

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**MEIOSE INVERTIDA QUIASMÁTICA E AQUIASMÁTICA EM PLANTAS
COM CROMOSSOMOS HOLOCINÉTICOS**

GABRIELA CORINA CARNEIRO DE CABRAL

**RECIFE
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

MEIOSE INVERTIDA QUIASMÁTICA E AQUIASMÁTICA EM PLANTAS
COM CROMOSSOMOS HOLOCINÉTICOS

Dissertação de mestrado apresentada por Gabriela Corina Carneiro de Cabral ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração Florística e Sistemática.

Orientador: Prof. Marcelo Guerra

RECIFE
2010

Cabral, Gabriela Corina Carneiro de

Meiose invertida quiasmática e aquiasmática em plantas com cromossomos holocinéticos / Gabriela Corina Carneiro de Cabral. – Recife: O Autor, 2010.

63 folhas : il., fig.

Orientador: Marcelo Guerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Vegetal, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biologia vegetal 2. Meiose 3. Genética vegetal

571.8452

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-214

GABRIELA CORINA CARNEIRO DE CABRAL

“MEIOSE INVERTIDA QUIASMÁTICA E
AQUIASMÁTICA EM PLANTAS COM CROMOSSOMOS
HOLOCINÉTICOS”.

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho (Orientador) – UFPE



Dra. Andréa Pedrosa-Harand – UFPE



Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal - UFPE

Recife- PE
2010

Agradecimentos

Agradeço à minha família, minha mãe Lena, pai Abraão e irmã Sofia, pelo apoio incondicional e por acreditarem no que eu faço, mesmo sem entender muito bem o que é.

Ao meu namorado Peter, pelos sonhos compartilhados, pelo apoio, por conseguir estar sempre perto e presente mesmo com quilômetros a nos separar e por me fazer extremamente feliz.

Aos meus bichos, por me lembrarem a todo o momento que a felicidade está no dia a dia e nas coisas mais simples.

Aos meus amigos Liliane, Joana, João, Luaní, Manuella, Manoel, Luis Gustavo, Jaqueline, Juliana, André e Filipe, pela amizade transatlântica e por estarem sempre lá quando tudo é azul e lindo e também quando o céu fica todo cinza.

Ao meu orientador Marcelo Guerra, por todos os anos de convivência e por ter me dado a base para eu entender e sentir o que é ciência e como ela deve ser feita.

Ao laboratório de Citogenética Vegetal: Gustavo, André, Liliane, Joana, Lidiane, Magdalena, Artur, Tiago, Silvo, Fernando, Nice, Sandrea, Fagna, Karla, Ana Emília e Andrea, pelo apoio mútuo no dia a dia e pelos momentos de distração.

Ao Dr. Peter Schlögelhofer, por apostar no projeto e por me ensinar que a ciência não deve estar limitada apenas ao que é mais simples de ser realizado.

Aos que fazem parte do laboratório do Dr. Peter Schlögelhofer: Tesi, Tanja, Fritz, Manuel, Clemens, Lisi, Michi, Bernd, por estarem sempre dispostos a me ajudar e ensinar, e à todo o departamento de Biologia Cromossômica da Universidade de Viena por me acolherem e pela boa convivência.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

Muito obrigada!

Resumo

De acordo com a extensão do cinetócoro, os cromossomos podem ser divididos em monocêntricos, com cinetócoro localizado, e holocinéticos, com cinetócoro difuso. Diversos organismos com cromossomos holocinéticos, incluindo todas as plantas com este tipo cromossômico, apresentam uma meiose bastante peculiar, na qual são observadas $2n$ cromátides individualizadas na prófase II. Este tipo de meiose é denominado meiose invertida ou pós-reducional, baseado na hipótese de que a segregação das cromátides irmãs na anáfase I seria a causa das cromátides individualizadas na prófase II. Neste trabalho, foi analisado o curso meiótico de duas espécies de Cyperaceae, *Rhynchospora pubera* ($2n = 10$) e *R. tenuis* ($2n = 4$), que apresentam meiose quiasmática e aquiasmática, respectivamente. Foram encontrados fortes indícios de meiose invertida nas duas espécies, uma vez que os cinetócoros das cromátides irmãs apresentaram ligação anfitélica com o fuso na metáfase I tanto nos univalentes de *R. tenuis* como nos bivalentes de *R. pubera*. A ligação anfitélica dos cinetócoros irmãos é um pré-requisito para a segregação das cromátides irmãs na anáfase I. Adicionalmente, foram investigados neste trabalho dois aspectos da prófase I que poderiam interferir na formação de quiasmas na meiose de *R. tenuis*. Neste caso, foi avaliada a presença de Rad51, uma enzima que atua no reparo de quebras na dupla fita de DNA, necessária para a formação do quiasma, e de ASY1, uma das proteínas que compõe o elemento axial dos cromossomos meióticos e é necessária para a sinapse. A formação de quebras na dupla fita de DNA na prófase I parece ocorrer normalmente, com base na distribuição dos sinais da recombinase Rad51. No entanto, a imunolocalização da ASY1 revelou a formação de filamentos anormais, com aspecto borrado, em *R. tenuis*, contrastando com os filamentos nítidos observados em *R. pubera*. A análise da distribuição dos sítios de DNAr 5S e das bandas CMA⁺ confirmou que a meiose de *R. tenuis* é assináptica. Baseado nos defeitos sinápticos observados em *R. tenuis*, é possível que a ausência de quiasmas deva-se a uma falha na formação do complexo sinaptonêmico, uma vez que as etapadas iniciais de recombinação estão presentes na espécie.

Palavras-chave: cromossomos holocinéticos, Cyperaceae, meiose, recombinação, sinapse.

Abstract

Based on the extension of the kinetochore, chromosomes are classified as monocentrics or holokinetics showing localized or diffuse kinetochore, respectively. Several organisms with holokinetic chromosomes, including all plants with this chromosome type, display a quite peculiar meiosis in which $2n$ individualized chromatids are observed in prophase II. This meiosis type is named inverted meiosis or post-reductional meiosis based on the hypothesis that sister chromatids segregation in anaphase I maybe the cause of individualized chromatids in prophase II. In this work, the course of meiosis of two Cyperaceae species was analyzed, *Rhynchospora pubera* ($2n = 10$), which shows a chiasmatic meiosis, and *R. tenuis* ($2n = 4$) with achiasmatic meiosis. Strong evidences for the occurrence of inverted meiosis in both species were found based on the amphitelic attachment of the kinetochore of sister chromatids to the spindle at metaphase I, observed in the univalents of *R. tenuis* and also in the bivalents of *R. pubera*. The amphitelic attachment of sister kinetochore is one pre-requisite for sister chromatid segregation in anaphase I. Additionally, two aspects of prophase I that may interfere with chiasma formation in *R. tenuis* meiosis were investigated. For that, the presence of RAD51, an enzyme with a role in the repair of double strand breaks and essential for chiasma formation, was evaluated and also the presence of ASY1, a component of the axial element of meiotic chromosomes that is essential for synapsis. The distribution of RAD51 foci have demonstrated the formation of double strand breaks at prophase I. Though this was compatible with normal chiasma formation, detection of ASY1 revealed the occurrence of anormal filaments with a blurred appearance in *R. tenuis*, in contrast to the sharp filaments observed in *R. pubera*, indicating some problem in the formation of *R. tenuis* axial elements. The analysis of 5S rDNA sites and CMA⁺ bands distribution has confirmed that *R. tenuis* meiosis is assynaptic. Based on the synaptic defect observed in *R. tenuis*, it is possible that the lack of chiasmata is due to a failure to form de synaptonemal complex, as the initial steps of recombination are present in this species.

Key words: holokinetic chromosomes, Cyperaceae, meiosis, recombination, synapsis.

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Resumo</i>	<i>ii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>1. Apresentação</i>	<i>8</i>
<i>2. Revisão de Literatura</i>	<i>11</i>
2.1. Meiose.....	12
2.1.1.Caracterização citogenética e molecular da meiose.....	12
2.1.1.1. Recombinação meiótica.....	13
2.1.1.2. Sinapse.....	15
2.1.1.3. Segregação de cromossomos homólogos	17
2.2. Cromossomos holocinéticos.....	18
2.2.1. Cinetócoro de cromossomos holocinéticos.....	19
2.2.2. Meiose de cromossomos holocinéticos.....	21
<i>3. Referências bibliográficas</i>	<i>24</i>
<i>4. Artigo a ser submetido à revista Cytogenetic and Genome Research</i>	<i>31</i>
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	36
Resultados.....	39
Discussão.....	41
Agradecimentos.....	43
Referências bibliográficas.....	43
Legenda das figuras.....	47
<i>5. Conclusões</i>	<i>55</i>
<i>6. Anexo</i>	<i>57</i>

1. Apresentação

Organismos com reprodução sexuada devem reduzir o número cromossômico à metade para formar gametas haploides. A redução do nível de ploidia ocorre na divisão meiótica, que consiste de duas divisões celulares consecutivas após uma única fase de replicação de DNA. Outra característica exclusiva à meiose e essencial para a redução do número cromossômico é a segregação dos cromossomos homólogos (divisão reducional) na anáfase I ao mesmo tempo em que as cromátides irmãs permanecem unidas. Na meiose II ocorre, então, a segregação das cromátides irmãs, assim como em uma mitose (divisão equacional) (Sakuno e Watanabe, 2009). Eventos que ocorrem na prófase I meiótica, como pareamento, sinapse e recombinação, são de extrema importância para o sucesso da redução do nível de ploidia (Hamant et al., 2006). Além disso, na meiose I os cinetócoros irmãos comportam-se como uma unidade, ligando-se a microtúbulos do mesmo pólo, o que é necessário para a segregação reducional na anáfase I (Hauf e Watanabe, 2004).

Embora os eventos meióticos sejam bastante conservados, exceções têm sido encontradas especialmente em organismos que apresentam cromossomos holocinéticos. Cromossomos holocinéticos são caracterizados pela ausência de um cinetócoro localizado e são encontrados em espécies de plantas, especialmente nas famílias Cyperaceae e Juncaceae, em ordens de insetos, como os Homoptera e Heteroptera, e em nemátodos (Mola e Papeschi, 2006). Algumas espécies de plantas e diversas ordens de insetos com cromossomos holocinéticos apresentam uma meiose bastante peculiar com um número diploide de cromátides individualizadas na anáfase I e prófase II (Mola e Papeschi, 2006; Guerra et al., 2010). Essa observação tem sido atribuída à segregação das cromátides irmãs na anáfase I, resultando na migração conjunta de cromátides homólogas não-irmãs, sem uma ligação física que as conecte, uma vez que o quiasma é desfeito antes da anáfase I. Esse tipo de meiose recebe o nome de meiose pós-reducional ou meiose invertida. No entanto, até o momento, faltam evidências claras em plantas que comprovem a segregação de cromátides irmãs na anáfase I. Embora haja dúvidas sobre a ocorrência de meiose invertida em bivalentes, as análises da meiose de univalentes holocinéticos têm deixado claro que as cromátides irmãs segregam na anáfase I, o que não é observado em univalentes monocêntricos (Viera et al., 2009). Pelo contrário, a ocorrência de univalentes em organismos monocêntricos resulta, em geral, em erros de segregação cromossômica, como observado em mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Stacey et al., 2006) e em linhagens monossômicas de milho (Friebe et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de meiose invertida em duas espécies de Cyperaceae, *Rhynchospora pubera* ($n = 5$) e *R. tenuis* ($n = 2$), que apresentam meiose quiasmática e aquiasmática, respectivamente. Adicionalmente, foi investigada a

origem da ausência de quiasmas em *R. tenuis* através da imunolocalização de proteínas meióticas envolvidas nos processos de recombinação e sinapse.

2. Revisão da Literatura

2.1. Meiose

A meiose é um tipo especial de divisão celular que ocorre nas células germinativas de organismos eucariotos e é essencial para a formação de gametas haplóides. A meiose é caracterizada por possuir apenas uma fase S de replicação seguida de duas divisões consecutivas (meiose I e II), tendo como resultado a formação de células filhas haploides. Para alcançar este resultado, em uma meiose típica, os cromossomos homólogos segregam na anáfase I (divisão reducional) e as cromátides irmãs na anáfase II (divisão equacional). Além da redução do nível de ploidia, a meiose também possui um papel no aumento da variabilidade genética ao reorganizar o material genético dos parentais através da recombinação. Por ter um papel crítico no sucesso da reprodução sexuada, a meiose é bastante conservada ao longo da evolução e as etapas mais cruciais da meiose podem ser encontradas desde os eucariotos basais aos superiores. A caracterização citogenética da meiose, inclusive de variações meióticas encontradas na natureza, como meiose assináptica e aquiasmática, possui um vasto registro na literatura (John e Lewis, 1965; White, 1973). Por outro lado, apenas nas duas últimas décadas, os aspectos moleculares da meiose têm sido alvo de investigação extensa (Hamant et al., 2006; Schvarzstein et al., 2010). Não obstante o curto intervalo de tempo, os avanços são significativos para a compreensão dos mecanismos moleculares por trás das etapas meióticas cruciais de sinapse, recombinação e segregação.

2.1.1. Caracterização citogenética e molecular da meiose

Assim como a mitose, ambas as divisões meióticas são divididas em prófase, metáfase, anáfase e telófase. A prófase da meiose I é uma fase caracteristicamente longa, subdividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese, e é durante a prófase I que ocorrem a sinapse e a recombinação entre cromossomos homólogos, formando os bivalentes (Zickler e Kleckner, 1998; 1999). Na metáfase I, ocorre a congregação dos bivalentes na placa metafásica, mediada pela ligação dos microtúbulos com os cinetócoros, sendo que cinetócoros irmãos apresentam orientação sintélica (Hauf e Watanabe, 2004). Consequentemente, na anáfase I ocorre a segregação dos cromossomos homólogos. A meiose II se assemelha a uma divisão mitótica, com a diferença de que na anáfase II há a segregação de um número haploide de cromátides para cada pólo.

A recombinação inter-homóloga consiste da troca de sequências entre cromátides homólogas não irmãs, levando a uma reorganização de sequências maternas e paternas e aumentando desta forma a diversidade genética. O outro papel essencial da recombinação é estabelecer, juntamente com a coesão entre cromátides irmãs, uma ligação física entre cromossomos homólogos necessária para garantir a correta segregação reducional na meiose I (Petronczki et al., 2003). Tal conexão é observada citologicamente a partir do diplóteno e é denominada quiasma. Sinapse é o processo pelo qual os eixos proteicos dos cromossomos homólogos são unidos fisicamente ao longo do comprimento cromossômico por proteínas do elemento central (EC), formando assim o complexo sinaptonêmico (CS). O complexo sinaptonêmico mantém os cromossomos homólogos juntos, auxiliando no progresso da recombinação de forma a gerar *crossovers* (Hunter, 2007). Desta forma, a sinapse possui um papel indireto na segregação de cromossomos homólogos. A segregação de cromossomos homólogos na anáfase I é uma característica exclusiva da meiose e o seu sucesso depende de eventos que ocorrem durante a prófase I, como o estabelecimento da coesão, a formação de *crossover* e a organização dos cinetócoros irmãos de forma que eles atuem como uma unidade (Petronczki et al., 2003).

2.1.1.1 Recombinação meiótica

A recombinação meiótica é iniciada pela formação de quebras programadas na fita dupla de DNA (DSB, *double strand break*). Essas quebras são formadas de maneira programada pela SPO11, uma proteína da família das topoisomerases com função altamente conservada entre eucariotos (Keeney et al., 1997). SPO11 atua na forma de um dímero, com cada unidade se ligando covalentemente a uma das fitas de DNA para formar a quebra dupla (Keeney e Neale, 2006). Após a formação de DSB, os locais de quebra sofrem a ação de enzimas do complexo Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX), gerando fitas simples de DNA (Hunter, 2007). Recombinases se associam às fitas simples, formando filamentos nucleoproteicos e desta forma catalisam a busca por sequências homólogas e a invasão da fita simples no DNA dupla fita que apresente homologia, gerando, assim, estruturas intermediárias como, por exemplo, as junções duplas de Holliday (Fig. 1) (Shinohara e Shinohara, 2004). Caracteristicamente, o reparo de DSB na meiose envolve o cromossomo homólogo, ainda assim a maior parte de DSBs são reparadas por eventos de conversão gênica e apenas a minoria resulta em *crossover* (Schwarzacher, 2003). Há duas recombinases que atuam na meiose, Rad51 e DMC1, sendo que apenas a última é exclusiva da meiose e determina a tendência de reparo de DSB

envolvendo cromátides homólogas não-irmãs. Por outro lado, Rad51 atua no reparo de DSB meióticas e mitóticas e comumente catalisa o reparo envolvendo a cromátide irmã (Kagawa e Kurumizaka, 2010). A análise de mutantes para Rad51 e DMC1 em *Arabidopsis thaliana* revelou que Rad51 é extremamente necessária para o reparo de DSB na meiose de forma que na sua ausência são observadas quebras cromossômicas (Li et al., 2004), enquanto que a segunda é necessária apenas para a recombinação entre cromossomos homólogos ao invés de cromátides irmãs, além de ser dependente da Rad51 (Vignard et al., 2007).

Os locais de reparo de DSB são visualizados ao microscópio eletrônico como nódulos de recombinação (NR), os quais ocorrem em maior número no zigóteno, quando são chamados de NR iniciais, e em menor número no paquíteno, formando os NR tardios. Os NR tardios representam os locais em que o reparo de DSB resultou na formação de *crossover* e, consequentemente, correspondem aos quiasmas observados entre diplóteno e metáfase I (Pawlowski e Cande, 2005). Rad51 e DMC1 colocalizam com os NR e são visualizadas como numerosos sinais entre leptóteno e zigóteno, enquanto que este número reduz substancialmente no paquíteno (Pawlowski e Cande, 2005; Vignard et al., 2007). Outras proteínas envolvidas em etapas mais avançadas da recombinação entre cromossomos homólogos co-localizam apenas com os NR tardios, como é o caso de Msh4 e Mlh1, as quais estão envolvidas na estabilização e resolução das estruturas intermediárias no processo de troca de fitas de DNA (Hunter, 2007). Mlh1 em especial colocaliza com os quiasmas inclusive em diplóteno e diacinese, quando todas as outras proteínas associadas à recombinação não são mais detectadas (Chelysheva et al., 2010).

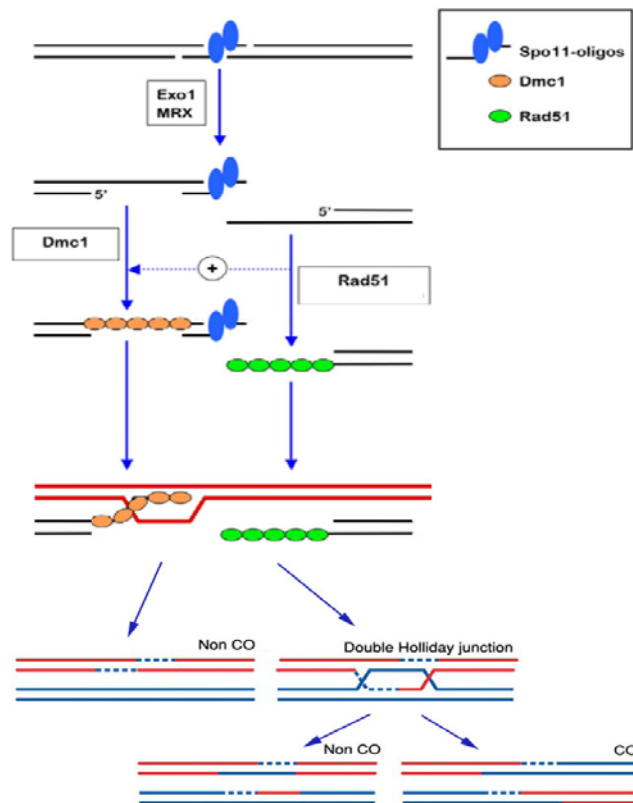


Figura 1: Modelo molecular da recombinação meiótica entre cromossomos homólogos adaptado de Hamant et al. (2006) e Hunter (2007).

2.1.1.2. Sinapse

Durante o processo de replicação de DNA, as cromátides-irmãs geradas se organizam formando alças de DNA que se ligam ao eixo de coesinas, o qual mantém a coesão entre as cromátides-irmãs (Nasmyth, 2001). Além das coesinas, o eixo proteico de cromossomos meióticos é formado por outras proteínas específicas da meiose como a ASY1/HOP1. ASY1/HOP1 passa a fazer parte do eixo cromossômico mais tardiamente do que as coesinas, aparecendo com aspecto filamentoso no leptóteno (Armstrong et al., 2002). A partir do zigóteno, proteínas do elemento central, ex. ZYP1, começam a estabelecer a ligação entre os eixos dos cromossomos homólogos, os quais passam a se chamar elementos laterais, dando início à sinapse. Os processos de sinapse e recombinação estão intimamente relacionados e são, de certa forma, interdependentes (Hunter, 2007). Ao menos em plantas, levedura e mamíferos, não apenas a recombinação, mas também a sinapse depende da formação de DSB (Barzel e Kupiec, 2008). A busca por sequências homólogas realizada pela recombinase Rad51 nos locais de DSB desempenha um importante papel tanto para a recombinação, como

também para o pareamento homólogo e mutantes para Rad51 são assinápticos (Li et al., 2004). Além disso, a polimerização de ZYP1 tem início em locais onde os eixos cromossômicos estão intimamente associados devido ao processo de recombinação (Kleckner, 2006). Mutantes para SPO11 em plantas, além de não formarem quiasmas, não apresentam sinapse por não haver polimerização do elemento central (Osman et al., 2006). Vale também salientar que após a formação de DSB, a alça de DNA contendo a quebra dobra-se e associa-se ao elemento axial onde o processo de reparo de DSB ocorre. Recentemente, foi demonstrado que a fosforilação da protenina do eixo ASY1/HOP1 impõe a preferência pelo reparo de DSB envolvendo o cromossomo homólogo na meiose de levedura (Carballo et al., 2008).

Além do papel exercido pela recombinase Rad51 no pareamento de cromossomos homólogos, a associação polarizada dos telômeros com a membrana nuclear, conhecida como *bouquet*, parece também desempenhar um importante papel no pareamento. Ao aproximar todos os telômeros, os cromossomos adquirem uma coorientação, facilitando a busca pelo cromossomo homólogo (Bass, 2003). Mutantes em milho com defeitos na formação do bouquet também apresentam problemas de sinapse (Golubovskaya et al., 2002). Proteínas que promovem a ligação dos telômeros com a membrana nuclear, o complexo proteico SUN-KASH, são necessárias para a formação do bouquet e apresentam movimentos ao longo da membrana nuclear bastante rápidos durante a prófase I (Alsheimer, 2009). Rápidos movimentos cromossômicos durante a prófase I já foram observados em levedura, milho, e *C. elegans* e têm implicações no pareamento de homólogos (Alsheimer, 2009; Penkner et al., 2009; Sheehan e Pawlowski, 2009).

No diplóteno, o complexo sinaptonêmico é desfeito pela ação da Aurora quinase Ipl1 que promove a dissociação da proteína do elemento central, ZYP1 (Jordan et al., 2009). Em *Arabidopsis*, a proteína do elemento lateral ASY1 desaparece dos cromossomos a partir do diplóteno, coincidindo temporalmente com a dissociação do complexo sinaptonêmico (Armstrong et al., 2002). Após a dissolução do complexo sinaptonêmico, os cromossomos homólogos mantêm-se unidos apenas pela região do quiasma. A união dos cromossomos homólogos pelo quiasma é de extrema importância para estabelecer a orientação correta dos bivalentes e garantir a segregação reducional na anáfase I (Petronczki et al., 2003).

2.1.1.3. Segregação de cromossomos homólogos

O quiasma fornece uma força contrária à força exercida pelos microtúbulos vindos de pólos opostos ao se ligaram nos cinetócoros, criando assim uma tensão. Essa tensão é monitorada pelo sistema de “ponto checagem” (*checkpoint*) do fuso, que permanece ativo até que todos os bivalentes estejam sob tensão e, consequentemente, alinhados no plano metafásico (Nezi e Musacchio, 2009). Quando a tensão é estabelecida em todos os bivalentes, o “ponto de checagem” é silenciado e o complexo promotor da anáfase (CPA) é ativado resultando na liberação da separase. A separase é uma enzima que catalisa a quebra da Rec8, subunidade de coesina específica da meiose, e desta forma abre o anel de coesina que mantinha as cromátides irmãs unidas. Quando a coesão nos braços cromossômicos é desfeita, o quiasma também o é, e, consequentemente, a conexão física entre os cromossomos homólogos deixa de existir, iniciando o movimento anafásico (Nasmyth, 2001).

Caracteristicamente, na meiose a coesão é desfeita de maneira gradativa: as coesinas dos braços cromossômicos são clivadas antes da anáfase I, enquanto a coesão na região centromérica é mantida, sendo desfeita antes da anáfase II. A manutenção da coesão centromérica após anáfase I é de extrema importância para garantir a orientação bipolar dos cinetócoros irmãos e, desta forma, a correta segregação das cromátides irmãs na anáfase II. As coesinas na região centromérica são protegidas da ação da separase na meiose I, por uma proteína chamada Shugoshina (Sgo). Sgo se localiza na região pericentromérica e recruta a fosfatase PP2A que atua desfosforilando a Rec8 na região pericentromérica, impedindo assim a ação da separase nesta região (Ishiguro et al., 2010).

Outra característica da meiose I é a orientação monopolar dos cinetócoros das cromátides irmãs, levando-os a se ligarem a microtúbulos vindos do mesmo pólo da célula (ligação sintética). Em outras palavras, os cinetócoros irmãos na meiose I funcionam como uma unidade, que é estabelecida por proteínas cinetocóricas específicas que fazem uma ponte entre os cinetócoros irmãos internos. Em levedura, a ligação sintética dos cinetócoros irmãos é garantida pela Monopolina, que atua exclusivamente na meiose (Hauf e Watanabe, 2004). Por outro lado, em milho, a proteína cinetocórica MIS12 promove a ligação sintética dos cinetócoros irmãos com microtúbulos, mas também participa da formação do cinetócoro mitótico. Quando os níveis de MIS12 são reduzidos, os cinetócoros irmãos frequentemente se ligam a microtúbulos de pólos opostos (ligação anfitética), gerando cromossomos retardatários na anáfase I (Li e Dawe, 2009). Em *Schizosaccharomyces pombe*, a orientação monopolar dos cinetócoros irmãos é promovida pela proteína Moa1, que difere da Monopolina e MIS12 por atuar de maneira dependente de coesina. Neste caso, a localização de coesinas na região centromérica interfere na geometria cinetocórica, induzindo orientação

sintética dos cinetócoros irmãos na meiose I, enquanto que a localização de coesinas na região pericentromérica promove uma orientação anfitélica, típica da meiose II e da mitose (Sakuno et al., 2009).

2.2. Cromossomos holocinéticos

De acordo com a extensão da região de ligação com os microtúbulos, os cromossomos dos eucariotos podem ser divididos em duas categorias distintas: cromossomos monocêntricos, com cinetócoro localizado, e cromossomos holocinéticos, que possuem cinetócoro difuso ao longo do comprimento cromossômico. Os cromossomos monocêntricos ocorrem de forma mais abrangente nos eucariotos, sendo o tipo cromossômico da grande maioria dos organismos-modelo estudados, com exceção do nemátoda *Caenorhabditis elegans*. Por outro lado, os cromossomos holocinéticos ocorrem em um número menor de espécies, entre as quais se destacam as famílias de monocotiledôneas Cyperaceae e Juncaceae, diversas ordens de insetos, além dos vermes nemátodos (para revisão, ver Mola e Papeschi, 2006). Aparentemente não há uma relação de origem dos cromossomos holocinéticos que una todos os organismos que os possuem como descendentes de um único ancestral comum, salvo algumas exceções, como as famílias Juncaceae e Cyperaceae que pertencem a clados irmãos dentro das monocotiledôneas (Tamura et al., 2004). Devido à grande distância evolutiva que separa os grandes grupos que apresentam cromossomos holocinéticos, postula-se que este tipo cromossômico tenha surgido de maneira independente em diferentes momentos da evolução de cada grupo (Guerra et al., 2010).

Embora o termo holocêntrico seja classicamente o mais utilizado para denominar cromossomos com cinetócoro difuso, o termo holocinético tem sido adotado em diversos trabalhos por representar mais precisamente a ocorrência de um cinetócoro difuso e não a presença de um extenso centrômero (Pérez et al., 1997, Mola e Papeschi, 2006, Guerra et al., 2010). Citogeneticamente, os cromossomos holocinéticos são caracterizados por não apresentarem constrição primária e por migrarem paralelos uns aos outros na anáfase mitótica, como resultado da distribuição por igual da tensão exercida pelos microtúbulos ao longo do cromossomo. Além disso, cromossomos holocinéticos possuem a peculiaridade de persistirem viáveis após quebra induzida por exposição a radiação, uma vez que a atividade

centromérica é mantida nos fragmentos gerados (Tanaka e Tanaka, 1977; Vanzela e Colaço, 2002). Por este motivo, tem sido proposto que agmatoploidia (fissão) e simplóidia (fusão) desempenham papéis importantes na evolução cariotípica de plantas com cromossomos holocinéticos (Escudero et al., 2008), gerando séries aneuploides bastante evidentes, por exemplo, no gênero *Carex* (Cyperaceae) (Roalson et al., 2007).

Diferente do observado durante a mitose, diversos estudos citogenéticos em plantas e animais com cromossomos holocinéticos mostraram que a extensão da atividade cinetocórica muda durante a meiose passando a ocorrer de maneira localizada na região terminal dos cromossomos. Tal fenômeno tem sido observado desde as primeiras análises sobre meiose de cromossomos holocinéticos (Malheiros *et al.*, 1947; Nordenskiöld, 1962; Goday e Pimpinelli, 1989; González-García *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997). Desta forma, cromossomos holocinéticos têm sido considerados funcionalmente monocêntricos durante a divisão meiótica, com implicações na resolução dos quiasmas e na segregação correta dos cromossomos durante a meiose I (Dernburg, 2001). Pérez et al. (1997) mostraram em *Triatoma infestans* (Heteroptera) que a atividade cinética pode ser exercida por regiões intersticiais do cromossomo, embora ocorra preferencialmente nos terminais. Adicionalmente, foi mostrado que, tanto em *T. infestans* quanto em *C. elegans*, a atividade cinetocórica varia de posição nas duas divisões meióticas, alternando entre os dois terminais cromossômicos na anáfase I e II (Albertson e Thomson, 1993; Pérez et al., 2000). Em *C. elegans* a atividade centromérica durante a meiose é determinada pela posição do quiasma, ocorrendo sempre de maneira oposta ao quiasma, que é único e com localização terminal ou sub-terminal (Albertson et al., 1997). Os primeiros relatos de meiose no gênero *Luzula* (Juncaceae) mostraram a região terminal dos cromossomos sendo puxada para os pólos na anáfase meiótica, indicando a ocorrência de atividade cinetocórica localizada também durante a meiose de plantas (Malheiros et al., 1947; Nordenskiöld, 1962).

2.2.1. Cinetócoro de cromossomos holocinéticos

A caracterização do centrômero de cromossomos holocinéticos é praticamente restrita ao organismo modelo *C. elegans* (Cheeseman et al., 2004), enquanto que em plantas pouco se sabe sobre a constituição do centrômero em termos de sequência e de componentes proteicos. No entanto, Haizel et al. (2005) isolaram e caracterizaram uma sequência de 178 pb repetida

em tandem em *Luzula nivea* denominada LCS1, usando a sequência centromérica de arroz (RCS2) como sonda. A sequência LCS1 está organizada em agrupamentos nas regiões heterocromáticas e colocaliza com a proteína centromérica Skip1.

Mais crucial do que a sequência de DNA na determinação do local e atividade centromérica são as proteínas constituintes do cinetócoro. Diversas proteínas do cinetócoro já foram caracterizadas e localizadas em *C. elegans*. Em *C. elegans*, o cinetócoro é constituído por duas regiões principais: o cinetócoro interno, que contém as proteínas cinetocóricas associadas à cromatina, e o cinetócoro externo, com as proteínas nas quais se ligam os microtúbulos (Monen et al., 2005). Na mitose, o cinetócoro é organizado como um fio contínuo em superfícies opostas dos cromossomos profásico/metáfásico (Moore et al., 1999, Oegema et al., 2001). Dentre as proteínas do cinetócoro destaca-se a CENH3, uma variante da histona H3 que substitui a H3 em todo centrômero ativo, estando envolvida com a determinação epigenética do local de atividade centromérica (Panchenko e Black, 2009). Até o momento, CENH3 é a única proteína cinetocórica já caracterizada em plantas com cromossomos holocinéticos. Nagaki et al. (2005) revelaram, por imunolocalização da CENH3 de *L. nivea* (LnCENH3), a ocorrência de um cinetócoro linear contínuo ao longo dos cromossomos mitóticos metafásicos. Mais precisamente, a localização da LnCENH3 se dá em cavidades laterais nos cromossomos, lembrando o cinetócoro dos cromossomos monocêntricos que se localiza numa depressão da cromatina, a constrição primária. A ocorrência do cinetócoro em uma cavidade na cromatina na metáfase mitótica já tinha sido observada em trabalhos anteriores por microscopia eletrônica (ME) em espécies de *Luzula*, sendo que com este tipo de abordagem o cinetócoro se apresenta como uma região não corada na face polar do cromossomo (Braselton, 1981; Bokhari e Godward, 1980). Durante a prófase mitótica, no entanto, a localização da LnCENH3 ocorre em nucleossomos intercalados, de forma que cinetócoro contínuo observado na metáfase mitótica é, aparentemente, o resultado do processo de condensação cromossômica (Nagaki et al, 2005).

O cinetócoro de organismos com cromossomos holocinéticos parece variar bastante entre cromossomos mitóticos e meióticos. As análises iniciais da meiose de *C. elegans* por ME indicaram a ausência de um cinetócoro típico nos cromossomos meióticos, de forma que os microtúbulos pareciam se associar diretamente à cromatina (Albertson e Thomson, 1993). No entanto, com o avanço da caracterização de proteínas constituintes do cinetócoro e com a produção de anticorpos específicos, foi possível localizar a proteína CENP-A (CENH3), além

de outras proteínas cinetocóricas, nos bivalentes de *C. elegans* (Howe et al., 2001; Monen et al., 2005). Na meiose de *C. elegans*, o cinetócoro apresenta uma configuração *cup-like* envolvendo cada cromossomos homólogo do bivalente pela face externa, com a excessão da CENP-A que ocorre em todo o cromossomo (Monen et al., 2005). Em plantas com cromossomos holocinéticos, ainda não há relatos sobre a localização de proteínas do cinetócoro durante a meiose. No entanto, muito pode ser inferido sobre o local de atividade cinetocórica pela análise da região na qual os microtúbulos se ligam. Na mitose de *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae) a ligação dos microtúbulos ocorre ao longo de todo comprimento cromossômico (Guerra et al., 2006). No entanto, a análise da ligação dos microtúbulos na meiose de uma espécie do mesmo gênero, *R. pubera*, mostrou que o local cromossômico no qual os microtúbulos se associam é bem mais restrito do que na mitose (Guerra et al., 2010). Tanto em *R. pubera* como em *L. echinata* foi relatado que os microtúbulos se ligam em uma cavidade na cromatina dos cromossomos meióticos (Braselton, 1981; Guerra et al., 2010).

Guerra et al. (2010) também descreveram associações laterais dos microtúbulos com a superfície dos cromossomos na anáfase I e II de *R. pubera*. A ligação lateral de microtúbulos com cromossomos meióticos também foi relatada na oogênese de *C. elegans*, sendo que neste caso a ligação lateral dos microtúbulos desempenha um papel mais importante do que a ligação terminal dos microtúbulos na migração dos cromossomos (Wignall e Villeneuve, 2009), além de também estar envolvida no alinhamento dos cromossomos no plano metafásico (Schwarzstein et al., 2010). Interessantemente, a associação lateral dos microtúbulos é um evento típico da meiose feminina de *C. elegans* na qual o centrôssomo está ausente (Müller-Reichert et al., 2010). Da mesma forma, plantas não possuem centrôssomo nem qualquer outro tipo de centro organizador de microtúbulos (Mineyuki, 2007).

2.2.2. Meiose de cromossomos holocinéticos

Uma característica única de organismos com cromossomos holocinéticos é a ocorrência de meiose invertida. Embora não ocorra de maneira generalizada, este tipo de meiose é tradicionalmente descrito para as plantas e para alguns grupos de insetos com cromossomos holocinéticos. Em oposição à meiose normal, na qual os cromossomos homólogos se separam na anáfase I (divisão reducional) e as cromátides-irmãs na anáfase II (divisão equacional), na meiose invertida a separação das cromátides-irmãs ocorre na meiose I e a separação das

cromátides homólogas não-irmãs na meiose II (Mola e Papeschi, 2006). O comportamento meiótico descrito para as diferentes famílias de plantas com cromossomos holocinéticos é bastante similar, com a ocorrência de um número diplóide de cromátides individualizadas na anáfase I/prófase II, as quais se reúnem aos pares antes da metáfase II de forma a permitir a segregação correta resultando em quatro núcleos haploides como em uma meiose normal (Malheiros et al., 1947; Pazy e Plitmann, 1987; Guerra et al., 2010). No entanto, a interpretação deste comportamento é dúbia uma vez que não se pode distinguir entre a segregação das cromátides-irmãs da segregação de cromossomos homólogos associada à perda precoce da coesão entre as cromátides-irmãs. Nos dois casos, o resultado esperado é um número diplóide de cromátides individualizadas na prófase II. Até o momento nenhum dos estudos realizados em plantas trouxe uma comprovação definitiva da ocorrência de meiose invertida. No entanto, o mesmo comportamento meiótico é observado em insetos coccídeos e, neste caso, a ocorrência de meiose invertida foi comprovada pela análise da segregação de um par de homólogos heteromórfico gerado por fragmentação após exposição a raios-X (Bongiorni et al., 2004). Contudo, devido à origem *de novo* dos cromossomos holocinéticos em diferentes grupos de organismos, ainda resta a dúvida sobre a ocorrência de meiose invertida em plantas.

Outra questão intrigante e não resolvida tanto em plantas como em insetos que, aparentemente, apresentam meiose invertida é como as cromátides voltam a parear durante a prófase II, uma vez que elas aparecem individualizadas na anáfase I/prófase II (Guerra et al. 2010). Caso não ocorra meiose invertida nas plantas, ainda assim, há a perda de coesão precoce entre as cromátides irmãs e uma reassociação durante a prófase II. Bongiorni et al. (2004) argumentam que as cromátides homólogas não-irmãs permanecem unidas durante a anáfase I/prófase II por reminiscências de coesinas presentes entre fragmentos irmãos oriundos dos eventos de recombinação. Este seria um mecanismo comparável ao que ocorre numa meiose normal de cromossomos monocêntricos, na qual as cromátides irmãs permanecem coesas numa região restrita após a anáfase I, a qual só é desfeita na anáfase II. A permanência de uma associação telomérica estabelecida durante a metáfase I entre as cromátides não-irmãs estaria envolvida com o mecanismo de orientação dos cromossomos na metáfase II permitindo uma segregação reducional eficaz na anáfase II. Uma outra hipótese para explicar a reunião aos pares das cromátides na prófase II baseia-se na observação de fios de cromatina conectando as cromátides durante a anáfase I e prófase II de *R. pubera* (Guerra et al., 2010). A ocorrência de fios ligando as cromátides indicaria que na realidade, estas cromátides nunca

se separam de fato, o que torna mais fácil a retomada de uma associação mais íntima na metáfase II. A ocorrência de fios heterocromáticos entre cromossomos foi observada na meiose I de *Drosophila melanogaster* conectando os cromossomos aquiasmáticos 4 e X, com um papel importante de propiciar a segregação correta destes cromossomos na anáfase I (Hughes et al., 2009).

Diversos outros organismos com cromossomos holocinéticos apresentam uma meiose normal, com a segregação dos cromossomos homólogos na anáfase I e das cromátides irmãs na anáfase II. No entanto, em teoria, a ausência de um cinetócoro localizado imporia dificuldades para a segregação cromossômica na meiose, uma vez que é na região do cinetócoro onde a coesão entre as cromátides irmãs é protegida da ação da separase na meiose I, garantindo a manutenção da conexão física entre cromátides irmãs necessária para a segregação correta na meiose II (Dernburg, 2001). Trabalhos recentes demonstraram que a perda gradual da coesão na meiose de *C. elegans* é regulada por domínios proteicos estabelecidos nos bivalentes durante a prófase I, diferindo substancialmente da meiose de monocêntricos (Carvalho et al., 2008; Martinez-Perez et al., 2008). O estabelecimento dos domínios proteicos depende da localização do quiasma que, por ter localização terminal/subterminal, divide o bivalente em um eixo maior e outro menor. No eixo menor, localizam-se proteínas que recrutam quinases que, por sua vez, promovem a perda da coesão, enquanto que no eixo maior se estabelecem proteínas que protegem as coesinas da clivagem, assegurando desta forma a manutenção da coesão entre cromátides irmãs até a anáfase II ter início (Schwarzstein et al., 2010).

3. Referências Bibliográficas

- Albertson DG, Rose AM, Villeneuve AM: Chromosome organization, mitosis, and meiosis. in Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR: *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 47–78 (1997).
- Albertson DG, Thomson JN: Segregation of holocentric chromosomes at meiosis in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Chromosome Research 1:15-26 (1993).
- Alsheimer M: The dance floor of meiosis: evolutionary conservation of nuclear envelope attachment and dynamics of meiotic telomeres. In: Meiosis. Ed Karger, 5: 81-93 (2009).
- 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*. Journal of Cell Science 115:3645-3655 (2002).
- Barzel A, Kupiec M: Finding a match: hoe do homologous sequences get together for recombination? Nature Reviews 9: 27-37 (2008).
- Bass HW: Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. Cellular and Molecular Life Sciences 60: 2319-2324 (2003).
- Bokhari FS, Godward MBE: The ultrastructure of the diffuse kinetochore in *Luzula nivea*. Chromosoma 79: 125-136 (1980).
- Bongiorni S, Fiorenzo P, Pippoletti D, Prantera G: Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. Chromosoma 112:331-341 (2004).
- Braselton JP: The ultrastructure of meiotic kinetochores of *Luzula*. Chromosoma 82: 143-151 (1981).
- Carballo JA, Johnson AL, Sedgwick SG, Cha RS: Phosphorylation of the axial element protein Hop1 byMec1/Tel1 ensures meiotic interhomolog recombination. Cell 132: 758-770 (2008).
- Carvalho CE, Zaaier S, Smolikov S, Gu Y, Schumacher JM, et al: LAB-1 antagonizes the Aurora B kinase in *C. elegans*. Genes & Development 22: 2869-2885 (2008).
- Cheeseman IM, Niessen S, Anderson S, Hyndman F, Yates III JR, Oegema K, Desai A: A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. Genes & Development 18:2255-2268 (2004).
- Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot G, Vrielynck N, et al.: An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during *Arabidopsis thaliana* meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. Cytogenetic and Genome Research 129: 143-153 (2010).

- Dernburg AF: Here, there, and everywhere: kinetochore function on Holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 153: 33-38 (2001).
- Escudero M, Valcárcel V, Vargas P, Luceño M: Evolution in *Carex* L. sect. *Spirostachyae* (Cyperaceae): a molecular and cytogenetic approach. *Organisms, Diversity and Evolution* 7: 271-291 (2008).
- Friebe B, Zhang P, Linc G, Gill BS: Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 293-297 (2005).
- Goday C, Pimpinelli S: Centromere organization in meiotic chromosomes of *Parascaris univalens*. *Chromosoma* 98: 160-166 (1989).
- Golubovskaya IN, Harper LC, Pawlowski WP, Schichnes D, Cande WZ: The *pam1* gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 162: 1979-1993 (2002).
- González-García JM, Antonio C, Suja JA, Rufas JS: Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Research* 4:124-132 (1996).
- Guerra M, Brasileiro-Vidal AC, Arana P, Puertas MJ: Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* 126:33-41 (2006).
- Guerra M, Cabral G, Cuacos M, González-García M, González-Sánchez M, et al: Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of centromeric rules. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 82-96 (2010).
- Haizel T, Lim YK, Leitch AR, Moore G: Molecular analysis of holocentric centromeres of *Luzula* species. *Cytogenetic and Genome Research* 109:134-143 (2005).
- Hamant O, Ma H, Cande WZ: Genetics of meiotic prophase I in plants. *The Annual Review of Plant Biology* 57: 267-302 (2006).
- Hauf S, Watanabe Y: Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* 119: 317-327 (2004).
- Howe M, McDonald KL, Albertson DG, Meyer BJ: HIM-10 is required for kinetochore structure and function on *Caenorhabditis elegans* holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 153(6): 1227-1238 (2001).
- Hughes SE, Guilliland WD, Cotitta JL, Takeo S, Collins KA, et al: Heterochromatic threads connect oscillating chromosomes during prometaphase I in *Drosophila* oocytes. *Plos Genetics* 5: e1000348 (2009).

- Hunter N: Meiotic recombination. In Aguilera A, Rothstein R.: Molecular Genetics of Recombination. Ed. Springer, pp.381-432 (2007).
- Ishiguro T, Tanaka K, Sakuno T, Watanabe Y: Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nature Cell Biology* 12: 500-506 (2010).
- John B, Lewis KR: The meiotic system. Nova York: Springer-Verlag (1965)
- Jordan P, Copsey A, Newnham L, Kolar E, Lichten M, et al.: Ipl1/Aurora B kinase coordinates synaptonemal complex disassembly with cell cycle progression and crossover formation in budding yeast meiosis. *Genes & Development* 23: 2237-2251 (2009).
- Kagawa W, Kurumizaka H: From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular rules of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *The FEBS Journal* 277: 590-598 (2010).
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N: Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalysed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-384 (1997).
- Keeney S, Neale MJ: Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society Transactions* 34: 523-525 (2006).
- Kleckner N: Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115: 175-194 (2006).
- Li W, Chen C, Markmann-Mulisch U, Timofejeva L, Schmelzer E, et al.: The *Arabidopsis AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *PNAS* 101(29): 10596-10601 (2004).
- Li X, Dawe RK: Fused sister kinetochores initiate the reductional division in meiosis I. *Nature Cell Biology* 11: 1103-1108 (2009).
- Malheiros N, Castro D, Câmara A: Cromosomas sem centrómero localizado. O caso de *Luzula purpurea* Link. *Agronomia Lusitana* 9:51-74 (1947).
- Martinez-Perez E, Schvarzstein M, Barroso C, Lightfoot J, Dernburg AF, et al: Crossovers trigger a remodeling of meiotic chromosome axis composition that is linked to two step loss of sister chromatid cohesion. *Genes & Development* 22: 2886-2901 (2008).
- Mineyuki Y: Plant microtubules studies: past and present. *Journal of Plant Research* 120: 45-51 (2007).
- Mola LM, Papeschi AG: Holokinetic chromosomes at a glance. *Journal of Basic and Applied Genetics* 17:17-33 (2006).

- Monen J, Maddox PS, Hyndman F, Oegema K, Desai A: Differential role of CENP-A in the segregation of Holocentric *C. elegans* chromosomes during meiosis and mitosis. *Nature Cell Biology* 7(12): 1248-1262 (2005).
- Moore LL, Morrison M, Roth MB: HCP-1, a protein involved in chromosome segregation, is localized to the centromere of mitotic chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology* 147(3): 471-479 (1999).
- Müller-Reichert T, Greenan G, O'Toole E, Srayko M: The *elegans* of spindle assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 2195-2213 (2010).
- Nagaki K, Kashiwara K, Murata M: Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. *The Plant Cell* 17: 1886-1893 (2005).
- Nasmyth K: Disseminating the genome: joining, resolving and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annual Reviews of Genetics* 35: 673-745 (2001).
- Nezi L, Musacchio A: Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 785-795 (2009).
- Nordenskiöld H: Tetrad analysis and the course of meiosis in three hybrids of *Luzula campestris*. *Hereditas* 47: 203-238 (1962).
- Oegema K, Desai A, Rybina S, Kirkhan M, Hyman AA: Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology* 153: 1209-1225 (2001).
- Osman K, Sanchez-Moran E, Higgins JD, Jones GH, Franklin FCH: Chromosome synapsis in *Arabidopsis*: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115: 212-219 (2006).
- Panchenko T, Black BE: The epigenetic basis for centromere identity. In *Centromere: structure and evolution*, edited by Durdica Ugarkovic. Springer, Berlin, pp: 1-32 (2009).
- Pawlowski WP, Cande WZ: Coordinating the events of meiotic prophase. *Trends in Cell Biology* 15: 674-681 (2005).
- Pazy B, Plitmann U: Persisting demibivalents: a unique meiotic behaviour in *Cuscuta babylonica* Choisy. *Genome* 29: 62-66 (1987).
- Penkner AM, Fridkin A, Gloggnitzer J, Baudrimont A, Machacek T, et al: Meiotic chromosome homology search involves modifications of the nuclear envelope protein Mafin/SUN1. *Cell* 139: 920-933 (2009).

- Pérez R, Panzera F, Page J, Suja JA, Rufas JS: Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 5:47-56 (1997).
- Pérez R, Rufas JS, Suja JA, Page J, Panzera F: Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 8:17-25 (2000).
- Petronczki, M.; Siomos, M.F.; Nasmyth, K. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440 (2003).
- Roalson EH, McCubbin AG, Whitkus R: Chromosome evolution in Cyperales. *Aliso* 23: 62-71 (2007).
- Sakuno T, Tada K, Watanabe Y: Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 458: 852-858 (2009).
- Sakuno T, Watanabe Y: Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Research* 17: 239-249 (2009).
- Schwarzstein M, Wignall SM, Vileneuve AM: Coordinating cohesion, co-orientation and congression during meiosis: lessons from holocentric chromosomes. *Genes & Development* 24: 219-228 (2010).
- Schwarzacher T: Meiosis, recombination and chromosomes: a review of genes isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. *Journal of Experimental Biology* 54: 11-23 (2003).
- Sheehan MJ, Pawlowski WP: Live imaging of rapid chromosome movements in meiotic prophase I in maize. *PNAS* 106:20989-20994 (2009).
- Shinohara A, Shinohara M: Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenetic and Genome Research* 107: 201-207 (2004).
- Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, et al: Arabidopsis Spo11-2 functions with Spo11-1 in meiotic recombination. *The Plant Journal* 48: 206-216 (2006).
- Tamura MN, Yamashita J, Fuse S, Haraguchi M: Molecular phylogeny of monocotyledons inferred from combined analysis of plastid *matK* and *rbcL* gene sequences. *Journal of Plant Research* 117:109-120 (2004).
- Tanaka N, Tanaka N: Chromosome studies in *Chionographis* (Liliaceae) I. On the holokinetic nature of chromosomes in *Chionographis japonica* Maxim. *Cytologia* 42: 753-763 (1977).

- Vanzela ALL, Colaço W: Mitotic and meiotic behavior of irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Acta Scientiarum* 24(2):611-614 (2002).
- Viera A, Page J, Rufas JS: Inverted meiosis: the true bugs as a model to study. In: *Meiosis*. Ed Karger, vol. 5, p. 137-156 (2009).
- Vignard J, Siwiec T, Chelysheva L, Vrielynck N, Gonord F, et al: The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics* 3: 1894-1906 (2007).
- White MJD: *Animal cytology and evolution*. 3ed. Cambridge University Press, Cambridge (1973).
- Wignall SM, Villeneuve AM: Lateral microtubules bundles promote chromosome alignment during acentrosomal oocyte meiosis. *Nature Cell Biology* 11:839-844 (2009).
- Zickler D, Kleckner N: The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Reviews of Genetics* 32: 619-697 (1998).
- Zickler D, Kleckner N: Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annual Reviews of Genetics* 33: 603-754 (1999).

***4. Artigo a ser submetido à revista
Cytogenetic and Genome Research***

Meiose invertida quiasmática e aquiasmática em plantas com cromossomos holocinéticos: o exemplo de *Rhynchospora pubera* e *R. tenuis* (Cyperaceae).

Gabriela Cabral¹, Peter Schlögelhofer^{2#} e Marcelo Guerra^{1*}

¹Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves s/n, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

Telefone: 55 81 21268846

²Department of Chromosome Biology, Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna, Vienna, Austria

#peter.schloegelhofer@univie.ac.at

*msfguerra@hotmail.com

Resumo

Na meiose padrão, uma fase S é seguida por dois eventos de segregação cromossômica, a anáfase I e II, nas quais ocorre a segregação dos cromossomos homólogos e das cromátides irmãs, respectivamente. Excepcionalmente, alguns organismos com cromossomos holocinéticos aparentemente apresentam uma meiose cujos eventos de segregação ocorrem de forma invertida com as cromátides irmãs segregando na anáfase I e os cromossomos homólogos na anáfase II. No entanto, em plantas com cromossomos holocinéticos, como na família Cyperaceae, o único indício de meiose invertida tem sido a observação de $2n$ cromátides individualizadas na prófase II. Neste trabalho, foi investigada a ocorrência de meiose invertida em duas espécies de Cyperaceae, *Rhynchospora pubera* ($2n = 10$) e *R. tenuis* ($2n = 4$), que apresentam meiose quiasmática e aquiasmática, respectivamente. Adicionalmente, a ausência de quiasmas na meiose de *R. tenuis* foi investigada com base na formação de quebras na dupla fita de DNA e na ocorrência de sinapse. Em ambas as espécies foi observado que os cinetócoros de cromátides irmãs apresentaram ligação anfitética na metáfase I, sendo um indicativo da ocorrência de meiose invertida. A formação de quebras na dupla fita de DNA em *R. tenuis* parece ocorrer normalmente com base nos sinais da recombinase RAD51. No entanto, os filamentos formados pela ASY1 (proteína componente do elemento axial e necessária para sinapse) apresentaram um aspecto borrado contrastando com os nítidos filamentos em *R. pubera* e indicando algum defeito na formação dos elementos axiais na primeira espécie. A ausência de sinapse em *R. tenuis* foi corroborada pela distribuição dos sítios de DNAr 5S e das bandas CMA⁺. Baseado nos defeitos sinápticos observados em *R. tenuis*, é possível que a ausência de quiasmas deva-se a uma falha na formação do complexo sinaptonêmico, uma vez que as etapas iniciais de recombinação estão presentes na espécie.

Palavras-chave: cromossomos holocinéticos, Cyperaceae, meiose, recombinação, sinapse.

Introdução

A meiose é um tipo especial de divisão celular presente em todos os eucariotos com a função principal de reduzir o nível de ploidia do genoma à metade. Para tanto, um único evento de replicação é sucedido por dois eventos de segregação cromossômica, sendo o primeiro reducional (segregação de cromossomos homólogos) e o segundo equacional (segregação de cromátides-irmãs). A segregação reducional correta depende de uma conexão física entre cromátides homólogas não-irmãs provida pelo quiasma que, juntamente com a coesão entre cromátides irmãs, mantém unidos os cromossomos paternos e maternos até a transição de metáfase I à anáfase I (Petronczki et al., 2003). Quiasmas são estruturas citológicas que correspondem aos locais onde houve eventos de recombinação entre cromossomos homólogos. A etapa inicial da recombinação é a formação de quebras na dupla fita de DNA, ou DSB (*double strand break*), catalisadas pela topoisomerase Spo11 (Keeney e Neale, 2006). Após a formação de DSB, o local de quebra é processado de forma a gerar fitas simples de DNA, as quais invadem o DNA fita dupla de uma cromátide homóloga (irmã ou não-irmã) no processo de reparo (Hunter, 2007). As recombinases Rad51 e DMC1 se ligam ao DNA fita simples formando filamentos nucleoproteicos com a habilidade de reconhecer sequências de DNA homólogas e, desta forma, catalisam o processo de invasão no DNA dupla fita (Pawlowski et al., 2003, Kagawa e Kurumizaka, 2010).

Estudos em diversos organismos mostraram que os eventos de recombinação meiótica possuem uma relação de interdependência com os eventos de pareamento e sinapse (Hamant et al., 2006). Em diversos organismos, incluindo as plantas, a formação e o processo de reparo de DSB são importantes para o sucesso do pareamento e da sinapse de cromossomos homólogos (Pawlowski et al., 2003; Page and Hawley, 2004 ;Stacey et al., 2006). Ao mesmo tempo, a formação do eixo cromossômico e a sinapse desempenham um importante papel na recombinação inter-homóloga (Colaiacovo, 2000). A formação de *crossovers* é comprometida em mutantes sinápticos, tanto de proteínas do elemento axial como do elemento central, embora as etapas iniciais da recombinação não sejam afetadas (Colaiacovo, 2006). Por exemplo, a proteína do elemento axial ASY1/HOP1, além de ser essencial para a sinapse, também coordena a atividade das recombinases favorecendo a recombinação entre cromátides homólogas não-irmãs (Sanchez-Moran et al., 2007; Carballo et al., 2008).

Além da formação de quiasma, outro aspecto importante para a segregação reducional é a orientação monopolar dos cinetócoros irmãos na meiose I que, juntamente com a manutenção da coesão na região centromérica, permite a migração conjunta das cromátides

irmãs na anáfase I (Hauf e Watanabe, 2004). O padrão temporal de liberação da coesão também é de grande importância para o sucesso da segregação na meiose I e II. A perda das coesinas ao longo dos braços cromossômicos e a sua manutenção na região centromérica permitem que cromossomos homólogos segreguem na anáfase I, enquanto mantêm as cromátides irmãs unidas garantindo a segregação correta na anáfase II (Barbero, 2009). A região centromérica é de extrema importância para a segregação meiótica, não apenas por ser a região de ligação dos microtúbulos, mas também por definir o padrão espacial de perda da coesão. A shugoshina, proteína que protege as coesinas centroméricas de serem clivadas na meiose I, se localiza na região centromérica dos cromossomos meióticos desde o início da prófase I (Hamant et al., 2005). Além disso, ao menos em *Schizosaccharomyces pombe*, a localização de coesinas na região central do centrômero leva à orientação monopolar dos cinetócoros irmãos, enquanto que coesinas na região pericentromérica resulta na orientação bipolar (Sakuno et al., 2009).

Com base na extensão do cinetócoro, os cromossomos podem ser classificados em dois tipos: monocêntricos, que apresentam cinetócoro localizado, e holocinéticos ou holocêntricos, com cinetócoro difuso. Cromossomos holocinéticos ocorrem em diferentes taxa incluindo nematódeos, como nos gêneros *Parascaris* e *Caenorhabditis*, diversas ordens de insetos, como Odonata e Heteroptera, e vegetais superiores, como nas famílias Cyperaceae e Juncaceae (revisado por Mola e Papeschi, 2006). Embora a presença de um cinetócoro difuso não represente um problema para a mitose, a ausência de um cinetócoro restrito poderia representar um problema para a dinâmica particular da coesão meiótica, necessária para manter as cromátides irmãs unidas ao mesmo tempo que os cromossomos homólogos segregam na anáfase I (Dernburg, 2001). Em *Caenorhabditis elegans* o quiasma determina subdomínios proteicos cromossômicos que atuam na perda gradual da coesão na meiose I e II, assim como ocorre em cromossomos monocêntricos (Schwarzstein et al., 2010).

Diferentemente de *C. elegans*, plantas e alguns outros organismos com cromossomos holocinéticos apresentam caracteristicamente um número diploide de cromátides individualizadas na prófase I, atribuído por vários autores à perda completa da coesão e à segregação das cromátides irmãs na anáfase I, caracterizando uma meiose invertida (Malheiros et al., 1947; Chandra, 1962; Nordenskiöld, 1962; Pazy e Plitmann, 1987; Guerra e García, 2004; Silva et al., 2005). Neste tipo de meiose, a segregação das cromátides irmãs se dá na anáfase I enquanto os cromossomos homólogos se separam na anáfase II. Nesse caso, há pelo menos dois pré-requisitos fundamentais para que a segregação das cromátides irmãs ocorra na meiose I: 1) orientação bipolar dos cinetócoros irmãos, os quais se associariam

independentemente a fusos opostos da célula (orientação anfitética); 2) perda completa da coesão entre cromátides irmãs antes do início da anáfase I. Embora evidências mais concretas da ocorrência de meiose invertida já tenham sido descritas para espécies de insetos (Bongiorni et al., 2004), no grupo das plantas com cromossomos holocinéticos ainda faltam evidências que distingam a segregação das cromátides irmãs da segregação dos cromossomos homólogos associada à perda precoce da coesão como as possíveis causas das cromátides individualizadas na prófase II.

Neste trabalho, foi analisado o comportamento meiótico de duas espécies de Cyperaceae com cromossomos holocinéticos, *Rhynchospora pubera* ($2n = 10$) e *R. tenuis* ($2n = 4$), com ênfase na associação dos cromossomos com os microtúbulos. Desta forma, objetivou-se avaliar a ocorrência de meiose invertida em plantas com cromossomos holocinéticos. A análise das duas espécies é complementar uma vez que *R. pubera* apresenta a meiose quiasmática comumente encontrada em plantas com cromossomos holocinéticos, enquanto *R. tenuis* apresenta uma condição excepcional por ser aquiasmática. Em ambos os casos foram encontradas fortes evidências para a ocorrência de meiose invertida. A razão da ausência de quiasmas na meiose de *R. tenuis* foi adicionalmente investigado através da imunolocalização de proteínas envolvidas nos processos de recombinação (Rad51) e sinapse (ASY1).

Material e Métodos

Material

Plantas de *R. tenuis* e *R. pubera* foram mantidas em vasos no Jardim Experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco. Os exemplares de *R. tenuis* foram coletados na localidade de Porto de Galinhas (Ipojuca) e os de *R. pubera* na Mata de Dois Irmãos (Recife), ambas no estado de Pernambuco, Brasil. Exsiccatas desses materiais encontram-se depositadas no herbário UFP desta universidade.

Preparação das lâminas para DAPI, CMA/DAPI e FISH

Anteras foram fixadas em uma solução de etanol/ácido acético (3:1, v/v) por 2-24 h e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a preparação das lâminas, todo o material foi lavado em água destilada e digerido em uma solução de celulase 4%, pectoliase 4% e citohelicase 4% a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 4 h. As anteras foram esmagadas em uma gota de ácido acético 60%. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas, após secarem, armazenadas a -20°C .

Coloração DAPI e bandeamento CMA/DAPI

As lâminas de meiose foram coradas diretamente com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 1 $\mu\text{g/ml}$, por 30 min e montadas em glicerol/tampão McIlvaine (1:1, v/v). Em algumas lâminas foi feita a coloração com cromomicina A3 (CMA) seguido de DAPI, como descrito por Vanzela e Guerra (2000). Nesse caso, as lâminas foram envelhecidas por três dias, coradas com CMA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) por 1 h e com DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) por 30 min e montadas em glicerol/tampão McIlvaine (1:1, v/v).

Hibridização in situ (FISH)

Após serem analisadas com DAPI, as lâminas destinadas à FISH foram descoradas em uma solução de etanol absoluto/ácido acético (3:1, v/v) por 30 min e em seguida em etanol absoluto por 2 h, podendo ser armazenadas a -20°C . A FISH foi realizada segundo Pedrosa et al. (2002) com algumas modificações. As modificações consistiram no tratamento das lâminas com pepsina (0,1 mg/ml) e desnaturação das lâminas por 10 min a 85°C em solução de 70% formamida. Além disto, as lâminas juntamente com o mix de hibridização foram novamente desnaturadas por 10 min a 90°C . Após os banhos de estringência, as lâminas foram contracoradas e montadas em DAPI/Vectashield H-1000 (2 $\mu\text{g/ml}$). Os sítios de DNAr 5S foram localizados usando como sonda o clone Rhy2 de *R. tenuis* (dos Santos et al., no prelo). O fragmento do DNAr 5S foi isolado através da técnica de mini-prep utilizando o Qiagen Mini Plasmid Kit (QIAGEN) e marcado com Cy3-dUTP (GE Healthcare) por *nick translation* (Invitrogen).

Imunocoloração

A imunocoloração para ASY1 foi realizada segundo Manzanero et al. (2000) com algumas modificações. As anteras foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão PBS (1,3 M NaCl, 70 mM Na_2HPO_4 , 30 mM NaH_2PO_4) por 40 min à temperatura ambiente, lavadas em PBS e esmagadas em uma gota do mesmo tampão. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram coradas com DAPI/PBS (2 $\mu\text{g/ml}$) e selecionadas. As lâminas foram lavadas e bloqueadas com 3% BSA em PBS por 10 min à temperatura ambiente. Foram usados anticorpos de coelho contra ASY1 de *Arabidopsis thaliana* (Armstrong et al., 2002), cedido

por F.C.H Franklin, diluído 1:250 em bloqueador, e anticorpo de cabra contra IgG de coelho conjugado com FITC (Sigma, #F9887) diluído 1:300. As lâminas foram contraincoradas e montadas em DAPI/Vectashield H-1000 (2µg/ml).

A imunocoloração para Rad51 foi realizada segundo Chelysheva et al. (2010), utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo contra Rad51 (NeoMarkers, #MS-988-P0) diluído 1:75 e anticorpo secundário de cabra contra IgG de camundongo conjugado com Alexa 568 (Molecular Probes, #A11031) diluído 1:300.

A localização da tubulina foi realizada de acordo com Peirson et al. (1997) com algumas modificações. Anteras foram pré-tratadas com 0,1 mM MBS (hidroxissuccinimida éster do ácido maleimido benzoico) por 15 min à temperatura ambiente e fixadas com paraformaldeído 4% diluído em tampão MTSB (50 mM PIPES, 5 mM MgSO₄, 5 mM EGTA, 0,1% Triton X-100, pH 6,9) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em MTSB e esmagadas em uma gota do mesmo tampão sobre lâmina coberta com uma camada de gelatina. As lâminas foram removidas por congelamento em nitrogênio líquido, as lâminas foram coradas com DAPI/MTSB (2µg/ml) e selecionadas ao microscópio de fluorescência. As melhores lâminas foram lavadas em tampão e digeridas com 1,4% - glucuronidase por 30 min à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem, as lâminas foram bloqueadas em 3% BSA diluído em MTSB por 1 h à temperatura ambiente seguido da incubação com anticorpo primário. Para detecção de tubulina, foi usado anticorpo de camundongo contra β-tubulina (Sigma, #T9026) diluído 1:40 em bloqueador e anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado com TRITC (DAKO) diluído 1:25 ou com anticorpo cabra contra IgG de camundongo conjugado com Alexa 568 (Molecular Probes, #A11031) diluído 1:300. As lâminas foram contraincoradas e montadas em DAPI/Vectashield H-1000 (2 µg/ml).

Microscopia

Imagens do ciclo meiótico com DAPI e CMA/DAPI e imunocoloração de ASY1 foram capturadas com o microscópio de fluorescência Leica DMRB equipado com câmera digital Cohu e com o programa Leica Q-FISH. As fotos de FISH e imunocoloração de Rad51 foram feitas com microscópio de desconvolução Carl Zeiss Axioplan 2 equipado com câmera Photometrics Quantix e com o programa MetaMorph 7.1.4.0 (Molecular Dynamics). As imagens de imunocoloração de microtúbulos foram feitas no microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 Meta com o programa LSM 510. A desconvolução foi realizada com o programa

Auto Deblur 9.2.1 (AutoQuant Imaging) e sobrepostas com o programa HeliconFocus 5.0. As imagens foram posteriormente editadas no Adobe Photoshop CS4.

Resultados

Meiose quiasmática de *Rhynchospora pubera*

A meiose em *R. pubera* foi quiasmática e regular, como descrito previamente (Guerra et al., 2010). No início da prófase I ocorreu o pareamento entre cromossomos homólogos e na diacinese foram observados cinco bivalentes com um ou dois quiasmas terminais ou subterminais. Na metáfase I, os cromossomos com apenas um quiasma assumiram tipicamente a forma de alter (fig. 1a), sendo cada metade geralmente referida como “meio-bivalente” (ver, por exemplo, Pazy e Plitmann, 1987). Na anáfase I os cromossomos pareciam puxados por uma estreita região, adquirindo a forma de gota (fig. 1b), e nunca na forma arqueada como reportado por Malheiros et al. (1947) para *Luzula purpurea*. Em anáfase I e prófase II foi observado um número diploide de cromátides individualizadas (fig. 1b,c). Em diversas células em prófase II, foram observados fios de cromatina ligando pares de cromátides (fig. 1c). Tais conexões de cromatina podem desempenhar um papel na reassociação de cromátides, levando à formação de pares de cromátides na metáfase II (fig. 1d) e à segregação de um conjunto haploide de cromátides para cada pólo da anáfase II (fig. 1e).

A imunodeteção de tubulina em metáfase I revelou que os microtúbulos se ligam na região intersticial dos cromossomos, em uma área reduzida se comparada aos cromossomos metafásicos mitóticos, formando geralmente um feixe denso na região central de cada meio bivalente (fig. 2a, b). Além disso, foi observado que os bivalentes em bastão se orientaram com o maior eixo perpendicular ao fuso e que cada meio-bivalente estava associado a microtúbulos de pólos opostos (fig. 2a-a”). Como cada meio-bivalente é aparentemente composto por duas cromátides-irmãs, as cromátides irmãs teriam, na metáfase I, uma orientação bipolar ou anitélica. Na metáfase II, cada cromátide estava associada a microtúbulos vindo de um dos pólos da célula e a área de ligação dos microtúbulos também foi reduzida em relação aos cromossomos mitóticos (fig. 2c, d).

Meiose aquiasmática de *Rhynchospora tenuis*

Durante as fases iniciais da prófase I de *R. tenuis*, ocorreu uma associação ponta-a-ponta entre os homólogos do par cromossômico que contém a região organizadora do nucléolo (evidenciada como banda CMA⁺), enquanto que o alinhamento lateral dos cromossomos não foi observado, indicando a não ocorrência de sinapse (fig. 3a). Para confirmar a ausência de sinapse entre os homólogos, foi analisada a associação entre os sítios de DNAr 5S durante os estágios iniciais da prófase I. Dados de mitose indicam que o único sítio de DNAr 5S está localizado na região intersticial do par oposto ao que contém o DNAr 45S (dos Santos et al., no prelo). Cerca de 80% das células em zigóteno-paquítenu, apresentaram sinais de DNAr 5S claramente separados, sugerindo a ausência de pareamento e sinapse nesse cromossomo (fig. 3b).

Ao final da prófase I foram observados quatro univalentes (fig. 3c,d) e na metáfase I, os quatro univalentes se reuniram na placa equatorial formando uma figura em forma de cruz (fig. 3e). Na anáfase I, a figura em forma de cruz se dividiu longitudinalmente em duas placas anafásicas, indicando a segregação de cromátides-irmãs (fig. 3f). Na prófase II foi observada apenas um leve descondensação, mantendo, no entanto, a mesma organização em cruz da metáfase I até metáfase II (fig. 3g). Na anáfase II ocorreu a segregação de duas cromátides para cada pólo (fig. 3h).

A imunodeteção de microtúbulos em metáfase I revelou que cada univalente em metáfase I estava associado a microtúbulos vindos de pólos opostos da célula (fig. 4a, b), ou seja, as cromátides-irmãs possuíam uma orientação bipolar e segregavam na meiose I. Na meiose II, tanto em metáfase como em anáfase (fig. 4c), cada cromátide estava associada a microtúbulos originados de apenas um dos pólos da célula. Assim como observado em *R. pubera*, a região de ligação dos microtúbulos na meiose I e II de *R. tenuis* apresentou-se reduzida em relação ao observado nos cromossomos mitóticos metafásicos (Guerra et al, 2006).

Para entender melhor a meiose aquiasmática de *R. tenuis* foi feita a imunolocalização em *R. tenuis* e *R. pubera* de uma proteína relacionada ao processamento de DSB, a recombinase Rad51, e de uma proteína importante do elemento lateral do complexo sinaptonêmico, a ASY1. Em ambas as espécies, foram observados numerosos sinais de Rad51 em leptóteno (fig. 5a,c), mas, com o avanço da prófase, em zigóteno e paquíteno o número de sinais foi mais reduzido (fig. 5b,d). Por outro lado a imunodeteção de ASY1 revelou em ambas as espécies um padrão filamentoso colocalizando com os cromossomos em prófase I (fig. 6a,b). Uma diferença observada entre o elemento lateral das duas espécies foi quanto à

nitidez dos filamentos de ASY1. Em *R. pubera*, ASY1 formou filamentos bem nítidos ao longo do eixo dos cromossomos (destaque na fig. 6b'), enquanto que em *R. tenuis* os filamentos apresentaram uma marcação mais difusa, observando-se vagamente alguns fios (destaque na fig. 6a'), o que indica algum defeito na formação do complexo sinaptonêmico.

Discussão

A ocorrência de um número diploide de cromátides individualizadas na prófase II tem sido a principal indicação citogenética da meiose invertida em diversas espécies (Malheiros et al., 1947; Silva et al., 2005; Bongiorno et al., 2004). Essa alteração do curso normal da meiose pode ser atribuída tanto à segregação de cromátides-irmãs quanto à segregação de cromossomos homólogos acompanhada da perda precoce de coesão entre cromátides-irmãs. Na meiose de univalentes holocinéticos a ocorrência de cromátides-individualizadas na prófase II é decorrente da separação de cromátides-irmãs, como observado aqui em *R. tenuis*. Um comportamento meiótico semelhante foi observado no cromossomo B de *Cuscuta babylonica* (Pazy, 1997), em cromossomos sexuais de heteróptera (Viera et al., 2009) e em outros univalentes, como em *Acanonicus hahni* (Papeschi e Mola, 1990). Esta parece ser uma peculiaridade de cromossomos holocinéticos, uma vez que univalentes monocêntricos (especialmente cromossomos sexuais) mantêm a orientação sintélica dos cinetócoros irmãos e segregam reducionalmente na anáfase I (Rebollo et al., 1998). No caso de bivalentes holocinéticos, só é possível obter evidências que distingam entre as duas possíveis causas da ocorrência de cromátides individualizadas na prófase II quando existe heteromorfismo para um par cromossômico. Por exemplo, no coccídeo *Planococcus citri* (Homoptera), a análise de um indivíduo com heteromorfismo cromossômico mostrou que a ocorrência de cromátides individualizadas na prófase II seria o resultado de uma segregação equacional (Bongiorno et al., 2004). Embora não haja cromossomos heteromórficos em *R. pubera*, a análise da ligação dos microtúbulos nos cromossomos em metáfase I mostrou que os cinetócoros irmãos ligavam-se ao fuso de maneira anfitélica, cuja consequência lógica seria a segregação de cromátides irmãs na anáfase I, corroborando, desta forma, a hipótese da ocorrência de meiose invertida nesta espécie. Adicionalmente, foi observado que a ligação dos microtúbulos se deu na região intersticial de cada cromátide na metáfase I de *R. pubera*, diferindo do descrito

para *C. elegans*, no qual a ligação dos microtúbulos nos cromossomos em metáfase I ocorre na região distal ao quiasma (Wiganll e Villeneuve, 2009)

A ausência de sinapse e quiasmas na meiose de *R. tenuis* torna esta espécie bastante peculiar entre as plantas com cromossomos holocinéticos. Apesar da ocorrência de univalentes na prófase I inicial, o processo inicial da formação de quebras na dupla fita de DNA (DSB), necessário para o estabelecimento dos quiasmas está presente na prófase I de *R. tenuis*, evidenciado pelos sinais de Rad51. No entanto a presença de Rad51 não significa necessariamente que ocorra a formação de quiasmas, uma vez que a Rad51 catalisa o reparo de DSB envolvendo tanto cromátides-homólogas como cromátides-irmãs (Carballo et al., 2008). Além disso, Rad51 está envolvida tanto na recombinação meiótica quanto na recombinação mitótica (Kagawa e Kurumizaka, 2010). É possível que em *R. tenuis* a presença de Rad51 esteja relacionada a ocorrência de reparo exclusivamente entre cromátides-irmãs, não gerando quiasmas. Estudos em diversos organismos têm mostrado que a formação do eixo cromossômico e a sinapse desempenham um importante papel na formação de quiasmas ao gerar uma barreira contra a utilização de cromátides-irmãs no reparo de DSB (Colaiacovo, 2006). Mutantes de componentes do complexo sinaptonêmico de diversos organismos apresentam uma redução no número de quiasmas, especialmente acentuada em mutantes para a proteína do elemento axial HOP1/ASY1 (Sym e Roeder, 1994; Sanchez-Moran et al., 2007; Osman et al., 2006; Zetka et al., 1999). Além disso, Carballo et al (2008) demonstraram que a preferência de recombinação com o cromossomo homólogo é imposta pela fosforilação da proteína homóloga à ASY1 em *S. pombe*. Somado ao fenótipo assináptico, evidenciado pela localização das RONS o dos sítios de DNAr 5S na prófase I, o elemento lateral do complexo sinaptonêmico de *R. tenuis* parece se formar de maneira anormal, com base na morfologia pouco precisa dos filamentos de ASY1. Diferentemente de *R. pubera*, na qual os elementos axiais são bem definidos e os quiasmas ocorrem regularmente. Desta forma, é possível especular que a ausência de sinapse na meiose de *R. tenuis* estaria interferindo no processo de reparo de DSB, favorecendo o reparo envolvendo a cromátide-irmã e gerando, assim, um fenótipo aquiasmático..

A análise comparada da meiose dessas duas espécies de *Rhynchospora* suporta fortemente a hipótese da ocorrência de meiose invertida em plantas com cromossomos holocinéticos, tanto na presença como na ausência de quiasma. A presença de um cinetócoro localizado parece desempenhar um papel crucial no sucesso da divisão meiótica por determinar o padrão de segregação de uma meiose normal (Kitajima et al., 2004; Hamant et al., 2006). O surgimento da meiose invertida parece ter sido uma das alternativas encontradas

no processo evolutivo para lidar com a ausência de uma região centromérica localizada, como no caso de cromossomos holocinéticos.

Agradecimentos

À Christopher Franklin por nos fornecer o anticorpo contra ASY1. GC e MG tiveram o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para o desenvolvimento do projeto. PS teve o suporte financeiro da Austrian Science Fund, projeto F19037, e da Austrian Academy of Sciences, projeto APART11230.

Referências bibliográficas

- 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*. *Journal of Cell Science* 115:3645-3655 (2002).
- Barbero JL: Cohesins: chromatin architects in chromosome segregation, control of gene expression and much more. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2025-2035 (2009).
- Bongiorni S, Fiorenzo P, Pippoletti D, Prantera G: Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. *Chromosoma* 112:331-341 (2004).
- Carballo JA, Johnson AL, Sedgwick SG, Cha RS: Phosphorylation of the axial element protein Hop1 byMec1/Tel1 ensures meiotic interhomolog recombination. *Cell* 132: 758-770 (2008).
- Chandra HS: Inverse meiosis in triploid females of the mealy bug, *Planococcus citri*. *Genetics* 47: 1441-1454 (1962).
- Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot G, Vrielynck N, et al.: An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during *Arabidopsis thaliana* meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 143-153 (2010).
- Colaiacovo MP: The many facets of SC function during *C. elegans* meiosis. *Chromosoma* 115: 195-211 (2006).
- Dernburg AF: Here, there, and everywhere: kinetochore function on Holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, vol. 153, n. 6, p. 33-38, 2001.

- Guerra M, Brasileiro-Vidal AC, Arana P, Puertas MJ: Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* 126:33-41 (2006).
- Guerra M, Cabral G, Cuacos M, González-García M, González-Sánchez M, et al: Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of centromeric rules. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 82-96 (2010).
- Guerra M, García MA: Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47: 134-140 (2004).
- Hamant O, Golubovskaya I, Meeley R, Fiume E, Timofejeva L, et al: A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Current Biology* 15: 948-954 (2005).
- Hamant O, Ma H, Cande WZ: Genetics of meiotic prophase I in plants. *The Annual Review of Plant Biology* 57: 267-302 (2006).
- Hauf S, Watanabe Y: Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* 119: 317-327 (2004).
- Hunter N: Meiotic recombination. In Aguilera A, Rothstein R.: *Molecular Genetics of Recombination*. Ed. Springer, pp.381-432 (2007).
- Kagawa W, Kurumizaka H: From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular rules of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *The FEBS Journal* 277: 590-598 (2010).
- Keeney S, Neale MJ: Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society Transactions* 34: 523-525 (2006).
- Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y: The conserved kinetochore protein Shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427: 510-517 (2004).
- Malheiros N, Castro D, Câmara A: Cromosomas sem centrómero localizado. O caso de *Luzula purpurea* Link. *Agronomia Lusitana* 9:51-74 (1947).
- Manzanero S, Arana P, Puertas MJ, Houben A: The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animal at meiosis. *Chromosoma* 109:308-317 (2000).
- Mola LM, Papeschi AG: Holokinetic chromosomes at a glance. *Journal of Basic and Applied Genetics* 17:17-33 (2006).

- Nordenskiöld H: Tetrad analysis and the course of meiosis in three hybrids of *Luzula campestris*. *Hereditas* 47: 203-238 (1962).
- Osman K, Sanchez-Moran E, Higgins JD, Jones GH, Franklin FCH: Chromosome synapsis in *Arabidopsis*: analysis of the transverse filament protein ZYP1 reveals novel functions for the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115: 212-219 (2006).
- Page SL, Hawley RS: The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:525-558 (2004).
- Papeschi AG, Mola LM: Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Stal) (Coreidae, Heteroptera) I. Behaviour of univalents in desynaptic individuals. *Genetica* 80: 31-38 (1990).
- Pawlowski WP, Golubovskaya IN, Cande WZ: Altered nuclear distribution of recombination protein Rad51 in maize mutants suggests the involvement of Rad51 in meiotic homolog recognition. *The Plant Cell* 15: 1807-1816 (2003).
- Pazy B: Supernumerary chromosomes and their behaviour in meiosis of the holocentric *Cuscuta babylonica* Choisy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 123: 173-176 (1997).
- Pazy B, Plitmann U: Persisting demibivalents: a unique meiotic behaviour in *Cuscuta babylonica* Choisy. *Genome* 29: 62-66 (1987).
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A: Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161: 1661-1672 (2002).
- Peirson BN, Bowling SE, Makaroff CA: A defect in synapsis causes male sterility in a T-DNA-tagged *Arabidopsis thaliana* mutant. *The Plant Journal* 11(4): 659-669 (1997).
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K: Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440, 2003.
- Rebollo E, Martín S, Manzanero S, Arana P: Chromosomal strategies for adaptation to univalency. *Chromosome Research* 6: 515-531 (1998).
- Sakuno T, Tada K, Watanabe Y: Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 458: 852-858 (2009).
- Sanchez-Moran E, Santos J, Jones GH, Franklin FCH: ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 21: 2220-2233 (2007).
- Schwarzstein M, Wignall SM, Vileneuve AM: Coordinating cohesion, co-orientation and congression during meiosis: lessons from holocentric chromosomes. *Genes & Development* 24: 219-228 (2010).

- Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL: Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. Botanical Journal of the Linnean Society 149:457-464 (2005).
- Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, et al: Arabidopsis Spo11-2 functions with Spo11-1 in meiotic recombination. The Plant Journal 48: 206-216 (2006).
- Sym M, Roeder GS: Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. Cell 79: 283-292 (1994).
- Vanzela ALL, Guerra M: Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). Genetics and Molecular Biology 23:453-456 (2000).
- Viera A, Page J, Rufas JS: Inverted meiosis: the true bugs as a model to study. In: Meiosis. Ed Karger, vol. 5, p. 137-156 (2009).
- Wignall SM, Villeneuve AM: Lateral microtubules bundles promote chromosome alignment during acentrosomal oocyte meiosis. Nature Cell Biology 11:839-844 (2009).
- Zetka MC, Kawasaki I, Strome S, Muller F: Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. Genes & Development 13: 2258-2270 (1999).

Legenda das figuras

Fig. 1: Algumas fases da meiose de *Rhynchospora pubera*. **a)** Metáfase I. **b)** Anáfase I mostrando cromátides puxadas por uma região estreita, adquirindo forma de gota (setas). **c)** Prófase II com dez cromátides individualizadas em cada pólo. Seta aponta para fio de cromatina ligando duas cromátides. **d)** Metáfase II. **e)** Anáfase II tardia. Barra em **f)** corresponde a 5µm.

Fig. 2: Ligação dos microtúbulos em cromossomos de *Rhynchospora pubera*. **a – a’)** Metáfase I de *R. pubera* em vista polar com um bivalente em destaque, mostrando plano focal superior (**a**), médio (**a’**) e inferior (**a’’**). **b)** Metáfase mitótica, com um cromossomo destacado no canto superior direito. **c – c’)** Metáfase II mostrando plano superior (**b**) e plano inferior (**b’**). Os esquemas em **d** e **d’** correspondem à metáfase superior de **c** e **c’**, respectivamente. **d’)** Sobreposição dos esquemas de **d** e **d’**. Barra em **d’’** corresponde a 5µm.

Fig. 3: Meiose de *Rhynchospora tenuis*. **a)** Zigóteno mostrando a associação ponta-a-ponta dos cromossomos com a RON (CMA⁺, em amarelo). **b)** Zigóteno mostrando os sítios de DNAr 5S (em vermelho) dissociados. **c)** Diplóteno com quatro univalentes. **d)** Diacinese com bandas CMA⁺ (setas, em amarelo) no menor par cromossômico. **e)** Metáfase I com univalentes organizados em cruz. **f)** Anáfase I inicial em vista lateral. **g)** Metáfase II com cromátides organizadas em cruz. **h)** Anáfase II inicial. Barra em **h)** corresponde a 5µm.

Fig. 4: Ligação dos microtúbulos em cromossomos de *Rhynchospora tenuis*. **a – a’)** Metáfase I em vista lateral com microtúbulos em ambos os lados de cada univalente. Apenas três dos quatro univalentes são vistos. **b)** esquema da sobreposição em **a’**. **c - c’)** Anáfase II inicial. Seta aponta para uma cromátide ligada a microtúbulos de um único pólo. Barra em **c’** corresponde a 5µm.

Fig. 5: Localização de RAD51 na prófase I de *Rhynchospora tenuis* (**a, b**) e *R. pubera* (**c, d**). **a** e **c)** Leptóteno de *R. tenuis* (**a – a’**) e *R. pubera* (**c – c’**) com numerosos sinais de RAD51. **b** e **d)** Zigóteno de *R. tenuis* (**b – b’**) e *R. pubera* (**d – d’**) com um número reduzido de sinais de RAD51. Barra em **d’** corresponde a 5µm.

Fig. 6: Localização de ASY1 no leptóteno de *Rhynchospora tenuis* (**a – a''**) e *R. pubera* (**b – b''**). Destaque no canto superior esquerdo de **a'** e **b'** representam a ampliação da área selecionada. Note a diferença de nitidez entre os filamento de ASY1 de *R. tenuis* e *R. pubera*. Barra em **a''** e **b''** correspondem a 5µm.

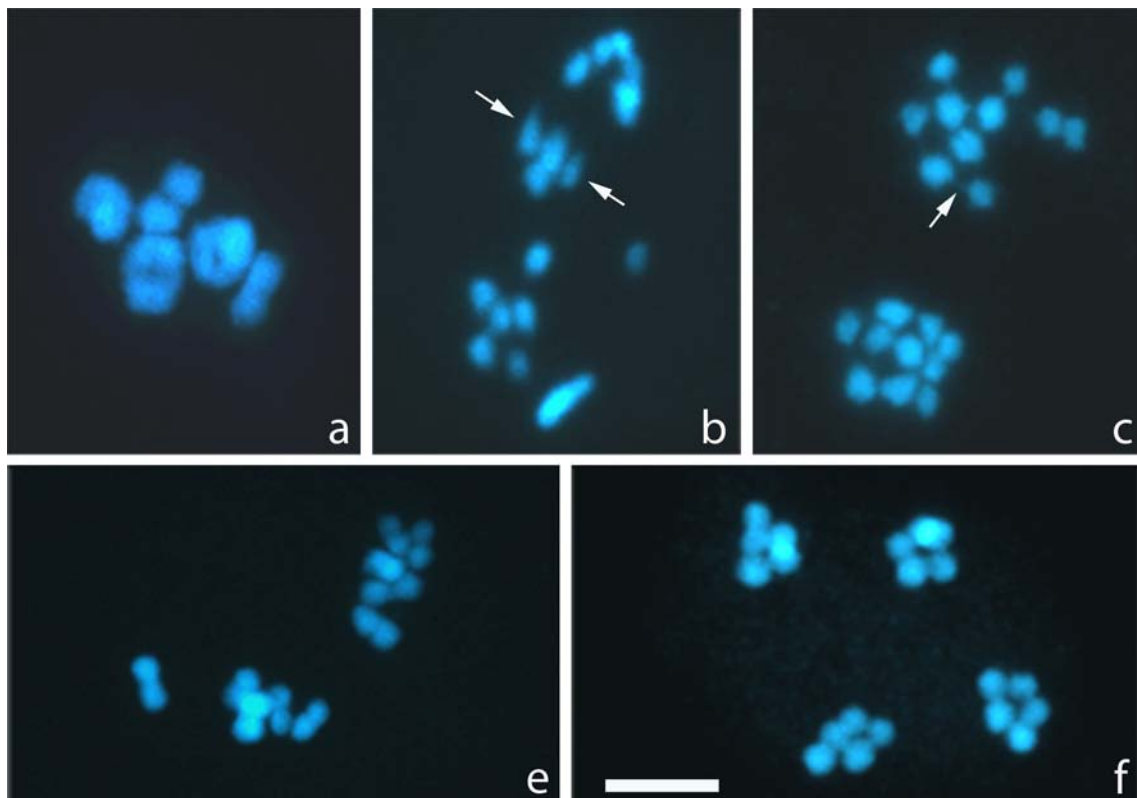


Fig. 1

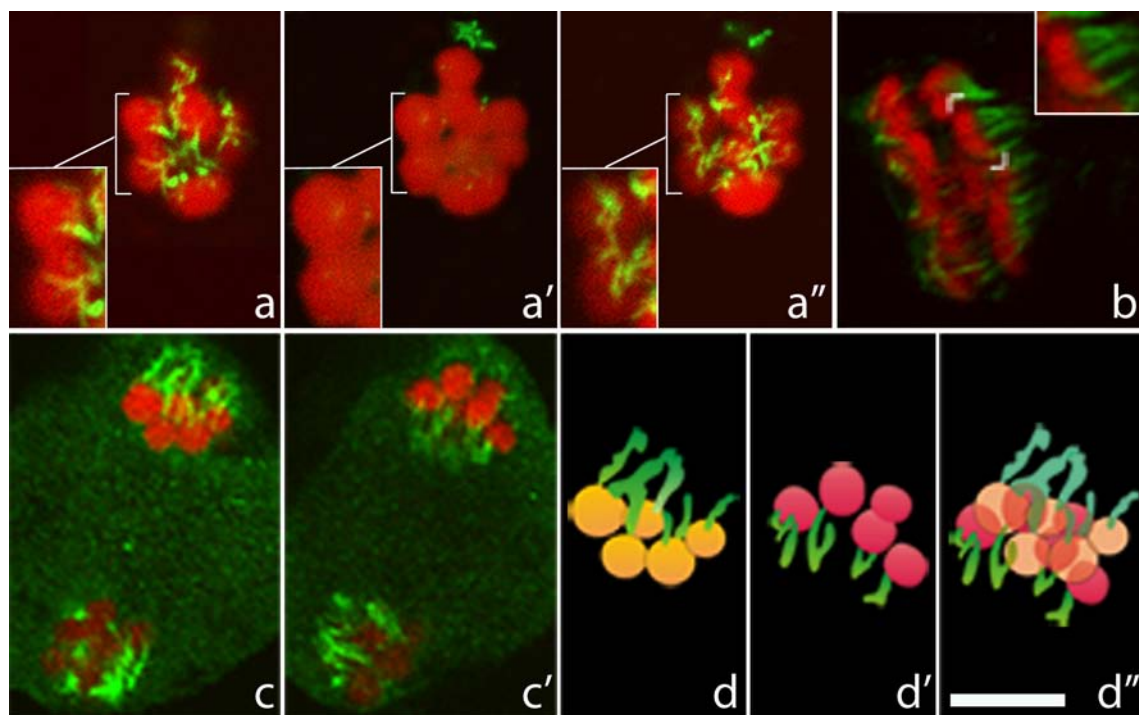


Fig. 2

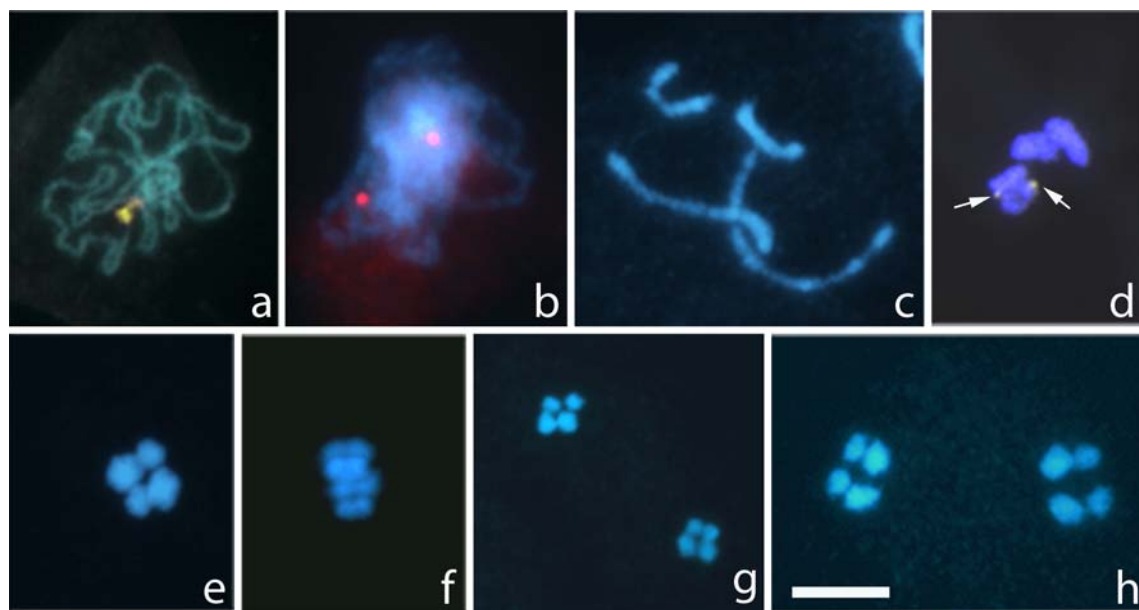


Fig. 3

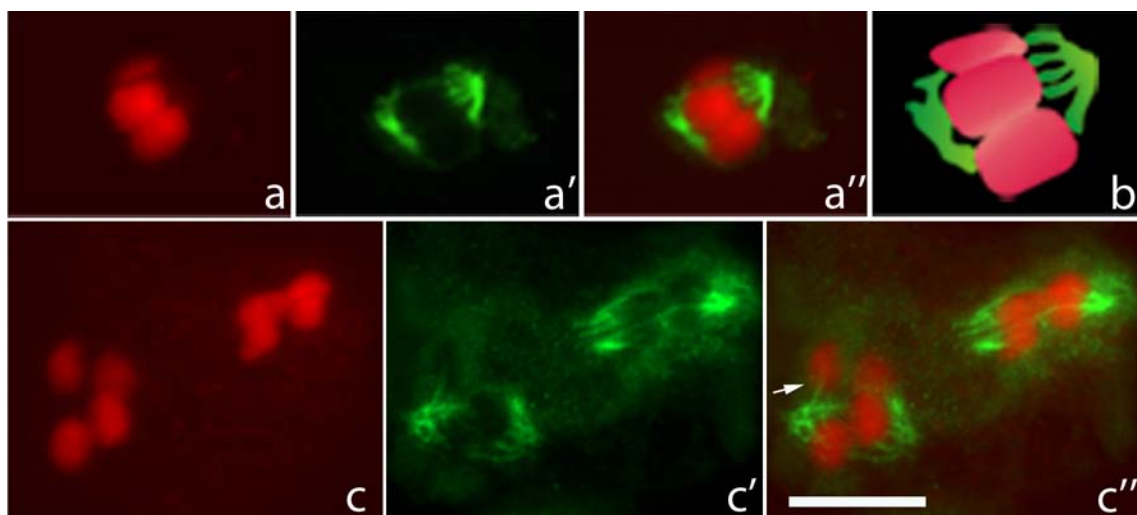


Fig. 4

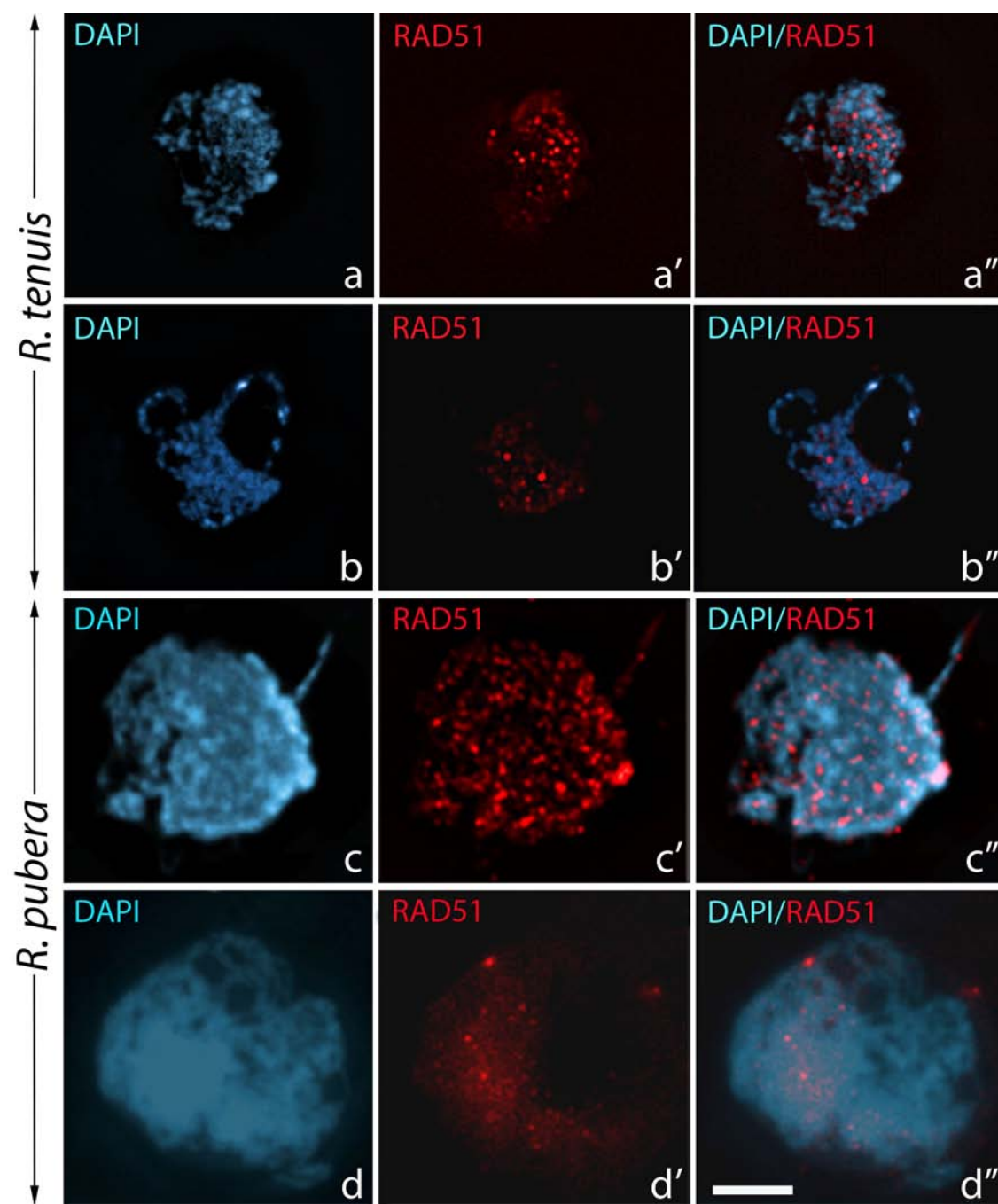


Fig. 5

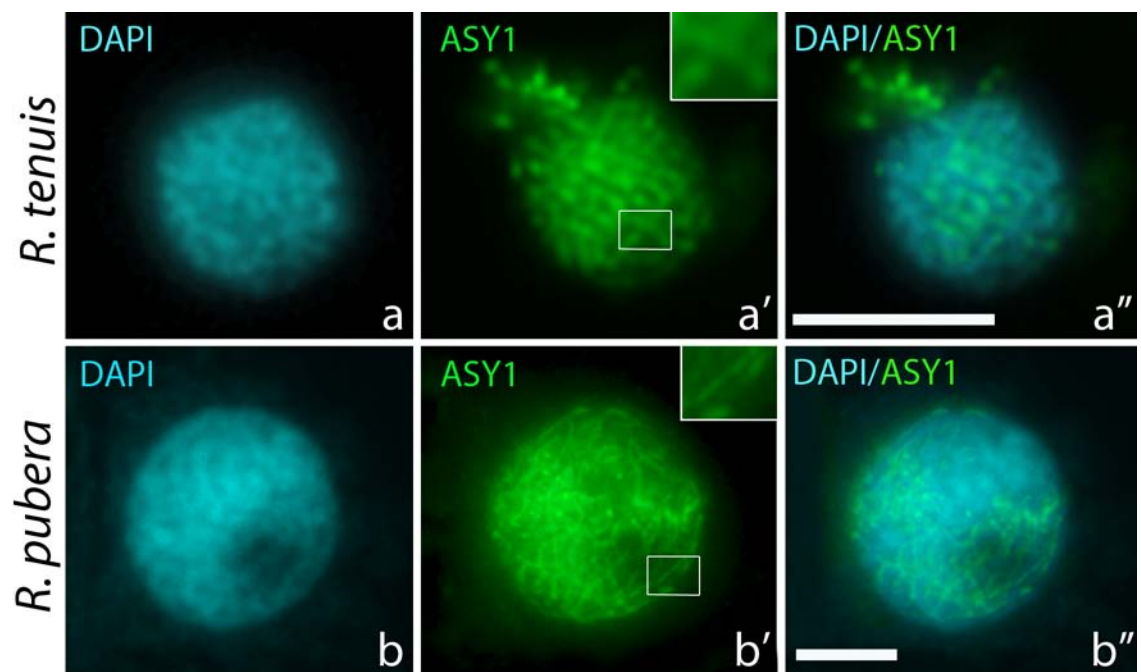


Fig. 6

5. Conclusões

- Na meiose quiasmática de *R. pubera*, as cromátides irmãs apresentam ligação anfitélica com o fuso na metáfase I, indicando a ocorrência de segregação equacional na anáfase I e, consequentemente de meiose invertida.
- Na meiose aquiasmática de *R. tenuis*, as cromátides irmãs se ligam de forma anfitélica com o fuso na metáfase I e segregam equacionalmente, comprovando a ocorrência de meiose invertida.
- Embora não ocorram quiasmas na meiose de *R. tenuis*, a formação de quebras na dupla fita de DNA foi evidenciada pelos sinais da recombinase RAD51.
- No zigóteno-paquíteno de *R. tenuis*, os sítios de DNAr 5S encontraram-se separados e os cromossomos homólogos portadores da RON estavam associados ponta-a-ponta, possivelmente como consequência da ausência de sinapse. Além disso, o elemento axial de *R. tenuis* apresenta formação anormal com filamentos pouco nítidos de ASY1. Portanto, a ausência de quiasmas na meiose de *R. tenuis* pode ser consequência de uma falha na formação do complexo sinaptonêmico, uma vez que recombinação e sinapse são eventos relacionados.

Normas da revista Cytogenetic and Genome Research

Guidelines for Authors

www.karger.com/cgr_guidelines

Introduction

Categories of Manuscripts

Single Topic Issues

Submission

Arrangement

Literature Cited

Gene Symbols

Cell Lines in Cancer Research

*Author's Choice*TM

Page Charges, Color Reproductions

Electronic Proofs

Reprints

Requirements for Gene Mapping Reports

Introduction

'Cytogenetic and Genome Research' publishes high quality original reports and reviews covering all aspects of chromosomes, genes and genomes in man, animals and plants.

Categories of Manuscripts for Conventional Issues

Original Articles are reports on

Human, Animal and Plant Cytogenetics

Cancer Cytogenetics

Molecular Cytogenetics

Gene Mapping, Cloning and Sequencing

Gene Characterization

Comparative Gene Mapping

Somatic Cell Genetics

Genes and Diseases

Developmental Genetics

Epigenetics.

Other categories closely related to the above topics could be considered by contacting the Editors.

Reviews covering a timely topic by experts in the field are either invited by the Editors or may be submitted for consideration.

Short Reports must present results of sufficient importance to justify accelerated acceptance. They should not be longer than 4 printed pages, including figures, tables and references.

Human Cytogenetics Case Reports are for de novo observations, particularly such which apply the use of HGMP (Human Genome Mapping Project) resources to the detailed characterization of chromosome rearrangements thereby further highlighting the nature of the abnormalities being described.

Cytogenetics of Rare or Endangered Species with straightforward karyotype descriptions of animals or plants should not be longer than 3 printed pages, including figures, tables and references.

Chromosome and Gene Workshops or Reports compile data that have been collected for single chromosomes, genes or genomes, hereditary diseases and gene-phenotype correlations in man, animals and plants. Illustrations and tables may be included.

Collaborative and Interactive Research Projects are contributions from investigators who are in need of research materials, or need the assistance of colleagues with specialized expertise, or who have data that is inadequate for a full report but which could be published when combined with data of others.

Commentaries are a forum for observations, opinions, and comments outside the realm of conventional scientific papers. Original data, illustrations and tables may be included.

Single Topic Issues

The journal has a tradition in publishing a series of themed issues. For these volumes we are soliciting the assistance of one or more expert investigators to act as Guest Editors in the area that is particularly interesting and/or one in which there is a need for a thorough overview. The Guest Editors invite top researchers to contribute original research reports or reviews of a topic that is in their main area of interest. These manuscripts are peer reviewed the same way as the papers received for the conventional issues. Proposals clearly outlining a theme and nominating potential Guest Editors are welcome.

Submission

Manuscripts should be submitted as pdf file attachments via e-mail to m.schmid@biozentrum.uni-wuerzburg.de.

Authors should indicate which of the Executive or Associate Editors they feel would be most appropriate for their report. All manuscripts are subject to editorial review. The editors reserve the right to improve style and, if necessary, return the manuscript for rewriting to the authors. The editorial office reserves rights to reject manuscripts based on priorities and space availability in the journal.

Arrangement

Manuscripts must be prepared strictly in accordance with the style of this journal.

Title page: The first page should give the full names of the authors and their affiliations, the full postal address, telephone and fax numbers, as well as the e-mail address of the corresponding author.

Abstracts should be provided for all Original Articles, Reviews, Human Cytogenetics Case Reports, and Cytogenetics of Rare or Endangered Species.

Figures: Digital illustrations should be sharp with good contrast and color rendition. Resolution for all graphics should be at least 300 dots per inch. We request that all illustrations be in a common format such as .jpg (.jpeg, .jpe), .tif (.tiff), .eps or .ppt.

Tables must be in Word format. Please use MS WORD Table > Insert > Table command from the menu bar to make tables.

Literature Cited

References should be quoted in the text as follows:

Single author: Jones (1999)

Two authors: Jones and Smith (2000)

More than two authors: Jones et al. (2001)

The reference list should be arranged alphabetically according to the first author's surname.

Titles should be given in full.

Papers published in electronic format should list authors, title and journal as above followed by the journal's URL, eg:

Chinnappan D, Zhang Y, Ravid K:

AIM-1 Transgenic mice with a curly tail phenotype and its chromosome location.

Cytogenet Genome Res 98:231A (2002)

<http://karger.com/doi/10.1159/000069799>

Book references must include the book title, editor(s), publisher, and city of publication.

Recent issues of the journal should be carefully consulted for reference list style.

Agreement between text citations and the reference list should be checked carefully, and the latter checked for accuracy. If many errors are found, the manuscript will be returned for corrections which may cause considerable publication delay.

Gene Symbols

Human gene symbols: Only official gene symbols of the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) are accepted. Authors must obtain or verify the official gene symbol of the gene(s) mapped and indicate that they have done so in the manuscript submitted. This can be accomplished for human genes by contacting
HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)
European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)
Wellcome Trust Genome Campus
Hinxton, Cambridgeshire
CB10 1SA, UK
Fax +44 (0)1223 494 468
E-Mail hgnc@genenames.org
Website: www.genenames.org
Guidelines set forth by the HUGO Gene Nomenclature Committee are available at <http://www.genenames.org/guidelines.html>.
New symbols and names for genes can be requested electronically through the online gene symbol request form at http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc_request.pl.

Animal gene symbols: Authors submitting material on mouse and rat genetics should obtain correct genetic nomenclature before publication. Contact
Dr. Lois Maltais
MGD Nomenclature Coordinator
The Jackson Laboratory
600 Main Street
Bar Harbour ME 04609 (USA)
Tel. +1 (207) 288 6429
Fax +1 (207) 288 6132
E-mail nomen@informatics.jax.org
MGD home page: www.informatics.jax.org
Guidelines set forth by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice are available at www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/table.shtml
New symbols and names for genes can be requested electronically through the online symbol registry form at www.informatics.jax.org/mgihome/nomen

Gene mapping data for the mouse should also be submitted to the Mouse Genome Database (MGD) following the guidelines at

www.informatics.jax.org/mgihome/submissions/submit.shtml.

The assigned MDG accession numbers should be included in the manuscript for publication. Assistance with submissions can be obtained by sending an e-mail to submissions@informatics.jax.org.

Guidelines for the Use of Cell Lines in Cancer Research

Guidelines published by the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research may be downloaded from the NCRN website:

<http://www.ncrn.org.uk/csg/publications.htm>.

*Author's Choice*TM

With this option the author can choose to make his article freely available online against a one-time fee of CHF 2,750.00. This fee is independent of any standard charges for supplementary pages, color images etc. which may apply. More information can be found at www.karger.com/authors_choice. Does your funding agency/institute require you to deposit your article in an institutional archive (e.g. PubMedCentral)? You will be pleased to hear that Karger journals are fully geared up for this requirement. All you have to do is opt for open access publication of your article through Karger's Author's ChoiceTM. Karger will also take care of the immediate deposit in the PubMedCentral archive and what's more, not of the manuscript, but of the final, published article. The article will also be available with open access right away, and not just after 12 months. The cost of Author's ChoiceTM is a permissible cost in your grant, so please take care to budget for it.

Page Charges, Color Reproductions

The journal will defray the costs of the first eight printed pages (a total of about 8,000 words minus any tables or figures). Any additional pages will be defrayed on a cost-sharing basis by the authors at the

rate of CHF 290.00 per page. There are no charges for illustrations and color reproductions.

Electronic Proofs

Unless otherwise indicated, proofs are e-mailed to the corresponding author.

Reprints

Reprints are available against payment. Order forms listing prices are provided with the proofs. If no reprints are desired this should be indicated on the form. Orders submitted after the issue has gone to press are subject to considerably higher prices.

Requirements for Gene Mapping Reports

1. The gene must not have been previously mapped by any technique.

Authors should check the above listed databases to determine if this is true. This means that mapping confirmations will not be accepted. Relocations of genes incorrectly mapped within a major chromosome band, i.e., to a different subband, will not be accepted. However, genes that are relocated a significant distance from the one to which it had been assigned, or to another chromosome, will be accepted. The evidence for the new assignment must be obtained with two different methods.

2. Well-described flanking markers must be given for all mapping assignments.

The relative location of the flanking markers can be established by standard radiation hybrid or mouse backcross panels. For mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH), the markers must be within 5 cM or 5 Mb of the gene or genes that have been mapped.

3. The results from DNA sequence database searches must be given for the mapped gene(s).

The entire sequences should not be given, just the size, degree of the matches and their significance. If several sequences are involved, this should be presented in a concise table listing the standardized gene names as established by the HUGO Gene Nomenclature Committee (see above) and accession numbers of the matching sequences. The human chromosome reference sequences nucleotide position of mapped genes should also be given as they become available.

The following categories must be collected into a single publication if submitted from one group of investigators:

(a) All cDNAs representing a single multigene family (b) Genes located within a single chromosome band (c) A series of orthologous genes when the results of comparative mapping studies in the mouse (or some other species) and human genes are reported.

Authors of both accepted and not accepted papers are encouraged to submit their data to mapping databases.

The mirror sites of the Genome Database (www.gdb.org) are prepared to accept the data if presented in the short report format.