



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea
Scienze Biologiche**

La segregazione cromosomica meiotica nei gameti maschili e femminili: il ruolo del checkpoint dell'assemblaggio del fuso.

Meiotic chromosome segregation in male and female gametes: the role of the spindle assembly checkpoint.

Tesi di Laurea
di:

Martina Malvolti

Docente Referente:
Chiar.mo Prof

Maria Assunta Biscotti

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2020/2021

Introduzione

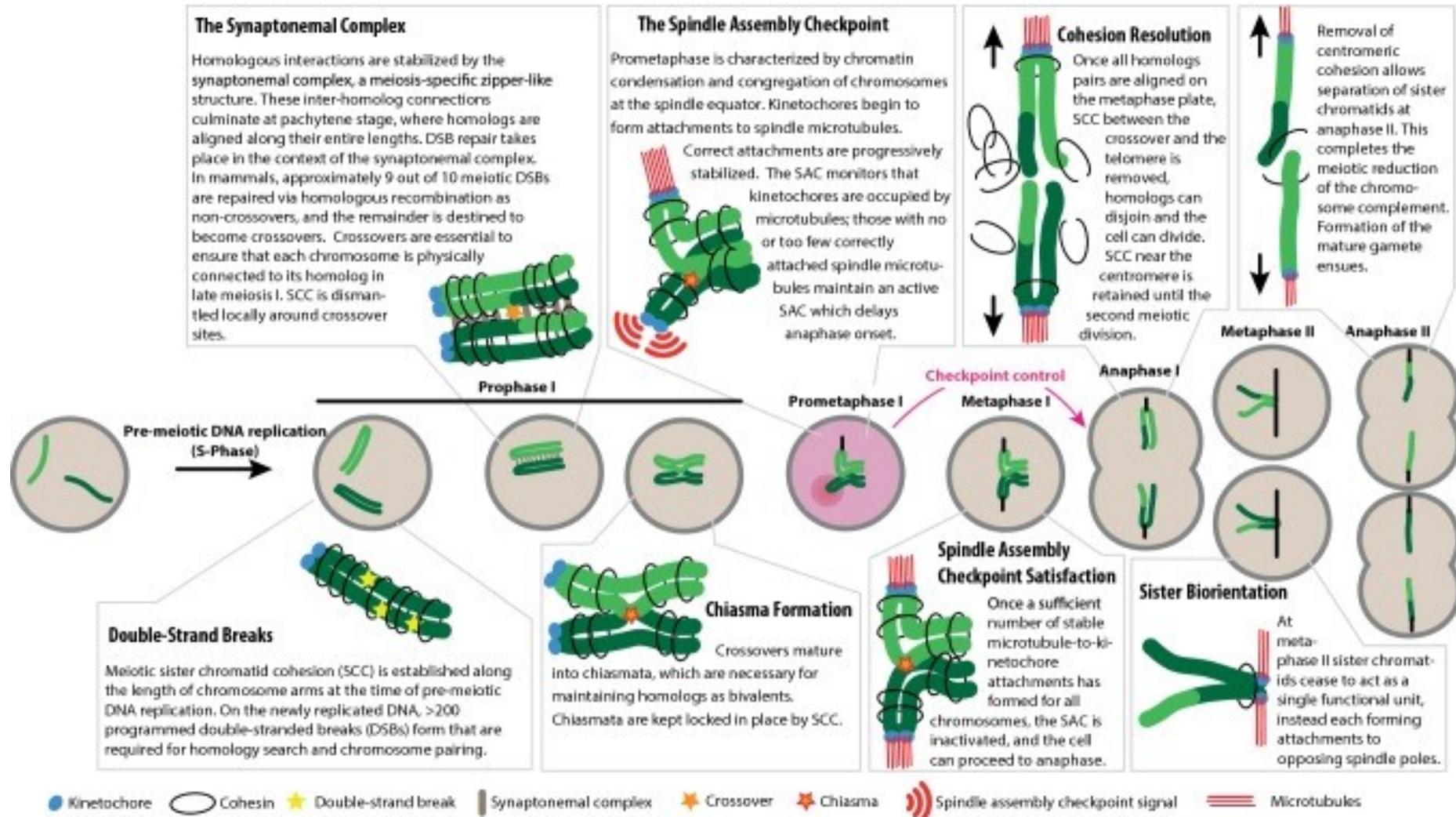


Il checkpoint dell'assemblaggio del fuso (SAC) è il custode della fedele segregazione dei cromosomi. La funzione compromessa del SAC nella meiosi può portare alla formazione di gameti aneuploidi che, nella stragrande maggioranza dei casi, sono incompatibili con il successivo sviluppo dell'embrione, presumibilmente perché il complemento errato dei cromosomi porta a massicci squilibri genici.

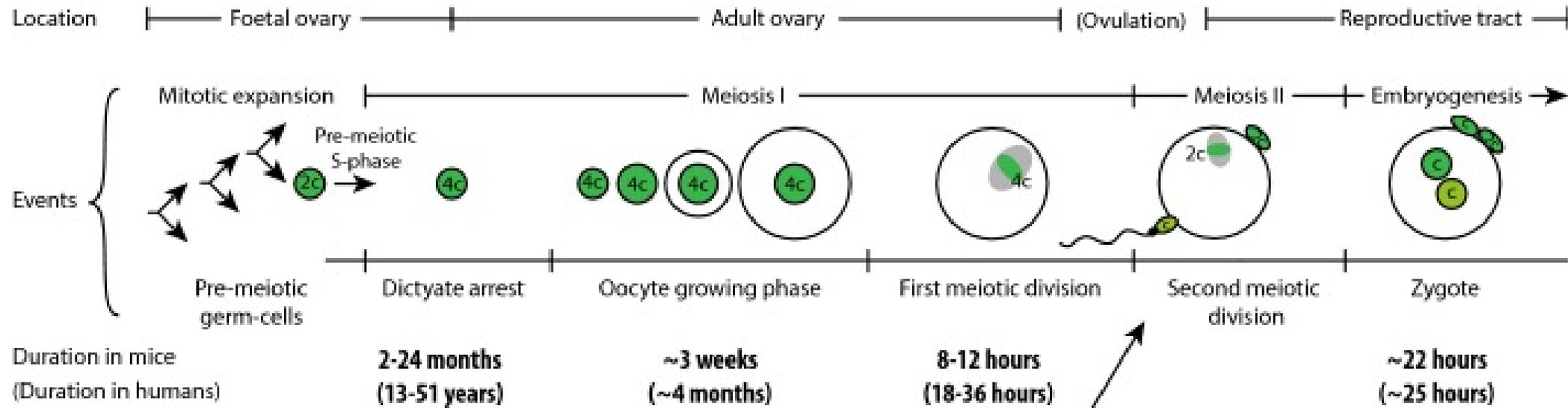
L'aneuploidia deriva da un processo in due fasi che consiste nella comparsa di un cromosoma con la propensione alla separazione errata, seguito dall'incapacità del SAC meiotico di reagire a tale situazione.



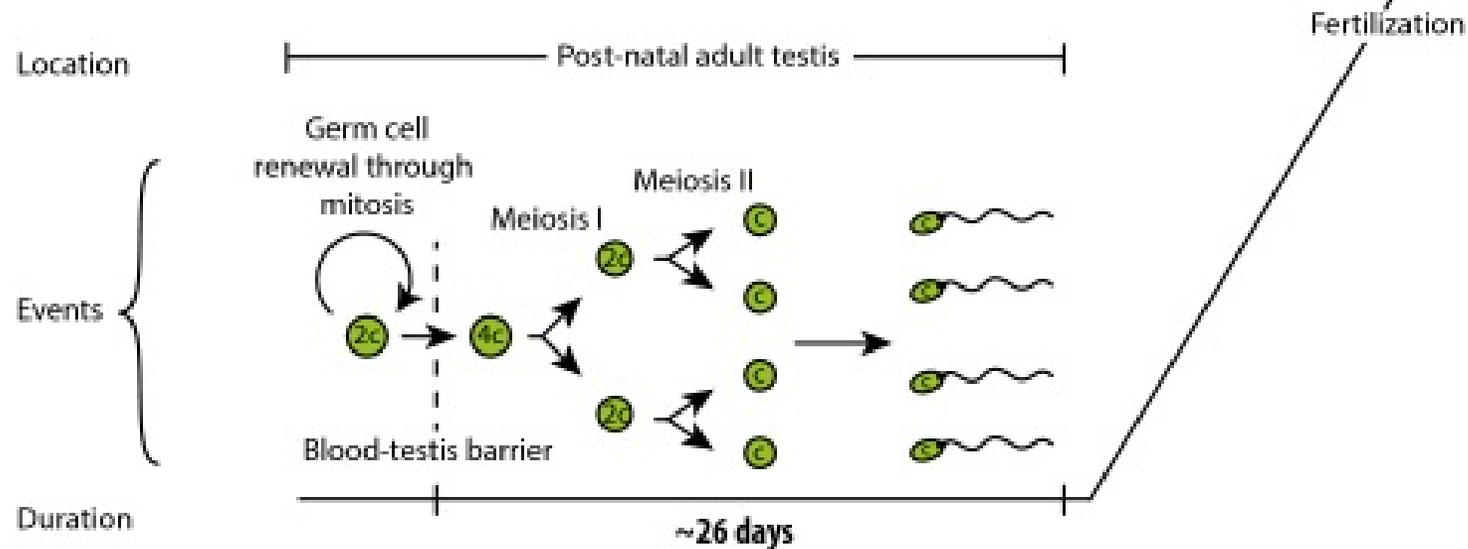
Eventi chiave della meiosi I



Female

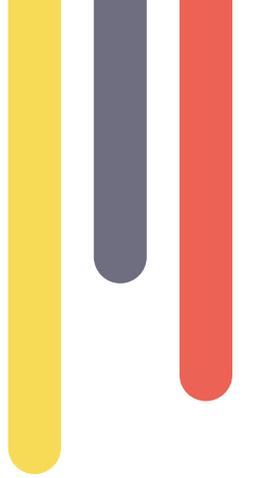
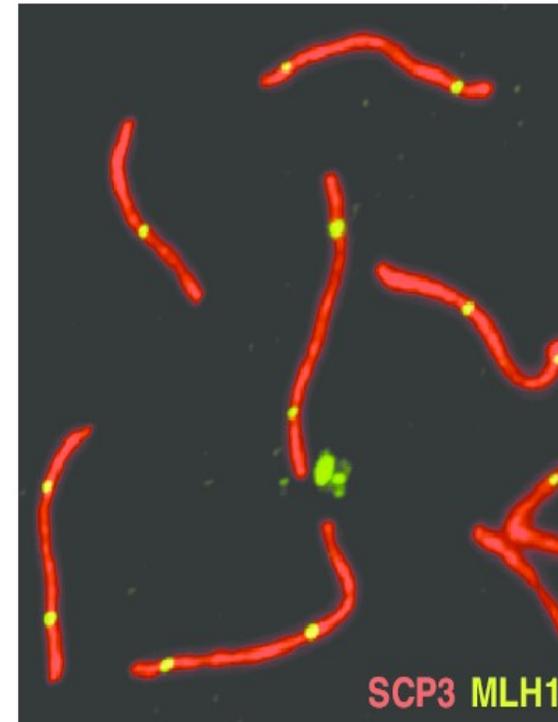


Male

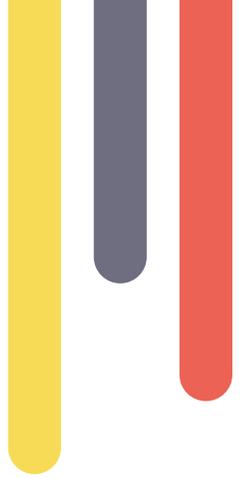
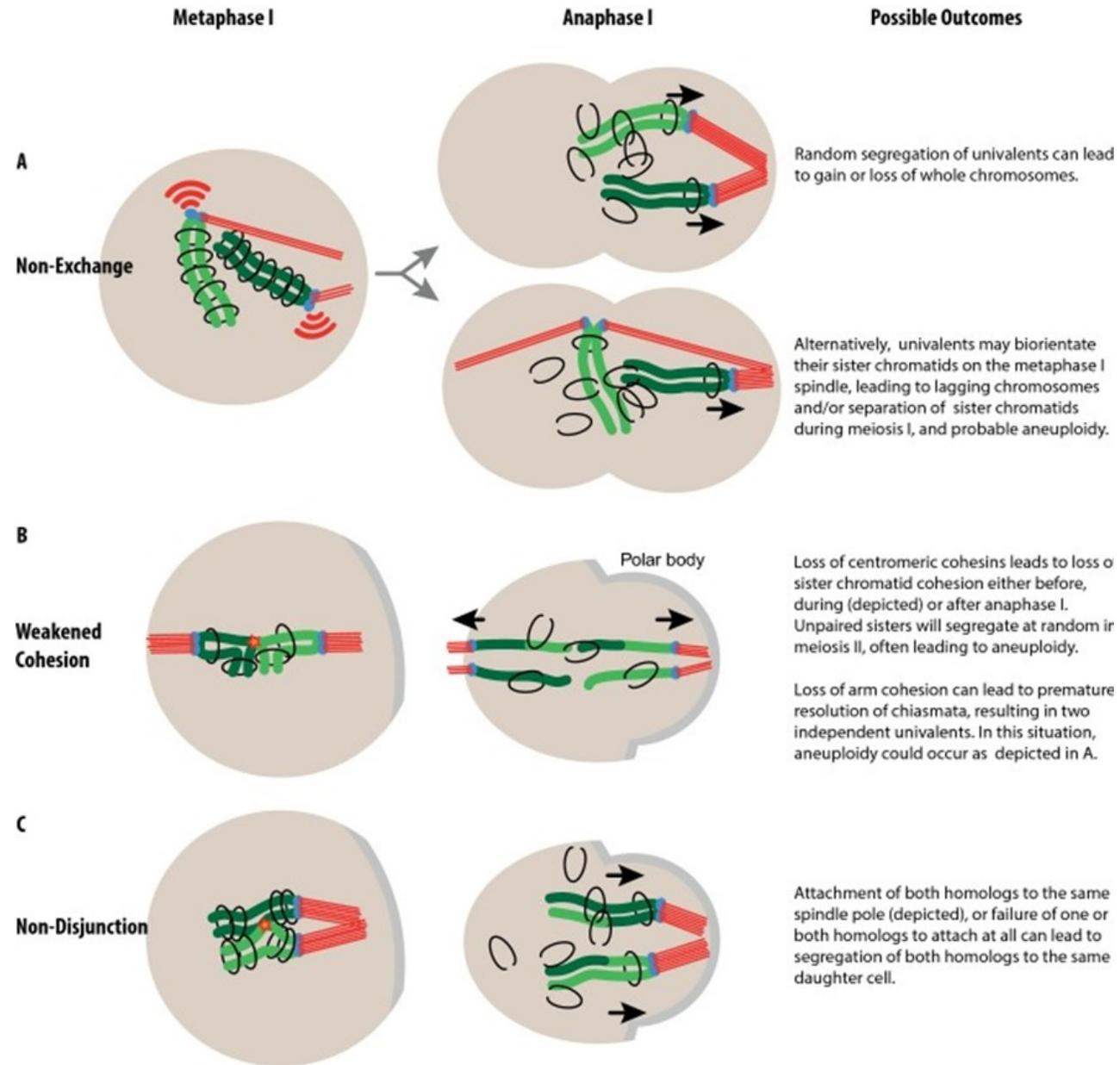


Esempi di crossover
contrassegnati dalla
colorazione di MLH1
(verde) sui cromosomi
di topo.

Mouse crossover sites marked by MLH1

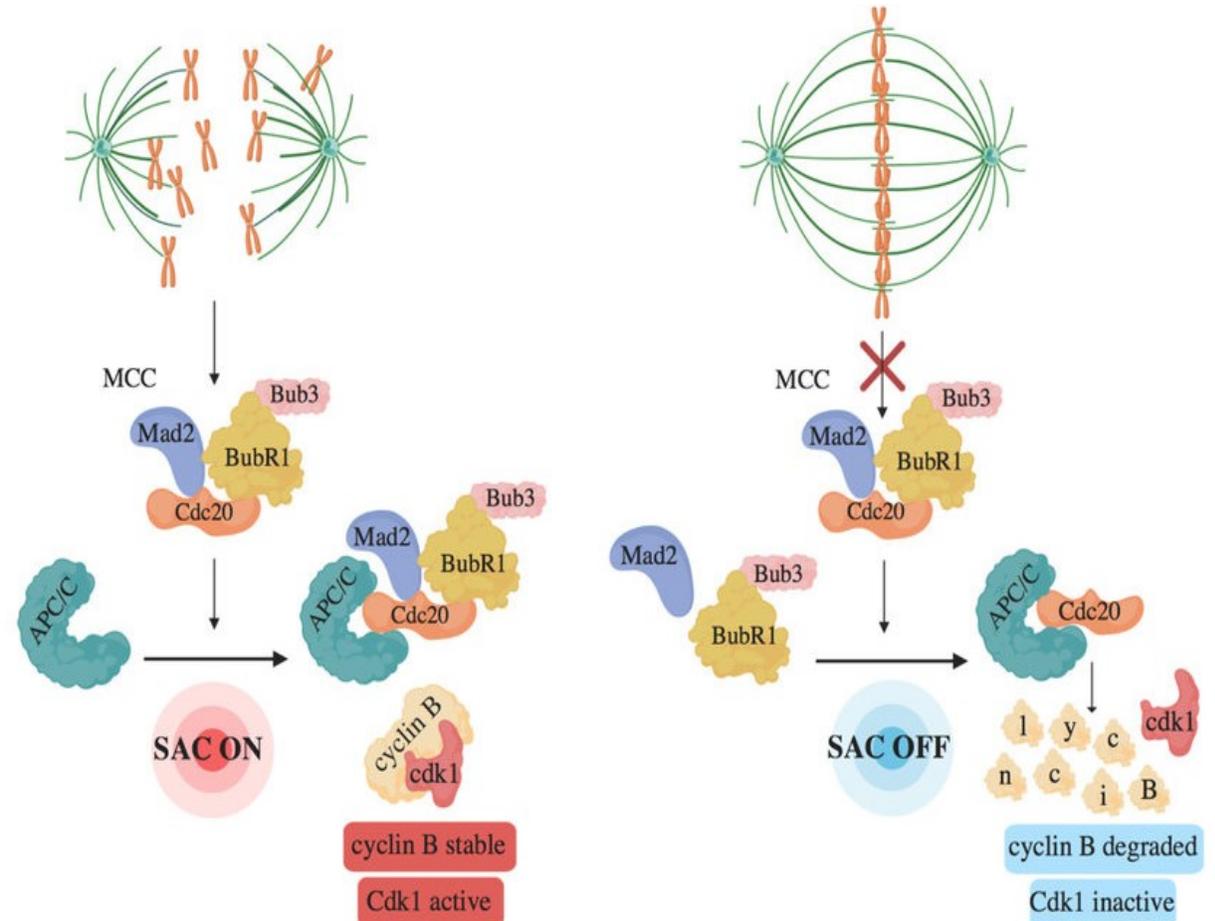


I difetti della meiosi I possono provocare aneuploidie



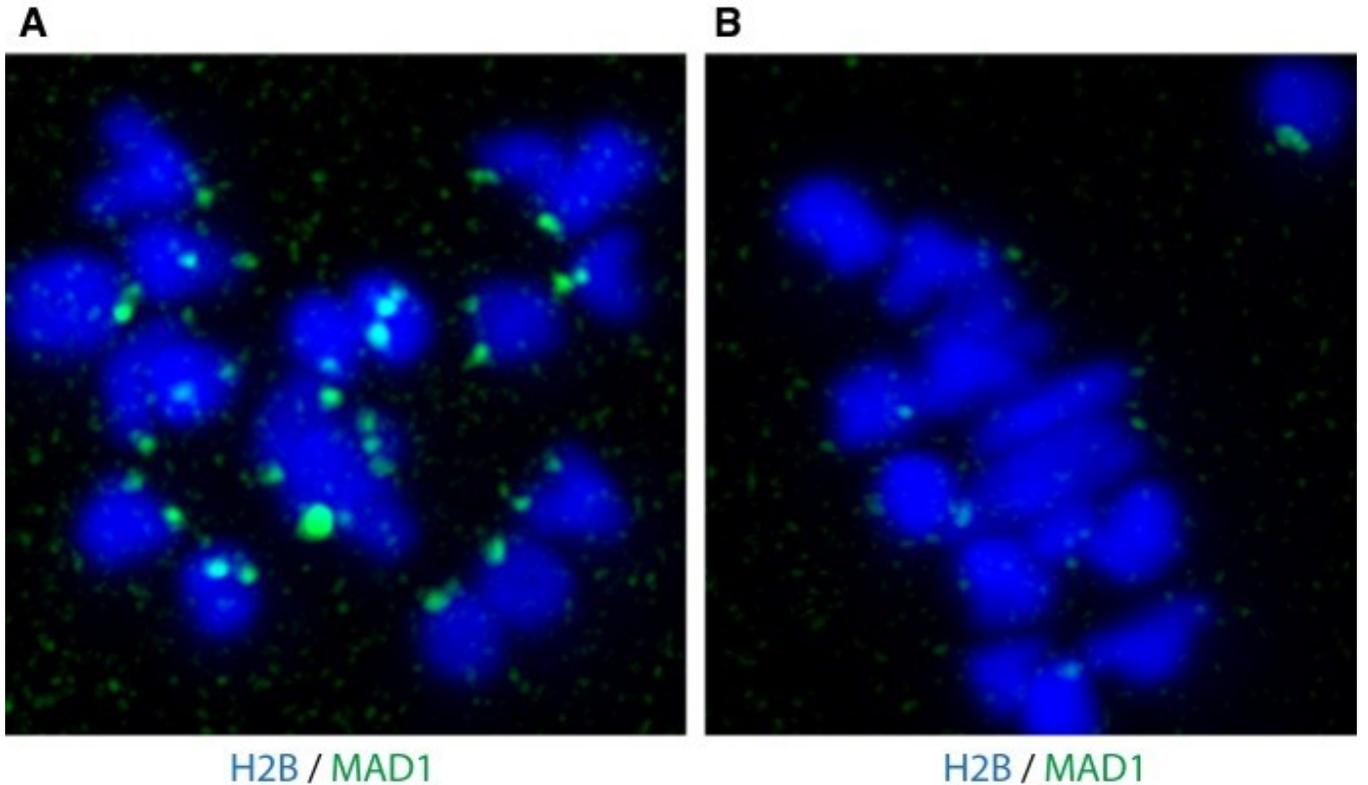
Il punto di controllo dell'assemblaggio del fuso (SAC)

- I cromosomi non attaccati o attaccati in modo errato promuovono la formazione del Mitotic Checkpoint Complex (MCC). Fino all'assemblaggio del fuso, l'MCC, composto da Mad2, BubR1-Bub3 e Cdc20, forma, lega e blocca l'azione APC/C (SAC ON). Dopo il montaggio del fuso, MCC viene smontato e Cdc20 senza MCC attiva APC/C (SAC OFF).
- Un aspetto importante del SAC è che, per ottenere la fedeltà nella segregazione cromosomica, il segnale proveniente da un solo cinetocore deve essere sufficientemente forte da inibire l'APC in tutta la cellula.



Il SAC nella meiosi I

Le proteine SAC si localizzano nei cinetocori meiotici. MAD1 si localizza nei cinetocori di un ovocita di topo che esprime MAD1-2GFP (verde) e H2B-mCherry (blu) nella prometafase (a) e nella metafase (b) della meiosi I. Si noti il cromosoma non allineato in b che recluta modesti livelli di MAD1.



Livelli più bassi di alcune, ma non tutte, le proteine SAC provocano aneuploidia meiotica

Gene	Setting	Gender	Consequence	References
<i>Mad2</i>	In vivo (<i>Mad2</i> ^{+/-})	F	Accelerated meiotic progression and meiosis I chromosome mis-segregation in > 20% of oocytes	[124]
	In vivo (<i>Mad2</i> ^{+/-})	M	Low-level sperm aneuploidy in the presence of non-exchange sex chromosomes	[49]
	Microinjection of dominant-negative Mad2 into oocytes	F	Premature anaphase onset	[32]
	Depletion in oocytes using morpholino	F	Increased aneuploidy, premature degradation of cyclin B and securin, accelerated meiosis I progression	[50]
<i>Bubr1</i>	In vivo (<i>Bubr1</i> ^{+/-})	F	Unstable microtubule-to-kinetochore attachments, relaxed SAC	[37, 125]
	In vivo (<i>Bubr1</i> ^{+/-})	M	No effect reported	[125]
	In vivo (hypomorph <i>Bubr1</i> ^{H/H})	M	Elevated aneuploidy in secondary spermatocytes	[125]
<i>Bub1</i>	Oocyte-specific conditional KO	F	Accelerated chiasma resolution, PSSC, bivalent malorientation, chromosome mis-segregation	[126]
	In vivo (<i>Bub1</i> ^{+/-})	F	Meiosis I aneuploidy and PSSC in oocytes; males: no effect	[127]
<i>Bub3</i>	In vivo (<i>Bub1</i> ^{+/-})	M	No effect reported	[127]
	RNAi in oocytes	F	Chromosome misalignment, aneuploidy	[39]
<i>Mps1</i>	Oocyte-specific conditional KO	F	MAD2 fails to localize to kinetochores, premature APC activation, 70% of meiosis II oocytes aneuploid	[36]
<i>AurkB/C</i>	Oocyte-specific conditional ATP-binding pocket mutant of AURKC	F	Most oocytes arrest at metaphase I, escapees are aneuploid	[41]
	In vivo (<i>Aurkc</i> ^{-/-})	F	Increased metaphase I arrest, increased chromosome misalignment, aneuploidy not increased	[44]
	In vivo (<i>Aurkc</i> ^{-/-})	M	No effect on meiosis I, subfertility due to post-meiotic spermatogenic defects	[128]
	Spermatocyte-specific conditional KO of <i>Aurkb</i>	M	Metaphase I arrest and apoptosis	[128]
	Microinjection of kinase-dead <i>Aurkc</i> into oocytes	F	Misaligned chromosomes, premature chromosome segregation, abnormal k-fibre attachments, BUB1 and BUBR1 fail to localize to kinetochores	[129]
	Aurora kinase inhibitor	F	Frequent chromosome misalignment, accelerated meiotic progression, premature anaphase onset	[130]

Le differenze nella funzione del SAC nella meiosi I maschile rispetto a quella femminile possono essere rivelate utilizzando modelli murini con frequenze aumentate di cromosomi anormali che dovrebbero attivare il SAC.

Sensibilità del SAC negli ovociti rispetto agli spermatoцити

Mlh1^{-/-}

Fusioni
Robertsoniane

Trattamento con
nocodazolo

Topo XO

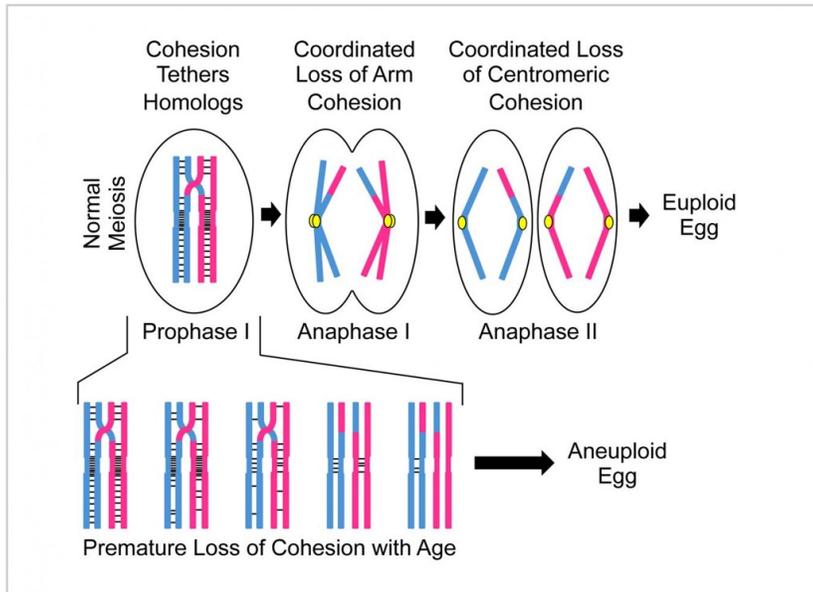


Il SAC nelle femmine può rilevare cromosomi che si comportano in modo anomalo solo quando sono presenti in numero elevato.

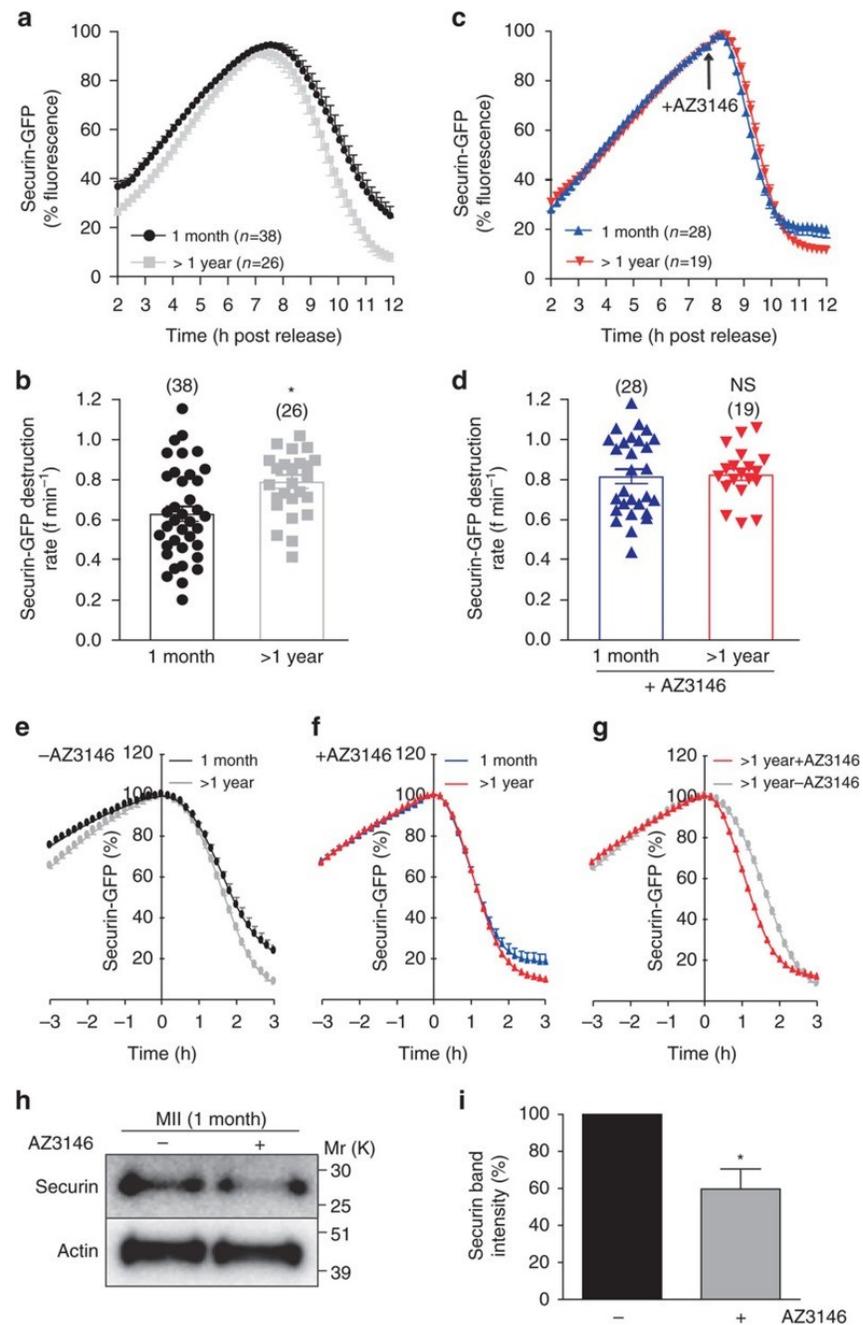


Nei maschi, la sensibilità del SAC può essere fissata a livello di un singolo cromosoma, come nel caso della mitosi.





È interessante notare che la perdita di coesione legata all'età può anche essere promossa indirettamente da una maggiore attività di separasi durante l'intercinesi tra meiosi I e II, a sua volta derivante da una maggiore perdita di securina durante la meiosi I, negli oociti di topi più anziani.



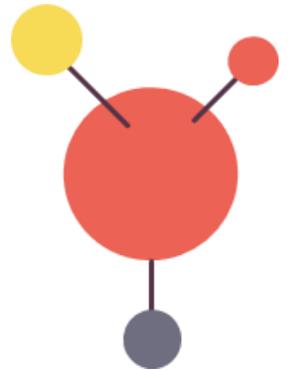
Fattori ambientali

1. Radiazioni a radiofrequenza non ionizzanti

- Studi in vivo e in vitro con cellule spermatiche umane;
- Gautam et al. hanno studiato gli effetti del 3G (1.8– 2.5 GHz) dei telefoni cellulari sul sistema riproduttivo dei ratti Wistar maschi;

2. Alcol e caffeina

3. Bisfenolo A (BPA)

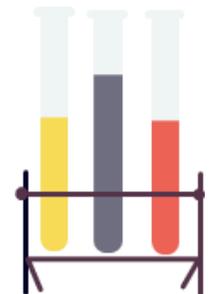


Osservazioni conclusive

Per oltre due decenni, la genetica dei topi ha fornito informazioni fondamentali sui meccanismi molecolari della funzione del SAC e della segregazione cromosomica nella meiosi maschile e femminile.

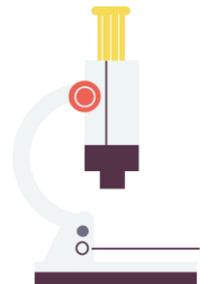
I recenti progressi nella microscopia ad alta risoluzione (topi) e nella tecnologia di sequenziamento ad alto rendimento (uomo) hanno svelato come i cromosomi univalenti nelle femmine possano sfuggire alla sorveglianza meiotica del SAC e come la coesione diminuisca irreversibilmente con l'età.

La combinazione di questi approcci continuerà a chiarire le affascinanti somiglianze e differenze nella segregazione dei cromosomi meiotici tra maschi e femmine.



Riferimenti

- https://www.researchgate.net/figure/Unattached-or-incorrectly-attached-chromosomes-promote-formation-of-the-Mitotic_fig1_338871411
- https://www.researchgate.net/figure/Examples-of-crossover-interference-AExamples-of-crossovers-marked-by-staining-of-MLH1_fig2_49799525
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6701402/#!po=1.47059>
- <https://www.eurekalert.org/multimedia/684633>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454377/figure/f3/?report=objectonly>



Riassunto

L'**aneuploidia** deriva da un processo in due fasi che consiste nella comparsa di un cromosoma con la propensione a segregare male e nell'incapacità del SAC meiotico di reagire a tale situazione.

Gli ovociti presentano maggiori difficoltà rispetto agli spermatozoi quando si tratta di precisione nella segregazione cromosomica. La differenza più evidente tra meiosi I maschile e femminile consiste nella tempistica di sviluppo.

I **passaggi chiave della meiosi** maschile e femminile sono sostanzialmente identici: i cromosomi omologhi si trovano, si accoppiano, si ricombinano, e segregano in cellule figlie diverse. È necessario almeno un crossover per coppia di omologhi per garantire successivamente un'accurata segregazione dei cromosomi.

Successivamente, i crossover maturano in chiasmi che collegano gli omologhi fino all'anafase I. Nella pro-metafase i bivalenti iniziano a riunirsi e ad allinearsi sull'equatore cellulare. In questo momento formano attaccamenti ai microtubuli del fuso (fibre k) tramite i loro cinetocori.

Il **SAC** monitora gli attacchi da microtubuli a cinetocore e controlla la progressione dalla metafase all'anafase.

I **principali fattori che contribuiscono** alla generazione di cromosomi che sono soggetti a **mis-segregazione** in anafase sono l'incapacità di formare un crossover sul PAR per i topi maschi e la perdita di coesione per i topi femmine.

Il **nucleo del SAC** è l'MCC (Mitotic Checkpoint Complex), il quale agisce per inibire l'APC, costituito dalle proteine: MAD2, BUBR1, BUB3 e CDC20 (attivatore APC). Vi sono altre proteine SAC come MAD1, BUB1 e MPS1.

Per **valutare la sensibilità del SAC**, vengono utilizzati modelli murini con frequenze aumentate di cromosomi anormali che dovrebbero attivare il SAC: topo **Mlh1** (univalente nella meiosi I), topi portatori di cromosomi con fusioni Robertsoniane, topo **XO**.

I **legami coesivi** che tengono insieme cromatidi e cromosomi sono suscettibili di una graduale **perdita nel corso della vita riproduttiva femminile**, sia nei topi che nell'uomo. La perdita di coesione durante l'età può essere promossa anche da una maggiore attività della **separasi** durante l'intercinesi tra meiosi I e II, a sua volta derivante da una maggiore perdita di **securina** durante la meiosi I negli ovociti di topi più anziani.

I **fattori ambientali** possono predisporre all'aneuploidia meiotica: l'assunzione di alcol e caffeina aumenta l'aneuploidia dello sperma; il bisfenolo A (BPA) è un componente delle plastiche e delle resine epossidiche che può indurre ad aneuploidia ovocitaria o ad un ridotto crossing-over negli spermatociti (tramite esposizione delle cellule staminali spermatogoniali BPA). Le radiazioni a radiofrequenza non ionizzanti emessi dai telefoni cellulari aumentano le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e il danno al DNA negli spermatozoi. Non esistono però dati sull'effetto della segregazione cromosomica.