

GENETYCZNA I MOLEKULARNA CHARAKTERYSTYKA MIKROSPOROGENEZY U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH

GENETIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICROSPOROGENESIS IN ANGIOSPERMS

Krzysztof ZIENKIEWICZ, Elżbieta BEDNARSKA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie: Mejoza jest procesem o ogromnym znaczeniu dla rozwoju i ciągłości życia na Ziemi. U znakomitej większości organizmów żywych powstałe w wyniku mejozy komórki bezpośrednio zaangażowane są w procesy rozmnażania płciowego. Intensywny rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na identyfikację licznych genów zaangażowanych w podział mejotyczny. Modelowe organizmy wykorzystywane w tych badaniach to przede wszystkim drożdże oraz *Caenorhabditis elegans*. Ostatnie lata przyniosły też szereg informacji dotyczących genetycznej i molekularnej regulacji mejozy u roślin, głównie u *Arabidopsis thaliana*. Molekularne podłoże mejozy u roślin, z uwagi na lepszą dostępność materiału i łatwość obserwacji fenotypowych efektów mutacji, prowadzone są przede wszystkim na komórkach męskiej linii generatywnej, tj. podczas mikrosporoogenezy. Okazało się, że większość znanych z badań u drożdży genów zaangażowanych w takie etapy podziału mejotycznego, jak: koniugacja chromosomów homologicznych czy *crossing-over*, ma swoje homologi u roślin. Wskazuje to na wysoki stopień uniwersalności molekularnych mechanizmów mejozy w komórkach eukariotycznych. Praca stanowi kompilację aktualnych wiadomości na temat genetycznej i molekularnej kontroli mikrosporoogenezy u roślin okrytonasiennych, które przedstawiono na tle informacji znanych z badań u innych organizmów, w tym szczególnie u drożdży.

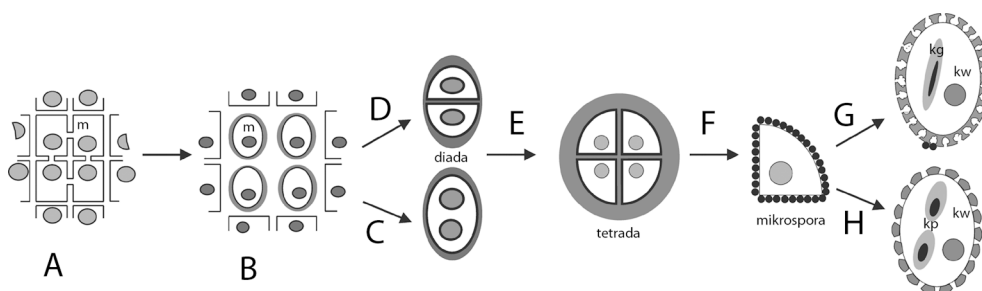
Słowa kluczowe: mejoza, mikrosporoogeneza, *crossing-over*, cytokineza.

Abstract: Meiosis is a process which have a great weight for development and continuity of life on Earth. In a great majority of organisms the cells which are made during meiosis are directly involved in sex reproduction processes. High development of molecular biology techniques makes possible an identification of numerous genes involved in meiotic division. Model organisms in these research in the first place are yeasts and *Caenorhabditis elegans*. The last years bring also many informations about genetic and molecular regulation of meiosis in plants, mainly in *Arabidopsis thaliana*. Molecular basis of meiosis in plants, because of better accessibility of the biological material and easiness of observations of the mutation fenotypical effects, is studied mainly in the male generative cells line, i.e. during mikrosporoogenesis. It was shown that the majority of genes known from research on yeasts which are involved in such

steps of meiotic division as homologue chromosomes coniugation or crossing-over has the homologues in plants. This indicate that there is a high degree of universality of meiosis molecular mechanisms in eucariotic cells. This work is a compilation of actual informations about genetic and molecular controll of microsporogenesis in angiosperms, which are presented in the background of the results from studies on different organisms, especially in yeasts.

Key words: meiosis, microsporogenesis, crossing-over, cytokinesis.

Kluczowym etapem w rozwoju zarówno męskiego, jak i żeńskiego gametofitu roślin okrytonasiennych jest podział mejotyczny, w wyniku którego powstaje haploidalne pokolenie komórek bezpośrednio zaangażowanych w rozmnażanie płciowe. Cytologiczne aspekty mejozy u roślin okrytonasiennych od dawna były przedmiotem badań biologów komórki oraz botaników i zostały dobrze poznane u wielu gatunków. Niezwykle intensywny rozwój technik biologii molekularnej w ostatnich latach przyczynił się do poznania i charakterystyki wielu genów kontrolujących proces mejozy. Dzięki temu zidentyfikowano także liczne mutanty roślinne charakteryzujące się zaburzeniami w przebiegu mejozy. Modelową rośliną wykorzystywaną w tych badaniach, z uwagi na łatwość manipulacji genetycznych i powszechne zastosowanie w badaniach molekularnych, jest *Arabidopsis thaliana* (L.). Tradycyjnie geny, których mutacja objawia się zaburzeniami przebiegu któregośkolwiek ze stadiów mejozy zarówno w linii męskiej (mikrosporogeneza), jak i żeńskiej (megasporogeneza), przyjęto określać mianem genów mejotycznych. Natomiast geny, które kontrolują prawidłowy przebieg tylko mikrosporogenezy oraz rozwoju pyłku, nazywane są genami męskosterylnymi. Znaczna większość prac dotyczących genów mejotycznych, z uwagi na lepszą dostępność materiału i łatwość obserwacji fenotypowych efektów mutacji, prowadzona jest na komórkach męskiej linii generatywnej. W związku z tym w niniejszej pracy informacje dotyczące grupy genów mejotycznych ujęte zostały głównie w aspekcie ich aktywności podczas mikrosporogenezy.



RYCINA 1. Przebieg mikrosporogenezy (mejozy pylnikowej) u roślin okrytonasiennych. A. Wczesna I profaza mejotyczna – mikrosporocyty (m) połączone szerokimi kanałami cytoplazmatycznymi. B. Pod koniec I profazy wokół mikrosporocytów syntetyzowana jest ściana kalozowa. C-D. Po I podziale mejotycznym powstaje diada nieprzedzielona ścianą komórkową (C), lub zbudowana z dwu komórek oddzielonych ścianą kalozową (D). E. Po drugim podziale mejotycznym wytwarzane są 4 zredukowane mikrospory oddzielone ścianą kalozową syntetyzowaną sukcesywnie (D-E) lub równocześnie (D-E). F. Po enzymatycznej lizie ściany kalozowej uwalniane są mikrospory, które różnicują się w dwukomórkowe (G) lub trójkomórkowe (H) ziarna pyłkowe (kg – komórka generatywna, kw – komórka wegetatywna, kp – komórki plemnikowe)

Przebieg mejozy pylnikowej jest zasadniczo wspólny dla większości roślin okrytonasiennych i nie odbiega od typowego redukcyjnego podziału mikrosporocytów (ryc. 1). Mikrosporigeneza u roślin dzikiego typu charakteryzuje się wysokim stopniem synchroniczności, która możliwa jest dzięki licznym kanałom cytoplazmatycznym łączącym mikrosporocyty podczas wczesnych etapów podziału. Podczas dalszego przebiegu mejozy mikrosporocyty izolują się od siebie za pomocą ściany kalozowej, która oddziela także powstałe po mejozie 4 haploidalne mikrospory. Po rozpadzie ściany kalozowej z mikrospor rozwijają się dwu- lub trójkomórkowe ziarna pyłkowe. Praca stanowi kompilację aktualnych wiadomości dotyczących genetycznej kontroli mikrosporigenezy u roślin okrytonasiennych, które przedstawiono na tle informacji znanych z badań u innych organizmów, w tym szczególnie u drożdży (tab I).

1. KOHEZJA SIOSTRZANYCH CHROMATYD

Jednym z etapów przygotowania do podziału komórkowego jest replikacja materiału genetycznego, która zachodzi w fazie S interfazy. W przypadku cyklu redukcyjnego nowopowstałe chromatyd siostrzane pozostają połączone ze sobą aż do anafazy II podziału mejotycznego. Trwałe połączenie obu chromatyd możliwe jest dzięki ich interakcji z wielkocząsteczkowym kompleksem specyficznych białek – kohezyn. Jak dotąd opisano dwa mutanty *Arabidopsis*, które wykazywały zaburzenia w przestrzennym związku siostrzanych chromatyd podczas wczesnych etapów podziału mejotycznego.

Pierwszym z nich jest mutant *swi1/dyad* (*switch1/dyad*). Mutacja 3 poznanych alleli genu *SWITCH1* (*SWI11*)/*DYAD* objawia się zaburzeniami związku pomiędzy chromatydami zarówno w przebiegu mega-, jak i mikrosporigenezy. Nieprawidłowości w przestrzennych interakcjach pomiędzy chromatydami siostrzanymi tylko podczas mikrosporigenezy wykazują natomiast rośliny, które mają zmutowany jeden z alleli tego genu, tj. o genotypie *swi1-2* [36]. W pylnikach mutantów już podczas I profazy mejotycznej obserwuje się zanik połączeń między siostrzanymi chromatydami mikrosporocytów. Efektem tych zaburzeń jest niekompletny bądź całkowicie zahamowany proces kondensacji chromosomów oraz brak wyróżnialnych stadiów leptotenu, zygotenu oraz pachytenu. Przedwczesna segregacja takich anormalnych chromatyd podczas pierwszego i drugiego podziału mejotycznego doprowadza do wytworzenia od 1 do 10 nierównocennych jąder, które następnie degenerują [33]. Jak wykazała analiza molekularna, transkrypt genu *SWI1* podlega alternatywnemu splicingowi i koduje dwa białka o długości odpowiednio 578 i 635 aminokwasów, które różnią się jedynie na końcu N. Jak dotąd nie stwierdzono homologii tych białek względem żadnych znanych sekwencji, które figurują w bazach danych [33].

Komórkowa lokalizacja białka SWI1 badana była u rzodkiewnika pospolitego przy użyciu konstruktu SWI1-GFP. Wykazano, że konstrukt ten kolokalizował z DNA wyłącznie w jądrach komórek podlegających mejozie, jest to zatem białko specyficzne dla cyklu mejotycznego. Ponadto w jądrach komórkowych białko obecne było jedynie

TABELA 1. Homologi/ortologi drożdżowych genów kontrolujących poszczególne etapy mejozy u *Arabidopsis thaliana*

GEN DROŻDZY	HOMOLOG/ ORTOLOG <i>A. thaliana</i>	FUNKCJA KODOWANEGO BIAŁKA
REKOMBINACJA MATERIAŁU GENETYCZNEGO		
SPO11	AtSPO11-1 AtSPO11-2 AtSPO11-3	Topoizomerazy typu II odpowiedzialne za inicjację dwuniciowych pęknięć DNA [26]
MRE11 RAD50	AtMRE11 AtRAD50	Tworzą kompleks odpowiedzialny za naprawę dwuniciowych pęknięć DNA [11]
RAD51	AtRAD51	Rekombinaza; wymiana fragmentów nici oraz naprawa uszkodzeń DNA [1]
RAD51C XRCC3 DMC1	At RAD51C AtXRCC3 AtDMC1	Prawdopodobnie uczestniczą w montażu i stabilizacji białka RAD51 [1,10] Identyfikacja homologii DNA między lepkiem końcem 3' a chromosomem homologicznym [40]
MND1 ATM	AtMND1 AtATM	Naprawa DSB, stabilizacja heterodupleksów [20] Kinaza białkowa aktywowana pęknięciami DNA; fosforyluje białka naprawiające pęknięcia DNA [23]
RECQ HELICASES	RecQ (sześć homologów)	Replikacja i rekombinacja DNA podczas późniejszych stadiów naprawy pęknięć dwuniciowego DNA [6]
MLH1 MEI1 (MCD1)	AtMLH1 AtMEI1	Naprawa niedopasowań po wymianie odcinków DNA [40] Uczestniczy w odpowiedzi na pęknięcia DNA i blokadę replikacji u <i>Eukariota</i> [27]
MSH4 MSH5 MER3	AtMSH4 – AtMER3	Udział w szlaku powstawania crossovers klasy I [28] Helikaza; stabilizacja molekuł uczestniczących w powstawaniu "podwójnej struktury Hollidaya" [35]
MUS81 MMS4 EME1	– – – PTD	Endonukleazy; cięcie i naprawa pęknięć DNA. U drożdży katalizują szlak powstawania crossovers klasy II [29] Rekombinacja materiału genetycznego [46]

podczas interfazy premeiotycznej oraz bardzo wczesnej profazy [33]. W związku z tym autorzy sugerują, że białko SWI1 jest odpowiedzialne raczej za inicjację przestrzennego związku pomiędzy chromatydami siostrzanymi aniżeli jego utrzymywanie podczas kolejnych stadiów mejozy.

Drugi mutant charakteryzujący się nieprawidłowościami w kohezji pomiędzy chromatydami siostrzanymi opisany został przez dwie niezależne grupy badawcze. Bai i wsp. [7] oraz Bhatt i wsp. [8] wykazali, że mutacja genu *SYN1/DIF1* (*SYN1/DETERMINATE, INFERTILE1*) objawia się najpierw zaburzeniami w kondensacji chromosomów w leptotenie, a następnie ich fragmentacją w metafazie I i defektami w segregacji podczas anafazy I. Zidentyfikowano pięć mutantów genu *SYN1/DIF1*, a mutacja u każdego z nich powodowała całkowitą sterylność zarówno męską, jak i

TABELA 1, cd.

GEN DROŹDZY	HOMOLOG/ORTOLOG- <i>A. thaliana</i>	FUNKCJA KODOWANEGO BIAŁKA
KOHEZJA SIOSTRZANYCH CHROMATYD		
RAD21/REC8	SWI1/DYAD SYN1/DIF1	Inicjacja kohezji chromatyd siostrzanych [33] Aktywność kohezyny; formowanie połączeń między chromatydami siostrzanymi [8]
KONIUGACJA CHROMOSOMÓW HOMOLOGICZNYCH		
MEU13 ⁺ HOP1	SWI1/DYAD SDS AHP2 ASY1	Formowanie elementów bocznych kompleksu synaptonemalnego [33] Cyklina typu B; decyduje o czasie rozdzielania chromosomów tworzących bivalent [5] Kontrola parowania chromosomów homologicznych [39] Interakcja między elementami osiowymi kompleksu synaptonemalnego a chromatyną chromosomów homologicznych [3,4]
ORGANIZACJA WRZECIONA PODZIAŁOWEGO		
	KATA/ATK1	Kinezyzna; organizacja mikrotubul wrzeciona podziałowego [17]
PRZEBIEG CYTOKINEZY		
	<i>STD/TES</i>	Kinezyzna; uczestniczy w powstawaniu tzw. jądrowych domen cytoplazmatycznych odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg cytokinezy postmejotycznej [30,51]
EKSPRESJA GENÓW MEJOTYCZNYCH		
	<i>SPL/NZZ</i> <i>MMD1</i> <i>DUET</i> <i>MS1</i> <i>AMS1</i>	<div> Czynnik transkrypcyjny MADS Box; przejście ze stanu wegetatywnego w generatywny [41,50] regulacja transkrypcji genów mejotycznych; remodelowanie chromatyny [52] regulacja organizacji chromatyny i ekspresji genów podczas mikrosporoogenezy [38] regulacja transkrypcji genów tapetum [47] </div> <div> } <div>białka z klasy PHD- finger</div> </div> Czynnik transkrypcyjny z klasy MYB; regulacja rozwoju tapetum [42]
KONTROLA CYKLU KOMÓRKOWEGO		
SKP1	ASK1 TAM1 MS5 (TMD/ POLLEN- LESS3)	Element ligaz ubikwitynowych; degradacja białek uczestniczących w kolejnych procesach I profazy [53,54] Cyklina typu A - CYCA 1,2 [31, 44] } Kontrola wyjścia z mejozy [16]

żeńską. W stadiach postpachytenowych w mikrosporocytach mutantów *syn1/dif1* obserwowano zmienione morfologicznie chromosomy, co może wskazywać na nieprawidłowości w mechanizmie kohezji siostrzanych chormatyd. Późniejsze zaburzenia w rozdzielaniu takich chormosomów prowadziły do powstawania produktów mejozy złożonych często nawet z 8 komórek o różnym kształcie, fenotypie i ploidalności [8].

Badania porównawcze ujawniły, że gen *SYN1/DIF1* jest w wysokim stopniu homologiczny do drożdżowego genu *RAD21/REC8* (**R**ADiation sensitive **21**/**d**eficient **i**n **m**eiotic **R**E**C**ombination **8**), kodujących rodzinę kohezyn zaangażowanych w formowanie połączeń pomiędzy chromatydami siostrzanymi i kondensację chromatyny podczas cyklu mitotycznego [7]. Analiza molekularna genu *SYN1/DIF1* wykazała, że jego transkrypt podlega alternatywnemu splicingowi i koduje dwa białka. Pierwsze o długości 627 reszt aminokwasowych, które syntetyzowane jest na niskim poziomie we wszystkich tkankach, oraz drugie zbudowane z 617 aminokwasów, ulegające ekspresji tylko w pąkach kwiatowych [16]. Białka te mają dwa sygnały lokalizacji jądrowej (NLS, z ang. *Nuclear Localization Signal*) i kilka domen PEST (z ang. *proline* (**P**), *glutamate* (**E**), *serine* (**S**), and *threonine* (**T**) *rich domain*), które obecne są zazwyczaj w białkach ulegających niezwykle szybkiej degradacji w komórkach eukariotycznych [7]. Kohezyjna funkcja białka SYN1/DIF1 wydaje się być bardziej powszechna. Stosując testy komplementacji [21] stwierdzili bowiem, że białko to częściowo zastępuje mitotyczną kohezynę Mcd1 u drożdży. Wskazuje to, iż białko SYN1/DIF1 może pełnić rolę kohezyny w komórkach dzielących się zarówno mejotycznie, jak i mitotycznie.

2. KONIUGACJA CHROMOSOMÓW HOMOLOGICZNYCH

Poza redukcją liczby chromosomów efektem każdej mejozy jest także rekombinacja materiału genetycznego, która odbywa się zazwyczaj w zygotenie w procesie *crossing-over*. Aby zaszedł *crossing-over*, chromosomy ojcowski i matczyne muszą wejść w specyficzną interakcję przestrzenną (koniugacja, synapsis), w wyniku której w zygotenie powstają struktury określane mianem biwalentów. Opisana interakcja umożliwia późniejszą reakcję wymiany odcinków pomiędzy chromatydami chromosomów homologicznych. Koniugacja chromosomów homologicznych zachodzi za pośrednictwem makromolekularnej struktury określanej mianem kompleksu synaptonemalnego (ryc. 2). Kompleks synaptonemalny zaczyna formować się już w leptotenie, kiedy chromosom ojcowski i matczyne zbliżą się do siebie na odległość mniejszą aniżeli 200 nm, a na powierzchni nici chromatynowych obu chromosomów odbywa się montaż białkowych elementów osiowych (ang. *axial elements*). Podstawowe części w pełni uformowanego kompleksu synaptonemalnego to: 1) elementy boczne, utworzone z kontaktujących się ze sobą licznych elementów osiowych, bezpośrednio związane z chromatydami chromosomów homologicznych, 2) element centralny łączący oba elementy boczne za pośrednictwem poprzecznych włókien oraz 3) grudka rekombinacyjna. Elipsoidalne grudki rekombinacyjne zbudowane są z białek uczestniczących w koniugacji i wymianie odcinków chromosomów homologicznych. W zależności od stadium I profazy mejotycznej oraz ich wyposażenia grudki rekombinacyjne dzieli się na wczesne i późne.

Wczesne grudki rekombinacyjne widoczne są już w zygotenie i zawierają białka biorące udział w inicjacji przestrzennego związku pomiędzy chromosomami homologicznymi i wczesnych etapach rekombinacji. Późne grudki rekombinacyjne pojawiają się zazwyczaj w środkowym pachytenie, są mniej liczne aniżeli grudki wczesne, a miejsca ich występowania uznaje się za tożsame z miejscami zajścia *crossing-over* [2].

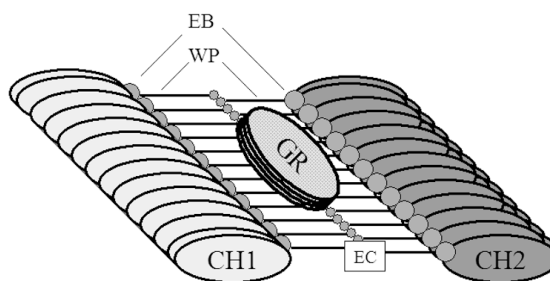
Modelowym organizmem wykorzystywanym do badań nad

genetyczną i molekularną naturą procesu koniugacji chromosomów homologicznych i *crossing-over* u *Eukaryota* są drożdże. Cechy, które decydują o wykorzystaniu tych komórek w poznawaniu molekularnych podstaw rekombinacji meiotycznej, to: mały genom, wysoka częstość rekombinacji (100 miejsc *crossing-over*/podział) oraz łatwość manipulacji genetycznych. Znakomita większość genów związanych z kontrolą profazy I podziału meiotycznego u *Eukaryota*, w tym również procesu rekombinacji, zidentyfikowana została właśnie dzięki badaniom prowadzonym na drożdżach. W ostatniej dekadzie zidentyfikowano także znaczną liczbę genów zaangażowanych w proces *crossing-over* w komórkach roślinnych, przy czym stopień homologii tych genów określano w odniesieniu do sekwencji genów drożdżowych.

Generalnie, u większości organizmów mutacje w genach kodujących białka charakterystyczne dla wczesnych grudek rekombinacyjnych objawiają się zaburzeniami koniugacji chromosomów homologicznych i wczesnych etapów *crossing-over*. Z kolei defekty genów kodujących białka obecne w późnych grudkach rekombinacyjnych nie wpływają na przestrzenny związek pomiędzy chromosomami matczynym i ojcowskim, ale zaburzają lub uniemożliwiają proces rekombinacji.

2.1. Geny odpowiedzialne za formowanie synapsis chromosomów homologicznych

W ciągu ostatniej dekady zidentyfikowano dużą liczbę mutantów *A. thaliana* charakteryzujących się różnorodnymi defektami w interakcjach chromosomów podczas I profazy meiotycznej. Opisane powyżej badania białka SWI1 ujawniły, że oprócz udziału w kohezji siostrzanych chromatyd, jest ono także zaangażowane w formowanie elementów bocznych kompleksu synaptonemalnego [34]. W metafazie I podziału meiotycznego u mutantów *swi1-2* nie obserwowano bowiem typowych dla rzodkiewnika pospolitego pięciu biwalentów, a 20 pojedynczych chromatyd. Ponadto brak widocznych chiazmy sugeruje, że u roślin tych nie zaszedł *crossing-over*, co wskazuje na udział białka SWI1 także w procesie rekombinacji [34].



RYCINA 2. Schemat budowy kompleksu synaptonemalnego. CH1, CH2 – chromatyd niesiostrzane chromosomów homologicznych, EB – elementy boczne, EC – element centralny, WP – włókna poprzeczne, GR – grudka rekombinacyjna

Azumi i wsp. [5] opisali mutant *solo dancers (sds)* wykazującego nieprawidłowości w koniugacji chromosomów podczas I profazy meiotycznej. Wszystkie rośliny o tym genotypie charakteryzowały się silnie zredukowaną płodnością. Mutanty *sds* cechowały się prawidłową kondensacją chromosomów, jednakże obserwowano, że rozwój większości mikrosporocytów zatrzymywał się w stadium zygotenu, tylko część z nich przechodziła do pachytenu. Na tej podstawie autorzy sugerują, że rośliny te mają zaburzony proces formowania biwalentów oraz *crossing-over*, co w przypadku nielicznych komórek podlegających pełnemu podziałowi meiotycznemu, prowadzi do nieuporządkowanego rozmieszczenia chromosomów podczas kolejnych stadiów mejozy i powstawania anormalnych mikrospor [5]. Analiza molekularna białkowego produktu genu *SDS* wykazała między innymi, że na C-końcu zawiera on tzw. „region rdzeniowy cyklina” (z ang. „*cyclin core region*”) – konserwatywną domenę charakterystyczną dla cyklina B u *Arabidopsis* [5]. Możliwe zatem, że białko SDS reprezentuje nowy typ cyklina, prawdopodobnie specyficznych dla komórek podlegających podziałowi meiotycznemu. Ponadto założono, że musi również istnieć zależna od cyklina specyficzna kinaza, która być może odgrywa kluczową rolę w regulacji interakcji pomiędzy chromosomami homologicznymi. Na tej podstawie Azumi i wsp. [5] stworzyli model, który zakłada, że białko SDS decyduje o czasie rozdzielania chromosomów tworzących biwalent poprzez fosforylację białek zaangażowanych w utrzymanie tego związku przestrzennego, przy czym możliwe, że jednym z tych białek jest opisane powyżej SWI1.

Podobnego fenotypowo do *sds* mutantu *Arabidopsis* opisali Schommer i wsp. [39]. Rośliny z mutacją genu *AHP2 (Arabidopsis Homologue Pairing 2)* były sterylne w wyniku zaburzeń mejozy. Wykorzystując technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do lokalizacji sekwencji organizatora jąderkowego (NOR) stwierdzono, że w mikrosporocytach mutantów *ahp2-1* chromosomy rozmieszczone są w sposób przypadkowy, co jest konsekwencją nie wytworzenia się biwalentów w I profazie meiotycznej [39]. Wynikiem tych zaburzeń jest nieprawidłowa segregacja chromosomów podczas anafazy I i II podziału meiotycznego. Badania molekularne ujawniły, że gen *AHP2* jest homologiem genu *meu13⁺*, który kontroluje parowanie chromosomów homologicznych podczas mejozy u drożdży. Na tej podstawie autorzy sugerują, że funkcja drożdżowego genu *meu13⁺* jest konserwowana w bardziej ewolucyjnie zaawansowanych komórkach eukariotycznych [39].

Kolejnym genem rzodkiewnika pospolitego, który kontroluje przestrzenny związek pomiędzy chromosomami homologicznymi, jest *ASY1 (ASynaptic 1)*. Mutacja tego genu objawia się całkowitym brakiem formowania biwalentów podczas I profazy meiotycznej [3]. Brak synapsis pomiędzy chromosomami homologicznymi u roślin o genotypie *asy1* powoduje, iż chromosomy pozostają uniwalentami, nie tworzą się też chiazmy. Efektem są zaburzenia w rozchodzeniu się chromosomów homologicznych podczas anafazy I podziału meiotycznego i powstanie jąder o przypadkowej liczbie i składzie chromosomów. W rezultacie po II podziale meiotycznym u mutantów *asy1* dochodzi do powstania nienaturalnych wielokomórkowych produktów mejozy, tzw. poliad, zawierających zróżnicowaną liczbę chromosomów [3].

Immunolokalizacja białka ASY1 u roślin *A. thaliana* i *Brassica oleracea* dzikiego typu wydaje się odzwierciedlać jego funkcję podczas koniugacji chromosomów

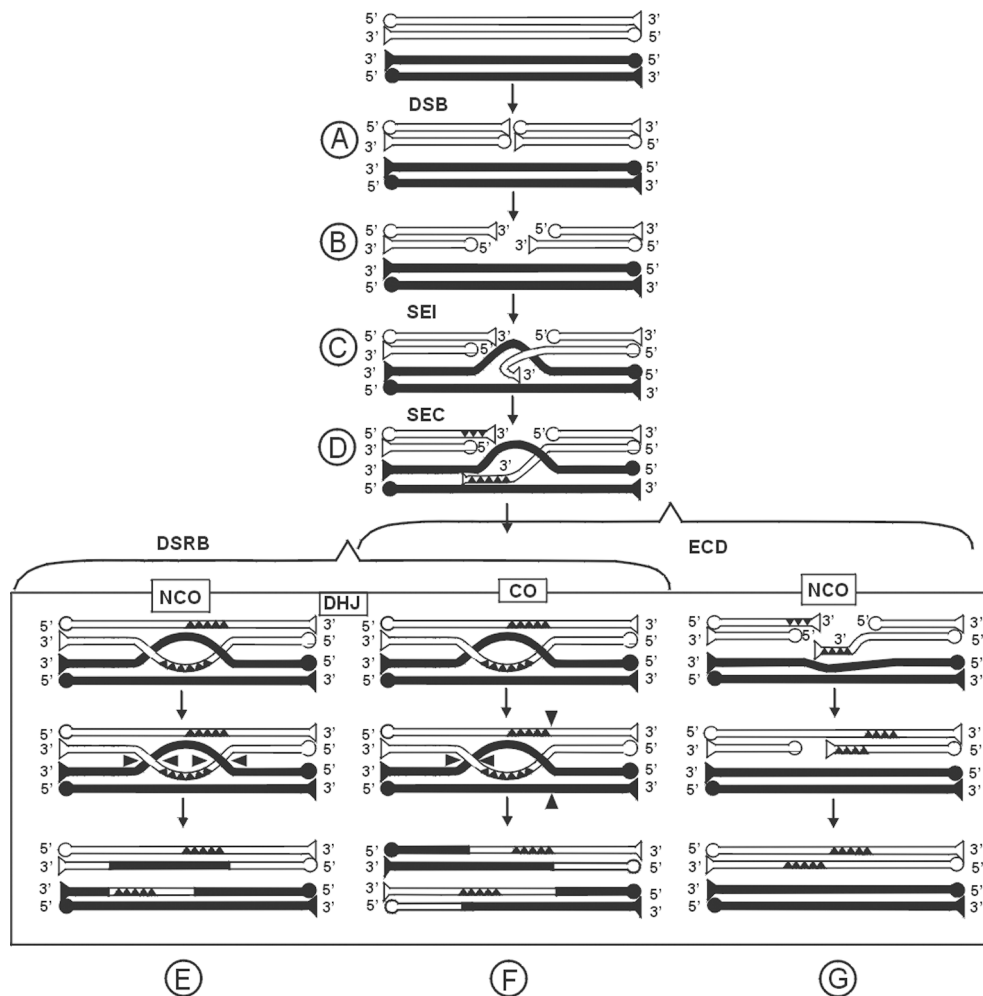
homologicznych [4]. W interfazie premejotycznej białko ASY1 występowało w postaci punktowych skupisk na terenie jąder mikrosporocytów. Z chwilą wejścia komórek w I profazę mejotyczną jego lokalizacja stawała się bardziej homogenna i w okresie leptotenzjotyten obserwowana była jedynie na obszarze elementów osiowych chromatyd chromosomów homologicznych. Badania na poziomie subkomórkowym wykazały, że białko ASY1 występuje jedynie wzdłuż chromatyny bezpośrednio zasocjowanej z elementami osiowymi (bocznymi) kompleksu synaptonemalnego. Podczas dalszego etapu I profazy mejotycznej następowało stopniowe obniżanie poziomu białka ASY1 na terenie kompleksu synaptonemalnego. Proces ten był skorelowany z postępującą separacją chromosomów homologicznych. W okresie późnego diplotenu białko lokalizowano jedynie w postaci nielicznych, niezwiązanych z chromatyną agregatów na terenie jądra komórkowego [4].

Badania molekularne ujawniły, że białko ASY1 wykazuje znaczącą homologię do N-końcowego odcinka drożdżowego białka HOP1 (*Homolog Of Presenilin*), które również związane jest z elementami osiowymi chromosomów [15]. Homologiczny region zawiera charakterystyczną domenę HOMA, która występuje w białkach zasocjowanych z chromatyną. Białko HOP1 charakteryzuje się także podobnym do ASY1 wzorem czasowej i przestrzennej lokalizacji komórkowej w okresie leptotenu. Badania *in vitro* ujawniły ponadto, że białko HOP1 wchodzi w interakcję z innym białkiem – RED1, które jest niezbędne do prawidłowego montażu elementów osiowych podczas mejozy w komórkach drożdży [48]. Nie wykazano jednakże podobieństw sekwencji amino-kwasów drożdżowego białka RED1 do ASY1, ani żadnego innego białka rzodkiewnika pospolitego. W związku z tym sugeruje się, że ASY1 może pełnić analogiczną rolę jak białka HOP1/RED1 u drożdży, tj. pośredniczyć w interakcji pomiędzy elementami osiowymi kompleksu synaptonemalnego i chromatyną chromosomów homologicznych [4].

Zaburzenia w łączeniu chromosomów homologicznych w pary wykazują także mutanty *dys1* (*desynaptic 1*) i *dys10* (*desynaptic 10*), jednakże molekularne podłoże tych fenotypów nie zostało jeszcze poznane. Oba mutanty charakteryzują się zredukowaną płodnością, wynikającą z nietrwałej asocjacji chromosomów, których separacja zachodzi już pod koniec I profazy mejotycznej. Ostatecznym efektem mejozy u roślin *dys1* i *dys10* są jedno- lub wielojądrowe wielokomórkowe struktury, charakteryzujące się różną ilością DNA [48].

3. REKOMBINACJA MATERIAŁU GENETYCZNEGO (CROSSING-OVER)

Aktualnie w literaturze funkcjonują dwa podstawowe modele rekombinacji materiału genetycznego u *Eukaryota* (ryc. 3). Oba stworzono na podstawie badań tego procesu głównie u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Pierwszy z nich opracowany przez Szostaka i wsp. [43] to model DSBR (*Double-Strand-Break-Repair*), zwany także modelem przerw dwuniciowych, drugi natomiast określany jest mianem ECD (*Early-Crossover-Decision*) [9]. Zasadniczo modele te różnią się czasem, w którym „podjęta

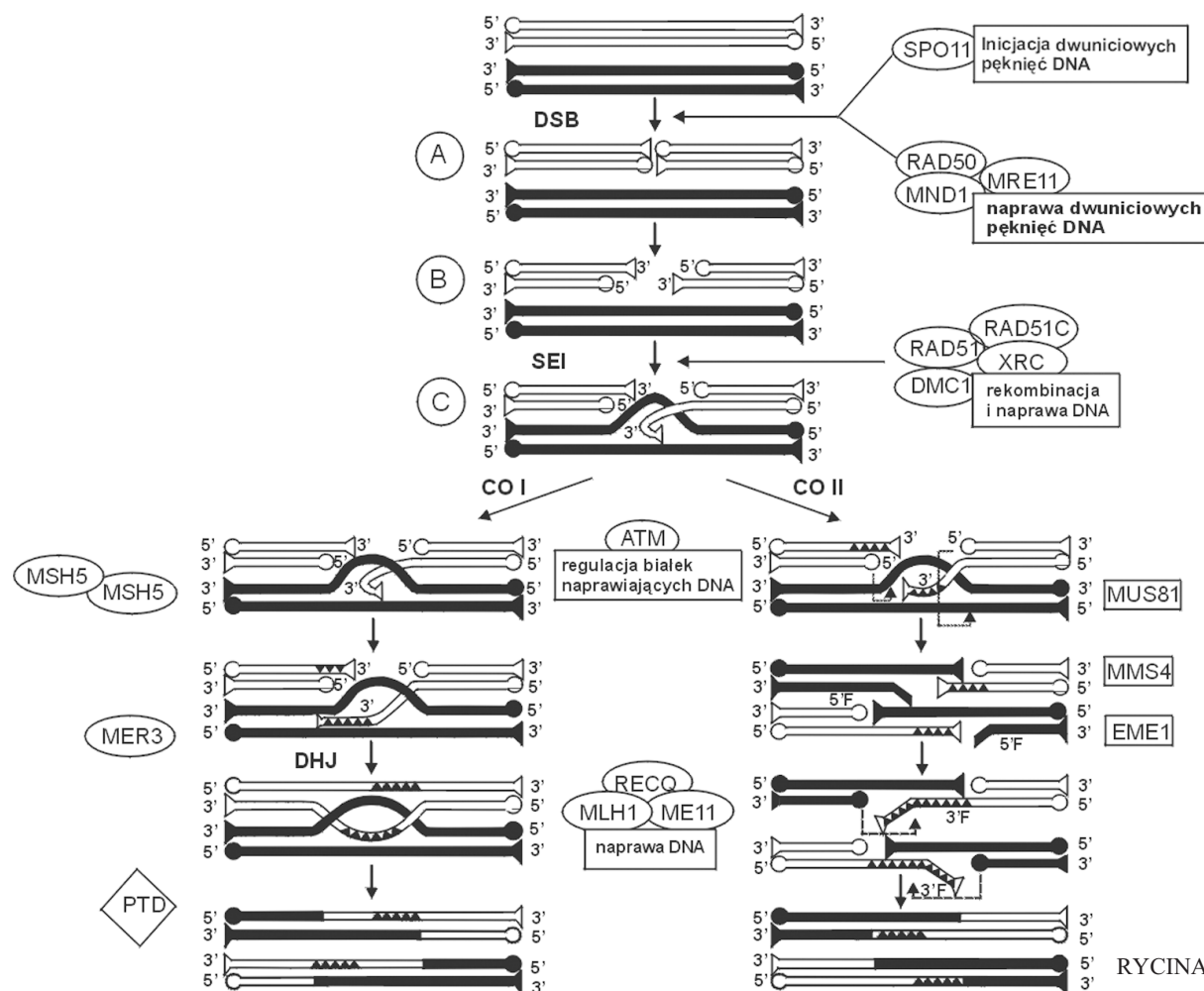


RYCINA 3. Schemat procesu rekombinacji wg modeli DSB i ECD (kolorem białym i czarnym zaznaczono podwójne łańcuchy DNA chromatyd niesiostrzanych). Wg obu modeli proces inicjuje pęknięcie podwójnej nici DNA jednej z chromatyd chromosomów homologicznych, efektem czego jest wytworzenie tzw. intermediatu DSB (A). Po częściowej lizie końców 5' powstają fragmenty jednoniciowego DNA z lepkimi końcami 3' (B). Atak 3' końca jednoniciowego DNA na nieprzeciętą nić DNA niesiostrzanej chromatydzie powoduje powstanie intermediatu SEI z tzw. pętlą D (C). Synteza brakujących fragmentów DNA na matrycy nici DNA niesiostrzanej chromatydzie prowadzi do powstania intermediatu SEC, który może podlegać różnym dalszym przemianom (D). E-F – wg modelu DSRB połączenie lepkiego końca 3' atakującej nici DNA z jej macierzystą nicią doprowadza do uformowania podwójnej struktury Hollidaya (DHJ). Nici w obrębie DHJ podlegają następnie cięciu przez specyficzne endonukleazy. Potencjalne miejsca cięcia oznaczono gwiazdkami. W zależności od miejsca cięcia nici tworzących DHJ dochodzić może do powstania dwu rodzajów produktu rekombinacji: E – NONCROSSOVER (NCO) lub F – CROSSOVER (CO) (opis w tekście). F-G – Wg modelu ECD do powstania intermediatu DHJ dochodzi jedynie w przypadku szlaku prowadzącego do CO (F). Szlak powstawania NCO obejmuje wydłużanie atakującej nici, a następnie jej wycofanie z pętli D i ponowne połączenie ze swoją macierzystą nicią (G) (wg [29], zmieniony)

zostaje decyzja” o końcowym efekcie *crossing-over* – czy będzie to tylko konwersja genu, tzn. fragmenty DNA usunięte z jednej nici DNA zostaną zastąpione przez kopie DNA z nici homologicznej (NCO – *NonCrossOver*), czy też dojdzie do rekombinacji między niesiostrzanymi chromatydami danego biwalentu (CO – *CrossOver*) [13].

Według obu modeli pierwszym etapem rekombinacji jest pęknięcie podwójnej nici DNA jednej z chromatyd chromosomu homologicznego (tzw. DSB, z ang. *Double-Strand-Breaks*), wynikiem czego jest powstanie dwu wolnych końców 3' i 5' (ryc. 3A). Po rozcięciu dochodzi do częściowej degradacji tych nici DNA, które mają wolne końce 5' (ryc. 3B). W rezultacie tworzą się jednoniciowe odcinki DNA mające 3' lepki koniec. Jedna z tych nici przemieszcza się i atakuje nieprzerwaną podwójną nić DNA chromatydy niesiostrzanej. W poszukiwaniu komplementarnych sekwencji inwazyjne jednoniciowe DNA przesuwają się wzdłuż zaatakowanej nici DNA, czemu towarzyszy rozplatanie jej podwójnej spirali. Efektem jest powstanie struktury nazywanej pętlą D, która umożliwia odnalezienie się komplementarnych odcinków DNA pomiędzy niesiostrzanymi chromatydami. Wytworzony w tym procesie intermediat określa się SEI (z ang. *Single-End-Invasion*) (ryc. 3C). W ten sposób jednoniciowe odcinki DNA nieprzeciętej chromatydy stają się matrycami do syntezy DNA i wydłużenia pojedynczych nici zakończonych lepkimi końcami 3' z chromatydy niesiostrzanej. W procesie tym powstaje kolejny intermediat procesu *crossing-over* – SEC (z ang. *Second-End-Capture*) (ryc. 3D). Kowalencyjne połączenie nowosyntetyzowanego fragmentu nici zakończonej 3' z lepkim końcem 5' zlokalizowanym po drugiej stronie pętli D oraz ligacja wszystkich nowosyntetyzowanych fragmentów DNA doprowadza do powstania kluczowego intermediatu procesu *crossing-over* – tzw. podwójnej struktury Hollidaya (z ang. *Double Holliday Junction* – **DHJ**) (ryc. 3E, F). W modelu DSBR założono, że podczas *crossing-over* zawsze dochodzi do powstania podwójnej struktury Hollidaya, a efekt tego procesu, tj. wytworzenie NCO lub CO, zależy od sposobu cięcia nici DNA tworzących DHJ. W przypadku cięcia jedynie nici DNA o tej samej polaryzacji (ryc. 3E) dochodzi do konwersji genów pomiędzy chromosomami homologicznymi, a produkty tego procesu to tzw. *NonCrossOvers* (NCO). Jeśli natomiast endonukleazy przetną również nici DNA skierowane w przeciwnym kierunku, możliwa staje się wymiana odcinków pomiędzy chromatydami niesiostrzanymi, czego efektem są typowe produkty procesu *crossing-over* – CO (ryc. 3F) [29].

Model ECD zakłada natomiast, że podczas procesu rekombinacji kierunek przemian molekularnych prowadzących do powstania CO bądź NCO zostaje określony na długo przed powstaniem podwójnej struktury Hollidaya. Prawdopodobnie „decyzja” ta ma miejsce już w leptotenie profazy I, tuż po powstaniu DSB [12]. Według tego modelu tylko szlak prowadzący do wytworzenia CO obejmuje powstanie stabilnego intermediatu DHJ oraz wymianę odcinków DNA pomiędzy chromatydami niesiostrzanymi (ryc. 3F). Natomiast jeśli efektem końcowym rekombinacji będzie NCO, nie dochodzi do powstania intermediatu HDJ (ryc. 3G). W tym przypadku po wydłużeniu przeciętej, atakującej swym końcem 3' nici DNA, ulega ona wycofaniu z pętli D. Synteza brakujących odcinków DNA oraz ich ligacja z macierzystymi nićmi DNA prowadzi do powstania NCO jako ostatecznego produktu rekombinacji.



RYCINA 4. Opis obok

Dzięki intensywnym badaniom molekularnym możliwa jest ciągła weryfikacja istniejących modeli procesu rekombinacji. Dobrym tego przykładem jest jedno z najbardziej spektakularnych odkryć ostatnich lat, dotyczące formowania CO. Wykazano bowiem, najpierw u drożdży [19], a następnie u *A. thaliana* [28], że istnieją dwie alternatywne drogi powstawania CO podczas rekombinacji mejotycznej (ryc. 4D,E). W związku z tym wyróżniono dwie klasy produktów *crossing-over*: *crossovers* podlegające interferencji (**CO I**) (ryc. 4D) oraz *crossovers* niepodlegające interferencji (**CO II**) (ryc. 4E). Interferencja jest znanym od dawna zjawiskiem, polegającym na tym, że zajście *crossing-over* w jednym odcinku chromosomu zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia drugiego *crossing-over* w jego najbliższym sąsiedztwie [22]. Ponieważ CO są niezbędne do prawidłowej segregacji chromosomów podczas pierwszego podziału mejotycznego, defekty w interferencji mogłyby spowodować zaburzenia segregacji lub rozchodzenia chromosomów.

Obecnie zakłada się, że CO klasy I powstają w sposób opisany w modelu ECD, który obejmuje generowanie typowych intermediatów *crossing-over*: SEC oraz DHJ (ryc. 4D). Cięcie nici DNA tworzących podwójną strukturę Hollidaya prowadzi do wymiany odcinków DNA pomiędzy niesiostrzanymi chromatydami chromosomów homologicznych. Biochemiczny szlak powstawania CO niepodlegających interferencji jest odmienny i nie wymaga powstawania HDJ (ryc. 4E). Po wydłużeniu końca 3' przeciętych nici DNA następuje cięcie obydwu nici tworzących tzw. pętlę D. W efekcie w obu niciach DNA na końcach 5' mogą powstawać zarówno „przerwy” (ang. *gaps*), wynikające z braku pewnych sekwencji DNA, jak i „zakładki” (ang. *flaps*), tj. powielone

RYCINA 4. Hipotetyczny model genetycznej i molekularnej regulacji rekombinacji mejotycznej u *A. thaliana* (kolorem białym i czarnym zaznaczono podwójne łańcuchy DNA chromatyd niesiostrzanych). A – Formowanie intermediatu DSB wymaga aktywności białek SPO11 oraz kompleksu innych białek, m.in. RAD50 i MRE11, które uczestniczą w cięciu i naprawie podwójnej nici DNA jednej z chromatyd niesiostrzanych. B – Częściowa liza 5' nici DNA. C – W przemieszczenie oraz atak lepkiego końca 3' jednoniciowego DNA na nić DNA chromatydy niesiostrzanej zaangażowane są: w kompleks białek RAD51/RAD51C/XRC oraz białko DMC1. Prowadzi to do uformowania intermediatu SEI i powstania „pętli D”. D – Wytworzenie CO klasy I (zależne od interferencji) przebiega w sposób podobny jak w modelach DSB i ECD z udziałem m.in. białek MSH4 i MSH5 oraz białka MER3. Synteza i wydłużenie lepkich końców 3' jednoniciowego DNA odbywa się na matrycy nici DNA chromatydy niesiostrzanej, co prowadzi do wytworzenia intermediatu SEC, a następnie powstania podwójnej struktury Hollidaya (DHJ). Cięcie wszystkich 4 pojedynczych nici DNA umożliwia wymianę odcinków DNA między chromatydami niesiostrzanymi. E – Produkty *crossing-over* klasy II (niezależne od interferencji) generowane są prawdopodobnie przy udziale egzonukleaz homologicznych do drożdżowych białek MUS81/EME1 i oraz MUS81/MMS4, które przecinają nici DNA tworzące „pętlę D” (strzałki z przerywaną linią). Proces ten inicjuje powstawanie produktów *crossing-over* zawierających tzw. 5' zakładki (5'F) oraz „przerwy” (z ang. *gaps*). Izomeryzacja 5' zakładek w 3' zakładki (3'F) umożliwia drugą rundę cięcia przez kompleksy białek MUS81/EME1 i MUS81/MMS4. Synteza nowych fragmentów DNA w „przerwach” oraz ich ligacja prowadzi do powstania CO bez konieczności formowania DHJ. F – W stabilizacji powstałych podczas *crossing-over* heterodupleksów uczestniczy białko MND1. Naprawa DNA w procesie rekombinacji odbywa się z udziałem m.in. białek RECQ, MLH1, MEI1, których aktywność regulowana jest przez kinazę białkową ATM. Geny umieszczone w elipsach to zidentyfikowane u *A. thaliana* homologi genów drożdżowych, w prostokątach – geny zidentyfikowane tylko u drożdży. Gen PTD (romb), o nieznanym dotąd funkcji, nie wykazuje homologii do żadnego z genów drożdżowych, co sugeruje, że rekombinacja u roślin jest regulowana nieco odmiennymi szlakami metabolicznymi (wg [29], zmieniony).

fragmenty nici DNA. Zakładki te mogą zostać wycięte przez specyficzne 5' endonukleazy i może nastąpić ligacja lepkich końców wszystkich 4 nici DNA. Wg innej hipotezy przed ostateczną ligacją nici DNA następuje izomeryzacja „zakładek” z końca 5' na koniec 3'. W tym przypadku to zakładki 3' ulegają wycięciu. Synteza brakujących fragmentów DNA i ich ostateczne łączenie skutkowałoby powstawaniem produktów CO bez obecności intermediatu DHJ, typowego dla CO klasy I [29].

3.1. Geny kontrolujące proces rekombinacji meiotycznej

Intensywne badania molekularnej natury procesu *crossing-over* prowadzone na takich modelach badawczych, jak: drożdże, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oraz myszy, wykazały, że geny kontrolujące proces wymiany odcinków chromatyd między chromosomami homologicznymi podczas mejozy są generalnie wysoce konserwatywne ewolucyjnie. W genomie różnych gatunków roślin okrytonasiennych zidentyfikowano dużą liczbę homologów i ortologów genów związanych z procesem rekombinacji u drożdży, *Drosophila melanogaster* czy kręgowców wyższych, w tym również człowieka. Poniżej przedstawiono informacje dotyczące większości genów bezpośrednio zaangażowanych w proces rekombinacji meiotycznej u drożdży, z uwzględnieniem ich homologów lub ortologów znalezionych u roślin, przede wszystkim u *A. thaliana*. Pozwala to na określenie ich przypuszczalnej funkcji i skonstruowanie hipotetycznego modelu molekularnej kontroli rekombinacji u *A. thaliana* (ryc. 4).

Geny kontrolujące proces rekombinacji materiału genetycznego podczas mejozy kodują przede wszystkim enzymy uczestniczące w organizacji struktury DNA oraz cięciu i naprawie DNA.

Inicjacja pęknięć podwójnej nici DNA (DSB) jednego z chromosomów homologicznych, która rozpoczyna *crossing-over*, u drożdży znajduje się pod kontrolą genu *SPO11*. Białko SPO11 należy do rodziny topoizomeraz typu II. U *A. thaliana* opisano homologi tego genu nazwane *AtSPO11-1*, *AtSPO11-2*, *AtSPO11-3* (ryc. 4A). Podobnie jak u drożdży, białka SPO11 rzodkiewnika mają właściwości topoizomerazy. Rośliny *spo11-1*, zarówno w mikro- jak i megasporocytach, formują nieliczne biwalenty, co prowadzi do nieprawidłowości w rozdziale chromosomów podczas anafazy I i II podziału meiotycznego. Efektem tych zaburzeń w pylniku jest formowanie anormalnych wielokomórkowych produktów mejozy o różnej zawartości DNA [26].

U drożdży w skład kompleksu katalizującego pękanie podwójnej nici DNA wchodzi dodatkowe białko, m.in. kodowane przez geny *MRE11* i *RAD50*. Ich homologi opisano również u *A. thaliana* (*AtMRE11*, *AtRAD50*). Białka MRE11 oraz RAD50 wchodzi w skład kompleksu odpowiedzialnego za naprawę dwuniciowych pęknięć DNA. U rzodkiewnika fenotypowym efektem mutacji *rad50* jest jego duża wrażliwość na działanie siarczanu metylmetanu, związku uszkadzającego DNA. Rośliny takie są całkowicie sterylne, bowiem chromosomy homologiczne są niezdolne do koniugacji, co w konsekwencji doprowadza do ich destrukcji podczas dalszych stadiów mejozy [11].

Do wytworzenia intermediatu SEI, który powstaje po usunięciu fragmentów jednoniciowych odcinków DNA jednej z chromatyd niesiostrzanych (ryc. 4B), konieczna jest ekspresja genu *RAD51* i jego paralogów *RAD51C* i *XRC* oraz genu *DMC1*. Białka

RAD51 i DMC1 są homologami bakteryjnej rekombinazy RecA, natomiast RAD51C i XRCC3 odgrywają prawdopodobnie rolę w montażu i stabilizacji białka RAD51. U drożdży białka te uczestniczą w prawidłowym parowaniu chromosomów homologicznych, oddziaływaniach pomiędzy niciami DNA, wymianie ich fragmentów oraz naprawie uszkodzeń DNA. Zgodnie z modelem ECD uważa się, że białka RAD51 i DMC1 opłaszczają wolny koniec 3' jednoniciowego DNA, powstającego po usunięciu końców 5' drugiej nici, i promują jego atak na nić DNA chromatyd niesiostrzanej (ryc. 4C). Białko DMC1, jak się sądzi, odgrywa istotną rolę w identyfikacji homologii DNA między nicią z 3' końcem a nienaruszoną nicią z chromatyd niesiostrzanej.

Homologi opisanych genów odnaleziono także u roślin, m.in. u *A. thaliana* (geny *AtRAD50*, *AtRAD51*, *AtXRCC3*, *AtDMC1*), *Oryza sativa* (gen *OsDMC1*, RiLIM15A i B oraz *Zea mays* i *Hordeum vulgare* (gen *HvDMC1*) [40]. U *A. thaliana* mutanty *rad51*, *rad51c* oraz *Xrcc3* charakteryzują się wysoką wrażliwością na czynniki uszkodzające DNA i są sterylne. Rozwój wegetatywny roślin *rad51c* oraz *xrcc3* jest normalny, jednakże ich pylniki pozbawione są ziaren pyłkowych [1,10]. Zaburzenia płodności wykazują też mutanty *dmc1*, u których nie tworzą się biwalenty, a efektem mejozy są wielokomórkowe poliady o zróżnicowanej zawartości DNA.

W 2002 roku doniesiono o identyfikacji ortologów drożdżowego genu *MND* w genomie pierwotniaków, ssaków oraz roślin, w tym *A. thaliana* [24]. Na tej podstawie autorzy sugerują, iż funkcja białka MND jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie. Białko MND w komórkach drożdży jest zaangażowane najprawdopodobniej w proces naprawy DSB podczas pierwszych etapów procesu rekombinacji mejotycznej. Uczestniczy też w stabilizacji powstających heterodupleksów DNA. Domenichini i wsp. [20] wyizolowali mutantą rzodkiewnika pospolitego – *atmnd1-Δ1*, który charakteryzował się normalnym rozwojem wegetatywnym oraz morfogenezą kwiatu, jednakże wykazywał znaczne nieprawidłowości podczas pierwszej profazy mejotycznej. U roślin *atmnd1-Δ1* obserwowano bowiem fragmentację chromosomów, a następnie ich nierówną dystrybucję pomiędzy komórkami tworzącymi poliadę. Wysoka wrażliwość mutantów *atmnd1-Δ1* na promieniowanie γ , obserwowana zarówno w komórkach linii generatywnej, jak i somatycznych, zdaniem autorów świadczyć może o udziale białka MND w procesach naprawy uszkodzeń DNA także w komórkach dzielących się mitotycznie [20].

W kompleksach synaptonemalnych z białkami RAD51 i DMC1 kolokalizuje białko kodowane przez gen *RECQ HELICASES*. Jest to helikaza z rodziny RecQ, która uczestniczy w replikacji i rekombinacji DNA w późniejszych etapach naprawy pęknięć dwuniciowego DNA. U *A. thaliana* opisano 6 homologów tego genu. Roślina ze zmutowanym genem *AtRecQ14* charakteryzowała się zwiększoną wrażliwością na zniszczenia DNA oraz podwyższoną częstością rekombinacji *in planta* [6].

Do genów, które kontrolują proces naprawy DNA podczas *crossing-over* u drożdży, a których homologi odnaleziono u *A. thaliana*, należą też *MLH1*, *MEI1* oraz *ATM*. Gen *MLH1* u drożdży koduje białko odpowiedzialne za naprawę ewentualnych niedopasowań podczas wymiany odcinków chromatyd w procesie rekombinacji mejotycznej. Badania u *A. thaliana* wykazały, że mutacja w promotorowym regionie genu *AtMLH1* nie wpływa na poziom jego ekspresji, a homozygotyczne rośliny nie

wykazywały widocznych efektów fenotypowych. Natomiast mutanty *mei1* wykazują zaburzenia zarówno męskiej, jak i żeńskiej mejozy. Defekty objawiają się między innymi fragmentacją chromosomów, powstawaniem poliad oraz zredukowaną płodnością [27]. Białko MEI1 u *A. thaliana* zawiera na C-końcu pięć domen BRCA (BRCT). Domeny BRCA identyfikowano jak dotąd w białkach związanych z procesami naprawy DNA oraz molekułach kontrolujących cykl komórkowy.

W regulację czynników białkowych, bezpośrednio uczestniczących w rekombinacji DNA, zaangażowany jest produkt genu *ATM*, którego homolog występuje u *A. thaliana* (gen *AtATM*). Białko ATM jest składnikiem zarówno wczesnych, jak i późnych grudek rekombinacyjnych. Jest to kinaza białkowa, której aktywność indukują pęknięcia DNA, szczególnie podwójnych nici. Kinaza ATM fosforyluje białka biorące udział w naprawie pęknięć DNA, między innymi podczas mitozy i mejozy. Mutacje genu *AtATM* objawiały się wysoką podatnością roślin na promieniowanie gamma oraz specyficzne związki chemiczne niszczące strukturę DNA. Ponadto rośliny o genotypie *atatm* były częściowo sterylne, prawdopodobnie w wyniku nasilonej fragmentacji chromosomów i zaburzeń ich rozdziału podczas mejozy [23].

Badania u drożdży wskazują, że wytwarzanie dwu klasy produktów *crossing-over*, tj. CO I i CO II, kontrolowane jest dzięki ekspresji różnych genów. Molekułami obsługującymi szlak CO I są homologi bakteryjnego białka MutS – MSH4 (*MutS Homolog 4*) i MSH5 (*MutS Homolog 5*) (ryc. 4D). Tworzą one kompleks i razem z białkami Zip1, Zip2, Zip3 oraz MER3 zaliczane są do epistatycznej rodziny białkowej – ZMM. Mutacja genów *MSH4* i *MSH5* powoduje defekty w formowaniu synapsis chromosomów homologicznych podczas profazy I podziału meiotycznego oraz trzy- lub czterokrotną redukcję poziomu *crossing-over*. Również mutanty genu *mer3* wykazują obniżoną ilość CO, aczkolwiek mutacja ta nie wpływa na poziom formowania NCO. Ponadto opisywane mutanty nie wykazywały obecności takich intermediatów rekombinacji, jak: SEI oraz DHJ. Mazina i wsp. [32] wykazali, że białko MER3 ma aktywność helikazy i może uczestniczyć w stabilizacji molekuł uczestniczących w szlaku formowania podwójnej struktury Hollidaya (HDJ). Genetyczna analiza pozostałej grupy produktów *crossing-over* u opisanych mutantów drożdżowych wykazała ponadto, że nie podlegają one zjawisku interferencji [12].

Badania drożdży ze szczepu *Saccharomyces pombe* pozwoliły na zidentyfikowanie trzech genów, które są potencjalnie związane z generowaniem CO klasy II (ryc. 4E). Są to: *MUS81*, *MMS4* oraz *EME1*. Ich białkowe produkty wykazują aktywność endonukleazową i najprawdopodobniej są odpowiedzialne za cięcie oraz naprawę pęknięć DNA [29]. U *S. pombe* mutacja wszystkich trzech genów objawia się prawie całkowitą redukcją CO, zaburzeniami segregacji chromosomów i obniżeniem żywotności spor do zaledwie 1% w stosunku do typu dzikiego. Mutacja tych samych genów u *S. cerevisiae*, również wpływa na przebieg procesu rekombinacji i żywotność spor, ale w znacznie mniejszym stopniu aniżeli u *S. pombe* [29].

Jak dotąd wykazano, że w komórkach *Eukaryota* większość powstających CO należy do I klasy i jest zależna od interferencji, a w ich generowaniu biorą udział białka MSH4 oraz MSH5. Druga klasa CO II stanowi znacznie mniejszą grupę, nie podlega zjawisku

interferencji, a szlak jej biogenezy obsługiwany jest między innymi przez białka MUS81, MMS1 oraz EME1 [29]. Interesujący wydaje się fakt, że stosunek CO I do CO II jest różny u różnych organizmów. I tak na przykład u *S. pombe* wszystkie generowane CO wydają się należeć do II klasy CO, podczas gdy u *S. cerevisiae* większość wszystkich CO stanowią te należące do I klasy. Z kolei u *C. elegans* mutacja genów *MSH4* i *MSH5* całkowicie znosi powstawanie CO, co wskazuje, że u tych organizmów obecne są wyłącznie CO I klasy. U kręgowców sytuacja nie jest w pełni poznana, aczkolwiek u myszy i u człowieka zidentyfikowano geny należące do szlaków biochemicznych obu klas CO [35].

Intensywne badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że u rzodkiewnika obecne są homologi zarówno drożdżowego genu *MSH4*, jak i *MER3* [28, 35]. Analiza mutantów ujawniła ponadto, że u tego gatunku generowane są obie klasy CO, przy czym CO klasy I stanowią zdecydowaną większość. Badania Higgins i wsp. [28] pokazały, że mutacja genu *AtMSH4* nie wpływa na prawidłowy rozwój wegetatywny rośliny, ale powoduje znaczną redukcję jej płodności. Przyczyną obniżonej zdolności reprodukcyjnej tych roślin jest opóźnienie formowania synapsis chromosomów homologicznych oraz znaczny spadek ilości chiazmy – do 15% w stosunku do roślin typu dzikiego. Obniżenie liczby chiazmy (cytologiczny marker zajścia *crossing-over*) oraz nieregularny wzorec ich rozmieszczenia (marker interferencji) wskazuje, że powstałe chiazmy reprezentują niezależne od *MSH4* CO klasy II [28]. Również mutacja genu *MER3*, właściwego dla I klasy CO, powoduje podobne efekty fenotypowe jak u mutantów *atmsh4*. U roślin z genotypem *mer3* obserwowano bowiem znaczną redukcję płodności, zaburzenia mejozy, w tym silnie obniżony poziom większości, ale nie wszystkich produktów *crossing-over*. Wyniki te wskazują ponadto, że funkcja białka *MER3* jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie [35].

Jak dotąd, nie zidentyfikowano w genomie *A. thaliana* homologów drożdżowych genów, których produkty białkowe uczestniczą w szlaku powstawania *crossovers* klasy II. Jednakże wyniki dotychczasowych badań genetycznych i molekularnych wskazują, że podczas mejozy u rzodkiewnika pospolitego występują, podobnie jak u drożdży *S. cerevisiae*, cząsteczki obsługujące oba szlaki procesu *crossing-over*.

W 2006 roku doniesiono o identyfikacji genu *PTD* (*PARTING DANCERS*), którego mutacja skutkuje bardzo podobnym fenotypem do opisanych powyżej przykładów. Rośliny *atptd* wykazują między innymi obniżoną płodność oraz redukcję liczby chiazmy w profazie I podziału mejotycznego. Nieliczne pozostałe chiazmy zajmują losową pozycję w mikrosporocytach, co wskazuje że najprawdopodobniej nie podlegają one zjawisku interferencji. Analiza molekularna genu *PTD* nie wykazała jego znaczącej homologii względem żadnego z drożdżowych genów rekombinacji. Sugeruje się zatem, że jego białkowy produkt pełni nieznaną dotąd rolę w formowaniu CO zależnych od interferencji [46].

Podsumowując, wyniki badań molekularnych wskazują, że u *A. thaliana* i prawdopodobnie także innych roślin okrytonasiennych, funkcjonują dwa niezależne szlaki formowania CO – zależnych i niezależnych od interferencji. Intensywne badania w tej dziedzinie owocują identyfikacją w genomie rzodkiewnika pospolitego homologów drożdżowych genów kontrolujących proces rekombinacji, jak również genów związanych z formowaniem CO, ale niespotykanych ani u drożdży, ani u innych organizmów.

Niewykluczone zatem, że rośliny wykształciły nieco inny mechanizm biochemiczny rekombinacji genów podczas mejozy. Udowodnienie słuszności tej tezy wymaga jednakże dalszych badań.

4. FUNKCJONOWANIE WRZECIONA KARIOKINETYCZNEGO

Odrębną funkcjonalnie grupę genów związanych z mejozą pylnikową stanowią te, których mutacja objawia się zaburzeniami w organizacji i funkcjonowaniu wrzeciona podziałowego. U mutantów tych genów procesy związane z kondensacją, koniugacją i rekombinacją chromosomów przebiegają prawidłowo. Efekty fenotypowe pojawiają się dopiero podczas segregacji chromosomów i chromatyd, co prowadzi do przypadkowego rozdzielania materiału genetycznego.

Jednym z genów kontrolujących prawidłowe funkcjonowanie wrzeciona kariokinetycznego jest *KATA/ATK1* (*Kinesin-like from Arabidopsis Thaliana A/Arabidopsis Thaliana Kinesin-like 1*). Gen ten koduje białko homologiczne do kinezyn [17]. Kinezyny to białka motoryczne, które są strukturalnie i funkcjonalnie związane z komórkowym szkieletem mikrotubularnym. Jak powszechnie wiadomo, kinezyny zaangażowane są w transport różnego rodzaju cargo na terenie komórki. Białka te ponadto odpowiedzialne są za wzajemną interakcję przestrzenną mikrotubul oraz być może – ich polimeryzację i depolimeryzację. Podczas podziałów komórkowych kinezyny uczestniczą między innymi w wydłużaniu i stabilizacji wrzeciona kariokinetycznego, a także w przemieszczaniu chromosomów wzdłuż mikrotubul podczas kariokinezy [25, 37]. Mutacja genu *KATA/ATK1* u rzodkiewnika powoduje wyłącznie męskosterylność, która wynika najprawdopodobniej z zaburzeń podczas rozdziału chromosomów w dzielących się mikrosporocytach. Fenotypowe efekty mutacji *KATA/ATK1* widoczne są od metafazy I podziału mejotycznego, kiedy część chromosomów nie zajmuje prawidłowej pozycji równikowej względem wrzeciona podziałowego. W rezultacie podczas anafazy I następują zaburzenia rozchodzenia się chromosomów homologicznych, przy czym niektóre z biwalentów wcale nie ulegają rozdzieleniu [17]. Badania cytologiczne roślin *kata/atk1* ujawniły, że w porównaniu z roślinami typu dzikiego, już w metafazie I na obszarze wrzeciona dzielących się mikrosporocytów występuje mniejsza ilość tubuliny, mikrotubule wykazują znaczną dezorganizację, a bieguny wrzeciona są zdestabilizowane [17].

W genomie *A. thaliana* ta sama grupa badawcza zidentyfikowała homolog genu *KATA/ATK1* – *ATK5*, który wykazuje 95% podobieństwa do *KATA/ATK1* na poziomie sekwencji aminokwasów w białku. Dwa inne geny wykazujące homologię do genów kodujących kinezyny u *Arabidopsis* to *KATB* i *KATC*, które charakteryzują się odpowiednio 57% i 56% podobieństwem sekwencji aminokwasowych do *KATA/ATK1*. Wymienione geny kodują prawdopodobnie inne białka z licznej rodziny kinezyn rzodkiewnika pospolitego [16].

5. CYTOKINEZA POSTMEJOTYCZNA

Aby podział komórki był kompletny, zarówno w mitozie jak i w mejozie, po podziale jądra komórkowego (kariokinezie) musi dojść do rozdzielenia cytoplazmy pomiędzy komórki potomne (cytokinezy). Cytokineza zachodząca po mejozie pylnikowej u roślin okrytonasiennych odróżnia się od cytokinezy mitotycznej kilkoma charakterystycznymi cechami (ryc. 1). Po pierwsze, pomiędzy nowopowstałymi haploidalnymi mikrosporami syntetyzowana jest specyficzna ściana kalozowa, zbudowana z polimeru β -1-3-glukanu. Ściana kalozowa przez pewien czas izoluje tetradę młodych mikrospor, a następnie ulega lizie, co doprowadza do rozpadu tetrady i uwolnienia mikrospor. Ponadto, od dawna wiadomo, że zależnie od przynależności systematycznej, wyróżnia się dwa typy cytokinezy u roślin okrytonasiennych: cytokinezę sukcesywną i równoczesną. U roślin jednoliściennych mikrosporocyty po kariokinezie przechodzą tzw. cytokinezę sukcesywną, która charakteryzuje się dwuetapowym formowaniem ściany. Ściana kalozowa syntetyzowana jest najpierw po pierwszym podziale mejotycznym pomiędzy komórkami diady, a następnie pomiędzy mikrosporami w końcowych etapach drugiego podziału mejotycznego. Z kolei większość roślin dwuliściennych przechodzi po mejozie pylnikowej cytokinezę równoczesną, podczas której synteza wszystkich ścian ma miejsce dopiero po drugim podziale mejotycznym.

Inną charakterystyczną cechą cytokinezy postmejotycznej w pylniku, odróżniającą ją od cytokinezy postmitotycznej, jest odmienna organizacja elementów cytoszkieletu, które decydują o późniejszym wzorcu podziału cytoplazmy. W większości komórek somatycznych podczas fazy G_2 interfazy występuje tzw. pierścień preprofazowy (ang. *PreproPhase Band* – PPB), który dokładnie wyznacza plan przyszłej cytokinezy. Jest to struktura utworzona z połączonych ze sobą mikrotubul i mikrofilamentów, które tworzą pierścień okalający jądro komórkowe. Powstający po mitozie fragmoplast zakłada się dokładnie w tym samym miejscu dzielącej się komórki, w którym w końcowym okresie interfazy występował pierścień preprofazowy [51]. Pierścienie preprofazowe nie tworzą się jednakże w komórkach dzielących się mejotycznie. Podczas podziału mejotycznego płaszczyznę cytokinezy wyznacza inna, specyficzna organizacja cytoszkieletu. Po I i II podziale mejotycznym (cytokineza sukcesywna) lub tylko po II podziale mejotycznym (cytokineza równoczesna) jądra komórkowe przyszłych mikrospor zastają otoczone przez mikrotubule, które promieniście odchodzą od błony jądrowej. Powstają w ten sposób struktury nazywane jądrowymi domenami cytoplazmatycznymi (ang. *Nuclear Cytoplasmatic Domains* – NCDs) lub też domenami sporowymi. Obszary styku takich domen wyznaczają jednocześnie przyszłe granice komórki oraz miejsce odkładania się ściany kalozowej po zakończeniu cytokinezy [13].

Rzodkiewnik należy do licznej grupy roślin, u których podczas mikrosporoogenezy występuje cytokineza równoczesna. Zaburzenia w przebiegu tego procesu zidentyfikowano wśród licznych mutantów tej rośliny. Klasycznym już przykładem są rośliny z mutacją genu *STUD/TETRASPORE* (*STD/TES*) [30]. U roślin *stud/tetraspore* kariokineza przebiega prawidłowo, w telofazie II podziału mejotycznego powstają 4 haploidalne jądra. Fenotypowy efekt mutacji genu *STUD/TETRASPORE* objawia się

natomiast częściowym lub kompletnym brakiem cytokinezy postmeiotycznej. W rezultacie u roślin o genotypie *std/tetraspore* zamiast tetrady mikrospor powstaje jedna duża, czterojądrowa mikrospora („tetraspora”). Interesujące, że takie anormalne mikrospory przechodzą dalszy rozwój. Każde z haploidalnych jąder jest zdolne do całkowitej niezależnej mitozy, z cytokinezą włącznie, co wskazuje że pierwsza mitoza pyłkowa (PM I) jest procesem kontrolowanym przez czynniki wewnętrzne obecne w mikrosporze. W wielu przypadkach dochodzi też do podziału komórki generatywnej (PMII) i ostatecznie powstają duże ziarna pyłkowe zawierające cztery jądra wegetatywne i do ośmiu jąder plemnikowych. Podczas kiełkowania z ziaren tych jednakże wyrasta tylko jedna łagiewka pyłkowa [30].

W 2003 roku Yang i wsp. dokonali analizy molekularnej genu *STD/TES*, którego mutacja powoduje opisany powyżej fenotyp. Wykazano, iż gen ten koduje jedną z 61 zidentyfikowanych w genomie *A. thaliana* kinezyn – AtF7K15.60. Białko STD/TES zawiera na N-końcu domenę homologiczną do domeny motorycznej kinezyn, natomiast na C-końcu jego sekwencja wykazuje dużą homologię do mało licznej rodziny kinezyn roślinnych, do której należą między innymi białka HINKEL (HIK) u *A. thaliana* oraz NACK1 i NACK2 u tytoniu. Białka te zaangażowane są w organizację mikrotubul podczas cytokinezy mitotycznej u opisanych gatunków [51].

Immunocytochemiczna lokalizacja mikrotubul w mikrosporocytach u roślin dzikiego typu oraz u mutantu *std/tes* wykazała, że u tego ostatniego nie dochodzi do powstania jądrowych domen cytoplazmatycznych [51]. W związku z tym autorzy sugerują, że kinezyna kodowana przez gen *STD/TES* jest konieczna do formowania NCDs, a tym samym do prawidłowego przebiegu postmeiotycznej cytokinezy w pylnikach *A. thaliana*.

6. REGULACJA EKSPRESJI GENÓW SPECYFICZNYCH DLA PRZEBIEGU MIKROSPOROGENEZY

Odrębną grupę molekuł odpowiedzialnych za precyzyjną koordynację wydarzeń związanych z wejściem w mejozę oraz przebieg samej mejozy stanowią czynniki transkrypcyjne oraz elementy maszyneryi kontrolującej przebieg cyklu komórkowego.

Jak dotąd zidentyfikowano niewielką liczbę roślinnych czynników transkrypcyjnych specyficznych dla procesu mejozy. Większość z nich kodowana jest przez geny, których mutacja powoduje częściową lub całkowitą sterylność roślin. Jednym z takich genów jest *SPOROCYTELESS (SPL)/NOZZLE (NZZ)*, który został zidentyfikowany i scharakteryzowany w 1999 roku przez niezależne od siebie dwie grupy badawcze u *A. thaliana* [50, 41]. Produkt białkowy genu *(SPL)/NZZ* jest niezbędny do prawidłowej inicjacji sporogenezy zarówno w męskich, jak i żeńskich organach generatywnych. Podczas rozwoju pylnika mutantów *spl/nzz* obserwuje się zaburzenia w różnicowaniu komórek ściany i tkanki archesporialnej, co w efekcie objawia się brakiem wyróżnianego endotecjum, tapetum oraz mikrosporocytów [50]. Analiza molekularna genu

(*SPL*)/*NZZ* wykazała, że koduje on białko jądrowe wykazujące podobieństwo do czynników transkrypcyjnych z rodziny MADS box. W związku z tym autorzy sugerują, że białkowy produkt genu *SPL/NZZ* jest jednym z czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów zaangażowanych w przejście *A. thaliana* ze stanu wegetatywnego w generatywny [50].

Czynnikiem transkrypcyjnym *A. thaliana*, kontrolującym ekspresję genów specyficznych tylko dla mejozy pylnikowej jest białko MALE MEIOCYTE DEATH 1 (*MMD1*) [52]. Białko to jest homologiczne do czynników transkrypcyjnych należących do klasy PHD-finger (ang. *Plant Homeo Domain-finger*), tj. zawierających roślinną homeodomenę zmodyfikowanego palca cynkowego. Czynniki z tej klasy zidentyfikowano zarówno u człowieka, drożdży, jak i wielu roślin wyższych, a ich wspólną cechą jest obecność sekwencji podobnej do motywu palca cynkowego. Mutacja genu *MMD1* powoduje degenerację mejocytów już pod koniec profazy I podziału mejotycznego. Mikrosporocyty w tym okresie wykazywały oznaki apoptozy, obserwowano w nich bowiem fragmentację chromatyny i defekty w organizacji chromosomów oraz kurczenie się cytoplazmy. Śmierć mikrosporocytów u roślin *mmd1* następowała jeszcze przed cytokinezą postmeiotyczną. Możliwe, że rola białka *MMD1* polega na regulacji ekspresji genów mejotycznych poprzez remodelowanie chromatyny i/lub udział w transkrypcji tych genów [52].

W 2003 roku Reddy i wsp. [38] u *A. thaliana* opisali innego całkowicie męskosterylnego, lecz żeńsko-płodnego mutantu, który został nazwany *duet*. Mutant charakteryzował się zaburzeniami w zachowaniu chromosomów podczas końcowych stadiów I profazy mejozy pylnikowej. W mikrosporocytach mutantów obserwowano przedwczesną separację chromosomów, która miała miejsce już podczas pachytenu i diplotenu. Ponadto w metafazie I zamiast pojedynczych chromosomów w dzielących się komórkach widoczna była jedynie rozproszona masa DNA [38]. Analiza molekularna genu *DUET* ujawniła, że wykazuje on ekspresję tylko w mikrosporocytach, a kodowane przez niego białko zawiera wspomnianą domenę PHD-finger. Obecność tej domeny wskazuje, iż białko *DUET* może pełnić istotną rolę w regulacji organizacji chromatyny oraz transkrypcji genów podczas mikrosporoogenezy [38].

Kolejnym zidentyfikowanym regulatorem transkrypcji, który jednakże jest specyficzny wyłącznie dla rozwoju komórek męskiej linii generatywnej, jest białko kodowane przez gen *MALE STERILITY 1* (*AtMS1*) [47]. Mutanty *ms1* są całkowicie męskosterylne, bowiem tuż po uwolnieniu z tetrady następuje degeneracja ich mikrospor. Proces ten wydaje się być efektem braku prawidłowej interakcji mikrospor z komórkami tapetum. Analiza cytologiczna mutantów ujawniła bowiem, że w komórki tapetum ulegają przedwczesnej, anormalnej wakuolizacji. Badania molekularne wykazały, że białko *MS1* jest homologiczne do czynników transkrypcyjnych należących do klasy PHD-finger. W związku z tym sugeruje się, że odgrywa ono kluczową rolę w regulacji ekspresji genów związanych przede wszystkim z rozwojem tapetum, a pośrednio także z rozwojem męskiego gametofitu u *Arabidopsis* [47].

Przedwczesną degenerację tapetum i mikrospor, tj. tuż po rozpadzie tetrad, opisano też u mutantu *aborted microspore 1* (*ams1*) [42]. Mutant charakteryzował się

całkowitą sterylnością męską – pylniki kompletnie pozbawione były żywotnych ziaren pyłku. Analiza molekularna genu *AMS1* wykazała, że ma on podstawową domenę wiążącą DNA oraz motyw helix-pętla-helix (HLH), co jest charakterystyczne dla grupy czynników transkrypcyjnych z rodziny MYB. Czynniki transkrypcyjne z rodziny MYB są fosfoproteinami o krótkim okresie półtrwania, które lokalizuje się przede wszystkim na terenie jądra komórkowego. Wykazują one dużą specyficzność względem zespołów genowych i/lub pojedynczych genów w różnych typach komórek roślin i zwierząt. Generalnie, rola czynników transkrypcyjnych z rodziny MYB polega na kontroli ekspresji genów odpowiedzialnych za takie procesy komórkowe jak przebieg cyklu komórkowego czy apoptoza. Przypuszcza się, że białko AMS1 odgrywa zasadniczą rolę w regulacji rozwoju komórek tapetum oraz przebiegu postmeiotycznych etapów cyklu życiowego mikrospor *Arabidopsis* [42].

Fenotypy odrębnej grupy mutantów rzodkiewnika pospolitego wydają się być efektem zaburzeń w regulacji cyklu komórkowego podczas mejozy lub tuż po jej zakończeniu.

Mutanty *tam1* (*tardy asynchronous meiosis 1*) są wrażliwe na temperaturę i wykazują asynchroniczność mejozy w obrębie pylnika. U roślin tych dochodzi do opóźnienia cyklu komórkowego zarówno w pachytenie, jak i w okresie drugiego podziału mejotycznego. U rośliny *tam1* po zakończeniu kariokinezy i powstaniu czterech haploidalnych jąder dochodzi tylko do pojedynczej cytokinezy, w wyniku której ściana kalozowa dzieli tetradę na dwie, a nie jak w przypadku roślin typu dzikiego, na cztery komórki. Jako ostateczny produkt mejozy najczęściej powstają diady zbudowane z dwujądrowych mikrospor. W rzadkich przypadkach, kiedy dochodzi do normalnej syntezy sporodermy, wytwarzane są tzw. „diady pyłkowe”, tj. dwie dwukomórkowe struktury zamknięte we wspólnej ścianie komórkowej [31]. Gen *TAM1* koduje cyklinę typu A-CYCA1;2. W mikrosporocytach najwyższy poziom tego białka obserwowano w pachytenie, było ono natomiast niewykrywalne od końca profazy I do telofazy II. Z uwagi na efekty fenotypowe sugeruje się, że produkowane podczas profazy I białko CYCA1;2 reguluje nie tylko I podział mejotyczny, ale także – w sposób pośredni lub bezpośredni – II podział mejotyczny [44].

Istotną rolę w przebiegu mejozy u roślin prawdopodobnie odgrywa też gen *MS5/TMD1/POLLENLESS3* [16]. Jak dotąd wykazano jedynie, że gen *MS5/TMD1/POLLENLESS3* wykazuje pewną homologię do dwóch białek: 1) SCP1 będącego składnikiem kompleksu synaptonemalnego u szczura oraz 2) regulatorowej podjednostki kinazy zależnej od cyklin u *Xenopus*. Nie jest to homologia pełna, jednakże na podstawie czasowego i przestrzennego wzorca ekspresji genu *MS5/TMD1/POLLENLESS3* sugeruje się, że białko to uczestniczy w regulacji cyklu życiowego mikrosporocytów *A. thaliana*.

Mutacja genu *MS5/TMD1/POLLENLESS3* fenotypowo ujawnia się dopiero po zakończeniu mikrosporogenezy. Powstałe po mejozie haploidalne mikrospory rozpoczynają kolejny podział, który jednakże nie jest poprzedzony replikacją DNA. Do jednochromatydowych, mających 1 centromer chromosomów mogą się zatem przyczepić włókna wrzeciona kariokinetycznego z obydwu biegunów komórki. W rezultacie chromosomy są nienaturalnie „rozciągane” i pozostają przyczepione do wrzeciona bądź

są przypadkowo rozdzielane do jąder potomnych. Jeżeli dochodzi do odtworzenia jąder interfazowych, zawierają one różne liczby chromosomów (chromatyd). W opisanych przypadkach dochodzi do powstania struktur złożonych nawet z ośmiu mikrospor [16].

Zatrzymanie cyklu komórkowego większości mikrosporocytów po I podziale mejotycznym jest efektem mutacji genu *DSY10*. Wśród efektów fenotypowych mutacji tego genu opisano też: asynchronizację mejozy w pylnikach, rozpad biwalentów pod koniec profazy I, nieprawidłowy rozdział chromosomów podczas anafazy I. Produktem mejozy u roślin z genotypem *dsy10* są nieliczne tetrazy mikrospor o różnej ilości jąder komórkowych [14]. Jak dotąd nie analizowano molekularnie i genetycznie mutacji *dsy10*. Na podstawie cytologicznej analizy mutantów przypuszcza się, że gen *DSY 10* pełni istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego mikrosporocytów rzodkiewnika [14].

Wyłącznie męskosterylne są rośliny *A. thaliana* ze zmutowanym genem *ASK1* (*ARABIDOPSIS SKP1-LIKE*). U roślin tych produktem mejozy pylnikowej były wielokomórkowe „poliady”, charakteryzujące się zróżnicowaną zawartością DNA w komórkach [54]. Pierwsze zaburzenia cytologiczne w mikrosporocytach mutantów *ask1-1* mają jednakże miejsce już na przełomie leptotenu i zygotenu. W jądrach tych komórek m.in. stwierdzono defekty w przestrzennym związku pomiędzy chromosomami homologicznymi, nie obserwowano też charakterystycznej dla tego okresu wędrówki jąderka na peryferia jądra [45]. Głównym fenotypowym efektem mutacji *ask1-1* były zaburzenia w segregacji chromosomów podczas anafazy I, włącznie z tym, iż niektóre biwalenty w ogóle nie ulegały rozdziałowi. Nieprawidłowości obserwowano także podczas anafazy II, kiedy nie dochodziło do rozdziału siostrzanych chromatyd [49]. Ponadto w metafazie i anafazie I podziału mejotycznego stwierdzono wydłużenie wrzeciona kariokinetycznego mikrosporocytów. Efekty mutacji genu *ASK1* potwierdzono nie tylko w komórkach linii generatywnej. Homozygoty *ask1-1*, oprócz nieprawidłowości w budowie kwiatów, cechowały się mniejszymi rozmiarami liści rozetkowych oraz międzywęźli, co jest wynikiem mniejszej liczby komórek w tych strukturach [53].

Molekularna analiza genu *ASK1* wykazała, że jest on homologiem ludzkiego i drożdżowego genu *SKP1*. Białko SKP stanowi kluczowy element kompleksu ligazy SCF typu E3, która reguluje cykl życiowy komórek somatycznych poprzez ubiquitylację białek przeznaczonych do degradacji w proteasomach. Istotnie, białko ASK1 jest komponentem ligaz ubiquitynowych E3 typu SCF (*Skp1-Cullin-F-box*), które piętnują określone białka do degradacji w proteasomach typu 26S [45]. Jak wiadomo, profaza I podziału mejotycznego jest wypadkową zdarzeń następujących po sobie w ściśle określonej kolejności i czasie. W związku z tym sugeruje się, że białko ASK1 może być elementem maszynarii proteolitycznej, która reguluje zasobność puli białek uczestniczących w poszczególnych stadiach pierwszej profazy mejotycznej. U rzodkiewnika ekspresję konstruktu GFP-ASK1 obserwowano podczas całej profazy I podziału mejotycznego, aczkolwiek najwyższy jego poziom widoczny był w okresie od leptotenu do pachytenu. Wyniki te potwierdzają obserwacje mikrosporocytów roślin o genotypie *ask1-1*, w których pierwsze fenotypowe efekty mutacji genu *ASK1* widoczne były właśnie w tym okresie profazy I. Jest to okres koniugacji i rekombinacji chromosomów homologicznych. Wydaje się zatem, że białko ASK1 jest szczególnie zaangażowane w prawidłowy przebieg procesu rekombinacji podczas mikrosporoogenezy [45]. Biorąc

pod uwagę mnogość białek uczestniczących w *crossing-over* zakłada się, iż w mikrosporocytach istnieje precyzyjny mechanizm odpowiedzialny za degradację cząsteczek uczestniczących w jednym z etapów rekombinacji, aby umożliwić działanie białek zaangażowanych w kolejny etap tego procesu.

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano jak dotąd 21 genów *ASK*, przy czym najlepiej poznano opisany powyżej gen *ASK1*. Ostatnie badania Zhao i wsp. [54] wykazały, że białko, kodowane przez inny gen z rodziny *ASK* - *ASK2*, wykazuje ponad 75% homologii do *ASK1* i podobnie jak ono asocjuje z cząsteczkami uczestniczącymi w procesach proteolitycznej degradacji białek. Wzór ekspresji genów *ASK1* i *ASK2* jest zasadniczo podobny, aczkolwiek ekspresja genu *ASK2* ma nieco niższy poziom aniżeli genu *ASK1* [54]. Defekty w procesie rekombinacji u mutantów *ask1* wskazują, że poziom ekspresji genu *ASK2* jest zbyt niski, aby zniwelować efekty tej mutacji, lub też białko *ASK2* ma inne funkcje aniżeli *ASK1*. Zhao i wsp. [54] wykazali, że rzeczywiście podwyższenie poziomu ekspresji genu *ASK2* tylko częściowo znosi efekty mutacji genu *ASK1* podczas mejozy pylnikowej. W związku z tym autorzy sugerują, że białko *ASK2* pełni nieco odmienną rolę aniżeli białko *ASK1* i nie jest zdolne do jego zastąpienia podczas mejozy pylnikowej u *Arabidopsis*.

ZAKOŃCZENIE

Mejoza jest procesem o ogromnym znaczeniu dla rozwoju życia na Ziemi. Wiele aspektów tego wyjątkowego podziału komórek jest wspólnych i silnie konserwatywnych ewolucyjnie w świecie żywym, niezależnie od pozycji systematycznej organizmów. Intensywny rozwój metod biologii molekularnej oraz powszechne zastosowanie technik uzyskiwania mutantów owocują identyfikacją licznych genów kontrolujących złożoną sieć procesów związanych z podziałem mejotycznym. Modelowe organizmy wykorzystywane w badaniach mejozy, a zwłaszcza procesu rekombinacji genetycznej, to przede wszystkim drożdże, *Caenorhabditis elegans* oraz rzodkiewnik pospolity. Dzięki wspomnianej już konserwatywności ewolucyjnej molekularnych mechanizmów podziału mejotycznego, możliwe stało się identyfikowanie i ustalanie stopnia homologii licznych genów mejotycznych. Jednoczesna analiza cytologiczna uzyskanych mutantów w ogromnym stopniu przyczynia się do precyzyjnego ustalenia wpływu mutacji na cały organizm, a dzięki temu pozwala na ustalenie potencjalnej funkcji genu. Badania genetycznego podłoża mejozy roślinnej z pewnością przyczynią się również do poszerzenia informacji na temat molekularnej kontroli procesu wytwarzania gamet, nie tylko u roślin.

LITERATURA

- [1] ABE K, OSAKABE K, NAKAYMA S, ENDO M, TAGIRI A, TODORIKI S, ICHIKAWA H, TOKI S. *Arabidopsis RAD51C* gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiol* 2005; **139**: 896–908.
- [2] ANDERSON LK, STACK SM. Meiotic recombination in plants. *Curr Genomics* 2002; **3**: 507–525.
- [3] ARMSTRONG SJ, FRANKLIN FCH, JONES GH. Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4207–4217.
- [4] ARMSTRONG SJ, CARYL AP, JONES GH, FRANKLIN FCH. Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3645–3655.
- [5] AZUMI Y, LIU D, ZHAO D, LI W, WANG G, HU Y, MA H. Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the *SOLO DANCERS* gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* 2002; **21**: 3081–3095.
- [6] BAGHERIEH-NAJJAR MB, DE VRIES OM, DIJKWEL PP. *Arabidopsis RecQ1A* suppresses homologous recombination and modulates DNA damage responses. *Plant J* 2005; **43**: 789–798.
- [7] BAI X, PEIRSON BN, DONG F, XUE C, MAKAROFF CA. Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 417–430.
- [8] BHATT AM, LISTER C, PAGE T, FRANSZ P, FINDLAY K, JONES GH, DICKINSON HG, DEAN C. The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *REC8/RAD21* cohesin gene family. *Plant J* 1999; **19**: 463–472.
- [9] BISHOP DK, ZICKLER D. Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell* 2004; **117**: 9–15.
- [10] BLEUYARD JY, WHITE CI. The *Arabidopsis* homologue of Xrcc3 plays essential role in meiosis. *EMBO J* 2004; **23**: 439–449.
- [11] BLEUYARD JY, GALLEO ME, WHITE CI. Meiotic defects in the *Arabidopsis rad50* mutant point to conservation of MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* 2004; **113**: 197–203.
- [12] BÖRNER GV, KLECKNER N, HUNTER N. Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 2004; **117**: 29–45.
- [13] BROWN RC, LEMMON BE. The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* 2001; **215**: 35–49.
- [14] CAI X, MAKAROFF CA. The *dsy10* mutation of *Arabidopsis* results in desynapsis and a general breakdown in meiosis. *Sex Plant Rep* 2001; **14**: 63–67.
- [15] CARYL AP, ARMSTRONG SJ, JONES GH, FRANKLIN FCH. A homologue of the yeast *HOP1* gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma* 2000; **109**: 62–71.
- [16] CARYL AP, JONES GH, FRANKLIN FCH. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *J. Exp Bot* 2003; **54**: 25–38.
- [17] CHEN C, MARCUS A, LI W, HU Y, CALZADA J-PV, GROSSNIKLAUS U, CYR RJ, MA H. The *Arabidopsis ATK1* gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. *Development* 2002; **129**: 2401–2409.
- [18] COPENHAVER GP. Plant genetics: when not to interfere. *Curr Biol* 2005; **15**: 290–291.
- [19] DE LOS SANTOS T, HUNTER N, LEE C, LARKIN B, LOIDL J, HOLLINGSWORTH NM. The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* 2003; **164**: 81–84.
- [20] DOMENICHINI S, RAYNAUD C, NI DA, HENRY Y, BERGOUNIOUX C. *Atmnd1-D1* is sensitive to gamma-irradiation and defective in meiotic DNA repair. *DNA Repair* 2006; **5**: 455–464.
- [21] DONG F, CAI X, MAKAROFF CA. Cloning and characterization of two *Arabidopsis* genes that belong to the RAD51/REC8 family of chromosome cohesin proteins. *Gene* 2001; **271**: 99–108.
- [22] GAJEWSKI W. Genetyka klasyczna i molekularna. PWN W-wa; 1983.
- [23] GARCIA V, BRUCHET H, CAMESCASSE D, GRANIER F, BOUCHEZ D, TISSIER A. *AtATM* is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell* 2003; **15**: 119–132.
- [24] GERTON JL, DeRISI JL. Mnd1p: an evolutionarily conserved protein required for meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6896–6900.

- [25] GOLDSTEIN LSB. Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tails. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 477–482.
- [26] GRELON M, VEZON D, GENDROT G, PELLETIER G. *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 2001; **20**: 589–600.
- [27] GRELON M, GENDROT G, VEZON D, PELLETIER G. The *Arabidopsis* *MEI1* gene encodes a protein with five BRCT domains that is involved in meiosis-specific DNA repair events independent of SPO11-induced DSBs. *Plant J* 2003; **35**: 465–475.
- [28] HIGGINS JD, ARMSTRONG SJ, FRANKLIN FC, JONES GH. The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2004; **18**: 2557–2570.
- [29] HOLLINGSWORTH NM, BRILL SJ. The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* 2004; **18**: 117–125.
- [30] HÜLSKAMP M, PAREKH NS, GRINI P, SCHNEITZ K, ZIMMERMANN I, LOLLE SJ, PRUITT RE. The *STUD* gene is required for male-specific cytokinesis after telophase II of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* 1997; **187**: 114–124.
- [31] MAGNARD JL, YANG M, CHEN YC, LEARY M, McCORMICK S. The *Arabidopsis* gene *tardy asynchronous meiosis* is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiol* 2001; **127**: 1157–1166.
- [32] MAZINA OM, MAZIN AV, NAKAGAWA T, KOLODNER RD, KOWALCZYKOWSKI SC. *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51; implications for crossover control in meiotic recombination. *Cell* 2004; **117**: 47–56.
- [33] MERCIER R, VEZON D, BULLIER E, MOTAMAYOR JC, SELLIER A, LEFEVRE F, PELLETIER G, HORLOW C. Switch1 (Swi1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 1859–1871.
- [34] MERCIER R, ARMSTRONG SJ, HORLOW C, JACKSON NP, MAKAROFF CA, VEZON D, PELLETIER G, JONES GH, FRANKLIN FC. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. *Development* 2003; **130**: 3309–3318.
- [35] MERCIER R, JOLIVET S, VEZON D, HUPPE E, CHELYSHEVA L, GIOVANNI M, NOGUE F, DOUTRIAUX MP, HORLOW C, GRELON M, MEZARD C. Two meiotic crossover classes cohabit in *Arabidopsis*: one is dependent on *MER3*, whereas the other one is not. *Curr Biol* 2005; **15**: 692–701.
- [36] MOTAMAYOR JC, VEZON D, BAJON C, SAUVANET A, GRANDJEAN O, SIDDIQI I, GANESH G, GROSSNICLAUS U, SUBBIAH V. The *DYAD* gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis*. *Development* 2000; **127**: 197–207.
- [37] REDDY ASN. Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol* 2001; **204**: 97–178.
- [38] REDDY TV, KAUR J, AGASHE B, SUNDARESAN V, SIDDIQI I. The *DUET* gene is necessary for chromosome organization and progression during male meiosis in *Arabidopsis* and encodes a PHD finger protein. *Development* 2003; **130**: 5975–5987.
- [39] SCHOMMER C, BEVEN A, LAWRENSON T, SHAW P, SABLowski R. *AHP2* is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. *Plant J* 2003; **36**: 1–11.
- [40] SCHWARZACHER T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. *J Exp Bot* 2003; **54**: 11–23.
- [41] SCHIEFTHALER U, BALASUBRAMANIAN S, SIEBER P, CHEVALIER D, WISMAN E, SCHNEITZ K. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11664–11669.
- [42] SORENSEN A-M, KRÖBER S, UNTE US, HUIJSER P, DEKKER K, SAEDLER H. The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* 2003; **33**: 413–423.
- [43] SZOSTAK JW, ORR-WEAVER TL, ROTHSTEIN RJ, STAHL FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 1983; **33**: 25–35.
- [44] WANG Y, MAGNARD JL, McCORMICK S, YANG M. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. *Plant Physiol* 2004; **136**: 4127–4135.
- [45] WANG Y, YANG M. The *ARABIDOPSIS SKP1-LIKE (ASK1)* protein acts predominately from leptotene to pachytene and repress homologous recombination in male meiosis. *Planta* 2006; **223**: 613–617.
- [46] WIJERATNE AJ, CHEN C, ZHANG W, TIMOFEEVA L, MA H. The *Arabidopsis thaliana* *PARTING DANCERS* gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 1331–1343.

- [47] WILSON ZA, MORROLL SM, DAWSON J, SWARUP R, TIGHE PJ. The *Arabidopsis* *MALE STERILITY 1 (MSI)* gene is transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcriptional factors. *Plant J* 2001; **28**: 27–39.
- [48] WILSON ZA, YANG C. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. *Reproduction* 2004; **128**: 483–492.
- [49] YANG M, HU Y, LODHI M, McCOMBIE WR, MA H. The *Arabidopsis* *SKP1-LIKE* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11416–11421.
- [50] YANG WC, YE D, XU J, SUNDARESAN V. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev* 1999; **13**: 2108–2117.
- [51] YANG C-Y, SPIELMAN M, COLES JP, LI Y, GHELANI S, BOURDON V, BROWN RC, LEMMON BE, SCOTT RJ, DICKINSON HG. *TETRASPORE* encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003; **34**: 229–240.
- [52] YANG X, MAKAROFF CA, MA H. The *Arabidopsis* *MALE MEIOCYTE DEATH 1* gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. *Plant Cell* 2003; **15**: 1281–1295.
- [53] ZHAO D, YANG M, SOLVA J, MA H. The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev Genet* 1999; **25**: 209–223.
- [54] ZHAO D, HAN T, RISSEUW E, CROSBY WL, MA H. Conservation and divergence of *ASK1* and *ASK2* gene functions during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 163–173.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 23.05. 2006 r.

Przyjęto: 12.07. 2006 r.

ul. Gagarina 9, 87-100 TORUŃ

e-mail: kzienk@biol.uni.torun.pl