwszy etap upakowania materiału genetycznego [1]. Histon łącznikowy (H1) łączy się z nukleosomem od zewnątrz, tworząc chromatosomal, co skutkuje jeszcze silniejszym upakowaniem DNA [1]. Ze względu na taki sposób oddziaływania z resztą kompleksu histon ten cechuje się dużo wyższą mobilnością niż histony rdzeniowe [2].

Histony H1 są białkami o długości najczęściej 180-250 aminokwasów (AA). Na N-końcu posiadają krótki, zazwyczaj ok. 20-70-aminokwasowy fragment nieustrukturyzowanego peptydu, po którym występuje charakterystyczna dla nich domena globularna o długości ok. 70-80 aminokwasów. Jest ona wysoce konserwowana ewolucyjnie i odpowiada za oddziaływanie z nukleosomem [1,3]. Za nią znajduje się ok. 100-140-aminokwasowa domena C-końcowa bardzo bogata w aminokwasy zasadowe [3] i uczestnicząca w szczególnie sposób w kondensacji DNA przez histony łącznikowe *in vivo* [4] oraz odpowiedzialna za utrzymanie DNA łącznikowego w strukturze łodygi (ang. *stem*) *in vitro* [5]. Postuluje się także, że w dużej mierze odpowiada ona za oddziaływania H1 z białkami [3].

W pracach nad strukturą chromatosomal proponowano jak dotąd wiele odmiennych od siebie modeli oddziaływania H1 z nukleosomem [2,6-10], które podzielono na dwie grupy ze względu na symetrię [1,5]. Do pierwszej z nich zaliczono modele z H1 wiążącym się w trybie symetrycznym (ang. *on-dyad*), w których histon ten znajduje się w osi symetrii nukleosomu i oddziałuje z fragmentami DNA łącznikowego z obu jego stron. Druga grupa zawiera modele asymetryczne (ang. *off-dyad*), w których H1 oddziałuje z 10. lub 20. pz łącznikowego DNA z jednej tylko strony kompleksu [5]. Obecnie uważa się, że histon H1 może oddziaływać z nukleosomem na różne sposoby, jednak bierze się również pod uwagę, że do tak dużej różnorodności przedstawianych modeli mogła przyczynić się niedoskonałość metod badawczych [5]. Zagadnienie to omówiono szerzej w rozdziale „Modele struktury chromatosomal a H1”.

NIEALLELICZNE WARIANTY H1

W danym organizmie geny kodujące histon H1 mogą występować w różnej liczbie kopii, w zależności od gatunku [11]. Geny te są paralogami [12] i zajmują różne *loci* – mogą tworzyć klastry lub też lokalizować się w bardzo odległych od siebie miejscach [13].

SSAKI

W organizmach ssaków występuje 11 wariantów histonów łącznikowych, co czyni H1 najbardziej zróżnicowaną grupą spośród wszystkich histonów [14]. Wyróżnia się warianty kanoniczne i niekanoniczne, a także somatyczne oraz charakterystyczne dla komórek rozrodczych.

WARIANTY SOMATYCZNE

Wśród wariantów somatycznych wyróżnia się zależne (kanoniczne) oraz niezależne od faz cyklu komórkowego. Geny kodujące warianty kanoniczne, tj. H1.1, H1.2, H1.3, H1.4 oraz H1.5, znane także – odpowiednio – jako: H1a, H1c, H1d, H1e, H1b, zlokalizowane są u człowieka w rejonie bogatym w geny histonowe (ang. *histone major cluster*) na chromosomie 6 w *locus* 6p21.3-22. W tym *locus* znajdują się również geny wariantu H1t, który opiszemy później [13]. Geny histonów kanonicznych charakteryzują się brakiem intronów oraz ekspresją podporządkowaną fazom cyklu komórkowego. Ponadto ich transkrypty nie posiadają ogona poliadeninowego, lecz w ich 3'-UTR znajduje się konserwowany ewolucyjnie zarówno w swojej sekwencji, jak i strukturze, motyw spinki do włosów. Transkrypty te zakończone są klasycznym kapem m⁷G [15]. Ekspresja genów kodujących wszystkie histony kanoniczne jest najintensywniejsza podczas fazy S cyklu komórkowego, podczas której ich mRNA utrzymuje się na nawet 35-krotnie wyższym poziomie niż w innych warunkach [15]. Po zakończeniu replikacji DNA mRNA tych histonów jest natychmiast degradowane [15].

Wariantami somatycznymi niezależnymi od cyklu komórkowego są H1.0 i H1x (określany także jako H1.10). W przeciwieństwie do wariantów kanonicznych, ich transkrypty są poliadenylowane [16]. Wiadomo także, że ekspresja H1.0 znacznie wzrasta w komórkach krańcowo zróżnicowanych [16]. Geny kodujące H1.0 oraz H1x znajdują się odpowiednio w *loci* 22q13.1 i 3q21.3 [13] – poza klastrem kodującym kanoniczne histony łącznikowe u człowieka. Uważa się, że geny te mogły zostać wyłączone spod regulacji ekspresji zależnej od cyklu komórkowego poprzez zmianę struktury 3'-końca mRNA. Dzięki temu mechanizmowi białka te mogą być syntetyzowane także w komórkach nie przechodzących podziałów, co pozwala na systematyczne uzupełnianie zdegradowanych lub uszkodzonych histonów [12]. Wariant H1.0 uważany jest za najbliższy homolog H5, histonu łącznikowego występującego w erytrocytach ptaków [3]. Hipotezę bliskiej homologii pomiędzy tymi białkami wspiera fakt, że erytrocyty są komórkami skrajnie zróżnicowanymi, dla których to charakterystyczny jest wariant H1.0.

Warianty somatyczne różnią się między sobą wieloma cechami, zwłaszcza w domenach N- (NTD) i C-końcowej (CTD), które są słabiej konserwowane w ewolucji niż domena globularna. Najkrótszym z histonów łącznikowych człowieka jest H1.0, a jego CTD liczy sobie jedynie 97 aminokwasów [17]. Jednocześnie to właśnie ten wariant posiada w swojej sekwencji największą gęstość reszt zasadowych, zawierając jedną argininę i 41 lizyn [17].

Różnice pomiędzy wariantami histonowymi dotyczyć mogą również motywów aminokwasowych o funkcjach regulatorowych. Odpowiedzialne za oddziaływanie H1 z kinazami zależnymi od cyklin motywy (S/T)PxK (gdzie „x” oznacza dowolny aminokwas) występują u człowieka w różnej liczbie w zależności od wariantu. H1.1 zawiera najmniej, bo jedynie dwa takie motywy [17] podczas gdy H1.4 oraz H1.5 zawierają ich pięć [18]. Ponadto, wariant H1.4 posiada w domenie N-końcowej motyw ARKS uczestniczący w regulacji kondensacji chromatyiny nie występujący w żadnym innym wariantcie histonu łącznikowego u człowieka, a jedynie w histonie rdzeniowym H3 [19].

WARIANTY CHARAKTERYSTYCZNE DLA KOMÓREK ROZRODCZYCH

Oprócz wariantów somatycznych, u ssaków wyróżnia się warianty histonowe specyficzne dla komórek rozrodczych. U człowieka są to: występujące w komórkach męskich H1t, H1T2 oraz H1LS, a także obecny w komórkach żeńskich H1.oo [13].

H1t, H1T2 i H1LS znane są również odpowiednio pod nazwami H1.6, H1.7 oraz H1.9 [1]. H1t – wariant występujący w spermatydach – tak samo jak kanoniczne histony łącznikowe, kodowany jest w opisanym wcześniej rejonie *histone major cluster*. Geny kodujące H1T2 oraz H1LS – warianty obecne w spermatocytach – znajdują się zaś odpowiednio w *loci* 12q13.11 oraz 17q21.33 [13]. Co ciekawe, H1t został wykryty w śledzionie, a także w limfocytach u myszy [29]. Autorzy pracy uważają, że mógł on znaleźć się w komórkach somatycznych na dwa sposoby: albo – zsyntetyzowany na wczesnych etapach rozwoju – przetrwał wskutek dużej stabilności białek histonowych, albo też powstał w wyniku niespecyficznej transkrypcji zwanej przeciekaniem promotorów (ang. *gene leaking*) [20].

Wariant żeński, H1.oo, znany także pod nazwami H1.foo i H1.8, kodowany jest u człowieka w *locus* 3q21.3 [13]. Posiada on dwa warianty splicingowe, stąd niektórzy autorzy podają 12 jako liczbę wariantów histonu H1 u ssaków [1].

OWADY

Przez długi czas uważano, że w organizmie modelowym, jakim jest muszka owocowa *Drosophila melanogaster* obecny jest tylko jeden wariant histonu łącznikowego – występujący w tkankach somatycznych dH1. Białko to kodowane jest w klastrze zawierającym geny wszystkich histonów kanonicznych, powtórzonym w genomie około 110 razy [21]. W 2013 roku odkryto inny wariant histonu łącznikowego u *D. melanogaster* – dBigH1, obecny we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego oraz w gametach owada. Wariant ten charakteryzuje się dużym jak na H1 rozmiarem, za który odpowiada m.in. wydłużona na N-końcu NTD. Ten dodatkowy fragment domeny N-końcowej zawiera liczne aminokwasy o charakterze kwasowym (stosunek reszt kwasowych do zasadowych wynosi 5:1), co jest cechą bardzo nietypową dla histonów łącznikowych. Wykazano, że muszki owocowe pozbawione dBigH1 umierają na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, tak więc dBigH1 pełni istotną rolę w rozwoju tego owada. Spekuluje się, że obecność ujemnego

ładunku na NTD – będąca główną cechą charakterystyczną dBigH1 – ma znaczenie w wiązaniu się do chromatyny czynników regulatorowych [22].

ROŚLINY

Liczba wariantów histonów łącznikowych wygląda inaczej w królestwie roślin. U rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* będącego organizmem modelowym wyróżnia się dwa główne warianty H1 – H1.1 i H1.2 – oraz jeden wariant o ekspresji indukowanej stresem – H1.3. H1.2 jest wariantem najliczniej obecnym w komórkach – przewyższa on stężeniem H1.1 nawet dwunastokrotnie. H1.3 jest syntetyzowany głównie w warunkach stresu, ale nawet wtedy jego ilość nie przekracza 1% histonów łącznikowych [14].

A. thaliana jest organizmem zdolnym do życia nawet przy całkowitym braku H1, mimo występujących wówczas licznych defektów rozwojowych. Zaburzenia obejmują m.in. funkcjonowanie aparatów szparkowych (w którym bierze udział H1.3 [23]) formowanie korzeni bocznych, stan spoczynku nasion, czas kwitnienia oraz powstawanie kalusa [24]. Na poziomie mikroskopowym, u mutantów pozbawionych H1, można zauważyć dekondensację chromatyny i brak chromocentrow [24]. W przypadku mutantów pozbawionych pojedynczych wariantów H1 zmiany te są niewielkie – prawdopodobnie wskutek przejścia funkcji usuniętego białka przez inny wariant. Wykazano, że rośliny pozbawione wariantu H1.3 w warunkach kontrolnych charakteryzują się fenotypem takim samym jak dzikie; dopiero ekspozycja na stres w postaci ograniczonego dostępu do wody i światła indukuje charakterystyczne zmiany fenotypowe [23].

DROŹDZE

Drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae* posiadają tylko jeden wariant histonu łącznikowego. Podobnie jak u roślin, białko homologiczne do H1 (Hho1p) nie jest u nich niezbędne do przeżycia. Pozbawienie tego gatunku histonu łącznikowego wiąże się jednak z zaburzeniami w organizacji chromatyny [25], zwiększoną częstością rekombinacji homologicznej, a także skróconym czasem życia [26]. Uważa się, że hamowanie przez histon łącznikowy rekombinacji homologicznej u drożdży może zwiększać stabilność genomu [26].

W przeciwieństwie do wyższych organizmów eukariotycznych, drożdże charakteryzują się histonem łącznikowym o dwóch domenach globularnych. C-końcowa z tych domen jest dużo mniej stabilna od N-końcowej w roztworze soli fizjologicznej. Udowodniono, że C-końcowa domena globularna nie jest niezbędna do przyłączania się Hho1p do nukleosomu, stąd wniosek, że prawdopodobnie histon ten, mimo odmiennej budowy, łączy się z nukleosomem jedynie za pomocą N-końcowej domeny globularnej [27].

Drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe*, w przeciwieństwie do *S. cerevisiae*, nie posiadają histonu łącznikowego [28]. Wykazano jednak, że mimo braku endogennego histonu łącznikowego chromatyna *S. pombe* zdolna jest przyjmować struktury wyższego rzędu w obecności obcego H1 [28].

ORZĘSKI

Orzęski z rodzaju *Tetrahymena* – *T. thermophila* oraz *T. pyriformis* stanowią częsty przedmiot badań nad histonami łącznikowymi. Posiadają one dwa jądra komórkowe – mniejsze (mikronukleus) przechodzące mitozę i odpowiadające za koniugację oraz większe (makronukleus) dzielące się amitotycznie i odpowiedzialne za funkcje somatyczne [29]. W stadiach wegetatywnych mikronukleus jest nieaktywny transkrypcyjnie i nie posiada jąderka, zaś makronukleus charakteryzuje się intensywną transkrypcją chromatyny oraz ich dużą liczbą [29,30].

W obu jądrach występują odpowiedniki H1; różnią się jednak w swojej budowie od H1 u wyższych eukariotów. W makronukleusie występuje jeden wariant białka pełniącego funkcję podobną do histonu łącznikowego – jest on bardzo bogaty w aminokwasy zasadowe, jednak nie posiada domeny globularnej [31]. Kodowany jest on przez gen *HHO* występujący w genomie *Tetrahymena* w pojedynczej kopii [29]. Opiswane orzęski zdolne są do życia bez odpowiednika histonu łącznikowego w większym jądrze [29] jednak utrata tego białka skutkuje zmniejszeniem stopnia upakowania chromatyny i tym samym powiększeniem jądra [32].

Białka o funkcji histonów łącznikowych występujące w mniejszym jądrze komórkowym również kodowane są przez pojedynczy gen – *MLH1* (ang. *Micronuclear Linker Histone 1*). W przeciwieństwie jednak do większego jądra, mikronukleus charakteryzuje się bardziej skomplikowanym profilem białek pełniących rolę podobną do H1. *MLH1* transkrybowany jest bowiem na 2,4 kb mRNA kodujące białko o masie 71 kDa [33]. Część cząsteczka ta jest następnie cięta w motywach ↓RTS na cztery krótsze białka: α, β, γ oraz δ [33]. Białka te, podobnie jak eukariotyczne H1, są bardzo bogate w aminokwasy zasadowe [33], jednak nie posiadają domeny globularnej [32,34]. Pozbawienie mniejszego jądra komórkowego białek o funkcji histonu łącznikowego niesie za sobą poważniejsze skutki niż *knock-out HHO* w większym jądrze. Co prawda orzęski zdolne są do przeżycia w stadium wegetatywnym bez odpowiedników H1 w mikronukleusie, jednak oprócz dekondensacji chromatyny i powiększenia jądra [32] modyfikacja ta uniemożliwia ich koniugację i prowadzi do utraty chromosomów mniejszego jądra [34].

Mimo, że w dużej liczbie publikacji białka pełniące funkcję histonu łącznikowego u *Tetrahymena* nazywane są histonami H1, trudno jest jednoznacznie wykazać ich homologię. Co prawda, przy obecnym stanie wiedzy nie można wykluczyć wspólnego pochodzenia tych białek, jednak z powodu braku domeny globularnej podobieństwo ich sekwencji do H1 jest na tyle małe, że nazywanie ich histonami łącznikowymi może okazać się nadużyciem. Bardziej zasadnym wydaje się określanie ich jako pełniących funkcję H1.

BUDOWA H1

Białka, jakimi są histony H1, dzielą się na trzy fragmenty strukturalne – nieustrukturyzowane domeny: N-końcową (ang. *N-terminal domain*, NTD) i C-końcową (ang. *C-terminal*

domain, CTD), zwane „ogonami” oraz na znajdującą się pomiędzy nimi wysoce konserwowaną ewolucyjnie domenę globularną typu helisy ze skrzydełkiem (ang. *winged helix*, GH1) [6]. Mimo że nieustrukturyzowane fragmenty na obu końcach H1 nie przyjmują struktur wyższego rzędu w roztworze wodnym, zwyczajowo przyjęło się je określać jako domeny. Mogą one tworzyć struktury drugorzędowe podczas interakcji z innymi białkami albo z DNA [11,35,36].

Właściwości końcowych domen determinują siłę kondensacji DNA oraz specyficzność wiązania danego wariantu histonowego [37]. Domeny te zawierają również charakterystyczne motywy aminokwasowe (S/T)PxK umożliwiające wiązanie z DNA i będące celem CDK [14].

DOMENA N-KOŃCOWA H1

Domena N-końcowa H1 jest peptydem długości około 20-60 AA. Mimo że w danych literaturowych najczęściej podaje się jej długość jako 20-35 [4,11], czy nawet ok. 45 AA [38], nie można zapomnieć, że np. H1.1 czy H1.2 *Arabidopsis thaliana* posiadają NTD długości nawet 60 AA [39]. Pod względem składu aminokwasowego można wyróżnić wewnątrz tej domeny dwa regiony: fragment bliższy N-końcowi charakteryzujący się obecnością aminokwasów hydrofobowych oraz fragment bliższy GH1 zawierający liczne aminokwasy o charakterze zasadowym [40]. Wykazano, że ten ostatni przyjmuje strukturę α -helikalną podczas interakcji z DNA [3]. Ponadto, Vila i in. [35] udowodnili, że mimo iż w roztworze wodnym domena N-końcowa nie tworzy struktur drugorzędowych, w roztworze trifluoroetanolu powstają w niej regiony α -helikalne w ilości podobnej jak przy interakcji z DNA, a łańcuchy boczne zasadowych aminokwasów tworzą zgrupowania przestrzenne po przeciwnych stronach helisy [35]. Autorzy uważają, że struktura ta może uczestniczyć w oddziaływaniu pomiędzy znajdującymi się niedaleko fragmentami DNA. Dowiedziono także, że NTD nie jest wymagana do związania się H1 do nukleosomu [9,18] jednak istnieją przesłanki świadczące, iż w przypadku jej braku H1 wiąże się z nukleosomem w odmienny sposób [41] tak więc może ona brać udział w zakotwiczeniu domeny globularnej [35].

Wariant H1.4 człowieka posiada w domenie N-końcowej motyw ARKS – „binarny przełącznik” odpowiedzialny za interakcje z wieloma białkami i rozpoznawany przez chromodomeny [42]. Warto wspomnieć, że dwa powtórzenia ARKS występują również w domenie N-końcowej H3, otaczając pozycje K9 oraz K27 [19], które – w zależności od PTM – mogą odpowiadać za aktywację lub represję transkrypcji [43]. Motyw ARKS charakteryzuje się ważną cechą obecności lizyny i seryny obok siebie. Lizyna może ulec metylacji, co pozwala na dołączenie białka HP1 promującego kondensację chromatyny. Fosforylacja seryny promuje zaś odłączenie go i tym samym zmniejszenie upakowania DNA [19].

Wykazano także, że NTD H1.4 myszy przyjmuje w dodatnio naładowanym fragmencie strukturę helisa-Gly-Gly-helisa podczas interakcji z DNA [44]. Przypuszcza się, że motyw dwóch reszt glicynowych może funkcjonować jako zawias umożliwiający uchwycenie podwójnej helisy DNA

lub też oddziaływanie z dwoma fragmentami kwasu nukleinowego jednocześnie.

DOMENA C-KOŃCOWA H1

Znajdująca się na C-końcu histonów łącznikowych domena nieustrukturyzowana zawiera zazwyczaj od 80 do 100 AA [11], jednak podobnie jak w przypadku domeny N-końcowej, warianty H1 u *A. thaliana* mogą liczyć sobie ich nawet 140 [39], zaś w wariantach ludzkich H1.3, H1.4 i H1.5 jest to około 110 AA. Fakt ten czyni CTD peptydem dłuższym od domeny N-końcowej oraz od domeny globularnej. Jest ona regionem szczególnie bogatym w aminokwasy zasadowe – zawiera ich ok. 60% z całej sekwencji H1 [45], co nadaje jej powinowactwo do kwasowego łańcucha DNA. Około 40% AA znajdujących się w CTD stanowią lizyny, około 20-35% – alaniny, a 15% – proliny [3,4]. Występujący w erytrocytach ptaków histon łącznikowy H5 zawiera w CTD również znaczną liczbę reszt argininy, praktycznie nieobecnej w domenach C-końcowych H1 [46]. Oprócz wymienionych AA w CTD występują z mniejszą częstością: walina, treonina, seryna i glicyna, natomiast pozostałe 12 AA pojawia się bardzo rzadko, praktycznie w śladowych ilościach [46]. Co ważne, sekwencja CTD nie jest konserwowana pomiędzy wariantami histonów łącznikowych [46,47] – np. domeny C-końcowe histonów H1.0 i H1t u myszy wykazują jedynie 30% identyczności sekwencji [36]. Mimo braku tego typu konserwacji, bardzo mocno zachowywany jest skład aminokwasowy [46], a także rozkład ładunku w peptydzie – naładowane reszty lizyny rozłożone są w CTD w bardzo równomierny sposób [48]. Sugeruje to, że właściwości chemiczne oraz rozmieszczenie reszt aminokwasowych pełnią ważną rolę funkcjonalną. Analiza ich położenia [47] wykazała, że nie zostały rozłożone w sposób losowy – wyraźnie preferowane są pojedyncze wystąpienia lizyn – w odstępach 2-7 AA – od ich rozmieszczenia w parach. Również alaniny prezentują przykład ułożenia raczej uporządkowanego – preferowane są ich wystąpienia w grupach po dwie nad wystąpieniami po trzy lub cztery, a odległości pomiędzy ich skupiskami wynoszą 4-6 AA. Autorzy uważają, że takie rozmieszczenie ładunku elektrostatycznego w domenie C-końcowej H1 nie pozwala na przyjęcie struktury α -helisy dopóki ładunek ten nie zostanie zneutralizowany, np. przez oddziaływanie z DNA. W momencie zrównoważenia ładunku przyjęcie struktury α -helisy uważane jest za bardzo prawdopodobne [47]. Z powodu możliwości przyjęcia struktury drugorzędowej w określonych warunkach C-końcowa domena H1 nie jest zaliczana do białek całkowicie nieustrukturyzowanych. Mówi się o niej raczej jako o tzw. strukturze stopionej globuli – peptydzie gotowym przyjąć konformację wyższego rzędu podczas interakcji z innymi związkami wielkocząsteczkowymi [46]. W CTD można wyróżnić dwa fragmenty odpowiedzialne za oddziaływanie z DNA [4]. Odkrycie tych regionów postawiło pod znakiem zapytania przez długi czas przyjmowaną koncepcję sprawdzającą rolę domeny C-końcowej jedynie do neutralizacji ładunku kwasu nukleinowego. Lu i Hansen [46] wykazali, że stopniowe pozabawianie H1 coraz większego fragmentu CTD nie skutkuje utratą funkcji proporcjonalną do zmniejszenia ładunku [46]. Za tworzenie się struktury łądygi i kondensację włókien chromatynowych odpowiadały tylko dwa fragmenty w obrębie tej domeny, nazwane przez ba-

daczy subdomenami. Delecja coraz większych fragmentów CTD wpływała jednak negatywnie na efektywność wiązania H1 do nukleosomu. Na podstawie przedstawionych wyników wywnioskowano, że prawdopodobnie dodatni ładunek domeny C-końcowej pełni ważną rolę w tworzeniu chromatosomów, jednak w procesach, za które odpowiadają histony łącznikowe związane już z nukleosomem – takich jak kondensacja DNA łącznikowego czy formacja struktur chromatynowych wyższego rzędu – ważniejszą rolę pełnią przedstawione mechanizmy alternatywne [46]. Również pozycja CTD względem domeny globularnej jest istotna dla wiązania H1 do nukleosomu. Wykazał to eksperyment, na potrzeby którego skonstruowano histon łącznikowy z domenami końcowymi zamienionymi miejscami [49]. Okazało się, że takie białko niezdolne jest do prawidłowego formowania struktur chromatyny wyższego rzędu i charakteryzuje się krótszym czasem oddziaływania z nukleosomem. Badacze uważają, że w białku o takiej strukturze wiązanie do nukleosomu zostało upośledzone przez brak możliwości poprawnego usytuowania CTD względem DNA. Mechanizm ten mógł polegać na przyłączeniu się H1 do nukleosomu inicjowanym przez domenę globularną [49].

Obecnie uważa się, że domena C-końcowa wraz z domeną globularną wspomagają się wzajemnie podczas wiązania do nukleosomu [14] – przytoczone dane także wspierają ten pogląd [49].

Fragmety CTD nie wchodzące w skład wspomnianych wcześniej „subdomen” – liczące ok. 50 AA mogą zaś odpowiadać za oddziaływanie z białkami, co wykazano dla metylotransferaz DNA [3] oraz apoptotycznej nukleazy DFF40/CAD, która jest aktywowana przez CTD, co zwiększa jej powinowactwo do DNA [4].

DOMENA GLOBULARNA

Domena globularna (GH1) zawiera około 70–80 AA i jest jedyną natywnie ustrukturyzowaną domeną H1 oraz jego najbardziej konserwowaną ewolucyjnie częścią [11,50]. Należy ona do nadrodziny (ang. *superfamily*) domen helisy ze skrzydełkiem (ang. *winged helix*), będących odmianą motywu helisa-skręt-helisa (ang. *helix-turn-helix*) [50] i odpowiada za wiązanie do DNA. Oprócz histonu H1 domenę tę posiadają np. czynniki transkrypcyjne, represory transkrypcji – w tym odpowiedzialne za indukcję regulonu SOS u bakterii białko LexA – helikazy – choćby bakteryjna RuvB – czy mediatory oddziaływań białko-białko [51]. Sama GH1 składa się z trzech struktur α -helisy oraz trzech – β -kartki. Dwie C-końcowe β -kartki oraz znajdujące się pomiędzy nimi wypełnienie tworzą skrzydełko (ang. *wing*) od którego pochodzi określenie *winged helix* [11].

Wewnątrz GH1 można wyróżnić konkretne aminokwasowy odpowiedzialne za wiązanie do nukleosomu. Udowodniono, że substytucja kluczowych dla tego procesu pozycji może skutkować zmianą trybu wiązania z *on-dyad* na *off-dyad* [52]. Za pomocą techniki FRAP (odzysk fluorescencji po fotobłaknięciu, ang. *fluorescence recovery after photobleaching*) wykazano także, że substytucja za pomocą alaniny nawet jednego aminokwasu obdarzonego ładunkiem w obrębie domeny globularnej drastycznie wpływa na czas przeby-

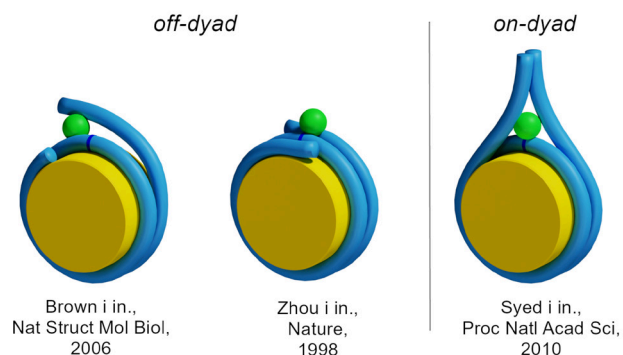
wania H1 na nukleosomie [3,53]. Pozycje aminokwasowe w obrębie GH1 odpowiedzialne za oddziaływanie z DNA – głównie lizyny – w komórkach ssaków mogą ulegać PTM zmieniającym powinowactwo H1 do nukleosomu, takim jak acetylacja czy N^ε-formylacja [20,54]. U *A. thaliana* oprócz wymienionych modyfikacji zidentyfikowano krotonylację reszt lizyny, a także metylację asparaginy [14].

MODELE STRUKTURY CHROMATOSOMU A H1

Jak dotąd przedstawiano wiele propozycji modelu chromatosomu różniących się znacznie między sobą [2,6–10]. Wśród nich można wyróżnić dwie grupy: modele *on-dyad*, w których histon łącznikowy wiąże się z nukleosomem w osi symetrii i oddziałuje z DNA łącznikowym z obu stron, oraz modele *off-dyad*, w których H1 znajduje się najczęściej tuż obok osi symetrii, oddziałując z najbliższym mu łącznikowym DNA (Ryc. 1).

W procesie wiązania się histonu łącznikowego do nukleosomu ważną rolę odgrywa wariant H1. Wykazano, że substytucja pięciu pozycji aminokwasowych w globuli H5 kury domowej *Gallus gallus* (wiązanie *off-dyad*) na odpowiadające im reszty z GH1 *D. melanogaster* (wiązanie *on-dyad*) skutkuje zmianą trybu wiązania tego histonu [52] oraz, że ludzkie warianty H1.0 i H1.4 sytuują się na nukleosomie inaczej niż H1.10 [55]. Również warianty histonów rdzeniowych wpływają na powinowactwo histonu łącznikowego do nukleosomu. Zamiana ostatnich pięciu aminokwasów domeny C-końcowej H2A na odpowiadające im pozycje z wariantu H2A.Z zmniejszyła powinowactwo H1 do nukleosomu do zaledwie wykrywalnego poziomu [5]. Wykazano także, że pozycja ogonów histonu H2A zależy od wariantu histonu łącznikowego związanego z nukleosomem [55]. Wpływ modyfikacji potranslacyjnych na tryb wiązania się histonu łącznikowego do nukleosomu nie został jeszcze dogłębnie zbadany, jednak przypuszcza się, że mogą one – zwłaszcza w obrębie GH1 – również wpływać na to wiązanie [1,26].

Jako, że struktury chromatosomów uzyskiwane były w różnych warunkach, często odmiennych od fizjologicznych, należy wziąć pod uwagę, że mogło przyczynić się to do powstania tak wielu modeli [5]. Udowodniono na przykład, że utrwalanie (ang. *cross-link*) za pomocą aldehydu glutarowe-



Rycina 1. Wybrane modele chromatosomu. Kolorem niebieskim oznaczono DNA, żółtym – oktamer histonów rdzeniowych, zielonym – histon łącznikowy. Kolorem ciemnoniebieskim zaznaczono fragment DNA w osi symetrii nukleosomu.

go zmienia tryb wiązania histonu H1.4 do nukleosomu oraz strukturę chromatyny wyższego rzędu [56].

Stopień upakowania chromatyny zależy od trybu wiązania H1, jednak eksperymenty dostarczają jak dotąd sprzecznych danych. Dostępne są zarówno wyniki sugerujące najsilniejsze upakowanie chromatyny dla H1 związanego *on-dyad* [57,58], jak i *off-dyad* [59], co skłania do przeprowadzenia dalszych badań.

MODELE OFF-DYAD

Zhou i in. [10] przeprowadzili w 1998 roku badania na domenie globularnej histonu H5 z erytrocytów *G. gallus*. Badacze skonstruowali 6 mutantów posiadających punktową substytucję seryny na cysteinę, która po modyfikacji chemicznej mogła pod wpływem światła UV tworzyć wiązania (ang. *cross-link*) z DNA. Na podstawie uzyskanych danych wywnioskowano, że helisa I (pierwsza α -helisa od N-końca domeny globularnej – w tym przypadku GH5) zwrócona jest w stronę rozpuszczalnika, helisa II – w stronę rdzenia nukleosomu, zaś helisa III oddziałuje z DNA w osi symetrii nukleosomu.

Asymetryczny model wiązania H1 do nukleosomu przedstawili również Brown i in. w 2006 roku [2]. Badacze sugerują, że histon ten lokalizuje się za osią symetrii, promując bardzo silne zagięcie DNA łącznikowego wzdłuż obwodu nukleosomu. W modelu tym histon łącznikowy oddziałuje z nukleosomem na dwóch powierzchniach. Wyniki te wykazują częściową zgodność z danymi Goytisolo i in. [60], którzy w 1996 roku również zidentyfikowali dwie powierzchnie wiązania się GH5 do nukleosomu – w obu badaniach podział na powierzchnie oddziaływania z DNA jest podobny, jednak Goytisolo i in. nie uwzględniają niektórych pozycji aminokwasowych uznawanych przez Brown i in. w I powierzchni, a także przyporządkowują do II powierzchni dwa aminokwasy, które autorzy drugiej publikacji uznali za nieuczestniczące w wiązaniu z DNA – nie można wykluczyć, że rozbieżności w rezultatach obu badań miały swoje źródło w odmiennym sposobie wiązania się histonu łącznikowego do nukleosomu.

Także George i in. [61] zaproponowali zbiór aminokwasów uczestniczących w oddziaływaniu H1-nukleosom niosząc sekwencje H1.0 oraz H1.2 odpowiednio na uzyskane metodą NMR modele struktury domen globularnych H1 i H5 *G. gallus*. Badacze spostrzegli, że mysli wariant H1.2 charakteryzuje się odmienną powierzchnią wiązania od H1.0 co wskazuje na zróżnicowany charakter wiązania się poszczególnych wariantów H1.

MODELE ON-DYAD

Model chromatossomu, w którym histon łącznikowy znajduje się w osi symetrii nukleosomu został przedstawiony m. in. przez Syed i in. [9]. Przy użyciu znakowania rodnikami hydroksylowymi (ang. *hydroxyl radical footprinting*) wykazano, że H1 osłania 10 par zasad DNA w osi symetrii nukleosomu oraz dodatkowo po 10 par DNA łącznikowego z obu stron. Ponadto, za pomocą mikrosko-

pii krioelektronowej udało się zaobserwować, że obecność domeny C-końcowej jest wymagana dla utworzenia się struktury łądygi z nici DNA łącznikowego. Udowodniono także, że mutanty H1.5 nie posiadające ostatnich 50 lub 100 aminokwasów CTD zdolne są do organizacji struktury łądygi podobnie do pełnego H1, zaś mutant pozbawiony 100 końcowych AA CTD generuje ją w ok. 15% rzadziej. Mutant pozbawiony 50 AA na C-końcu CTD formuje strukturę łądygi z taką samą efektywnością jak H1 typu dzikiego. Wyniki te zgodne są z hipotezą Lu i Hansena, którzy zasugerowali, że za kondensację DNA łącznikowego odpowiadają głównie dwa krótkie fragmenty CTD [46].

Bednar i in. w 2017 roku [62] zbadali sposób wiązania się do nukleosomu wariantu H1.0 Żaby szponiastej (*Xenopus laevis*). Przedstawiono model, w którym GH1 oddziałuje głównie z mniejszym rowkiem DNA. Pierwsza i trzecia α -helisa domeny globularnej oddziałują z DNA łącznikowym, druga zaś wraz ze „skrzydełkiem” znajduje się przy DNA nawiniętym na rdzeń. Helisy nr 1 i 2 oddziałują również z kwasem nukleinowym za pomocą ładunków dodatnich obecnych na swoich N-końcach.

STRUKTURY KRystalograficzne CHROMATOSOMU

Struktura nukleosomu została po raz pierwszy rozwiązana w 1997 roku przez Luger i współpracowników [63], a od tego czasu w bazie danych Protein Data Bank (rcsb.org) zdeponowano wiele jej podobnych. Struktura chromatossomu jednak okazała się być trudniejsza do opracowania – w bazie PDB do niedawna znajdowało się tylko kilka tego typu rekordów, co jednak zmieniło się w ciągu ostatnich dwóch lat (Tab. 1).

STRUKTURA CHROMATOSOMU 5NL0

Jedną z pierwszych uzyskanych struktur krystalicznych chromatossomu jest struktura uzyskana przez Bednar i in. [62] (5NL0), o rozdzielczości 5,4 Å (Ryc. 2). Wykorzystane DNA to palindromiczna pochodna sekwencji pozycjonującej „Widom 601” – „Widom 601L”, zaś sekwencje aminokwasowe histonów pochodzą z gatunku *X. laevis*. Co ważne, krystalizacji poddano rekonstruowany chromatossom człowieka, jednak najbliższą rozwiązana strukturą o możliwie najwyższej rozdzielczości był nukleosom *X. laevis* (3UT9) również zawierający sekwencję „Widom 601L”. W rezultacie wykorzystano więc ten model w metodzie podstawienia molekularnego [62] – jest to metoda wykorzystująca strukturę podobną do analizowanej w celu rozwiązania tzw. problemu fazowego w metodzie dyfrakcji promieni X [65]. Dzięki szybkiemu wzrostowi liczby zasobów baz danych struktur makrocząsteczek, metoda ta zyskuje na popularności ze względu na swoją szybkość, stopień automatyzacji oraz brak konieczności przeprowadzania dodatkowych eksperymentów [65].

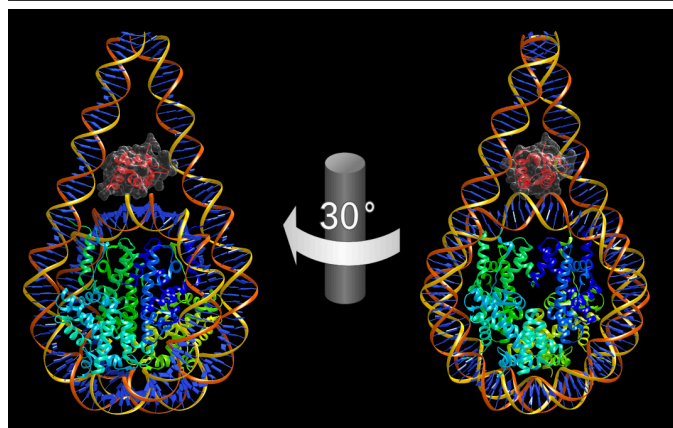
Jako, że w rozwiązywaniu struktury wykorzystano model nukleosomu, a więc jednostki pozbawionej histonu łącznikowego, koniecznym było opracowanie modelu tego histonu. Domenę globularną wariantu H1.0b *X. laevis*

Tabela 1. Modele chromatosomów dostępne obecnie w bazie danych PDB oraz ich parametry.

PDB ID	Rok	Gatunek H1	Wariant H1	Rozdzielczość [Å]	Metoda	Położenie H1
4QLC	2015	<i>Gallus gallus</i>	H5	3,50	XRD	<i>on-dyad</i>
5NL0	2017	<i>Xenopus laevis</i>	H1.0b	5,40	XRD	<i>on-dyad</i>
5WCU	2018	<i>Gallus gallus</i>	H5	5,53	XRD	<i>on-dyad</i>
6HKT	2018	<i>Xenopus laevis</i>	H1.0b	9,70	XRD	<i>on-dyad</i>
6L9Z	2021	<i>Homo sapiens</i>	H1.X	2,50	XRD	<i>off-dyad</i>
6LAB	2021	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	3,20	XRD	<i>off-dyad</i>
6LA2	2021	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	3,89	XRD	<i>on-dyad</i>
6LA8	2020	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	3,40	XRD	<i>off-dyad</i>
6LA9	2020	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	3,70	XRD	<i>on-dyad</i> i <i>off-dyad</i> (dinukleosom)
7COW	2021	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	2,86	XRD	<i>on-dyad</i>
7DBP	2021	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	4,50	Cryo-EM	<i>on-dyad</i>
7K5X	2020	<i>Homo sapiens</i>	H1.0	2,93	Cryo-EM	<i>on-dyad</i>
7K5Y	2020	<i>Homo sapiens</i>	H1.4	2,76	Cryo-EM	<i>on-dyad</i>
7K60	2020	<i>Homo sapiens</i>	H1.X	3,12	Cryo-EM	<i>on-dyad</i>
7K63	2020	<i>Homo sapiens</i>	chimeryczny: NTD - H1.4 GH1 - H1.X CTD - H1.4	3,03	Cryo-EM	<i>on-dyad</i>
7KBF	2021	<i>Xenopus laevis</i>	H1.8	4,42	Cryo-EM	<i>on-dyad</i>

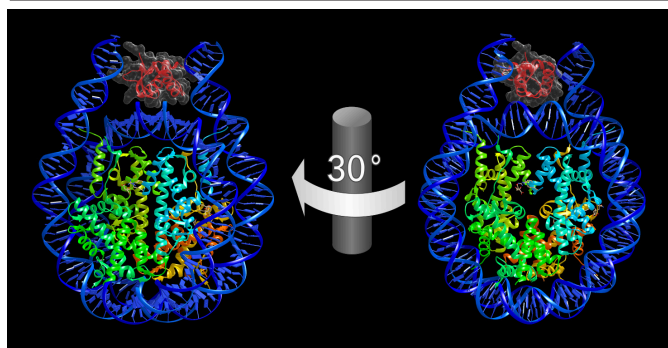
XRD - krystalografia rentgenowska; Cryo-EM - kriomikroskopia elektronowa.

evis wymodelowano na podstawie homologii do kurzego histonu H5, którego model obecny jest w bazie PDB (1HST), i zadokowano do nukleosomu z użyciem specjalistycznego oprogramowania (HADDOCK, Autodock-



Rycina 2. Struktura chromatosomu 5NL0 zdeponowana w bazie danych PDB. Wizualizacja w programie UCSF Chimera [70]. Kolorem czerwonym oznaczono histon H1. Odcieniami kolorów niebieskiego i zielonego oznaczono histony rdzeniowe.

-Vina). Otrzymany wynik pokrywał się z uzyskaną mapą gęstości elektronowej [62]. W opisywanej strukturze H1 łączy się do nukleosomu w trybie *on-dyad*. Za zaletę tej struktury można uznać obecność długiego (po 25 pz) łącznikowego DNA, formującego strukturę stem w obecności histonu H1.



Rycina 3. Struktura chromatosomu 4QLC zdeponowana w bazie danych PDB. Wizualizacja w programie UCSF Chimera [70]. Kolorem czerwonym oznaczono histon H1. Odcieniami kolorów błękitnego, zielonego i pomarańczowego oznaczono histony rdzeniowe.

STRUKTURA CHROMATOSOMU 4QLC

Inną strukturą chromatosomu jest rozwiązana przez Zhou i in. 4QLC (Ryc. 3) [57]. Posiada ona rozdzielczość 3,5 Å – wyższą niż 5NL0 – jednak charakteryzuje się krótszymi niż w tamtej strukturze DNA łącznikowymi (po 10 pz). Sekwencja histonów rdzeniowych pochodzi z *D. melanogaster*, zaś histonu łącznikowego – z *G. gallus* (wariant H5); wszystkie białka wyprodukowane zostały w *Escherichia coli*. Łańcuch DNA jest długości 167 pz, z czego 147 centralnych pz to sekwencja pozycjonująca „Widom 601”.

Podobnie jak w strukturze 5NL0 histon łącznikowy związany jest do nukleosomu w trybie *on-dyad*. Warto jednak zwrócić uwagę na zagięcie jednego z łącznikowych DNA.

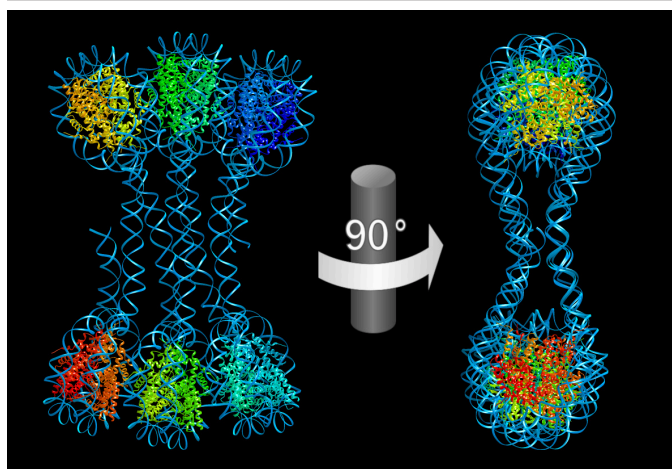
STRUKTURA HEKSACHROMATOSOMU 6HKT

W bazie danych PDB zdeponowano także bardziej złożoną strukturę – heksachromatosom (6HKT) (Ryc. 4) [66]. Mimo, że interpretacja położenia histonu łącznikowego nie była możliwa z uwagi na niską gęstość elektronową (mogącą wynikać z lokalizowania się H1 po dwóch stronach osi symetrii nukleosomu [66]), histon ten był obecny na nukleosomach podczas dokonywania pomiarów. Struktura ta nie jest zatem heksanukleosomem, jak mogłoby się wydawać, a heksachromatosomem o nieznanym położeniu H1. Obecność histonu łącznikowego można zidentyfikować obserwując charakterystyczną strukturę *stem* formowaną przez łącznikowe DNA.

W modelu tym wykorzystano ludzkie histony rdzeniowe, histon łącznikowy *X. laevis* w wariantcie H1.0b oraz sześciokrotnie powtórzoną sekwencję DNA „Widom 601”. Uzyskana struktura ma rozdzielczość 9,4 Å [67].

MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE H1

Histony łącznikowe, podobnie jak rdzeniowe, są modyfikowane potranslacyjnie. Ogony H1 zawierają specyficzne miejsca (ang. *regulatory hotspots*), ulegające licznym modyfikacjom potranslacyjnym (ang. *post-translational modification*, PTM) i pełniące ważne funkcje regulacyjne [19]. Mody-



Rycina 4. Struktura heksachromatosomu 6HKT zdeponowana w bazie danych PDB. Wizualizacja w programie UCSF Chimera [70]. Kolorem błękitnym oznaczono DNA. Pozostałymi kolorami oznaczono histony rdzeniowe.

fikacje te uczestniczą m.in. w regulacji cyklu komórkowego [68], regulacji transkrypcji genów [12], decydują o stopniu upakowania DNA [12], wpływają na oddziaływania z białkami [69] a także prawdopodobnie na sposób wiązania się H1 do nukleosomu [1].

FOSFORYLACJA H1

Fosforylacja jest jedną z pierwszych opisanych PTM histonów [70]. Nadaje ona ładunek ujemny resztom AA i wpływa na wiele procesów związanych ze zmianami struktury chromatyny podczas cyklu komórkowego [68].

Odpowiedzialne za wiązanie DNA motywy (S/T)PxK, a konkretnie seryna lub treonina, są celem kinaz CDK i ulegają fosforylacji zależnie od fazy cyklu komórkowego [14]. W komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) podczas fazy G1 na histonie H1 obecna jest średnio jedna reszta fosforanowa, w fazie S i G2 – 3 takie reszty, natomiast podczas mitozy na histonie H1 znajduje się średnio 6 reszt fosforanowych. Podczas telofazy następuje całkowita defosforylacja tego białka, oznaczająca początek kolejnego cyklu komórkowego [68].

Uważa się także, że fosforylacja H1 wpływa na kondensację chromosomów podczas mitozy [29] oraz że może ona funkcjonować jako wczesny mechanizm indukujący przebudowę chromatyny, aktywację genów oraz replikację i naprawę DNA [26].

Również w motywach ARKS fosforylacja odgrywa ważną rolę, o czym wspomnieliśmy wcześniej [19]. W histonach łącznikowych fosforylowane mogą być także reszty aminokwasowe nie znajdujące się w żadnym z wymienionych motywów – wiele z takich reszt znajduje się np. w NTD wariantu H1.2 u *A. thaliana* [14].

U *T. thermophila*, w przeciwieństwie do większości eukariontów, odpowiednik H1 w makronukleusie jest silnie ufosforylowany w interfazie, a uniemożliwienie tej fosforylacji nie jest letalne dla komórek [29]. Z drugiej strony, konstytutywna fosforylacja wspomnianego białka skutkuje fenotypem charakterystycznym dla osobników całkowicie go pozbawionych. Dzieje się tak wskutek neutralizacji ładunku odpowiedzialnego za silniejsze oddziaływanie z DNA [71]. Prawdopodobnie fosforylacja odpowiednika H1 u tego organizmu zmienia sposób jego oddziaływania z chromatyną, co prowadzi do aktywacji lub represji transkrypcyjnej niektórych genów [72].

U śluzowca *Physarum polycephalum* nadmierna fosforylacja H1 wywołuje zmiany fenotypowe, deregulując występującą naturalnie ścisłą synchronizację cyklu komórkowego i przyczyniając się do przedwczesnego rozpoczęcia replikacji DNA [73]. Spekuluje się, że modyfikacja ta promuje jego odłączenie się od chromatyny, co pozwala na utworzenie widełek replikacyjnych.

ACETYLACJA H1

Acetylacja polega na dołączeniu grupy acetylowej do wolnej reszty aminowej w białku. Najczęściej tej PTM ule-

ga łańcuch boczny lizyny lub N-koniec białka, a dołączona grupa acetylowa neutralizuje dodatni ładunek grupy aminowej. Acetylacja lizyny, w przeciwieństwie do acetylacji N-końca, jest odwracalna [74]. Wykazano, że w komórkach człowieka modyfikacji tej ulega N-koniec wszystkich kanonicznych wariantów H1 oraz H1.X [67] i H1.0 [20]; w tkankach myszy acetylację N-końca H1 potwierdzono dla wariantów kanonicznych, H1.0 oraz H1t [20]; modyfikację tą stwierdzono także w obu wariantach somatycznych H1 u *A. thaliana* [14].

Hystony acetylowane są przez acetylotransferazy histonowe (HATs), ostatnio określane także jako acetylotransferazy lizynowe (KATs) ze względu na modyfikowane przez nie białka niebędące histonami [74]. Enzymy te, modyfikując reszty lizyny, zmieniają ich powinowactwo do DNA oraz zdolność do oddziaływania z innymi białkami. Acetylacja usuwana jest przez deacetylazy histonowe (HDACs), również określane jako deacetylazy lizynowe (KDACs) [74].

Modyfikacji tej ulegają reszty GH1 wskazane przez Goytisoló i in. [60] jako uczestniczące w oddziaływaniu H1 z nukleosomem [20]. Poza domeną globularną tę PTM wykryto w NTD oraz CTD [20]. Poszczególne warianty histonu łącznikowego różniły się między sobą liczbą acetylowanych reszt aminokwasowych – w przeprowadzonym badaniu najwięcej z nich zidentyfikowano w H1.4 człowieka [20].

Obecność H1 na nukleosomie hamuje acetylację histonu H3 przez PCAF (ang. *p300/CREB-binding protein(CBP)-associated factor*), prawdopodobnie wskutek powstawania zawady sterycznej poprzez osłonięcie H3 przez ogony H1. Mimo że komórkowa PCAF – występująca w kompleksie z innymi białkami – potrafi ominąć tę zawadę, obecność H1 wciąż jest czynnikiem ograniczającym acetylację H3 i tym samym rozluźnienie chromatyny [75].

KROTONYLACJA H1

Obecność reszt krotonylowych dołączonych do lizyny w histonach została zidentyfikowana w 2011 roku; pośród krotonylowanych histonów znalazł się także H1 [76]. Okazało się, że modyfikacja ta szczególnie często występuje na histonach w regionach promotorów i wzmacniaczy (ang. *enhancers*) aktywnych transkrypcyjnie genów [76] a nawet, że promuje ona ekspresję genów silniej od acetylacji [77], która uważana jest za modyfikację charakterystyczną dla aktywnych regionów chromatyny.

Krotonylacja okazała się być modyfikacją nanoszoną i usuwaną z histonów za pomocą tych samych białek co acetylacja. Acetylotransferazy i deacetylazy histonowe okazały się być – odpowiednio – krotonylotransferazami i dekrotonylazami [78]. Analogicznie, białka odczytujące informację o acetylacji (ang. *readers*) okazały się również wykazywać powinowactwo do krotonylacji [78], a posiadające domenę YEATS białko AF9 wykazywało do niej nawet większe powinowactwo niż do acetylacji [79], z której rozpoznawaniem głównie kojarzona jest ta domena.

N^ε-FORMYLACJA LIZYNY W H1

W warunkach stresu oksydacyjnego w histonach do grupy aminowej w łańcuchu bocznym lizyny dołączana bywa reszta formylowa. Dzieje się to najprawdopodobniej wskutek reakcji transacylacji z 3'-formylofosforanem – produktem 5'-oksydacji deoksyrybozy [80]. Ze względu na bezpośrednie oddziaływanie z DNA histony są szczególnie podatne na uleganie tej PTM – najczęściej modyfikowanym histonem jest H1 [54]. Formylacji ulegają lizyny zarówno w ogonach, jak i w domenie globularnej tego histonu [54].

W komórkach limfoblastoidalnych człowieka (TK6) w warunkach hodowlanych modyfikacji tej ulegało 0,04–0,1% lizyn należących do białek rozpuszczalnych w środowisku kwasowym, zaś w warunkach stresu oksydacyjnego wartość ta wzrastała kilkukrotnie [80]. Uważa się, że N^ε-formylacja lizyny w histonach łącznikowych zachodzi najczęściej w miejscach odpowiedzialnych za oddziaływanie z DNA, a modyfikacja ta – jako że ulegają jej ważne pozycje aminokwasowe, których inne modyfikacje, a głównie metylacja i acetylacja, uczestniczą w regulacji funkcji chromatyny – może prowadzić do deregulacji ważnych procesów komórkowych, a w konsekwencji do chorób [54].

INNE ACYLACJE H1

Histon H1 ulega także innym, słabo dotąd poznanym acylacjom. Jak dotąd, w histonach łącznikowych w mózgu myszy zidentyfikowano także propionylację [14]. W histonach rdzeniowych zaś wykryto również acylacje takie jak butyrylacja, bursztynylacja czy malonylacja [14], możliwe więc, że wkrótce modyfikacje te zostaną również zidentyfikowane w histonach łącznikowych.

MONOMETYLACJA H1

Monometylacja lizyny jest modyfikacją rzadko występującą w zwierzęcych H1 [14]. Modyfikacja ta może jednak wpływać na stopień kondensacji DNA – białko HP1 łączy się ze zmetylowaną resztą lizyny w motywie ARKS w domenie NTD H1.4 [19].

Monometylowane reszty H1 są bardziej popularne w *A. thaliana* – badanie z wykorzystaniem spektrometrii mas (MS) wykazało, że w wariantcie H1.2 pojedynczej metylacji mogą ulegać dwie lizyny w CTD, a także reszta asparaginy w GH1, co jest modyfikacją nie spotykaną wcześniej w histonach [14].

DIMETYLACJA H1

Częstość występowania dimetylacji lizyny w histonach trudno oszacować z uwagi na podobieństwo jej masy do N^ε-formylacji. Z powodu częstego występowania i stosunkowo późnej identyfikacji tej ostatniej, liczba opisanych dimetylacji może być mocno przeszacowana, gdyż w badaniach z użyciem MS najprawdopodobniej formylacja była często mylona z dimetylacją [14]. W najpowszechniej występującym wariantcie histonu łącznikowego *A. thaliana* (H1.2) modyfikacja ta występuje na C-końcu CTD [14].

MONOUBIKWITYNACJA H1

Ubikwityna – białko o długości 76 AA i masie ok. 8,6 kDa – może być dołączane do innych peptydów w komórce. Ubikwitynacji mogą ulegać wolne reszty aminowe tworząc wiązanie peptydowe z C-końcem ubikwityny [81].

Dołączanie ubikwityny do H1 zachodzi między innymi wskutek aktywności TAF-1. Białko to katalizuje monoubikwitynację H1 – w przeprowadzonych badaniach na komórkach raka piersi MCF7 wykazano, że histony H1.2, H1.3 oraz H1.4 były ubikwitynowane w pozycji K46, co wiązało się z aktywacją transkrypcji [20,81]. Co ciekawe, warianty H1.0, H1x, H1t, a także H1.1 nie posiadają lizyny we wspomnianej pozycji, nie były więc w niej modyfikowane – wykazano jednak, że do H1.1 ubikwityna dołączana była do K116 [20].

POLIUBIKWITYNACJA H1

Ubikwityna może być także dołączona do jednej z siedmiu reszt lizyny w innej części ubikwityny. Poliubikwitynacja peptydów pełni wiele istotnych funkcji. Łańcuchy połączone ze sobą poprzez K63 oraz M1 często stanowią miejsce wiązania dla innych białek – np. związanych z naprawą DNA czy przekazywaniem sygnału odpowiedzi immunologicznej [81,82] – natomiast łańcuch cząsteczek ubikwityny połączonych ze sobą w inny sposób, np. poprzez K48, najczęściej jest sygnałem kierującym do degradacji przez proteasom [81].

Poliubikwitynacja H1 zachodzi w odpowiedzi na dwuniciowe pęknięcie genomowego DNA i jest ważnym znacznikiem umożliwiającym maszynierii naprawczej rozpoznanie uszkodzenia [82]. Dołączony do H1 łańcuch K63-poliubikwityny stanowi ważne miejsce wiązania czynników naprawy materiału genetycznego – zmniejszenie ekspresji lub powinowactwa do chromatyny H1 skutkowało mniejszą skutecznością naprawy dwuniciowych pęknięć DNA [82]. Ponadto wykazano, że K63-poliubikwitynację histonów: H1 oraz H2A katalizują dwa osobne, rozpoznające tylko dany histon enzymy [82].

SUMOILACJA H1

SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) jest konserwowanym ewolucyjnie białkiem długości około 100 AA [83]. W organizmie człowieka wykryto cztery jego warianty. Wariant 1 wykazuje ok. 47% identyczności sekwencji z wariantami 2 i 3, które z kolei różnią się między sobą tylko kilkoma pozycjami AA na N-końcu [84]. Wariant 1 zazwyczaj dołączany jest do białek pojedynczo, zaś 2 oraz 3 tworzą łańcuchy [84]. Udowodniono, że do histonów łącznikowych dołączany jest wariant 1 [84].

Białko SUMO najczęściej dołączane jest do lizyny w motywie $\Psi Kx[D/E]$ (gdzie Ψ oznacza duży hydrofobowy aminokwas); możliwe jest także występowanie motywu odwróconego, tj. $[D/E]xK\Psi$ [85]. W motywie tym obecność aminokwasów o charakterze kwasowym odgrywa kluczową rolę, a jego substytucja za pomocą alaniny całkowicie eliminuje sumoilację [86]. W ludzkim H1.3 sumoilacji ulega

jednak lizyna w motywie VKKP [84] – posiadającym prolinę w miejscu aminokwasu kwasowego. Nietypowa sekwencja sumoilacji wiąże się najprawdopodobniej z rzadkim występowaniem w białkach histonowych aminokwasów o charakterze kwasowym.

Mimo, że białko SUMO jest w swojej budowie podobne do ubikwityny, a mechanizmy sumoilacji i ubikwitynacji w większości dzielą te same ścieżki metaboliczne [84], sumoilacja generuje odmienny sygnał od ubikwitynacji. W przeciwieństwie do tej ostatniej, nie jest ona związana z degradacją peptydów, ale uczestniczy w procesach takich jak kierowanie ich do odpowiedniego przedziału komórkowego czy oddziaływania białko-białko [87]. Modyfikacje te posiadają niekiedy właściwości antagonistyczne – sumoilacja danego białka może zapobiegać jego ubikwitynacji [88]. Zdarza się jednak, że współdziałają one w ramach jednego procesu, co ma miejsce np. w reakcji na stres toksyczny [84]. Mimo przypadków, w których sumoilacja aktywuje transkrypcję genów, uważa się, że zazwyczaj przyczynia się ona do jej represji [88].

MONO(ADP-RYBOZYLACJA) H1

Reszty glutaminianu, argininy, a także prawdopodobnie fosfoseryny [89] w H1 mogą być modyfikowane poprzez dołączenie pojedynczej reszty ADP-rybozy. Mono(ADP-rybozylacja) glutaminianu uważana jest za modyfikację zarezerwowaną u eukariontów dla białek jądra komórkowego [89]. Możliwe, że jest ona odpowiedzią na stres genotoksyczny, gdyż w poddanych mu komórkach liczba tak zmodyfikowanych histonów wzrasta od 3 do 15 razy [89] zaś H1 ulega mono(ADP-rybozylacji) ponad 30-krotnie częściej [90]. Uznaje się jednak, że na częstość zachodzenia tej modyfikacji może mieć także wpływ faza cyklu komórkowego czy stopień zróżnicowania komórki [89].

POLI(ADP-RYBOZYLACJA) H1

Poli(ADP-rybozylacja) H1 polega na dołączeniu do glutaminianu lub lizyny [91,92] łańcucha PAR przez polimerazę PARP (PAR polymerase) wykorzystującą NAD^+ jako substrat. Polimer ten może tworzyć łańcuchy proste lub rozgałęzione [89], a jego dołączenie do histonu łącznikowego może być odpowiedzią komórki na uszkodzenia DNA [89,93]. Wykazano, że choć w niestymulowanych komórkach aktywność PARP jest bardzo niska, to w warunkach mitozy lub stresu genotoksycznego wzrasta ona od 10 do 500 razy. Czas półtrwania łańcuchów PAR powstałych w wyniku odpowiedzi na stres wynosi jednak mniej niż 40 s, podczas gdy czas półtrwania łańcuchów syntetyzowanych konstytutywnie wynosi 7,7h [89] – uważa się, że w warunkach stresowych degradacja PAR zachodzi natychmiast po syntezie.

Łańcuchy PAR mogą współzawodniczyć z DNA o wiązanie z histonami. Przypuszczano, że – jako że PAR niesie większy ładunek ujemny niż DNA – bogate w zasadowe reszty aminokwasowe histony będą preferencyjnie się z nim łączyć. Wykazano jednak, że chociaż histon H1 tworzy kompleksy z poli(ADP-rybozą) to jego powinowactwo do DNA jest większe niż do niej. Co ciekawe, inne histony nie

podzielają tych właściwości; np. H3 wykazuje takie samo powinowactwo do PAR i do DNA, natomiast H4 preferencyjnie łączy się z PAR [93].

Z wymienionych powodów poli(ADP-rybozylacja) histonów promuje rozluźnienie struktury chromatyny [92]. Postuluje się, że synteza PAR zmniejsza upakowanie materiału genetycznego w jądrze, czym ułatwia czynnikiem naprawczym dostęp do uszkodzonego DNA.

INNE MODYFIKACJE H1

W histonach łącznikowych *A. thaliana* zidentyfikowano także nie obserwowane wcześniej w histonach PTM. Nie określono dotąd jednoznacznie natury wszystkich z nich; na podstawie danych MS podejrzewa się jednak, że wśród nierozpoznanych modyfikacji może znajdować się fosfoglicerylacja, priopionylacja czy występująca u archeonów metylopirolinylacja [14].

FUNKCJE H1 W CHROMATYNIE

Rola H1 w procesach związanych z chromatyną nie jest w pełni wyjaśniona. Stosunek liczbowy histonów łącznikowych do nukleosomów zależy od rodzaju komórek i może przyjmować bardzo odmienne wartości [94]. Niekiedy liczba H1 jest mniejsza od liczby nukleosomów, a więc w danym momencie nie do każdego z nich musi być przyłączony H1. Dawniej uważano, że histon ten wiąże do nukleosomu w sposób stabilny, a jego wymiana zachodzi rzadko. Badania z wykorzystaniem metody FRAP udowodniły jednak, że histony łącznikowe opuszczają nukleosomy zazwyczaj po minucie lub dwóch od związania się z nimi [2,53]. Oprócz natury oddziaływania H1 z nukleosomem zastanawiano się nad rolą histonu łącznikowego w regulacji transkrypcyjnej genów. Przez długi czas uważano, że H1 odpowiedzialny jest głównie za ich wyciszenie, jednak obecnie wiadomo, że histon ten pełni dużo bardziej złożoną rolę [95]. Udowodniono na przykład, że białko o funkcji histonu łącznikowego u *Tetrahymena* może przyczyniać się do aktywacji transkrypcji: w przeprowadzonym eksperymencie mutacja typu *knock-out* jego genu nie tylko nie przyczyniła się – wbrew oczekiwaniom badaczy – do wzmożenia ekspresji większości genów u orzęska, ale poskutkowała spadkiem ekspresji niektórych z nich [29,32]. Podobnie zmniejszenie ilości H1 u *D. melanogaster* nie skutkowało masowym wzrostem ekspresji genów [95].

Uważa się również, że H1 preferencyjnie łączy się ze zmetylowanym DNA oraz że obecność niektórych jego wariantów hamuje metylację wysp CpG w promotorach [96]. W należącym do workowców grzybie *Ascobolus immersus* udowodniono, że histon H1 nie jest czynnikiem wymaganym do metylacji DNA, a jego usunięcie wiąże się z hipermetylacją obszarów ulegających tej modyfikacji w szczepie dzikim [97].

Ciekawych spostrzeżeń dostarczyły także badania na muszkach owocowych. W zarodkach *D. melanogaster* tryb wiązania histonu łącznikowego do nukleosomu miał wpływ na późniejsze jego przesunięcia względem DNA. Nukleosomy, do których H1 dołączył się po lewej stronie względem

osi symetrii przesunęły się na lewo podczas dalszego rozwoju owada, zaś te, w których H1 znalazł się z prawej strony – na prawo. Przesunięcie to prowadziło do ulokowania się histonu łącznikowego w osi symetrii nukleosomu [98]. W tym samym badaniu wykazano, że im intensywniejszej ekspresji ulega gen oraz im bliżej miejsca startu transkrypcji nukleosom się znajduje, tym rzadziej dołącza się do niego H1. Ponadto, histon łącznikowy lokuje się częściej na nukleosomach w 3'-końcu niż w 5'-końcu ciała genu. Dołączenie H1 do nukleosomu zaś zmniejsza prawdopodobieństwo jego przesuwania się [98].

FUNKCJE POZACHROMATYNOWE H1

Poza uczestnictwem w kondensacji chromatyny, histon H1 pełni w komórkach inne funkcje. U niektórych organizmów może stanowić on ośrodek organizacji mikrotubul wiciowych, co potwierdzono w gametach jeżowca i zielenicach *Chlamydomonas* [99]. Na pochodzących z tytoniu komórkach BY-2 wykazano zaś, że organizacja mikrotubul na powierzchni jądra komórkowego rozpoczyna się od przyłączonych do niej białek, zidentyfikowanych jako H1 [100]. Ważną hipotezą jest, że u nieposiadających centrosomów roślin wyższych H1 koordynuje proces organizacji mikrotubul z kondensacją chromosomów [101].

W komórkach myszy transport H1.2 do cytoplazmy skutkuje uwolnieniem cytochromu C z mitochondriów i indukcją apoptozy, a podobnego skutku nie wywołuje żaden inny wariant H1 [102].

Fragmenty histonu H1 w postaci 30 aminokwasów z domeny N-końcowej wykryto w śluzie łososia atlantyckiego *Salmo salar* i dowiedziono, że mają one właściwości hamujące rozwój mikroorganizmów [103]. Właściwości te nie zależą jednak prawdopodobnie od samej sekwencji aminokwasowej, gdyż syntetyczny peptyd o tej samej sekwencji wykazywał je dopiero po traktowaniu *cis-trans*-izomerazą peptydyloproliny [103].

H1 i jego fragmenty zidentyfikowano również w śluzie z przewodu pokarmowego człowieka. Próbkę pobrano z jelita krętego, które, jako że zawiera pokarm bogaty w substancje odżywcze, musi posiadać naturalne mechanizmy ograniczające wzrost mikroorganizmów bytujących licznie w sąsiadującym z nim jelicie grubym [104]. H1 syntetyzowany w cytoplazmie komórek nabłonka z kosmek jelitowych uwalniany jest do światła jelita najprawdopodobniej na drodze ich apoptozy [104].

PODSUMOWANIE

W porównaniu do histonów rdzeniowych, histon łącznikowy przez długi czas pozostawał słabo opisany. W ciągu ostatnich lat jednak sytuacja ta zmieniła się – pojawiło się wiele nowych publikacji i modeli kompleksu H1-nukleosom; mimo to niektóre kluczowe pytania, np. o sposób wiązania się H1 do nukleosomu *in vivo*, pozostają otwarte. Dogłębne poznanie funkcji H1 jest niezbędne do zrozumienia praw rządzących epigenetyką oraz do odkrycia powiązań pomiędzy strukturą chromatyny a procesami komórkowymi. Mimo że do kompleksowego opisanie tych

zależności potrzeba jeszcze wielu lat pracy, obserwując na bieżąco publikację naukowe, można śledzić jak coraz większa wiedza i doskonalsze metody pozwalają na odkrywanie kolejnych tajemnic tego interesującego białka.

PIŚMIENNICTWO

1. Brockers K, Schneider R (2019) Histone H1, the forgotten histone. *Epigenomics* 11:363–366
2. Brown DT, Izard T, Misteli T (2006) Mapping the interaction surface of linker histone H1.0 with the nucleosome of native chromatin *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* 13:250–255
3. Harshman SW, Young NL, Parthun MR, Freitas MA (2013) H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res* 41:9593–9609
4. Lu X, Hamkalo B, Parseghian MH, Hansen JC (2009) Chromatin condensing functions of the linker histone C-terminal domain are mediated by specific amino acid composition and intrinsic protein disorder. *Biochemistry* 48:164–172
5. Zhou B-R, Feng H, Kato H i in. (2013) Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. *Proc Natl Acad Sci* 110:19390–19395
6. Allan J, Hartman PG, Crane-Robinson C, Aviles FX (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 288:675–679
7. An W, Leuba SH, van Holde K, Zlatanova J (1998) Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci* 95:3396–3401
8. Pruss D, Bartholomew B, Persinger J i in. (1996) An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science* 274:614–617
9. Syed SH, Goutte-Gattat D, Becker N i in. (2010) Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci* 107:9620–9625
10. Zhou Y-B, Gerchman SE, Ramakrishnan V i in. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395:402–405
11. Jerzmanowski A, Archacki R (2017) Universal and lineage-specific properties of linker histones and SWI/SNF-chromatin remodeling complexes in plants. W: Rajewsky N, Jurga S, Barciszewski J (red) *Plant Epigenetics*. Springer International Publishing, Cham, str. 463–492
12. Hergeth SP, Schneider R (2015) The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep* 16:1439–1453
13. Happel N, Doenecke D (2009) Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1–12
14. Kotliński M, Rutowicz K, Kniżewski Ł i in. (2016) Histone H1 variants in *Arabidopsis* are subject to numerous post-translational modifications, both conserved and previously unknown in histones, suggesting complex functions of H1 in plants. *PLoS One* 11:e0147908
15. Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ (2008) Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* 9:843–854
16. Lyons SM, Cunningham CH, Welch JD i in. (2016) A subset of replication-dependent histone mRNAs are expressed as polyadenylated RNAs in terminally differentiated tissues. *Nucleic Acids Res* 9190–9205
17. Th'ng JPH, Sung R, Ye M, Hendzel MJ (2005) H1 family histones in the nucleus: control of binding and localization by the C-terminal domain. *J Biol Chem* 280:27809–27814
18. Hendzel MJ, Lever MA, Crawford E, Th'ng JPH (2004) The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin *in vivo*. *J Biol Chem* 279:20028–20034
19. Soshnev AA, Josefowicz SZ, Allis CD (2016) Greater than the sum of parts: complexity of the dynamic epigenome. *Mol Cell* 62:681–694
20. Wiśniewski JR, Zougman A, Krüger S, Mann M (2007) Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Mol Cell Proteomics* 6:72–87
21. Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS (1978) The Organization of the Histone Genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and Evolutionary Implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42:1047–1051
22. Pérez-Montero S, Carbonell A, Morán T i in. (2013) The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation. *Dev Cell* 26:578–590
23. Rutowicz K, Puzio M, Halibart-Puzio J i in. (2015) A specialized histone H1 variant is required for adaptive responses to complex abiotic stress and related DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 169:2080–2101
24. Rutowicz K, Lirski M, Mermaz B i in. (2019) Linker histones are fine-scale chromatin architects modulating developmental decisions in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 20:157
25. Georgieva M, Roguev A, Balashev K i in. (2012) Hho1p, the linker histone of *Saccharomyces cerevisiae*, is important for the proper chromatin organization *in vivo*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1819:366–374
26. Godde JS, Ura K (2008) Cracking the enigmatic linker histone code. *J Biochem (Tokyo)* 143:287–293
27. Yu Q, Kuzmiak H, Zou Y i in. (2009) *Saccharomyces cerevisiae* linker histone Hho1p functionally interacts with core histone H4 and negatively regulates the establishment of transcriptionally silent chromatin. *J Biol Chem* 284:740–750
28. Prieto E, Hizume K, Kobori T i in. (2012) Core histone charge and linker histone H1 effects on the chromatin structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:2261–2266
29. Mizzen CA, Dou Y, Liu Y i in. (1999) Identification and mutation of phosphorylation sites in a linker histone: phosphorylation of macro-nuclear H1 is not essential for viability in *Tetrahymena*. *J Biol Chem* 274:14533–14536
30. Gorovsky MA (1973) Macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*: a model system for studying the structure and function of eukaryotic nuclei. *J Protozool* 20:19–25
31. Wu M, Allis CD, Richman R i in. (1986) An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8674–8678
32. Shen X, Yu L, Weir JW, Gorovsky MA (1995) Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*. *Cell* 82:47–56
33. Wu M, Allis CD, Sweet MT i in. (1994) Four distinct and unusual linker proteins in a mitotically dividing nucleus are derived from a 71-kilodalton polyprotein, lack p34^{cdc2} sites, and contain protein kinase A sites. *Mol Cell Biol* 14:10–20
34. Qiao J, Xu J, Bo T, Wang W (2017) Micronucleus-specific histone H1 is required for micronuclear chromosome integrity in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS One* 12:e0187475
35. Vila R, Ponte I, Collado M i in. (2001) DNA-induced alpha-helical structure in the NH2-terminal domain of histone H1. *J Biol Chem* 276:46429–46435
36. Roque A, Iloro I, Ponte I i in. (2005) DNA-induced secondary structure of the carboxyl-terminal domain of histone H1. *J Biol Chem* 280:32141–32147
37. Roque A, Ponte I, Suau P (2017) Post-translational modifications of the intrinsically disordered terminal domains of histone H1: effects on secondary structure and chromatin dynamics. *Chromosoma* 126:83–91
38. Sridhar A, Orozco M, Collepardo-Guevara R (2020) Protein disorder-to-order transition enhances the nucleosome-binding affinity of H1. *Nucleic Acids Res* 48:5318–5331
39. The UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47:D506–D515
40. Böhm L, Mitchell TC (1985) Sequence conservation in the N-terminal domain of histone H1. *FEBS Lett* 193:1–4
41. Allan J, Mitchell T, Harborne N i in. (1986) Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *J Mol Biol* 187:591–601

42. Fischle W, Wang Y, David Allis C (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425:475–479
43. Calo E, Wysocka J (2013) Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* 49:825–837
44. Vila R, Ponte I, Jiménez MA i in. (2002) An inducible helix-Gly-Gly-helix motif in the N-terminal domain of histone H1e: a CD and NMR study. *Protein Sci Publ Protein Soc* 11:214–220
45. Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA i in. (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci* 95:14173–14178
46. Lu X, Hansen JC (2004) Identification of specific functional subdomains within the linker histone H1.0 C-terminal domain. *J Biol Chem* 279:8701–8707
47. Maeder DL, Bohm L (1991) The C-domain in the H1 histone is structurally conserved. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 1076:233–238
48. Subirana JA (1990) Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interaction with DNA. *Biopolymers* 29:1351–1357
49. Hutchinson JB, Cheema MS, Wang J i in. (2015) Interaction of chromatin with a histone H1 containing swapped N- and C-terminal domains. *Biosci Rep* 35:e00209
50. Kasinsky HE, Lewis JD, Dacks JB, Ausl6 J (2001) Origin of H1 linker histones. *FASEB J* 15:34–42
51. Harami GM, Gyimesi M, Kovács M (2013) From keys to bulldozers: expanding roles for winged helix domains in nucleic-acid-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 38:364–371
52. Zhou B-R, Feng H, Ghirlando R i in. (2016) A small number of residues can determine if linker histones are bound on or off dyad in the chromatosome. *J Mol Biol* 428:3948–3959
53. Flanagan TW, Brown DT (2016) Molecular dynamics of histone H1. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1859:468–475
54. Wiśniewski JR, Zougman A, Mann M (2008) N^ε-formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. *Nucleic Acids Res* 36:570–577
55. Zhou B-R, Feng H, Kale S i in. (2021) Distinct structures and dynamics of chromatosomes with different human linker histone isoforms. *Mol Cell* 81:166–182
56. Zhou B-R, Jiang J, Ghirlando R i in. (2018) Revisit of reconstituted 30-nm nucleosome arrays reveals an ensemble of dynamic structures. *J Mol Biol* 430:3093–3110
57. Zhou B-R, Jiang J, Feng H i in. (2015) Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones. *Mol Cell* 59:628–638
58. Zhou B-R, Bai Y (2019) Chromatin structures condensed by linker histones. *Essays Biochem* 63:75–87
59. Perišić O, Portillo-Ledesma S, Schlick T (2019) Sensitive effect of linker histone binding mode and subtype on chromatin condensation. *Nucleic Acids Res* 47:4948–4957
60. Goytisolo FA, Gerchman SE, Yu X i in. (1996) Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *EMBO J* 15:3421–3429
61. George EM, Izard T, Anderson SD, Brown DT (2010) Nucleosome interaction surface of linker histone H1c is distinct from that of H1⁰. *J Biol Chem* 285:20891–20896
62. Bednar J, Garcia-Saez I, Boopathi R i in. (2017) Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1. *Mol Cell* 66:384–397
63. Luger K (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. 389:10
64. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC i in. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612
65. Evans P, McCoy A (2008) An introduction to molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64:1–10
66. Garcia-Saez I, Menoni H, Boopathi R i in. (2018) Structure of an H1-bound 6-nucleosome array reveals an untwisted two-start chromatin fiber conformation. *Mol Cell* 72:902–915
67. Garcia BA, Busby SA, Barber CM i in. (2004) Characterization of phosphorylation sites on histone H1 isoforms by tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 3:1219–1227
68. Gurley LR, Valdez JG, Buchanan JS (1995) Characterization of the mitotic specific phosphorylation site of histone H1. *J Biol Chem* 270:27653–27660
69. McBryant SJ, Lu X, Hansen JC (2010) Multifunctionality of the linker histones: an emerging role for protein-protein interactions. *Cell Res* 20:519–528
70. Stocken LA, Ord MG (1969) Histone changes and cell division. *Biochem J* 114:51
71. Dou Y, Gorovsky MA (2002) Regulation of transcription by H1 phosphorylation in *Tetrahymena* is position independent and requires clustered sites. *Proc Natl Acad Sci* 99:6142–6146
72. Dou Y, Mizzen CA, Abrams M i in. (1999) Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression *in vivo* by mimicking H1 removal. *Mol Cell* 4:641–647
73. Thiriet C, Hayes JJ (2009) Linker histone phosphorylation regulates global timing of replication origin firing. *J Biol Chem* 284:2823–2829
74. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T (2016) The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* 1864:1372–1401
75. Herrera JE, West KL, Schiltz RL i in. (2000) Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Mol Cell Biol* 20:523–529
76. Tan M, Luo H, Lee S i in. (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146:1016–1028
77. Sabari BR, Tang Z, Huang H i in. (2018) Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol Cell* 69:533
78. Wan J, Liu H, Chu J, Zhang H (2019) Functions and mechanisms of lysine crotonylation. *J Cell Mol Med* 23:7163–7169
79. Zhang Q, Zeng L, Zhao C i in. (2016) Structural insights into histone crotonyl-lysine recognition by the AF9 YEATS domain. *Structure* 24:1606–1612
80. Jiang T, Zhou X, Taghizadeh K i in. (2007) N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:60–65
81. Nakagawa T, Nakayama K (2015) Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes Cells* 20:543–562
82. Thorslund T, Ripplinger A, Hoffmann S i in. (2015) Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527:389–393
83. Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE i in. (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20:966–976
84. Matafora V, D'Amato A, Mori S i in. (2009) Proteomics analysis of nucleolar SUMO-1 target proteins upon proteasome inhibition. *Mol Cell Proteomics* 8:2243–2255
85. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA i in. (2010) Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol Cell* 39:641–652
86. Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B i in. (2014) Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol* 21:927–936
87. Hilgarth RS, Sarge KD (2005) Detection of SUMOylated proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 301:329–338
88. Hay RT (2005) SUMO. *Mol Cell* 18:1–12
89. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 70:789–829

90. Kreimeyer A, Wielckens K, Adamietz P, Hilz H (1984) DNA repair-associated ADP-ribosylation *in vivo*. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins. *J Biol Chem* 259:890–896
91. Ogata N, Ueda K, Kagamiyama H, Hayaishi O (1980) ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, and the COOH-terminal lysine residue as modification sites. *J Biol Chem* 255:7616–7620
92. Kiliańska ZM, Żołnierczyk J, Węsierska-Gądek J (2010) Biologiczna aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy)-1. *Postepy Hig Med Dosw* 64:344–363
93. Węsierska-Gądek J, Sauermann G (1988) The effect of poly(ADP-ribose) on interactions of DNA with histones H1, H3 and H4. *Eur J Biochem* 173:675–679
94. Bates DL, Thomas JO (1981) Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome? *Nucleic Acids Res* 9:5883–5894
95. Bayona-Feliu A, Casas-Lamesa A, Carbonell A i in. (2016) Histone H1: lessons from *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1859:526–532
96. Johnson CA, Goddard JP, Adams RL (1995) The effect of histone H1 and DNA methylation on transcription. *Biochem J* 305 (Pt 3):791–798
97. Barra JL, Rhounim L, Rossignol JL, Faugeron G (2000) Histone H1 is dispensable for methylation-associated gene silencing in *Ascobolus immersus* and essential for long life span. *Mol Cell Biol* 20:61–69
98. Hu J, Gu L, Ye Y i in. (2018) Dynamic placement of the linker histone H1 associated with nucleosome arrangement and gene transcription in early *Drosophila* embryonic development. *Cell Death Dis* 9:765
99. Multigner L, Gagnon J, Van Dorsselaer A, Job D (1992) Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. *Nature* 360:33–39
100. Nakayama T, Ishii T, Hotta T, Mizuno K (2008) Radial microtubule organization by histone H1 on nuclei of cultured tobacco BY-2 cells. *J Biol Chem* 283:16632–16640
101. Jerzmanowski A (2009) Chromatyna - strukturalne podłoże systemu epigenetycznego. *Post Biol Kom* 36:33–41
102. Konishi A, Shimizu S, Hirota J i in. (2003) Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 114:673–688
103. Lüders T, Birkemo GA, Nissen-Meyer J i in. (2005) Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone H1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of atlantic salmon. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2399–2406
104. Rose FRAJ, Bailey K, Keyte JW i in. (1998) Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* 66:3255–3263

Histone H1 – structure and function

Marta Kilichowska^{1,2}, Maciej Kotliński¹✉

¹Department of Systems Biology, Faculty of Biology, University of Warsaw

²Department of Crystallochemistry and Crystallophysics, Faculty of Chemistry, Jagiellonian University in Cracow

✉corresponding author: mkotl@ibb.waw.pl

Keywords: H1, linker histone, chromatin, chromatosome, nucleosome, posttranslational modifications

ABSTRACT

Linker histones (H1) are proteins found in the nuclei of the vast majority of Eucaryota, playing important roles in their life and development. H1 takes part in processes such as chromatin condensation, transcriptional regulation of gene expression, apoptosis induction and many more. Despite its common presence and essential function, many questions remain unanswered. Experiments conducted to date don't provide unambiguous information on such crucial issues as e.g. the way linker histones bind to nucleosome. There is also much surprising information about H1 participating in physiological processes not connected directly to its widely known function – e.g. providing a microtubule organization centre in plants or contributing to the defence against pathogens in fish. The objective of the present work is to provide insights into many aspects of linker histone structure and function, collect and systematize current knowledge and to outline questions worth answering in the future.

