

XXV. Növénynevelési Tudományos Napok
2019. március 06. – 07.
MTA Székház
1051 Budapest, Széchenyi István tér 9.

**A CENTROMÉRÁK SZEREPE AZ IVARSEJTEKET KIALAKÍTÓ
MEIÓTIKUS SEJTOSZTÓDÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN:
KROMOSZÓMAPÁROSODÁS ÉS SZINAPSZIS KENYÉRBÚZÁBAN**

SEPSI ADÉL¹, FÁBIÁN ATTILA¹, TRUDE SCHWARZACHER², JÄGER KATALIN¹,

¹MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet, Növényi Sejtbiológia Osztály, Martonvásár

²Leicester-i Egyetem, Leicester, Egyesült Királyság

A fertilis ivarsejtek előállításáért felelős meiózis egy specializálódott sejtosztódás, amelynek során egyetlen replikációt két sejtosztódás követ, négy egyedi utódsejtet eredményezve. Az osztódás hiba nélkül történő lezajlásához elengedhetetlen, hogy korai meiózisban (profázis) az anyai és apai homológ kromoszómák felismerjék egymást, majd egy fehérjekomplex (a szinaptonémás komplex) segítségével teljes hosszukban összekapcsolódnak, szinapszist képezzenek. Ebben a szoros kapcsolatban a homológok rekombinálódnak, majd hosszú szakaszokat cserélnek ki egymással, így biztosítva az ivarsejtekben új genetikai kombinációk létrejöttét. A rekombináció alapvető fontosságú a kromoszómák tovább örökítéséhez és a következő nemzedék genetikai sokféleségének fenntartásához. A jelen kutatás célja, hogy feltárja az összetett genommal rendelkező kenyérbúza szinapszisének folyamatát és megfigyelje a kromoszómák viselkedését a meiózis kulcsfontosságú folyamatai során különös tekintettel a centromérák dinamizmusára. Megállapítottuk, hogy a centromérák a szinapszist megelőző időszakban programozott mozgást végeznek: pontosan meghatározott időpontban egymással dinamikusan összekapcsolódnak majd disszociálnak. Összefüggést fedeztünk fel a centroméra asszociációk és a szinapszis iniciációja között és rámutattunk arra, hogy a centromérák mozgása fontos mechanikai szerepet láthat el a meiózis folyamatainak szabályozásában.

Kulcsszavak: Búza, Centroméra, Meiózis, Homológ párosodás, Szinaptonémás komplex

**CENTROMERE FUNCTION AND CONTROL DURING MEIOTIC CELL DIVISION GIVING
RISE TO FERTILE GAMETES: CHROMOSOME PAIRING AND SYNAPSIS IN BREAD
WHEAT**

A SEPSI¹, A FÁBIÁN¹, T SCHWARZACHER², K JÄGER¹,

¹Agricultural Research Institute, Hungarian Academy of Sciences, Department of Plant Cell Biology, Martonvásár

²University of Leicester, Leicester, United Kingdom

Meiosis is the specialized cell division giving rise to the fertile gametes whereby one round of DNA replication is followed by two rounds of cell division resulting in four unique daughter cells. During early meiosis (prophase) maternal and paternal homologous chromosomes recognize each other and become connected along their entire length by a proteinaceous complex (the synaptonemal complex) to form synapsis. In this tight connection homologues recombine and exchange large chromosome segments ensuring the formation of new genetic combinations. Recombination is required for the faithful segregation of the chromosomes and for providing genetic diversity of the next generation. The aim of the present study is to decipher progression of synapsis in the large and

complex genome cereal bread wheat, and simultaneously study chromosome behavior with a special focus on the position of the centromeric regions. We showed that although centromeres synapsed last, only following extensive arm synapsis, they formed programmed associations and dissociations in precise timeframes of meiosis. We gave evidence that centromere dynamics and the progression of synapsis are correlated suggesting a mechanical role for the centromeres in the coordination of meiosis.

Key words: Wheat, Centromere, Meiosis, Homologous pairing, Synaptonemal complex,

Bevezetés

A haploid ivarsejtek kialakításáért felelős meiózis egy specializált sejtosztódás, amelynek döntő szerepe van a fertilitás kialakításában. A kromoszómákba rendeződött genetikai információ hű továbbadásának szigorú előfeltétele, hogy az anyai és apai homológ kromoszómák egymást kölcsönösen felismerjék a meiózis korai szakaszában, egy fehérjekomplex (szinaptonémás komplex) segítségével teljes hosszukban összekapcsolódnak (szinapszis) majd egyes részeket kicserélik egymással (rekombináció) crossover-eket eredményezve. Ahhoz, hogy egy adott kromoszóma a meiózis I osztódása során megfelelő irányba vándoroljon és tovább adódjon az utódsejtbe elengedhetetlen hogy legalább egy crossover-t hordozzon (obligát crossover). A genetikai információ hű átadásán túl a homológ kromoszómák közötti rekombináció lehetővé teszi a genetikai sokféleség kialakulását. A megtermékenyítés eredményessége és az új generáció fitnesze tehát ennek a komplex biológiai folyamatnak a sikerességén alapul. Különösen fontos e folyamat megértése a kenyérbúza esetében a jelen éghajlati viszonyok között. A klímaváltozás okozta környezeti stresszek erősen hatnak a búza generatív fázisában, amely meiótikus aberrációkhoz és következképp termés kieséshez vezethetnek.

A magasabbrendű növények kulcsfontosságú meiótikus génjeinek izolálása lehetővé tette az osztódásban szerepet játszó fehérjék sejtregon belül megjelölését és képalkotó módszerek segítségével a meiózis rendkívül pontos vizsgálatát (*Higgins et al. 2005*). Jelen kutatásunk célja, hogy megvizsgáljuk a kromatin viselkedését a hexaploid búza homológ kromoszómáinak szinapszisa közben, különös tekintettel a centromérák viselkedésére (*Sepsi et al. 2017*). Vizsgálataink során speciális ellenanyagok segítségével megjelöltük az aktív centromérákat és a szinaptonémás komplex elemeit így pontosan nyomon követhettük a centromérák viselkedését amelyből következtetni tudunk azok meiózisban betöltött szerepére.

Anyag és módszer

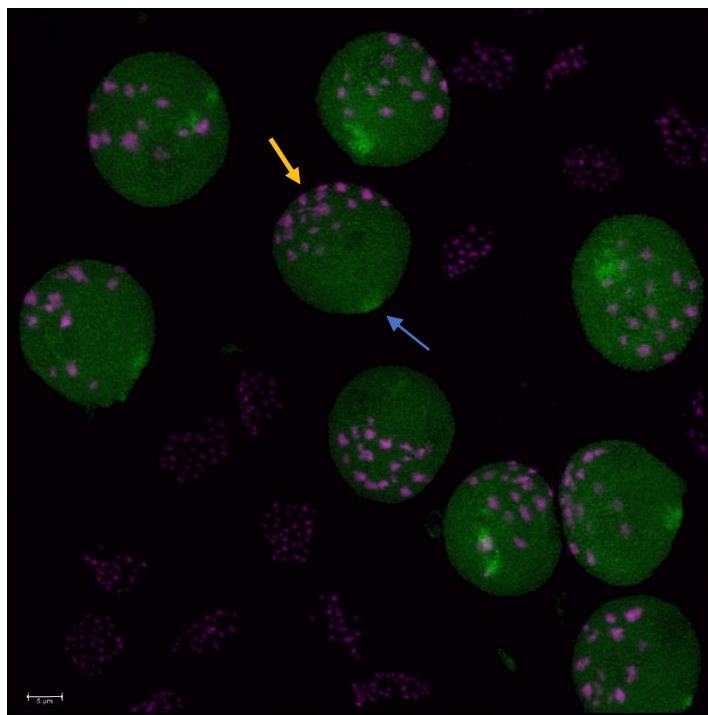
Kísérleteinket Chinese Spring búzavonal portokaiból izolált meiócitákon végeztük. Chinese Spring növényeket üvegházi körülmények között neveltük, majd amint a kalászok elérték a meiózis profázisát, portokokat gyűjtöttünk. A portokokat nem denaturáló fixáló (4% paraformaldehid) segítségével tartósítottuk, majd egy enzim keverékkel megemésztettük. Az így előkészített portokokból a meiótikus sejteket (pollen anyasejtek) tárgylemezre vittük, majd immunofestésnek vetettük alá. Az immunofestés során anti-CENH3, anti-ASY1 és Anti ZYP1 ellenanyagokat alkalmaztunk, amelyeket eltérő fluoreszcens festékekhez kötött másodlagos ellenanyagokkal detektáltunk. A minta előkészítést és az immunfestést a *Sepsi et al. (2018)* által leírt módon végeztük. A fluoreszcens jelet lézerpásztázó konfokális mikroszkópiával rögzítettük, a képsorozatokat dekonvolúciónak vetettük alá (Huygens Essentials, The Netherlands) majd a LASX szoftware (Leica Microsystems GmbH, Germany) segítségével 3 dimenzióban elemeztük.

Eredmények

A meiótikus sejtek pontos fejlődési állapotát a szinaptonémás komplex fehérjéi (ASY1 és ZYP1) által nyújtott jel segítségével határoztuk meg. Az ASY1 és ZYP1 fehérjék felépülése a meiótikus sejtregon belül a profázis egyes al-fázisaira jellemző, így a legmegbízhatóbb

meiótikus markerként használhatók. A begyűjtött pollen anyasejt minták a meiótikus interfázist és profázist teljes egészében lefedték, amelyeket a következő szempontok szerint azonosítottunk: A meiótikus interfázisban levő sejtmagok több (3-4) sejtmagvacskát hordoztak, míg késői interfázisban az ASY1 fehérje szórt jelként megjelent a sejtmagon belül. A profázis első szakaszában (leptotén) az ASY1 fehérje fokozatosan beépül a kromoszómák tengelyébe és szaggatott hosszanti jelet mutat. Leptotén végén az ASY1 fehérje teljesen lineáris, fonálszerű jelet ad és a telomérák a sejtmag periferiáján, egy szűk területen csoportosulnak (teloméra bouquet). A profázis következő szakaszában (zygotén) a kromoszómák szubtelomerikus régiói szinapszist alkotnak, ez az ASY1 szignál fokozatos eltűnéséből és a ZYP1 jel szubtelomerikus megjelenéséből látható. Később a kromoszómakarok több pontjáról egyidejűleg elkezdi felépülni a szinaptonémás komplex. Pachiténben a szinapszis teljes, amely a lineáris, mindenhol jelenlévő fonálszerű ZYP1 jelből látható. A szinapszis kialakulása során vizsgáltuk a kromatin és az aktív centromérák viselkedését. Megállapítottuk, hogy a centromérák korai leptoténben csoportokba tömörülnek a sejtmag periferiáján, amelyet a teloméra bouquet kialakulása követ. Ez egy feszített kromatin elrendeződést eredményezett, amelyben a kromoszómák a sejtmag két pólusa között voltak kifüggesztve. Ebben a kromatin elrendeződésben indult be a szinapszis a szubteloméráktól haladva a karok felé, illetve ezzel egyidőben a centromérák perifériás csoportjai fokozatosan felbomlottak és a sejtmag belsejébe hatoltak, random elrendezést mutatva. A kromoszóma karok esetében több pontból kiindulva haladt az intersticiális szinapszis, majd miután a karok nagy része már szinapszist alkotott, az kiterjedt a centromérákra is, amelyek így jellemzően utoljára párosodtak.

1. *ábra* CENH3 és ASY1 fehérjék lokalizációja a meiózis profázisának korai szakaszában (Leptotén) kenyérbúza pollenanyasejtekben. A CENH3 fehérje lila színnel jelölt, míg az ASY1 zölddel. A centromérák csoportokat alkotnak a sejt egyik pólusán (sárga nyíl) míg a teloméra bouquet a sejt ellentétes pólusán erősebb ASY1 jelként mutatkozik (kék nyíl). Bar=5µm



Következtetések

Kísérleteink alapján kenyérbúzában a szinapszis két lépésben indul be, először a szubteloméráktól kiindulva majd a kromoszóma karokon több ponton látható a szinapszis

iniciációja, amely folyamatosan hosszabbodik. A szinapszis beindulása előtt a centromérák perifériás csoportokat alkotnak, azonban a szubtelomérás szinapszist követően ezek a csoportok felbomlanak. Ezt követően indul be a karok több pontból kiinduló szinapszisa. A centroméra mozgások és a szinapszis iniciáció szigorú egybeesése arra utalt, hogy a centromérák mechanikai szerepet tölthetnek be a meiózis időzítésében. Mindaddig kifeszített állapotban tartják a kromatint, míg a szubtelomérikus szinapszis be nem indul, ezt követően a perifériáról történő leválásuk, fokozott mozgásteret ad a kromoszómakaroknak, lehetővé téve azok párosodását.

Köszönetnyilvánítás

A dolgozatban ismertetett munka az NKFIH FK124266, a KEP-5/2017 (MTA) pályázatok és a Bolyai János Ösztöndíj támogatásával valósult meg.

Irodalom

- Higgins J. D., Sanchez-Moran E., Armstrong S. J., Jones G. H., Franklin F. C. (2005). The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Development*, **19**, 2488–2500.
- Sepsi A., Fábrián A., Jäger K., Heslop-Harrison J. S., Schwarzacher T. (2018). ImmunoFISH: simultaneous visualisation of proteins and DNA sequences gives insight into meiotic processes in nuclei of grasses. *Frontiers in plant science*, **9**, 1193
- Sepsi A., Higgins J. D., Heslop-Harrison J. S., Schwarzacher T. (2017). CENH3 morphogenesis reveals dynamic centromere associations during synaptonemal complex formation and the progression through male meiosis in hexaploid wheat. *Plant Journal*, **89**, 235–249.