

## IDENTYFIKACJA OBSZARÓW HETEROCHROMATYNOWYCH ORAZ REJONÓW JĄDERKOTWÓRCZYCH W CHROMOSOMACH KONIA

Ewa Wójcik, Katarzyna Andraszek, Elżbieta Smalec

Akademia Podlaska w Siedlcach

**Streszczenie.** Kariotyp konia domowego charakteryzuje diploidalna liczba chromosomów równa 64 (13 par metacentrycznych i submetacentrycznych, 18 par akrocentrycznych autosomów oraz para heterochromosomów). Satelity na jednej parze chromosomów i przewężenia wtórne na chromosomach 28 i 31 są widoczne i ułatwiają ich identyfikację bez barwień prążkowych. Celem badań była charakterystyka kariotypu konia pod względem wielkości i rozmieszczenia bloków heterochromatyny konstytutywnej oraz lokalizacji i liczby obszarów jąderkotwórczych. W chromosomach konia prążki C zlokalizowano w okolicach centromerowych wszystkich badanych chromosomów, z wyjątkiem jedenastej pary. Na chromosomie płci X, oprócz proksymalnego prążka C, obserwowano dodatkowy prążek w części interstycjalnej ramienia q. Chromosom Y był w 44% heterochromatynowy. Aktywne NOR zidentyfikowano w terminalnych częściach ramienia pierwszej pary chromosomów oraz w subcentromerowej części ramienia q par 28. i 31. Średnia liczba NOR w komórce wynosiła  $3,61 \pm 1,03$ . Najczęściej obserwowano komórki posiadające trzy lub cztery aktywne NOR.

**Słowa kluczowe:** heterochromatyna, kariotyp, koń, NOR, obszary jąderkotwórcze, prążki C

### WSTĘP

Aktualny, międzynarodowy wzorzec kariotypu konia opracowano we Francji, w Jouy-Josas, w roku 1989. Jest to jedyny standaryzowany kariotyp dla gatunku *Equus caballus* od czasu powołania programów standaryzacji kariotypów zwierząt domowych na I Międzynarodowej Konferencji Standaryzacji Prążkowych Kariotypów Zwierząt Domowych w Reading w Anglii, w 1980 roku [Richer i in. 1990]. Diploidalna liczba chromosomów konia domowego (*Equus caballus*) wynosi  $2n = 64$ . Spośród 32 par chromosomów 31 stanowią autosomy (13 par metacentrycznych i submetacentrycznych oraz 18 par akrocentrycznych). Trzydziestą drugą parą są chromosomy płci. Chromosom X jest jednym z większych chromosomów w kariotypie, chromosom Y jednym z najmniejszych [McFelly 1990, Richer i in. 1990, Bowling i in. 1997].

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr inż. Ewa Wójcik, Katedra Genetyki i Hodowli Koni, Akademia Podlaska, ul. B. Prusa 14, 08–110, Siedlce, wojcik@ap.siedlce.pl

Chromosomy u konia można zidentyfikować przy użyciu barwienia prążkowego, jednak pewne cechy morfologiczne, takie jak satelity na pierwszej parze chromosomów czy przewężenia wtórne na dwóch parach chromosomów akrocentrycznych, to jest 28. i 31. są widoczne i ułatwiają ich identyfikację bez barwień prążkowych [McFelly 1990, Kubiś 1992, Kubiś i Opiela 2002]. Najwięcej informacji na temat kariotypu określonego gatunku można uzyskać podczas bezpośredniej obserwacji chromosomów uzyskiwanych z dzielących się komórek. Analizę cytogenetycznej identyfikacji chromosomów homologicznych przeprowadza się na podstawie różnych technik prążkowania replikacyjnego bądź strukturalnego, ujawniającego specyficzne obszary chromosomu, takie jak heterochromatyna konstytutywna (CBG) czy obszary jąderkotwórcze – (ang. Nucleolar Organizer Regions) – NOR [Holmquist 1992].

Strukturalną częścią prążków C jest heterochromatyna konstytutywna, która jest późno replikująca i bardzo polimorficzna oraz zawiera bardzo niewiele genów. Ponadto stwierdzono, że DNA znajdujące się w blokach heterochromatyny konstytutywnej jest rejonem niewykazującym genetycznej ekspresji [Zuckerlandl i Hennig 1995, Arrighi i Brown 1996]. Według Manueldisa [1990], Jenuweina [2001], Spectora [2003] heterochromatyna konstytutywna charakteryzuje się wysokim stopniem kondensacji, zbliżonym do współczynnika upakowania chromosomu metafazowego. Kondensacja heterochromatyny konstytutywnej wynika z modyfikacji nici DNA, to jest metylacji w obrębie wysp CpG oraz potranslacyjnych modyfikacji histonów rdzenia nukleosomu [Wegel i in. 2005]. Heterochromatyna konstytutywna w poszczególnych chromosomach może różnić się wielkością zajmowanego obszaru. W chromosomach płci stwierdzono jednak różnice dotyczące molekularnej natury heterochromatyny konstytutywnej. W chromosomie X prążek C wybarwia się chromomycyną, a zatem jest bogaty w pary G-C, natomiast heterochromatyna chromosomu Y nie wykazuje powinowactwa do żadnego z barwników fluorescencyjnych i ujawniana jest jedynie techniką prążków C.

Podstawową funkcją heterochromatyny jest tłumienie transkrypcji i rekombinacji powtarzalnych sekwencji DNA. Zdolność heterochromatyny konstytutywnej do wpływania na organizację jądra została wykorzystana ewolucyjnie do wywoływania interakcji między elementami regulacyjnymi, które są zdolne do wywierania regionalnej kontroli na odległość i ich docelowych *loci*. Białka, tworzące strukturalną organizację heterochromatyny, bezpośrednio uczestniczą w aktywacji genów [Grewal i Jia 2007]. Białka heterochromatynowe związane z transkrybowanymi genami modyfikują strukturę chromatyny po procesie transkrypcji, co jest konieczne, by uniknąć błędnych transkryptów z krytycznych miejsc startowych, dzięki czemu zostaje utrzymana integralność genomu [Carrozza i in. 2005]. Heterochromatyna konstytutywna współdziała z wieloma białkami i kompleksami efektorowymi, które zaznaczają i potęgują początek replikacji [Murzina i in. 1999, Maison i Almouzni 2004]. Heterochromatyna ułatwia angażowanie tych białek w regulacji replikacji i promowaniu dziedziczenia epigenicznego, również pośredniczy we właściwej segregacji chromosomów. Wady w tworzeniu heterochromatyny oddziałują na regiony pericentryczne, powodując niewłaściwą segregację. Heterochromatyna centromerowa ułatwia segregację achiasmaticzną chromosomów podczas mejozy [Karpen i in. 1996, Bernard i in. 2001]. Podczas podziału tworzy asocjacje w ciągu całej profazy

I aż do metafazy I, co jest szczególnie ważne przy niewielkiej ilości tworzących się w tym rejonie chiazm lub ich zupełnym braku. Przypisuje się jej także rolę w ukierunkowaniu przemieszczania się chromosomów homologicznych do dwóch biegunów wrzecionowa podziałowego [Dernburg i in. 1996]. Heterochromatyna składająca się z powtarzalnych sekwencji satelitarnego DNA o dużym stopniu konserwatywności mogła mieć znaczenie w procesach ewolucji, prowadzących do różnicowania się podgatunków.

Obszary jąderkotwórcze zorganizowane są jako bloki tandemowo powtarzających się jednostek, których rozmieszczenie, tj. liczba *loci* chromosomowych i liczba genów w każdym *locus*, jest cechą stałą i charakterystyczną dla danego gatunku [Weisenberger i Scheer 1995]. Standardową metodą stosowaną w analizie obszarów jąderkotwórczych jest barwienie z wykorzystaniem azotanu srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) w roztworze ochronnym formaliny [Goodpasture i Bloom, 1975] lub żelatyny [Howell i Black 1980]. Podstawą stosowania tej metody jest powinowactwo NOR do metali ciężkich. W efekcie wysrebrzenia ujawniają się żółtobrazowe chromosomy z czarnymi depozytami srebra odpowiadającymi lokalizacji obszarów jąderkotwórczych. Barwienie azotanem srebra nie ujawnia wszystkich obszarów zawierających geny rRNA, lecz tylko miejsca aktywne przy tworzeniu jąderka w poprzedzającej mitozę interfazie [Babu i Verma 1985, Verma i Babu 1995].

Epigenetyczne mechanizmy działające na poziomie metylacji DNA i modyfikacji histonów zmieniają strukturę chromatyny i kontrolują wzajemny stosunek aktywnych i nieaktywnych genów rRNA. Geny kodujące rRNA istnieją w dwóch formach. Ich konformacja „otwarta” jest aktywna transkrypcyjnie, natomiast konformacja „zamknięta” jest związana z tzw. procesem załamania transkrypcji. Ostatnie badania dowiodły, że wyciszaniu mogą ulegać całe rejony NOR lub tylko niektóre geny organizatorów jąderka [Grummt i Pikaard 2003].

Analiza preparatów barwionych w kierunku identyfikacji NOR wykazała zróżnicowane wielkości depozytów srebra w obrębie pary chromosomów homologicznych. Cecha ta występuje we wszystkich analizowanych metafazach i podlega dziedziczeniu mendelowskiemu. Zmienność ta, podobnie jak zmienność wielkości bloków heterochromatyny konstytutywnej, jest traktowana jako polimorfizm chromosomowy, a warianty różniące się wielkością NOR lub prążków C traktowane są jako markery chromosomowe.

Celem badań była charakterystyka kariotypu konia pod względem wielkości i rozmieszczenia bloków heterochromatyny konstytutywnej oraz lokalizacji i liczby obszarów jąderkotwórczych.

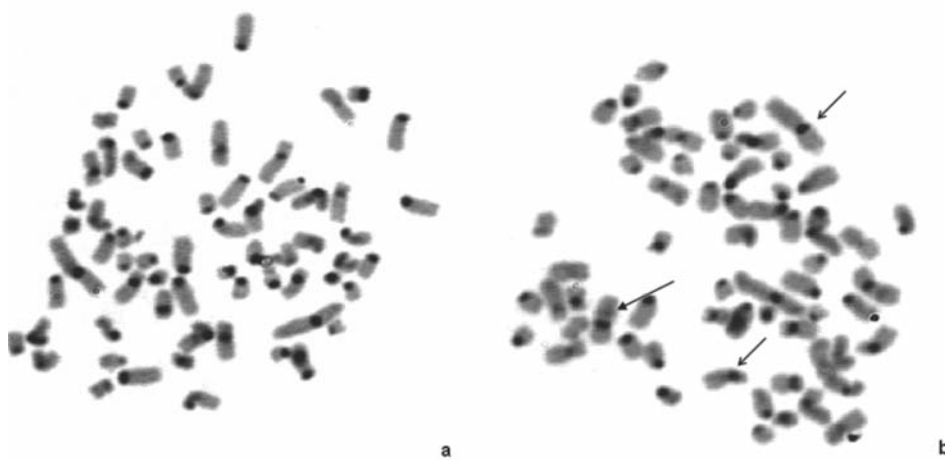
## MATERIAŁ I METODY

Aby osiągnąć cel analizowano budowę morfologiczną chromosomów, układ bloków heterochromatyny konstytutywnej oraz identyfikowano rejony jąderkotwórcze NOR w chromosomach konia domowego. Materiałem doświadczalnym była krew obwodowa 10 koni. Preparaty chromosomowe, uzyskane z prowadzonej *in vitro* hodowli limfocytów

krwi obwodowej, poddano dwóm standardowym technikom barwienia: CBG [Sumner 1972] i Ag-NOR [Howell i Black 1980]. Szczegółowym analizom cytogenetycznym poddano 20 płytek metafazowych uzyskanych od każdego osobnika. W chromosomach analizowano lokalizację i wielkość prążków heterochromatynowych oraz liczbę i lokalizację NOR. Uzyskane wyniki scharakteryzowano statystycznie.

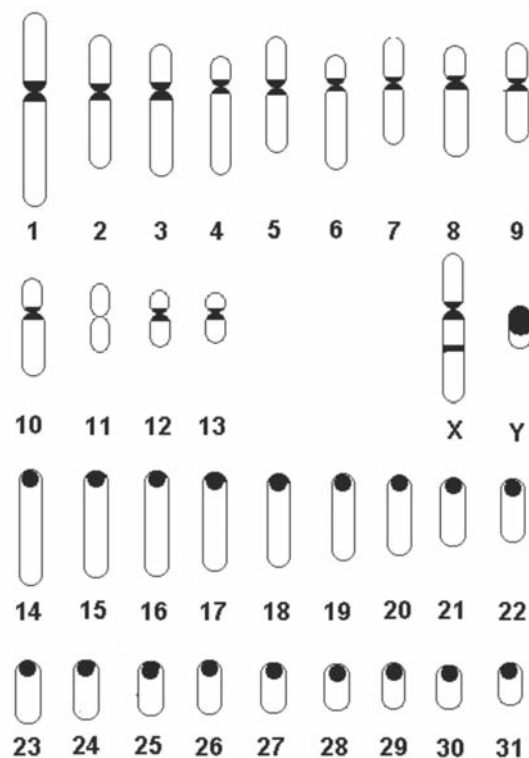
## WYNIKI

Zastosowana technika CBG umożliwiła określenie wzoru prążków C na chromosomach konia domowego (fot. 1a). Określono położenie oraz wielkość poszczególnych prążków heterochromatynowych, jako wartości względnej w stosunku do całej długości chromosomu. Łącznie na trzydziestu dwóch parach chromosomów ujawniono 66 bloków heterochromatyny konstytutywnej. Prążki heterochromatynowe zlokalizowano w okolicach centromerowych wszystkich badanych chromosomów autosomalnych z wyjątkiem jedenastej pary. Na chromosomie płci X, oprócz dużego prążka w okolicy proksymalnej, zarejestrowano niewielki prążek heterochromatyny konstytutywnej w części interstycjalnej ramienia q chromosomu (fot. 1b). Chromosom Y był w znacznej części heterochromatynowy. Położenie prążków na poszczególnych chromosomach przedstawiono w formie ideogramu (rys. 1).



Fot. 1. Płytki metafazowe – barwienie CBG; a – ogier, b – płytka metafazowa z zaznaczonymi prążkami C w części proksymalnej chromosomu (strzałka otwarta) i w interstycjalnej (strzałka zamknięta)

Photo 1. Metaphase plates – CBG banding; a – a – stallion, b – metaphase plate with C bands indicated in the proximal (open arrow) and interstitial (closed arrow) part of the chromosome



Rys. 1. Ideogram chromosomów konia – barwienie CBG

Fig. 1. Ideogram of the chromosomes of horse – CBG banding

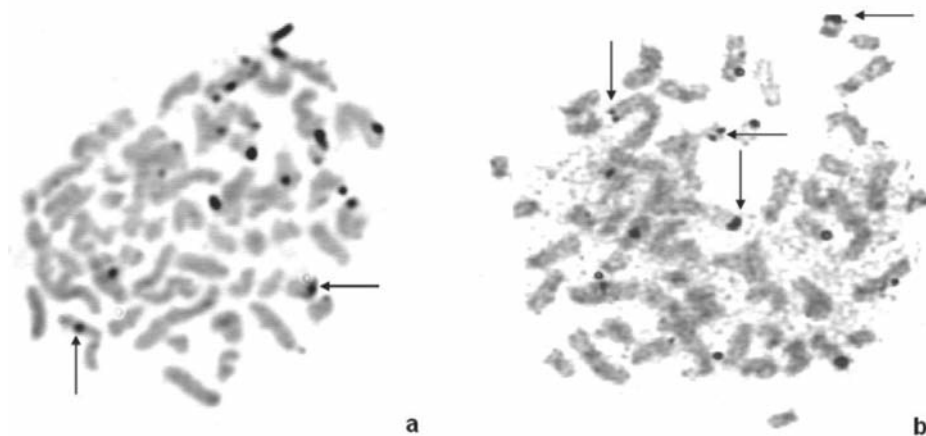
W analizowanych chromosomach metacentrycznych i akrocentrycznych zaobserwowano wyraźne zróżnicowanie pod względem rozległości obszarów heterochromatynowych. W wykonanych pomiarach wielkości bloków heterochromatyny konstytutywnej w stosunku do całej długości chromosomu, na autosomach metacentrycznych od pierwszego do trzynastego zlokalizowano najmniejszą wartość średnią na chromosomie pierwszym (12,64%), a największą na chromosomie trzynastym (28,24%). W chromosomach od pierwszego do szóstego ciemne zabarwienie w regionach proksymalnych obejmowało od 13% do 18% powierzchni chromosomu. W kolejnych chromosomach (siódmy do trzynastego) od 19% do 28%. Wyjątkiem był chromosom jedenasty, na którym nie zidentyfikowano prążków C. W chromosomach od czternastego do trzydziestego pierwszego ciemne zabarwienie w regionach proksymalnych obejmowało od 19% do 37% powierzchni chromosomu. Ciemne bloki heterochromatyny konstytutywnej chromosomu X stanowiły 15% całego chromosomu. Heterochromatyna umiejscowiona interstycjalnie stanowiła 8% powierzchni chromosomu X. Chromosom Y w 44% zbudowany był z heterochromatyny (tab. 1).

Zastosowane barwienie Ag-NOR ujawniło aktywne obszary jąderkotwórcze na chromosomach znajdujących się w różnych etapach metafazy. Analizowano zarówno płytki metafazowe z chromosomami nie podzielonymi na chromatydy, charakterystyczne dla

wczesnej metafazy (fot. 2a), jak i podzielone na chromatydy chromosomy charakterystyczne dla późnej metafazy (fot. 2b). Na chromosomach w późniejszych etapach metafazy NOR widoczny był w postaci dwóch ziaren srebra, po jednym na każdej chromatydzie.

Tabela 1. Wielkość bloków heterochromatyny konstytutywnej w chromosomach  
Table 1. Size of constitutive heterochromatin blocks in chromosomes

Chromosomy 1-13; XY Chromosomes 1-13; XY	Obszar chromosomu/ charakterystyka statystyczna Chromosome region/statistical description		Chromosomy 14-31 Chromosomes 14-31	Obszar chromosomu/ charakterystyka statystyczna Chromosome region/statistical description	
	proksymalny proximal	interstycjalny intersicial		proksymalny proximal	interstycjalny intersicial
	$\bar{x} \pm S$	$\bar{x} \pm S$		$\bar{x} \pm S$	$\bar{x} \pm S$
1	12,64 ± 3,91	–	14	19,31 ± 6,26	–
2	15,73 ± 4,42	–	15	20,80 ± 6,64	–
3	16,32 ± 4,36	–	16	20,29 ± 6,52	–
4	16,74 ± 4,45	–	17	20,52 ± 6,27	–
5	17,48 ± 4,77	–	18	22,27 ± 6,22	–
6	18,12 ± 5,24	–	19	22,2 ± 6,93	–
7	18,72 ± 5,07	–	20	23,08 ± 5,91	–
8	19,60 ± 6,12	–	21	24,63 ± 7,77	–
9	20,42 ± 5,23	–	22	26,43 ± 9,15	–
10	21,56 ± 6,91	–	23	27,90 ± 9,33	–
11	–	–	24	28,38 ± 8,02	–
12	27,15 ± 8,85	–	25	28,91 ± 7,82	–
13	28,24 ± 8,96	–	26	29,28 ± 7,98	–
X	14,91 ± 3,87	8,31 ± 3,88	27	30,61 ± 9,38	–
Y	44,40 ± 10,53	–	28	32,79 ± 9,35	–
			29	32,46 ± 9,34	–
			30	35,27 ± 11,07	–
			31	36,92 ± 11,15	–



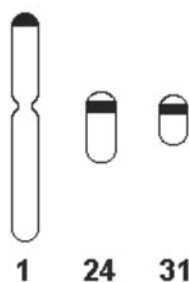
Fot. 2. Płytki metafazowe – barwienie Ag-NOR; wczesna metafaza (a), późna metafaza (b).

Przykładowe NOR zaznaczono strzałkami

Photo 2. Metaphase plates – Ag-NOR banding; early metaphase (a), late metaphase (b).

Exemplary NORs are indicated by arrows

Zastosowanie barwienia azotanem srebra umożliwiło zlokalizowanie aktywnych obszarów jąderkotwórczych na 1., 28. i 31. parze chromosomów. Na pierwszej parze chromosomów obszary jąderkotwórcze zidentyfikowano w części terminalnej ramienia p, natomiast chromosomy par 28. i 31. posiadają aktywne NOR w okołowcentromerowym obszarze ramienia. q. Schematyczne położenie NOR na chromosomach konia przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Schemat lokalizacji NOR w chromosomach konia domowego  
Fig. 2. Diagram of NOR location in domestic horse chromosomes

Łącznie, w ogólnej liczbie 200 komórek poddanych analizie cytogenetycznej, stwierdzono 702 aktywne obszary jąderkotwórcze. Liczba NOR w komórkach badanych osobników była zróżnicowana i wahała się w granicach od 64 do 80 w obrębie osobnika. Obserwowano różne wartości minimalnej i maksymalnej liczby NOR w komórkach. Na poziomie komórki stwierdzono od jednego do sześciu obszarów jąderkotwórczych. Najliczniejszą grupę komórek stanowiły komórki posiadające trzy lub cztery aktywne obszary jąderkotwórcze, odpowiednio 32% i 38% wszystkich komórek. Średnia liczba NOR w komórce wynosiła  $3,51 \pm 1,03$ . Stwierdzono zróżnicowanie w wybarwianiu się NOR na poszczególnych chromosomach. Najczęściej obszary jąderkotwórcze obserwowano na pierwszej parze chromosomów, w obrębie obu chromosomów homologicznych. Na pierwszej parze chromosomów stwierdzono ogółem 364 aktywne NOR. Średnia liczba obszarów jąderkotwórczych na tej parze wyniosła  $1,82 \pm 0,39$ . Kolejną, pod względem częstotliwości występowania obszarów jąderkotwórczych, była 31. para chromosomów. Ogółem, na 31 parze chromosomów zidentyfikowano 220 obszarów jąderkotwórczych. Średnia liczba NOR na tej parze wyniosła  $1,10 \pm 0,059$ . Na 28. parze chromosomów odnotowano najmniejszą częstość występowania NOR, w sumie, na 28. parze chromosomów zidentyfikowano 118 obszarów jąderkotwórczych. Średnia liczba NOR na tej parze wyniosła  $0,59 \pm 0,66$ . Szczegółowe wyniki dotyczące analizy liczby i lokalizacji NOR w komórkach oraz w obrębie osobnika, a także charakterystyki statystyczne analizowanych parametrów zestawiono w tab. 2.

Tabela 2. Zestawienie liczby NOR w komórkach badanych zwierząt  
Table 2. Numbers of NORs in the cells of examined animals

Osobnik Individual	Liczba NOR NOR number								
	chromosom chromosome						komórka cell		
	1		28		31		n	$\bar{x} \pm S$	min.- max
	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$			
1	37	1,85 ± 0,37	20	1,00 ± 0,65	23	1,15 ± 0,59	80	4,00 ± 0,73	3-5
2	37	1,85 ± 0,37	15	0,75 ± 0,64	27	1,35 ± 0,59	79	3,95 ± 1,10	2-6
3	37	1,85 ± 0,37	10	0,50 ± 0,61	24	1,20 ± 0,52	71	3,55 ± 0,83	2-5
4	38	1,90 ± 0,31	10	0,50 ± 0,61	18	0,90 ± 0,45	66	3,30 ± 0,80	2-5
5	37	1,85 ± 0,37	15	0,75 ± 0,79	17	0,85 ± 0,49	69	3,45 ± 0,89	2-5
6	38	1,90 ± 0,31	11	0,55 ± 0,69	23	1,15 ± 0,59	72	3,60 ± 0,88	3-6
7	36	1,80 ± 0,41	7	0,35 ± 0,59	21	1,05 ± 0,61	64	3,20 ± 1,15	1-6
8	34	1,70 ± 0,47	10	0,50 ± 0,61	23	1,15 ± 0,59	67	3,35 ± 1,14	2-6
9	35	1,75 ± 0,44	8	0,40 ± 0,60	21	1,05 ± 0,69	64	3,20 ± 1,32	1-6
10	35	1,75 ± 0,44	12	0,60 ± 0,68	23	1,15 ± 0,59	70	3,50 ± 1,15	1-6
Ogółem Total	364	1,82 ± 0,39	118	0,59 ± 0,66	220	1,10 ± 0,59	702	3,61 ± 1,03	1-6

## DYSKUSJA

Heterochromatyna konstytutywna tworzy ważną część chromosomu – mianowicie okolice okołowcentromerową. Może występować w rejonie telomerowym oraz interkalarnie, a także może obejmować całe ramię chromosomu. Bloki heterochromatyny konstytutywnej w poszczególnych chromosomach różnią się wielkością. Zmienność długości odcinków heterochromatynowych nie wpływa na fenotyp, może jednak różnicować morfologię chromosomów gatunku. Rola heterochromatyny w procesie podziału komórki jest bardzo ważna, wliczając transkrypcję, segregację chromosomów i interakcje chromatynowe w rozległym zakresie [Kleczkowska 1982, Grewal i Jia 2007].

W badaniach własnych heterochromatynę konstytutywną w postaci prążków C zaobserwowano na wszystkich analizowanych chromosomach w rejonie proksymalnym (prócz 11. pary), a także na ramieniu q chromosomu X. Kubień i Opiela [2002], analizując chromosomy konika polskiego pod względem rozmieszczenia heterochromatyny, stwierdzili występowanie prążków C w okolicach centromerowych wszystkich chromosomów, w rejonie telomerów wraz z satelitami w parze pierwszej, jak też prążka na ramieniu q chromosomu X. Chromosom Y wyżej wymienieni autorzy uznali jako cały heterochromatynowy. W badaniach własnych nie zaobserwowano prążków C w rejonach telomerowych analizowanych chromosomów. Nie stwierdzono także prążka heterochromatynowego w części satelitarnej pierwszej pary autosomalnej. Autosom jedenastej pary był pozbawiony heterochromatyny. Na podstawie wykonanych pomiarów wielkości bloku heterochromatyny konstytutywnej, w stosunku do całej długości chromosomu, stwierdzono w niniejszej pracy, że chromosom płci Y jest w 44% heterochromatyczny. Richer i in. [1990] opracowali standard kariotypu konia. Charakterystyki dokonali na podstawie barwienia RBG, GTG, CBG, NOR. W szczegółowym opisie identyfikacji prążków C podają, że chro-



mosomy w kariotypie konia pozytywnie wybarwiły się we wszystkich centrycznych i paracentrycznych regionach chromosomów z wyjątkiem autosomu jedenastego. Odnotowali również indywidualne zmiany w długości centrycznych i paracentrycznych rejonach chromosomu pierwszego, dwunastego i trzynastego oraz w długości heterochromatycznej części na długim ramieniu chromosomu Y. Ponadto zaobserwowali dodatkowy prążek na trzecim, co do długości, ramieniu chromosomu X. McFelly [1990] stwierdził, że zmienna szerokość odcinków centromerowych prążków C świadczy o występowaniu nieidentycznej wielkości heterochromatyny.

Bowling i in. [1997] podają, że spośród 32 par chromosomów konia, trzydziestą drugą parę chromosomów stanowią heterochromosomy X i Y. Chromosom X jest drugim z największych submetacentryków, a chromosom Y jest jednym z mniejszych akrocentryków. Duże zawartości heterochromatyny w małych autosomach i podobne rozmiary mogły spowodować mylne zaklasyfikowanie tych dwóch chromosomów do poszczególnych grup. Idealnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), która w 100% pozwoliłaby wyłonić chromosom Y z kariotypu.

W badaniach własnych dokonano pomiarów wielkości bloków heterochromatyny konstytutywnej w stosunku do całej długości chromosomów wszystkich analizowanych chromosomów. Wyniki pomiarów wykorzystano do charakterystyki kariotypu konia, jako ocenę obiektywną. Świtoński [1988] i Słota [1998] subiektywnie ocenili wielkości bloków heterochromatynowych za pomocą znaków „+”, charakteryzując kariotypy różnych gatunków zwierząt. W niniejszej pracy charakterystyki kariotypu dokonano w sposób ściślejszy, podając wyniki pomiarów scharakteryzowanych za pomocą podstawowych parametrów statystycznych, które umożliwiły ogólne określenie zmienności budowy chromosomów konia w odniesieniu do obszarów heterochromatynowych.

W ramach prowadzonych badań obszary jąderkotwórcze u przedstawicieli konia domowego zidentyfikowano na chromosomach par 1., 28. i 31. Uzyskana lokalizacja aktywnych NOR jest zgodna z przedstawioną w standardzie kariotypu konia oraz w innych pracach dotyczących identyfikacji obszarów jąderkotwórczych w chromosomach różnych ras koni [Richer i in. 1990, Świtoński i in. 1994, Loginova i in. 1996, Kubień i Opiela 2002]. Jedynie w pracach Loginova i in. [1996] i Derjusheva i in. [1998] aktywne NOR zidentyfikowano na 27. i 28. parze chromosomów u koni zimnokrwistych i konika polskiego.

Analizując uzyskane w pracy wyniki, stwierdzono, że NOR najczęściej wybarwia się na pierwszej parze chromosomów, natomiast najmniej NOR obserwowano na 28. parze chromosomów. Porównując wyniki własne z wynikami innych opracowań, stwierdzono, że mała aktywność 28. chromosomu na srebro jest cechą charakterystyczną chromosomów konia. Świtoński i in. [1994] oraz Richer i in. [1990] potwierdzają najniższą aktywność chromosomów 28. pary i jednocześnie bardzo dużą zmienność w reakcji na srebro potwierdzoną po zastosowaniu techniki FISH z sondą 18S–5,8S–28S [Loginova i in. 1996].

W przeprowadzonych badaniach najczęściej występowały komórki posiadające trzy lub cztery aktywne NOR. Sporadycznie obserwowano komórki z kompletem NOR (sześć osadów srebra). W publikacji Richer i in. [1990] stwierdzono, że sześć aktywnych NOR występuje bardzo rzadko. Najczęściej w komórkach obserwuje się cztery aktywne NOR.

Badania nad aktywnością NOR u innych gatunków potwierdzają, że nie jest ona jednaka dla wszystkich NOR-chromosomów. Przyjmuje się, że liczba wybarwionych NOR w mitozie zależy od aktywności transkrypcyjnej rDNA. U kozłów obszary jąderkotwórcze najczęściej obserwowano na największych, posiadających NOR chromosomach par 2. i 3. oraz chromosomie pary 28. Natomiast na chromosomie pary 5. NOR obserwowany był sporadycznie i często tylko na jednym homologie [Andraszek i in. 2009]. W podobnych badaniach prowadzonych u bydła obserwowano największą częstotliwość na trzecim, pod względem wielkości, chromosomie z aktywnym NOR oraz na najmniejszym NOR-chromosomie [Mayr i in. 1989]. Ponadto w metafazach tego samego osobnika istnieje międzykomórkowe zróżnicowanie ekspresji NOR, które dotyczy ilości, wielkości i intensywności barwienia osadów srebra [Weisenberger i Scheer 1995].

Liczba aktywnych NOR oraz ich lokalizacja w chromosomach jest cechą charakterystyczną każdego gatunku. U koni NOR zlokalizowane na pierwszej parze występowały w terminalnej części ramienia p, natomiast NOR par 28. i 31. w subcentromerowym regionie ramienia q. Subcentromerowe NOR obserwowano także u myszy oraz nornika burego [Goodpasture i Bloom 1975, Henderson i in. 1976]. Obszary jąderkotwórcze u innych gatunków zwierząt mogą występować także w terminalnych odcinkach chromosomów lub w przewężeniach wtórnych [Goodpasture i Bloom 1975, Henderson i in. 1976, Henderson i Bruere 1980, Richer i in. 1990, Solinas Toldo i in. 1992, Mellink i in. 1994, ISCNDB 2000].

## WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwoliły scharakteryzować kariotyp konia (*Equus caballus L.*) pod względem wzoru prążków C oraz liczby i lokalizacji aktywnych NOR. Na podstawie wykonanych analiz sformułowano następujące wnioski:

Chromosomy konia różniły się wielkością i morfologią. Chromosomy par od pierwszej do trzynastej i chromosom X były metacentryczne. Pozostałe chromosomy były akrocentryczne. Prążki heterochromatynowe zlokalizowano w okolicach centromerowych wszystkich badanych chromosomów, z wyjątkiem jedenastej pary. Na chromosomie płci X, oprócz prążka C w rejonie proksymalnym, zaobserwowano dodatkowy prążek w części interstycjalnej ramienia q chromosomu. Chromosom płci Y był w 44% heterochromatynowy.

Zidentyfikowano aktywne obszary jąderkotwórcze: w terminalnych częściach ramienia p pierwszej pary chromosomów oraz w subcentromerowej części ramienia q chromosomów par 28. i 31. Średnia liczba NOR w komórce wynosiła  $3,61 \pm 1,03$ . Aktywne NOR najczęściej obserwowano na chromosomach pierwszej pary, najrzadziej na chromosomach pary 28. W ogólnej liczbie 200 analizowanych komórek najczęściej występowały komórki z trzema lub czterema aktywnymi NOR.

## PIŚMIENNICTWO

- Andraszek K., Horoszewicz E., Smalec E., 2009. Nucleolar Organizer Regions, satellite association and nucleolus of goat (*Capra hircus*). Arch. Anim. Sci. (w druku).
- Arrighi F.E., Brown S.W., 1996. Heterochromatin. Science 151, 417–425.
- Babu K.A., Verma R.S., 1985. Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) in human chromosomes. Int. Rev. Cytol. 94, 151–176.
- Bernard P., Maure J.F., Partridge J.F., Genier S., Javerzat J.P., Allshire R.C., 2001. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. Science 294, 2539–2542.
- Bowling A.T., Breen M., Chowdhry B.P., Hirota K., Lear T., Millon L.V., Ponce de Leon F.A., Raudsepp T., Stranzinger G., 1997. International System For Cytogenetic Nomenclature of the domestic Horse. (ISCN). Chromosome Res. 5, 433–443.
- Carrozza M.J., Li B., Florens L., Sugauma T., Swanson S.K., Lee K.K., Shia W.J., Anderson S., Yates J., Washburn M.P., Workman J.L., 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. Cell 123, 581–592.
- Derjushva S.E., Loginowa J.A., Parada R., Chiryayeva O.G., Smirnov A.F., Jaszczak K., 1998. The comparative analysis of NOR polymorphism detected by FISH and Ag-staining on horse chromosomes. Caryologia 51, 1–11.
- Dernburg A.F., Sedat J.W., Hawley R.S., 1996. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. Cell 86 (1), 135–146.
- Goodpasture C., Bloom S.E., 1975. Visualization of nucleolar organiser regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53, 37 – 50.
- Grewal S.I., Jia S., 2007. Heterochromatin revisited. Nat. Rev. Genet. 8, 35–46.
- Grumt I., Pikaard C.S., 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4 (8), 641–649.
- Henderson A., Bruere A., 1980. Inheritance of Ag-stainability of the nucleolus organizer regions in domestic sheep *Ovis aries*. Cytogenet. Cell Genet. 26, 1–6.
- Henderson A., Eicher E., Yu M., Atwood K., 1976. Variation in ribosomal RNA gene number in mouse chromosomes, Cytogenet. Cell Genet. 17, 307–316.
- Holmquist G.P., 1992. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. Amer. J. Hum. Genet. 51, 17–37.
- Howell W.M., Black D.A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 36, 1014–1015.
- ISCNDB, 2000. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovides. Cytogenet. Cell Genet. 92 (3–4), 283–299.
- Jenuwein T., 2001. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. Trends Cell Biol. 11, 266–273.
- Karpen G.H., Le M.H., Le H., 1996. Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. Science 273, 118–122.
- Kleczkowska A., 1982. Warianty strukturalne chromosomów człowieka i polimorfizm prążków C. Postępy Biol. Komórki 9, 259–270.
- Kubień E., 1992. Badanie kariotypu u konia huculskiego i konika polskiego. IX Kongres PTNW Olsztyn. 1, 272.

- Kubień E., Opiela J., 2002. Cytogenetyczna ocena wybranych koni rasy konik polski. *Med. Weter.* 58 (10), 784–787.
- Loginova J., Derjusheva S., Jaszczak K., 1996. Some cases of NOR instability in horse chromosomes. *Arch. Zootech.* 45, 275–279.
- Maison C., Almouzni G., 2004. HP 1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 296–304.
- Manueldis L., 1990. A view of interphase chromosomes. *Science* 250, 1533–1540.
- Mayr B., Gruber K., Brem G., Mayrhofer G., 1989. Genetic studies on nucleolus organizer regions (NORs) in cattle. *Genet Res.* 53 (2), 111–118.
- McFelly R.A., 1990. *Domestic Animal Cytogenetics*. Academic Press INC. 34 (31), London, 131–167.
- Mellink C.H.M., Bosma A.A., De Hann N.A., 1994. Variation in the size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridisation signals in six breeds of domestic pig. *Hereditas* 120 (2), 141–149.
- Murzina N., Verreault A., Laue E., Stillman B., 1999. Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP 1 proteins. *Mol. Cell* 4, 529–540.
- Richer C.L., Power M.M., Klunder L.R., McFelly R.A., Kent M.G., 1990. Standard karyotype of domestic horse (*Equus caballus* L.). *Hereditas* 112, 289–293.
- Słota E., 1998. Polimorfizm chromosomów świni. *Rocz. Nauk. Zootech.* 7, 1–58.
- Solinas Toldo S., Pieńkowska A., Fries R., Świtoński M., 1992. Localization of nucleolar organizer regions in farm animals by *in situ* hybridization method with a probe from a human rRNA gene. *Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. Utrecht*, 228–231.
- Spector D.L., 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 2, 573–608.
- Sumner A.T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75, 304–306.
- Świtoński M., 1988. Chromosomy B u lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*), ich struktura, rozprzestrzenienie, dziedziczenie i znaczenie. *Rocz. Akad. Rol. Pozn.* 174, 1–65.
- Świtoński M., Marcolla P., Pieńkowska A., Cholewiński G., 1994. Preliminary investigation on inter-individual variation of the nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in the horse karyotype. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 12 (9), 15–19.
- Verma R.S., Babu A., 1995. *Human Chromosomes: Principles and techniques*. New York, McGraw-Hill.
- Wegel E., Shaw P., 2005. Gene activation and deactivation related changes in the three dimensional structure of chromatin. *Chromosoma* 114, 331–337.
- Weisenberger D., Scheer U., 1995. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.* 129, 561–575.
- Zuckerandl E., Hennig W., 1995. Tracking heterochromatin. *Chromosoma* 104, 75–83.

## IDENTIFICATION OF HETEROCHROMATIN REGIONS AS WELL AS NUCLEOLAR ORGANISER REGIONS IN HORSE CHROMOSOMES

**Abstract.** The domestic horse karyotype is characterized by the diploid number of chromosomes that equals 64 (13 metacentric and submetacentric pairs, 18 pairs of acrocentric autosomes and a pair of heterochromosomes). Satellites on the first pair of chromosomes as well as

secondary restrictions on acrocentric chromosomes 18 and 31 are visible and make it easier to identify them without banding. The aim of the study was to describe the horse karyotype in respect of the size and location of constitutive heterochromatin as well as the location and number of nucleolar organizer regions. C bands in horse chromosomes have been found in centromeric regions of all the examined chromosomes, excluding the 11. pair. Apart from a proximal band C, an additional band in the interstitial part of the *q* arm was found on the X sex chromosome. Forty-four per cent of the Y chromosome was made up of heterochromatin. Active NORs were identified in the terminal parts of *p* arm of the 1. chromosome as well as in the sub-centromeric part of *q* arm of pairs 28 and 31. The average NOR number in a cell was  $3.61 \pm 1.03$ . The most often observed cells had 3 or 4 active NORs.

**Key words:** C-band, heterochromatin, horse, karyotype, NOR, nucleolar organizer regions

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 13.07.2009