

TDK dolgozat

Egy új Rec8 mutáns karakterizálása

Egy felgyorsított reprodukív öregedés modell?

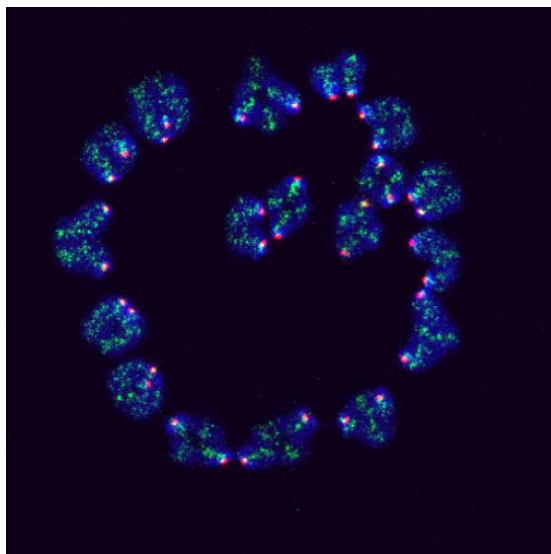
Borsos Máté

Eötvös Lóránd Tudományegyetem,
Biológus MSc, I. évfolyam

Témavezető:

Kikuë Tachibana-Konwalski

Institute of Molecular Biotechnology of the
Austrian Academy of Sciences (IMBA)



Budapest, 2012.

Tartalom

Összefoglaló	2
Bevezetés.....	3
Kísérleti háttér és Célok	6
Anyag és módszer	7
Egértörzsek genotipizálása	7
Petesejt izolálás	8
Kromoszóma preparátum készítése és festése.....	8
Szövettan	9
Képalkotás és analízis	9
Eredmények.....	9
Mind a centromérikus és a karokon lévő kohézió is gyengült a Rec8 ^{TEVMyc/TEVMyc} petesejtekben	9
7 hónapos kor után a Rec8 ^{TEVMyc/TEVMyc} egerek korai ovárium kimerülést mutatnak	11
Diskusszió.....	14
Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	16
Irodalom	17

Összefoglaló

Meiózis során a megfelelő kromoszóma szegregáció elengedhetetlen folyamat, hiányában aneuploid ivarsejtek képződhetnek. Ha ezek a sejtek részt vesznek a megtermékenyítésben, akkor a keletkező embriók legtöbbször még az anyaméhben elpusztulnak, vagy problémás utódok születnek. Ez utóbbinak jó példája a Down-szindróma, melyről az is ismert, hogy kialakulásának esélye adott anyai kor felett exponenciálisan növekedni kezd. Újabban feltételezik, hogy ennek egyik oka a már embrionális korban párba állt homológ kromoszómákat összetartó kohezin fehérje komplexek előregedése lehet. Ezen fehérje „gyűrűk” egyik meiotikus komponense a Rec8 gén terméke.

Munkám során egy új, mesterségesen létrehozott Rec8 mutáns egér törzs infertilitásának okát igyekeztem felderíteni. Ezen törzs homozigóta mutáns nőtényei képtelenek utódok létrehozására, azonban érett petesejtek megtalálhatóak bennük, ami alapján ez a Rec8 mutáció egy funkció felosztásos mutációnak bizonyul. Petesejt kromoszóma festéses eljárásokkal a mutáns fehérje centromérekhez közeli, illetve a kromoszóma karokon történő kohézióban való szerepét vizsgáltam. Továbbá szövettani teljes ovárium rekonstrukciókat végeztem, melyekből kiderült, hogy ezek a mutáns nőtények jóval idő előtt, már hét hónapos korban elvesztik a teljes petesejt készletüket. Ez arra utal, hogy a vizsgált egér törzs a Rec8 fehérje egyetlen doménjének mutációja által a reprodukív rendszer felgyorsított öregedésének modellje lehet.

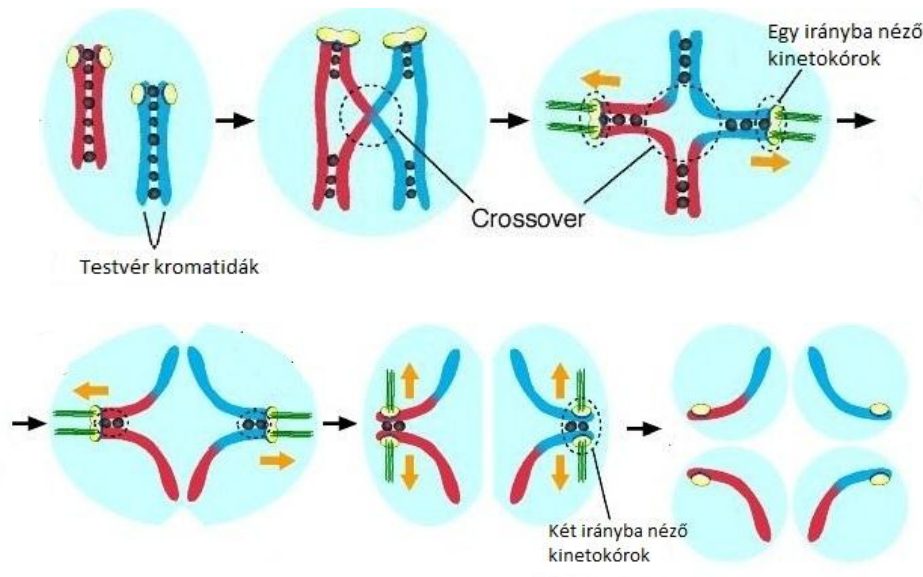
Bevezetés

A szexuálisan szaporodó élő szervezeteknek egy speciális sejtciklus programra van szükségük, mellyel haploid gamétákat képezhetnek a diploid ivarsejtjeikből. Ezen meiózisonak hívott folyamat során két egymást követő osztódási lépés valósul meg, közbeeső S fázis nélkül. A meiózison determinált sejtekben röviddel a replikáció után a homológ (apai és anyai eredetű) kromoszómapárok egymáshoz illeszkednek, fizikai kapcsolat alakul ki köztük és megtörténik a rekombináció. A rekombináció eredményeképp kialakulnak az ún. kiazmák és a két párban álló homológ kromoszóma négy kromatidája egy összefüggő, bivalensnek nevezett struktúrát formál (1. ábra). Ezt a szerkezetet a testvér kromatidák közötti kapcsolódás (kohézió) alakítja ki, ami mind a kromoszóma karokon és a centromér közeli régiókban is megvalósul. A meiózis ezen fázisában a testvér kromatidák kinetokórijai egy egybefüggő entitást képeznek, egy irányba néznek (mono-orientáltak). Ez ahhoz szükséges, hogy a következő osztódásnál megfelelően kapcsolódhassanak hozzájuk a magorsó mikrotubulusai és a helyes irányba, helyes mennyiségű örökítőanyagot húzzanak el. Az első meiotikus osztódás során a testvér kromatidák közötti kapcsolódás szelektíven csak a karokon veszik el és a magorsó fonalak így a rekombináns, két kromatidás kromoszómákat húzzák szét. Ezután a keletkezett leánysejtekben már ún. univalens kromoszómák találhatók. A második meiotikus osztódásakor a sejtek tovább felezik az örökítőanyagukat egy következő kromoszóma szegregációs és osztódási lépéssel. Ennek érdekében az univalenst alkotó két testvérkromatida kinetokórijai különválnak egymástól és ellentétes irányba néző (bi-orientált) kinetokórok jönnek létre. Ezáltal a magorsó fonalak már külön célpontként kezelhetik a kinetokórokat és a kapcsolódás után a centromérikus kohézió elvesztésével a testvér kromatidák is szétválnak. Így jönnek létre a haploid petesejtek vagy spermatoцитák (Petronczki et al., 2003).

Mindkét osztódási lépés során előfordulhatnak olyan meiotikus problémák, amik hibás kromoszóma szegregációhoz és ezáltal aneuploid gaméták létrejöttéhez vezetnek (Hassold et al., 2007; Siegel és Amon, 2012). Ha egy aberráns kariotípussal rendelkező sejt részt vesz a megtermékenyítésben, akkor egy aneuploid embrió alakul ki. Az ilyen embriók legtöbbször *in utero* elpusztulnak (Nagaoka et al., 2012), ellenkező esetben viszont aneuploid utódok jönnek világra. A legjobban ismert példa erre az esetre a humán 21-es kromoszóma triszómiája, amely Down-kórhoz vezet (Hassold és Hunt, 2001). Mára már elfogadott, hogy a legtöbb aneuploid fogantatás anyai eredetű, mivel a női meiózis jóval hibára hajlamosabbnak bizonyul a férfi

meiózishoz képest (Nagaoka et al., 2012). Ezért a petesejtek fejlődésének és az ezekben történő kromoszóma szegregációs történéseknek a molekuláris vizsgálata igen nagy jelentőséggel bír.

Azt már az 1930-as években felismerték, hogy a Down-szindrómás kisbabák nagyobb valószínűséggel születnek idősebb édesanyáktól (Penrose, 2009). Manapság tendencia, hogy a nők magasabb életkorban vállalnak gyermeket, ezért az ún. „anyai kor hatás” okainak és mechanizmusának kiderítése egy egyre inkább intenzíven kutatott, orvosiag erősen releváns témakör. Több mai tanulmány is arra utal, hogy a testvér kromatidákat összetartó kapcsolatok idővel történő elgyengülése, kimerülése és az ezáltal kialakult problémás kromoszóma szegregáció, egy az anyai kor hatás mögött álló faktor lehet (Chiang et al., 2010; Hodges et al., 2005; Lister et al., 2010). Azonban, az ezért a jelenségért felelős pontos molekuláris mechanizmus továbbra sem ismert, a kérdés máig megválaszolásra vár.



1. ábra

A meiózis fő lépéseinek sematikus rajza

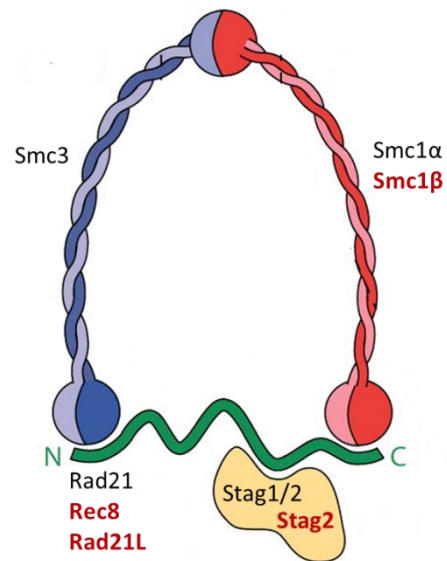
Az ábrán látható, ahogyan az univalens, két testvér kromatidából álló kromoszómák a kiazmák révén válnak bivalens struktúrákká. Fekete golyókkal a testvér kromatidákat összetartó kohézió van jelölve. Az első meiotikus osztódáskor a testvér kinetokórok összeolvadva egy irányba néznek. Ennél az első szegregációs lépésnél specifikusan csak a kromoszóma karokon történő kapcsolság szűnik meg, rekombináns univalneseket eredményezve. A második osztódáskor a kinetokórok már ellentétes irányba néznek, így a centromérikus kapcsolság elvesztése után az egyes kromatidák kerülhetnek az ellenkező leánysejtekbe. (Kudo, 2006) ábrája alapján módosítva.

A testvér kromatidák közötti fizikai kapcsolatról ismert, hogy a DNS replikáció során alakul ki (Uhlmann és Nasmyth, 1998), amely folyamat az emlős női meiocyták esetében egy

nagyon korai, embrionális stádiumban történik meg. Egy friss kutatásból kiderült, hogy egér petesejtek növekedési fázisa során nem észlelhető azon makromolekulák cserélődése (turnover-e), amik a kromoszóma kohézió fenntartásában fontosak (Tachibana-Konwalski et al., 2010). Tehát elképzelhető, hogy ugyan azok az egyedi fehérjék lehetnek felelősek a bivalens kromoszóma struktúrák életen át tartó összetartásáért, amik embrionális korban kialakították azokat. Ez egerek esetében hónapokat, embereknel pedig éveket, évtizedeket jelentene. Amennyiben tényleg igaz, ez a jelenség tovább erősítené az öregedés során, fokozatosan elgyengülő kromoszóma kohézió szerepét az anyai kor hatás okai között.

Mind a mitotikus és a meiotikus testvér kromatidák közötti kromoszóma kapcsolatok egy evolúciósan erősen konzervált fehérje komplex révén valósulnak meg, amit kohezin gyűrűnek neveznek. Meiózis során ezek a komplexek azok, amik a bivalenseket mind a kromoszóma karokon és a centromerek közelében is összetartják (Buonomo et al., 2000), továbbá ismert, hogy fontosak a megfelelő rekombináció kialakításában (Klein et al., 1999), illetve a kinetokórok pontos orientációjában is szerepük van (Watanabe, 2012). A kohezin komplex magja egy három alegységből álló gyűrű, ami körül zárja a testvér DNS molekulákat. Az emlősökben használatos nomenklatúra alapján a mitotikus gyűrű egyik része Smc fehérjékből, az Smc1 α -ból és az Smc3-ból áll, melyek egy V-alakú heterodimert alkotnak. Ezt köti össze egy ún. α -kleisin alegység, a Rad21 fehérje (2. ábra). Továbbá, a Stag1 és Stag2 fehérjék komplexe kapcsolódik az α -kleisin-hez, de ezek funkciójáról máig is kevés adat ismert. Ezen alap fehérjék közül többnek ismert meiózis specifikus variánsa: ilyen α -kleisin-ek a Rec8 és a Rad21L, valamint ismert egy Smc1 β és egy Stag3 fehérje is (Nasmyth és Haering, 2009).

A DNS kohezin gyűrűből való kijutása egy proteolitikus hasítás révén válik lehetségessé, ilyenkor egy szeparáz nevű cisztein proteáz elvágja az α -kleisin alegységet és az út a testvér kromatidák számára szabadabbá válik (Uhlmann et al., 2000). Korábbról ismert, hogy az első meiotikus szegregáció során a Rec8



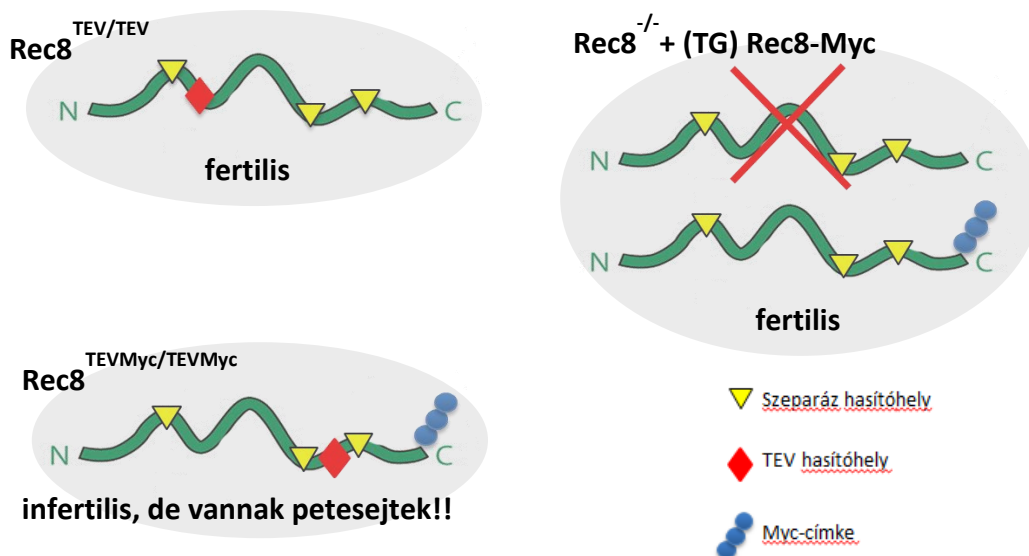
2. ábra
A kohezin komplex

Kéken és pirosan a két SMC alegység, zölden az α -kleisin látható. A fekete feliratok a mitotikus, a bordók a meiotikus komponenseket jelölik. (Nasmyth és Haering, 2009) ábrája alapján módosítva.

hasadása engedi a bivalensek univalensekre válását (Kudo et al., 2006) és most már az is bizonyított, hogy a Rec8 az α -kleisin alegység, amely mind az első és a második osztódáskor, tehát a karokon és a centroméreken is felelős a kromatidák kohéziójáért (Tachibana-Konwalski et al., 2010). Két korábbi, Rec8 funkciót vizsgáló cikk is kimutatta, hogy ez a fehérje a rekombinációhoz és a fertilitáshoz is szükséges: Rec8 hiányában az oogenezis nem megy végbe, így sem follikulusok, sem petesejtek nem detektálhatók a Rec8^{-/-} állatokban öt nappal születés után (Bannister et al., 2004; Xu et al., 2005). Ezek az adatok mind megerősítik, hogy a Rec8 fehérje fontos tényező a női emlős meiocyták fejlődésében és osztódási folyamataiban.

Kísérleti háttér és Célok

Munkám során az euploid petesejtek és embriók kialakításához szükséges folyamatokat igyekeztem vizsgálni, egy új Rec8 mutáns egértörzs karakterizálásán dolgoztam. Az egyik korábban már említett cikkben (Tachibana-Konwalski et al., 2010) a Rec8 szerepének megértéséhez több új egértörzset is létrehoztak. Ezekben az endogén gént különböző genetikailag módosított allélra cserélték le. Egyik ilyen törzs a Rec8^{TEV/TEV}, amelyben a Rec8 gén tizedik exonjába három egymást követő TEV (Tobacco Etch Virus) proteáz hasítóhelyet vittek be a kutatók (3. ábra). Az ilyen egerek fertilisek és nem mutatnak semmilyen fiziológiai defektust. Egy másik törzs, a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc}, ebben a TEV proteáz hasítóhelyek hármasa a tizenötödik exonban található, illetve a fehérje C-terminálisán egy Myc-címke is kódolt, az immuncitokémiai detektálás megkönnyítésének érdekében (3. ábra). Meglepő, hogy ezen egértörzs homozigóta mutánsai sterilek, azonban érett petesejteket lehet bennük találni. Korábbról ismert, hogy a Rec8 null mutánsok steril és petesejteket nélkülöző fenotípusa menekíthető egy olyan Rec8 transzgén hozzáadásával, aminek a C-terminálisán Myc-címke található (Kudo et al., 2006). Ez a tény arra utal, hogy a TEV proteáz hasítóhelyek tizenötös exonban való jelenléte okozza a steril, de emellett érett petesejteket tartalmazó fenotípust. Az emlős Rec8 fehérjében három endogén szeparáz hasítóhelyet azonosítottak *in vitro* (Kudo et al., 2009) és a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} mutáns törzsben a TEV hasítóhelyek a második és a harmadik szeparáz cél szekvenciák között találhatóak, ezért a fehérje ezen részét „szeparáz 2/3 doménnek” neveztük el.



3. ábra

A különböző létrehozott *Rec8* mutánsok

A tízes exonba bevitt TEV hasítóhely nem okoz gondot, fertilis állatok születnek. A tízenötös exonban lévő TEV hasítóhellyel és C-terminális Myc-címkével rendelkező *Rec8* fehérje viszont infertilis, de petesejteket tartalmazó fenotípust eredményez. Mivel a *Rec8* null mutánsok defektív fenotípusa menekíthető egy transzgenikus, C-terminális Myc-címkét tartalmazó *Rec8*^{TEVMyc/TEVMyc} bevitelével, ezért a tízenötös exonban lévő TEV hasítóhely kell felelős legyen a *Rec8*^{TEVMyc/TEVMyc} egerekben tapasztalható fenotípusért.

A *Rec8*^{TEVMyc/TEVMyc} egerek különleges fenotípusa arra utal, hogy a *Rec8* fehérje bizonyos funkcióit képes betölteni intakt szeparáz 2/3 domén nélkül is, azonban más funkcióihoz szükséges ennek a doménnek a sértetlensége. Tehát ezek az egerek a *Rec8* szempontjából funkció felosztásos mutánsoknak tekinthetők.

Munkám kezdeti célja az volt, hogy megvizsgáljam a szeparáz 2/3 domén esetleges szerepét a kromoszóma karokon és a centromérek közelében történő kohézióban.

Anyag és módszer

Egértörzsek genotipizálása

A felhasznált egerekből farok mintákat vettem, melyek lízis pufferben (10mM Tris, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 800 µg/ml Proteináz K, pH=8) 37°C-on egy éjszakán át oldódtak. 70°C-on 20 perc inaktiválás után a mintát kihígítva használtam PCR-hez templátként, a reakcióban vad típusra és TEV inszerciós mutánsra specifikus, eltérő termék méretet adó primereket alkalmazva.

Petesejt izolálás

Petesejt izoláláskor, a megfelelő ösztrusz ciklust mutató egerekből cervicalis dislocatio után az ováriumokat eltávolítottam, majd ezeket M2 médiumban (Millipore) 200 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma) mellett steril tűkkel dezintegráltam (az IBMX foszfatáz inhibitor, így a petesejtek M fázisba való lépését megindító szignalizációs útvonalak gátolva maradtak). Az érett petesejteket morfológia alapján szelektáltam, majd a sejtek 1-2 órán át termosztátban 37°C 5% CO₂ mellett regenerálódtak. A sejtek időzített, *in vitro* meiózisa indítása IBMX mentes M16 médiumban, termosztátban történt. 90 perccel az inhibitor mentes tápba helyezés után csak azokkal a sejtekkel dolgoztam tovább, melyekben ekkorra a sejtmaghártya már lebomlott, jelezve, hogy a sejtek valóban értek voltak.

Kromoszóma preparátum készítése és festése

Négy órával a sejtmaghártya lebomlása után a sejtek megfelelő korai metafázisos stádiumba jutnak, így ekkor fixáltam őket. Először 1-2 perces savas tyrode oldatban mostam a petesejteket a zona pellucida eltávolítása végett, majd 37°C-ra előmelegített agar lemezen lévő hipotóniás oldatba (1:1 PBS:Fetal Calf Serum) helyeztem őket 14 percre. A lyuggatott tárgylemezre előre kicseppentett fixáló elegybe (1% paraformaldehid PBS-ben, 0.15 % Triton X-100, 3 mM dithiotreitol) pipettáztam a sejteket. A tárgylemezek ezután sötét, párasított dobozban álltak egy éjszakán keresztül.

Másnap a tárgylemezeket 2x5 percig 0.08% Kodak Photoflo oldatban, 2x5 percig PBS-ben és 2x5 percig „immuno mosó” oldatban (0.1 % Tween, 0.2 % Bovine Serum Albumin, PBS-ben) mostam. Az elsődleges ellenanyagokat (egér anti-myc 1:500; humán anti-CREST 1:500) blokkoló oldatban (2.5 % BSA, 10 % kecske szérum (Sigma), 0.1 % Tween, PBS-ben) hígítottam fel. Az elsődleges festés 37°C-on, sötét, párasított dobozban történ 1.5 óráig. Ezután 3x10 percig immuno mosó oldatban mostam a mintákat. A másodlagos ellenanyagokkal (Alexa Fluor 488 kecske anti-egér 1:500; Alexa Fluor 594 kecske anti-humán 1:500) való festés 1 órán át, szobahőmérsékleten történt. 3x10 perc 0.1 % Tween PBS-ben való mosás után 10 percig 1:1000 hígítású Hoechst oldattal festettem meg a DNS-t, szintén sötét, párasított dobozban. 10 perces natúr PBS-ben való mosás után Vectashield beágyazó médiummal fedtem le a mintákat.

Szövettan

Az ováriumok fixálása 4%-os paraformaldehidben történt 6-8 órán keresztül, majd a szerveket paraffinba blokkba ágyaztam. A 3 μm -es metszeteket kerek mikrotómmal készítettem, azokat 48 órán keresztül szárítottam 55°C-on a tárgylemezekre. A haematoxylin-eosin festés konvencionális protokoll alapján történt.

Képalkotás és analízis

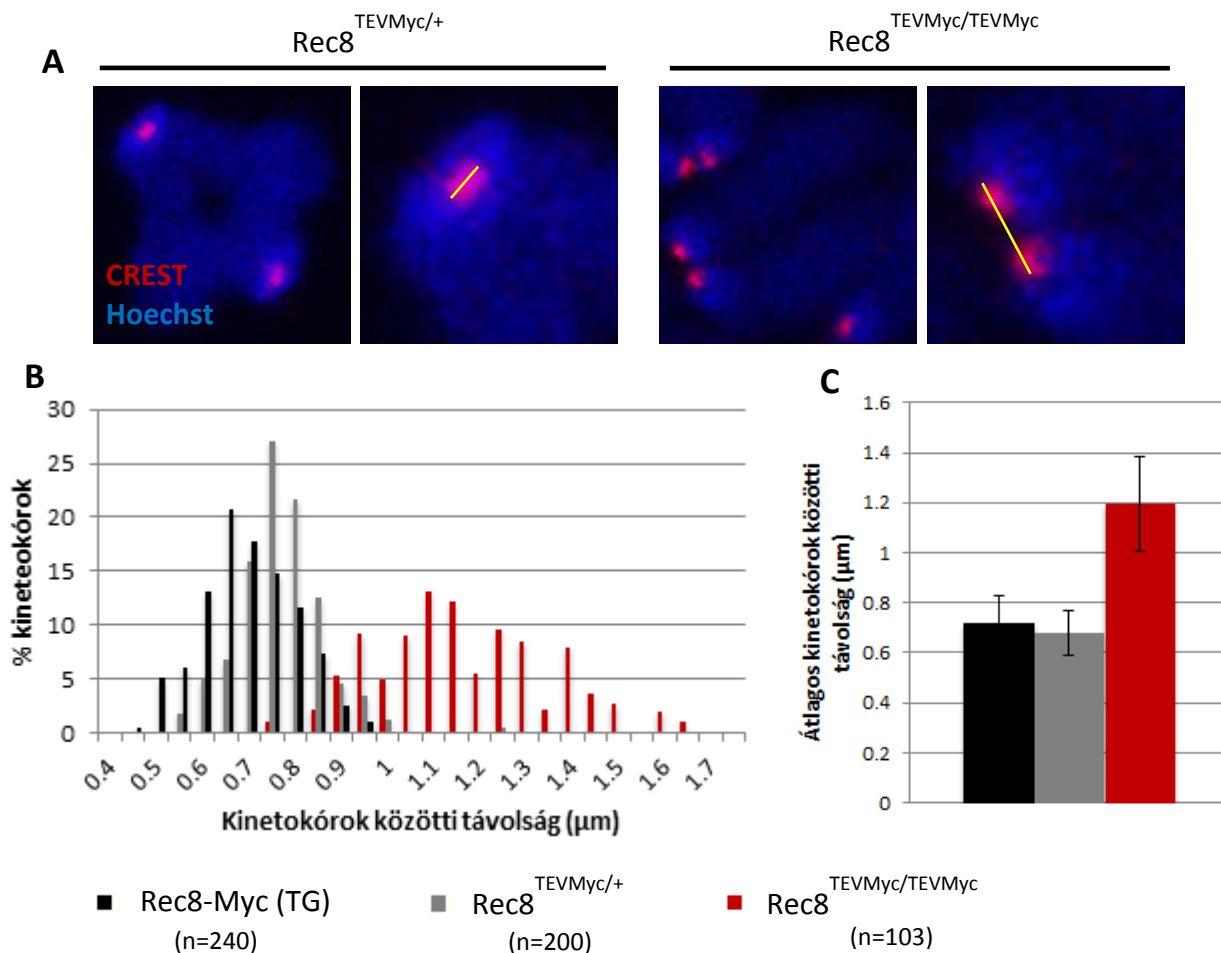
A kromoszóma preparátumokról egy Zeiss LSM 710-es mikroszkóppal, 63x/1.4 plan-apochromat Oil DIC objektívvel, Zen szoftverrel készítettem 0.3 μm -es intervallumonként Z-stack képeket amelyek maximum intenzitás projekciójával jutottam a véglegesen analizálható képekhez. A szövettani metszetek digitalizálását egy Mirax Slide Scanner-rel végeztem, majd a 3D-s rekonstrukciókat és a mozikat az Imaris és Autoaligner szoftverek segítségével hoztam létre.

Eredmények

Mind a centromérikus és a karokon lévő kohézió is gyengült a $\text{Rec8}^{\text{TEVMyc}/\text{TEVMyc}}$ petesejtekben

Annak érdekében, hogy teszteljük a szeparáz 2/3 domén szerepét a funkcionális kromoszóma kohézióban, korai metafázisos petesejtekből készítettem kromoszóma preparátumokat. Ezt először 2 hónapos $\text{Rec8}^{\text{TEVMyc}/\text{TEVMyc}}$ és hasonló idős kontroll egerek ($\text{Rec8}^{\text{TEVMyc}/+}$ és TG Rec8-myc) felhasználásával végeztem. Ez utóbbi törzsek sejtjei normális, a vad típussal azonos kromoszóma fenotípust mutatnak: húsz darab bivalens kromoszómájuk van, egy irányba néző kinetokórokkal.

Az említett domén centromérikus kapcsolódásban betöltött szerepét a kinetokórok immuncitokémiai megjelenítésével sikerült elérni. A kontroll preparátumokkal ellentétben a homozigóta mutánsok nem mutatták a konvencionális mono-orientált struktúrákat, a testvér kromatidák kinetokórjai egymástól különváltak (4. ábra). Az eredmények számszerűsítéséhez testvér kinetokórok közötti távolságot mértem, a két kinetokór jelének külső élét véve alapul. Ez a technika egy elfogadott módszer a centromérikus kohézió mértékének meghatározására (Lister et al., 2010). A mérések megmutatták, hogy mialatt a kontroll $\text{Rec8}^{\text{TEVMyc}/+}$ metafázis I-es petesejtek átlagos testvér kinetokórok közötti távolsága $0.68 \pm 0.09 \mu\text{m}$ volt, addig a homozigóta mutánsokban ez az érték $1.19 \pm 0.19 \mu\text{m}$ -re növekedett, jelezve a gyenge centromérikus kohéziót (4. ábra).



4. ábra

A Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} petesejtekben gyengült a centromérikus kapcsolódás

Az A ábrán egy vad típusú bivalens kromoszóma látható, egy irányba néző kinetokórok, illetve egy homozigóta mutánsban található univalens, melyben a két testvér kinetokór külön vált. A sárga vonalak a kinetokórok közötti távolságok mérésének módját mutatják. A B ábrán a különböző genotípusú egerek testvér kinetokórkai közti távolság eloszlása látható. Ezek az adatok átlag kinetokór távolsággént ábrázolva láthatók a C ábrán. Jól látszik, hogy a kontroll, mono-orientált távolságokhoz képest a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} petesejtekben ez a távolság majdnem duplájára emelkedik.

Következőleg kérdéses volt, hogy ennek a doménnek a kromoszóma karokon történő kapcsolódásban vajon van-e szerepe. Ennek vizsgálatára a kromoszóma preparátumokon a Rec8-at a Myc epitópon keresztül is festettem illetve a kromoszóma típusok arányát vizsgáltam. A kontroll sejtekkel szemben a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} petesejtekben egyetlen bivalens kromoszóma sem volt található, csak univalensek és egyedüli kromatidák keveréke volt azonosítható (5. ábra). Ez utóbbi két kromoszóma típus között az arány 53.6 % univalens és 46.4 % egyedüli kromatida volt

a két hónapos egerek esetében. Ez az eredmény jelzi, hogy ebben a korban nincs karokon történő funkcionális kohézió a homozigóta Rec8 mutánsokban.

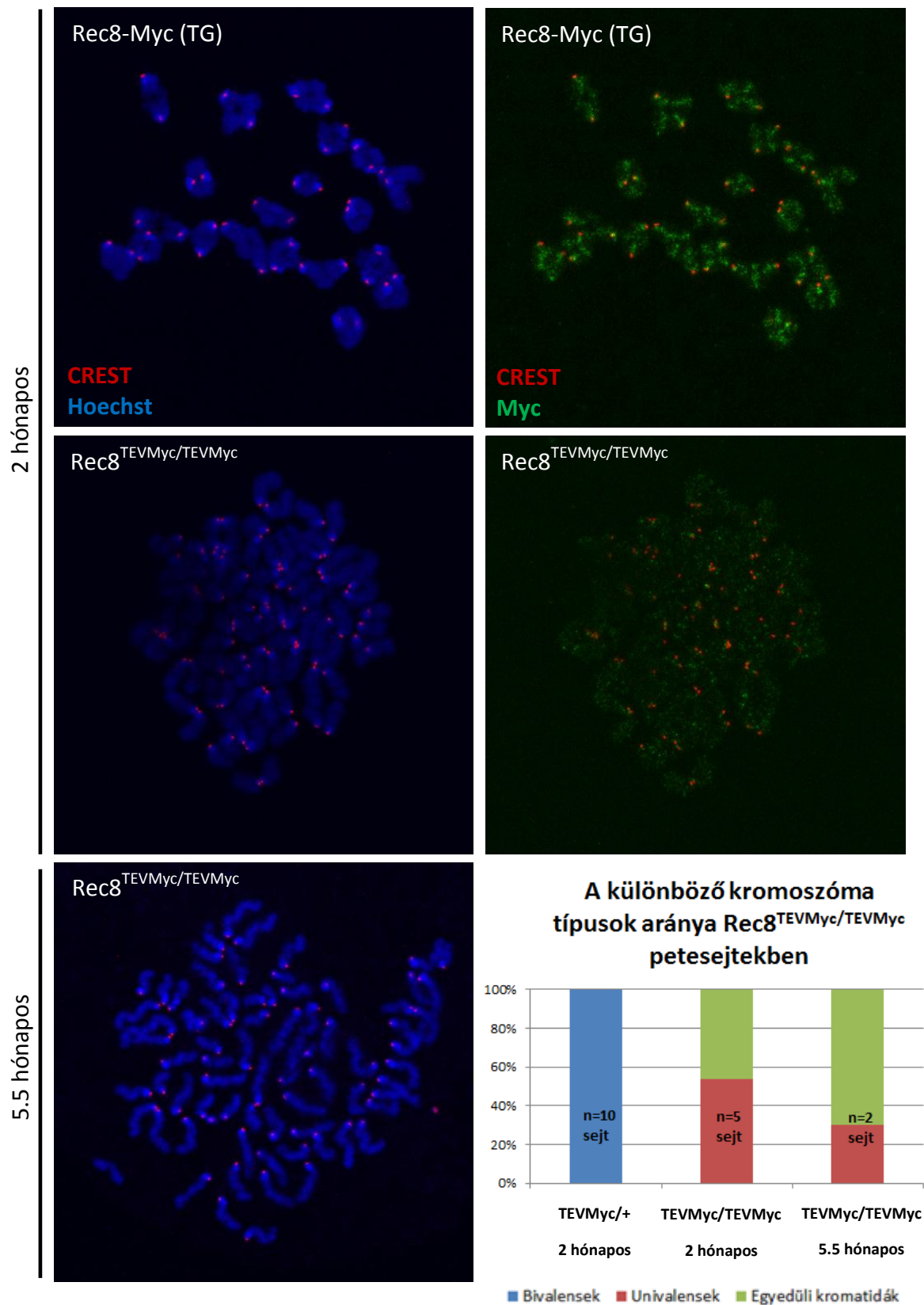
A heterozigóta kontroll petesejtekben a Myc festés szépen jelzi a Rec8 jelenlétét a bivalens kromoszómák tengelyeiben (5. ábra). Azonban a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerekben a festés nem jelöl pontos struktúrákat, jóval alacsonyabb intenzitású és nagy része valószínűleg háttér jelnek tudható be (5. ábra). Továbbá az egyedüli kromatidák jelenléte ismételten bizonyítja a meggyengült centromérikus kohéziót ezekben a mutánsokban.

Érdekes, hogy a 5.5 hónapos Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} petesejtekben az univalensek és az egyedüli kromatidák közötti arány 69.8 % és 30.2 %-ra változott (5. ábra). Ez a jelenség arra utal, hogy ezekben az állatokban a kromoszóma kohézió elvesztése a kor előrehaladásával fokozatosan növekszik.

7 hónapos kor után a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerek korai ovárium kimerülést mutatnak

Kíváncsiak voltunk, hogy a fent említett korfüggő kromoszóma kapcsolat gyengülés még idősebb petesejtekben tovább fokozódik-e. Ezért 7 hónapos egerekből is próbáltam petesejtek izolálni, meglepetésünkre azonban nem tudtam ilyen korú Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} ováriumokból oocytákat kinyerni. További új jelenség volt, hogy ezek az ováriumok megnövekedett vaszkularizációt mutattak sima, látható follikulusok nélküli felülettel. Így szükségesnek bizonyult, hogy szisztematikusan leteszteljük: tényleg nem találhatóak petesejtek a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerekben 7 hónapos kor után? A kérdés megválaszolására teljes ovárium preparátumokat készítettem és ezekből 3 µm vastag metszeteket szeltem egészen az egyik végüktől a másikig, átívelve a teljes szervet.

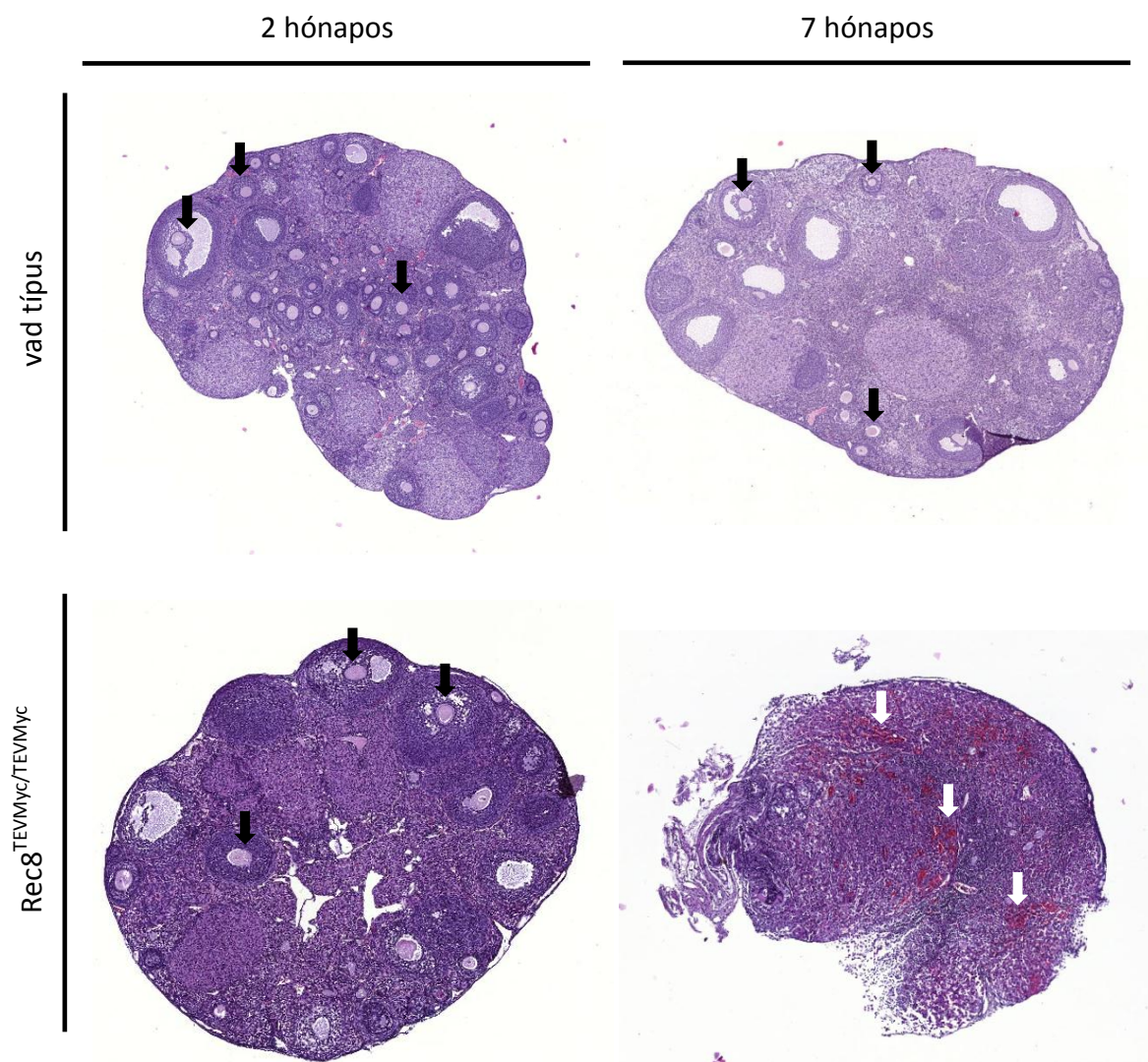
A 2 és 7 hónapos kontroll vad típusú ováriumok, illetve a két hónapos Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} ováriumok azonos szövettani képet mutattak, egészséges petesejtekkel, számos különböző stádiumban lévő tüszőkkel (6. ábra). A 7 hónapos homozigóta mutáns ováriumokból azonban teljesen hiányoztak a petesejtek és bármilyen tüszők (6. ábra). Az egyes metszeteket egymásra illesztve rövid mozikat készítettem, amelyeken jól látszik, hogy a petesejtek az ovárium minden pontjáról hiányoznak (kiegészítő videó 1. és 2.).



5. ábra

A Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} kromoszómák között idővel fokozatosan csökken a kapcsolat

A kontroll (TG) Rec8-Myc petesejtekben látható, hogy a Rec8 a bivalens kromoszómák tengelyében helyezkedik el. Ez a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} esetében már nem észlelhető, itt a Rec8 jele jóval gyengébb és nem strukturált. A homozigóta mutánsokban egyetlen bivalens sem található. Összehasonlítva a 2 és 5.5 hónapos Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} kromoszómákat, előtűnik, hogy az idősebb sejtekben nagyobb arányban jelennek meg egyedüli kromatidák.



6. ábra

A Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerek korai ovárium kimerülést mutatnak

Vad típusú ováriumokban mind 2 és 7 hónapos korban találhatóak különböző stádiumban lévő folliculusok, bennük egészséges petesejtekkel (fekete nyilak). A Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerek ováriumairól két hónapos korban még ugyanez elmondható, azonban 7 hónapos korukra ezek az egerek elvesztik a teljes petesejt készletüket. Az ováriumok erősen vaszkularizáltak, bevérzéseket tartalmaznak (fehér nyilak) és semmilyen folliculus sem azonosítható bennük.

Diszkusszió

Ezen új Rec8 mutáns törzs vizsgálata rávilágított, hogy sértetlen szeparáz 2/3 doménre van a fehérjének szüksége ahhoz, hogy fenn tudja tartani a kromoszómák közötti kapcsolatokat. A Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerek vizsgált doménjében egy 28 aminosav hosszú TEV proteáz hasítóhely inszerciója található. Az ennek hatására megjelenő univalens kromoszómák és egyedi kromatidák jelzik, hogy a kohézió meggyengült, azonban a jelenség mögött álló molekuláris mechanizmus még kiderítésre vár. Lehetséges magyarázat, hogy a TEV hasítóhely ebben a doménben való jelenléte destabilizálja a Rec8 és az Smc fehérjék közötti kapcsolatot, ezáltal magát a kohezin gyűrűt. Az is elképzelhető, hogy hatásmechanizmusukban még nem ismert, de leírtan stabilizáló faktorok pont a szeparáz 2/3 doménen keresztül erősítik meg a gyűrűt. Ilyen fehérje lehetne például a mitózisból ismert stabilizáló Sororin (Nishiyama et al., 2010).

A homozigóta mutánsokban az egyedüli kromatidák arányának 5.5 hónapos korra való megnövekedése sugallja, hogy a meggyengült kohézió a kor függvényében romlik le a kromoszómákról (4. ábra). Továbbá, a 2 hónapos mutánsokban a bivalens kromoszómák teljes hiánya felveti a kérdést, hogy fiatalabb Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerekben léteznek-e ilyen megfelelő kohézióval összetartott struktúrák. A kérdés megválaszolásához érett petesejtekre van szükség, mivel csak ezekben megfelelő kondenzáltságú a kromatin, ami előfeltétele annak, hogy a különböző kromoszóma típusokat (bivalensek, univalensek, egyedi kromatidák) meg lehessen különböztetni. Természetes folyamatok révén egerekben csak 8 hetes korra alakulnak ki érett petesejtek, azonban hormonok injektálásával kiváltott szuperoovulációval érett petesejtek nyerhetőek már 3-4 hetes egerekből is. A jövőben ilyen kísérletekkel is szeretném megvizsgálni, hogy egy korábbi stádiumban a homozigóta mutánsokban jelen van-e megfelelő kromoszóma kapcsoltság vagy az még korábban veszik el, esetleg ki sem alakul? Amennyiben 1 hónapos petesejtekben találhatóak bivalens kromoszómák, úgy elmondhatnánk, hogy bizonyos okokból pont 1 és 2 hónapos kor között történik a petesejtekben a karokon lévő kohézió elvesztése.

Mivel a Rec8-nak a rekombinációban is kimutatták a szerepét (Xu et al., 2005), ezért érdekes lenne megvizsgálni, hogy a fehérje szeparáz 2/3 doménje ebben a folyamatban is szereppel rendelkezik. Pachytén stádiumban lévő embrionális egér petesejtek MLH1 (MutL protein homolog 1) antitesttel való festésével a leendő kiazmák vizualizálhatók (Anderson et al., 1999). Ezzel a technikával szeretném a Rec8^{TEVMyc/TEVMyc} egerekben meghatározni az átlagos

crossover frekvenciát, amit a vad típussal összevetve kiderülhet, hogy a szeparáz 2/3 domén fontos-e a normális rekombinációs folyamathoz.

A szövettani kísérletek eredményei a szeparáz 2/3 domén egy újabb jelentőségére vezetnek rá. Vad típusú egerekből még 15 hónapos korban is izolálhatóak érett petesejtek, azonban a $\text{Rec8}^{\text{TEVMyc/TEVMyc}}$ egerekben a teljes petesejt készlet elveszik 7 hónapos korra (6. ábra). Ennek a korai ovárium elégtelenségnek az oka a TEV hasítóhellyel megzavart szeparáz 2/3 domén kell legyen, azonban a folyamat pontos mechanizmusa továbbra sem ismert. Érdekes kérdés, hogy erre a korra vajon az összes ivari leszármazású sejt eltűnik-e a homozigóta mutánsok ováriumából. A jövőben egy ivarsejt leszármazási vonalra specifikus Ddx4 (DEAD box protein 4) fehérje (Fujiwara et al., 1994) immunhisztokémiai festésével szeretném megvizsgálni ezt a kérdést.

Összefoglalva, a $\text{Rec8}^{\text{TEVMyc/TEVMyc}}$ egér petesejtekben tapasztalt fokozatos centromérikus kapcsoltság elvesztése és a korai ovárium elégtelenség arra utal, hogy ez az egértörzs nem csak a Rec8 funkciójának mélyebb megértésében lehet hasznos, hanem egy jó modellként is szolgálhat a női reprodukív rendszer egyes komponenseinek felgyorsított öregedésére. Így ennek a törzsnek a további vizsgálata hozzásegíthet egy manapság egészségügyileg is fontos probléma molekuláris mechanizmusainak megértéséhez.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Borsos Máté

- az egér törzseket genotipizáltam PCR-el,
- belőlük petesejteket izoláltam
- amikből kromoszóma preparátumokat készítettem és festettem
- ezeket konfokális mikroszkóppal fotóztam és a képeken kinetokórok közötti távolságokat mértem
- ováriumokat preparáltam, fixáltam, metszettem, festettem,
- a metszeteket beszkeneltem és számítógépes szoftverekkel mozit, 3D-s rekonstrukciót készítettem belőlük

.....
aláírás

Budapest, 2013 január 09.

Irodalom

- Anderson, L.K., Reeves, A., Webb, L.M., and Ashley, T. (1999). Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151, 1569-1579.
- Bannister, L.A., Reinholdt, L.G., Munroe, R.J., and Schimenti, J.C. (2004). Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. *Genesis* 40, 184-194.
- Buonomo, S.B., Clyne, R.K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin *Rec8* by separin. *Cell* 103, 387-398.
- Chiang, T., Duncan, F.E., Schindler, K., Schultz, R.M., and Lampson, M.A. (2010). Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol* 20, 1522-1528.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., and Noce, T. (1994). Isolation of a *DEAD*-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12258-12262.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R203-208.
- Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2, 280-291.
- Hodges, C.A., Revenkova, E., Jessberger, R., Hassold, T.J., and Hunt, P.A. (2005). *SMC1beta*-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* 37, 1351-1355.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K., and Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98, 91-103.
- Kudo, N.R., Anger, M., Peters, A.H., Stemmann, O., Theussl, H.C., Helmhart, W., Kudo, H., Heyting, C., and Nasmyth, K. (2009). Role of cleavage by separase of the *Rec8* kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *J Cell Sci* 122, 2686-2698.
- Kudo, N.R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K.G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., *et al.* (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126, 135-146.
- Lister, L.M., Kouznetsova, A., Hyslop, L.A., Kalleas, D., Pace, S.L., Barel, J.C., Nathan, A., Floros, V., Adelfalk, C., Watanabe, Y., *et al.* (2010). Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and *Sgo2*. *Curr Biol* 20, 1511-1521.
- Nagaoka, S.I., Hassold, T.J., and Hunt, P.A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 13, 493-504.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* 43, 525-558.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K., *et al.* (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* 143, 737-749.
- Penrose, L.S. (2009). The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. 1933. *J Genet* 88, 9-14.

- Petronczki, M., Siomos, M.F., and Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423-440.
- Siegel, J.J., and Amon, A. (2012). New insights into the troubles of aneuploidy. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 189-214.
- Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., van der Weyden, L., Champion, L., Kudo, N.R., Adams, D.J., and Nasmyth, K. (2010). Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev* 24, 2505-2516.
- Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* 8, 1095-1101.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 370-382.
- Xu, H., Beasley, M.D., Warren, W.D., van der Horst, G.T., and McKay, M.J. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* 8, 949-961.