

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 14

Double strand break durante la meiosi.

Le rotture della doppia elica di DNA che avvengono in meiosi sono regolate da processi cellulari.

Durante la meiosi si ha scambio di materiale genetico tra i cromosomi omologhi, e prevede la formazione di una struttura intermedia chiamata tetrade. Questa struttura permette ai cromosomi omologhi di restare vicini, e si risolve mediante rottura e riparazione delle molecole di DNA dei due cromosomi omologhi.

La formazione della tetrade è di fondamentale importanza nella meiosi, perché permette anche una corretta segregazione dei cromosomi omologhi.

La ricombinazione omologa inizia sempre dalla rottura della doppia elica di DNA, e la rottura non è un processo casuale.

Le cellule si assicurano di creare una rottura della doppia elica, esprimendo il gene *spo11*, che codifica per la proteina Spo11 che catalizza la rottura della doppia di DNA durante la meiosi. Questa proteina ha un controllo trascrizionale per cui è trascritta e tradotta solo durante la meiosi.

La proteina Spo11 taglia il DNA ed innesca la ricombinazione omologa. La ricombinazione omologa è un meccanismo per riparare la doppia elica di DNA, che in questo caso genera anche le strutture a X, o giunzioni di Holliday, che tengono appaiate i due cromosomi che si scambiano materiale genetico nella profase I della meiosi.

Profase I della meiosi

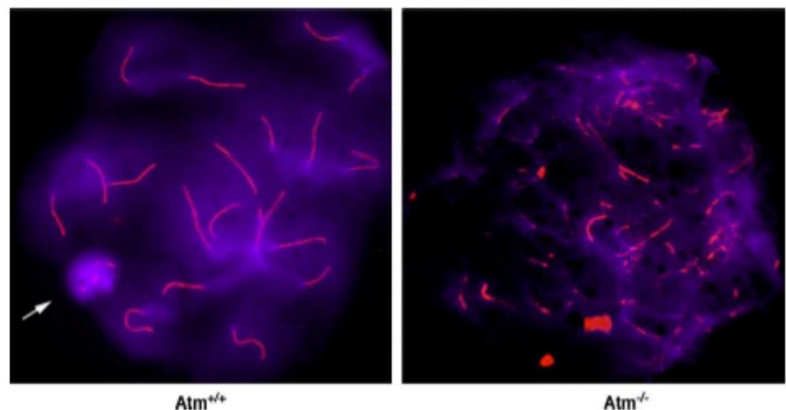
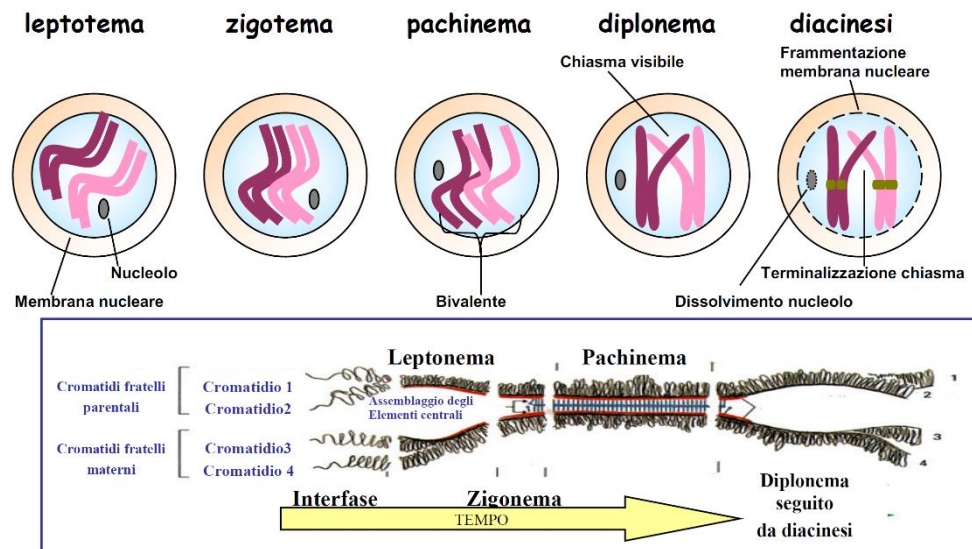
La profase I è suddivisa in varie fasi:

- Leptotene: i cromosomi si condensano e gli omologhi si appaiano
- Zigotene: si forma la sinapsi grazie alla formazione del complesso sinaptonemico
- Pachitene: la sinapsi è completa, con l'appaiamento dei cromosomi omologhi
- Diplotene: si formano i chiasmi
- Diacinesi: i chiasmi si spostano verso le estremità dei cromatidi, scompare il nucleolo e si dissolve la membrana nucleare.

Il complesso sinaptonemico non ha nessuna funzione nel mantenere l'associazione dei cromosomi omologhi. Anche se il complesso è rimosso si ha comunque la corretta segregazione dei cromosomi.

Il complesso sinaptonemico è composto da varie proteine. Questo complesso può essere visualizzato mediante anticorpi fluorescenti diretti contro alcune delle proteine di cui è composto, come SCP3.

La profase I meiotica



DSB in meiosi

Sappiamo che Spo11 catalizza la formazione di rotture sulla doppia elica di DNA in modo specifico nella meiosi. Vengono generate molte rotture per cromosoma, nel lievito se ne sono stimate circa 200 per cromosoma.

Spo11 funziona come una topoisomerasi di tipo II, infatti servono due proteine Spo11 che catalizzano il taglio ognuna su uno dei due filamenti. Catalizzato il taglio del filamento, Spo11 rimane covalentemente attaccata all'estremità 5' del sito tagliato.

La ricombinazione omologa è attivata dal processo di resection che si innesca all'estremità 5' del sito di rottura della doppia elica. Spo11 deve essere rimosso dall'estremità 5' a cui è legato dopo il taglio, ed a questo scopo interviene il complesso MRX, che catalizza un taglio endonucleolitico sul filamento a cui Spo11 è legato. Il complesso MRX effettua quindi la sua attività esonucleasica in direzione 3'5' partendo dal nick e fino ad arrivare all'estremità a cui è legato Spo11, che viene rimosso. Il nick serve anche da punto di accesso alla esonucleasi Exo1/Dna2, che rimuovono nucleotidi lasciando una estremità 3' protruding.

Quando nell'organismo modello si rimuove il gene Spo11, i gameti sono in maggioranza non vitali perché la segregazione dei cromosomi in meiosi è stata casuale.

Cellule in mitosi

Il meccanismo principale della riparazione delle rotture della doppia elica in mitosi è il SDSA. I prodotti generati sono di non-crossover in oltre il 90% dei casi.

Il processo di ricombinazione omologa in mitosi che avviene in mitosi viene riparato al 50% formando prodotti di crossover, ed al 50% formando prodotti di non-crossover.

Cellule in meiosi

Le cellule meiotiche, in cui Spo11 taglia la doppia elica, riparano le rotture preferenzialmente con il meccanismo della ricombinazione omologa. Sono stati identificati mutanti di lievito che fanno una meiosi con una alta percentuale di gameti non funzionanti, evidenziando che questo si verificava quando la cellula perdeva la preferenza verso la riparazione del danno mediante ricombinazione omologa. Ci sono evidentemente proteine importanti nel determinare la preferenza verso uno dei meccanismi di riparazione. La scelta del meccanismo dipende dalla stabilità dell'intermedio che si forma quando uno dei filamenti con la rottura fa strand invasion sul cromosoma omologo.

Ci sono proteine che inibiscono la formazione del chiasma tra i due cromatidi fratelli, favorendo quindi l'interazione tra cromosomi omologhi e garantendo una corretta segregazione dei cromosomi nelle cellule figlie.

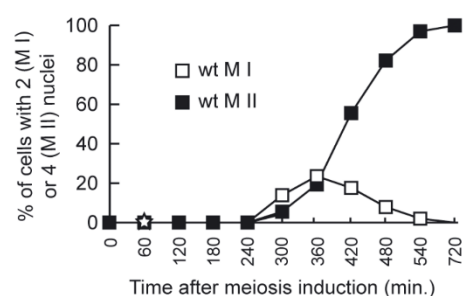
DSB meiotico e la sua riparazione

È possibile eseguire esperimenti sulle colture di lievito inducendone l'ingresso in meiosi, mediante incubazione in terreni di sporificazione, in cui non c'è glucosio. L'ingresso delle cellule in meiosi viene studiato mediante analisi citofluorimetrica, FACS, con cui si misura la quantità di DNA.

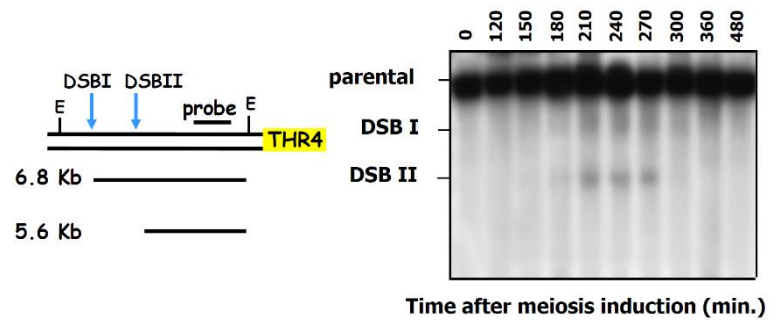
Un ceppo diploide è indotto alla meiosi, con duplicazione del DNA e formazione di quattro spore aploidi. La replicazione del DNA comincia dopo 90-120 minuti dall'ingresso delle celle in meiosi. Mediante microscopio a fluorescenza è possibile monitorare la prima e la seconda divisione meiotica, trattando le cellule con ioduro di propidio, che si lega al DNA ed emette fluorescenza rilevabile al FACS.

La fluorescenza permette così di evidenziare come cambia il numero di nuclei nelle cellule con l'avanzare della meiosi, dove si ha prima la duplicazione del nucleo, e poi la suddivisione del DNA nelle 4 spore.

A circa 240 minuti iniziano a comparire cellule con due nuclei, che poi diminuiscono con l'apparire di cellule con 4 nuclei.



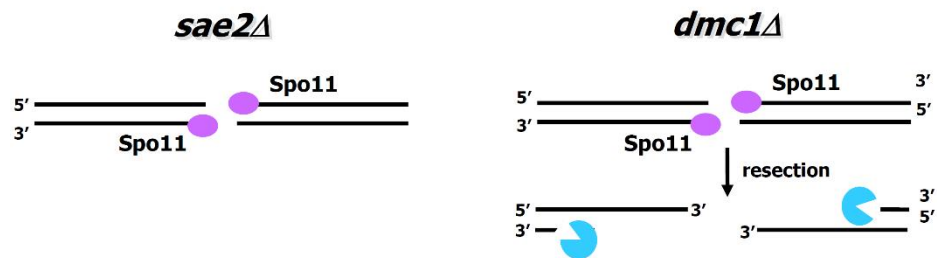
Con gli stessi campioni è possibile estrarre il DNA, tagliarlo con un enzima di restrizione, caricarlo su gel e fare un esperimento di Southern blot. Il campione dopo l'elettroforesi viene ibridato con una sonda, che nel caso in questione si lega vicino al gene THR4 di lievito, perché è un hotspot di ricombinazione. Si riescono così a distinguere frammenti derivanti dalla meiosi I e frammenti derivanti dalla meiosi II.



Le proteine Sae2 e Dmc1 sono proteine importanti nel processo di riparazione del DSB meiotico.

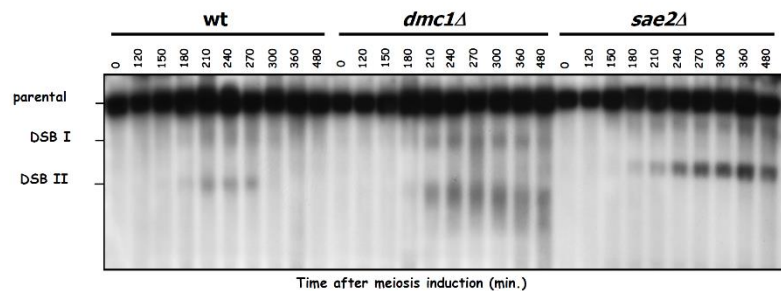
Sae2 serve ad attivare l'attività nucleasica del complesso MRX. **Dmc1** serve ad innescare il processo di ricombinazione meiotica, ed è un gene meiosi specifico.

Yeast cells lacking Sae2 or Dmc1 are unable to repair meiotic DSBs



In ceppi *sae2Δ* vediamo che si forma la rottura della doppia elica, ma la rottura non viene riparata (il segnale è visibile fino alla fine della procedura) per via della mancata attivazione del

complesso MRX. Questo impedisce la formazione del nick che innesca la resection. La maggior parte dei gameti con questa mutazione non sopravvive.



Ceppi *dmc1Δ* hanno un fenotipo in cui si genera la rottura della doppia elica, con generazione di ssDNA con estremità 3' protruding. Le cellule con questa mutazione non sono in grado di permettere la strand invasion da parte del filamento 3' protruding. Anche nell'elettroforesi del genoma ricavato da queste cellule si evidenzia la mancata riparazione del DSB, anche se diversa rispetto a quella di *sae2Δ*.