

Ignasi  
Roig

Tesi  
Doctoral

Aparellament i sinapsi en oòcits humans

2005

TESI DOCTORAL

Aparellament i sinapsi  
en oòcits humans

IGNASI ROIG NAVARRO

---

# Aparellament i sinapsi en oècits humans

---

Memòria presentada per Ignasi Roig Navarro per optar al grau de doctor en Biologia Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona

Ignasi Roig Navarro  
Abril de 2005

La doctora Montserrat Garcia Caldés i el doctor Josep Egozcue Cuixart, catedràtics de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**CERTIFIQUEN:**

Que Ignasi Roig Navarro ha realitzat sota la seva direcció el treball de tesi doctoral titulat:

### **Aparellament i sinapsi en oòcits humans**

a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I, perquè així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), abril de 2005

Dra. Montserrat Garcia Caldés

Dr. Josep Egozcue Cuixart

Al Tatí i la Jane,

A la Mireia,

Per la incertesa  
de molts camins faig via;  
tu m'acompanyes.  
Miquel Martí i Pol

*"Phfft! Facts. You can use them to prove anything."*

Homer Simpson

*“Science, I believe, is the search for new mysteries  
rather than the cataloguing of old facts.”*

Matt Ridley

Aquest treball s'ha pogut fer gràcies al finançament dels projectes d'investigació següents:

- FIS 96/1992-02
- Fundación Salud 2000-Ayudas Serono
- FIS 02/ 0297
- SGR-00201

Aquesta estudi també s'ha beneficiat d'una beca del programa de *Formación de Profesorado Universitario* (AP2000-0992) del *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte*, a més a més de tres ajuts, proceden d'aquest mateix programa, per a fer estades a l'estranger.



# Índex

Índex	i
Abreviatures	vii
Proteïnes estudiades	ix
CAPÍTOL 1: Introducció	1
1.1. ANEUPLOIDIES CROMOSÒMIQUES EN HUMANS	3
1.1.1. Incidència i efectes de les aneuploïdies cromosòmiques	3
1.1.2. Origen de les aneuploidies	6
1.1.3. Errors que condueixen a l'aparició de les aneuploidies cromosòmiques	7
1.2. GAMETOGÈNESI	11
1.2.1. Espermatogènesi	11
1.2.2. Oogènesi	12
1.2.2.1. Etapa prenatal	13
1.2.2.2. Etapa postnatal	15
1.3. MEIOSI	18
1.3.1. Esdeveniments previs a l'inici de la meiosi	19
1.3.2. Primera divisió meiótica	23
1.3.2.1. Profase	23
1.3.2.1.1. Preleptotè	23
1.3.2.1.2. Leptotè	24
1.3.2.1.3. Zigotè	31
1.3.2.1.4. Paquitè	34
1.3.2.1.5. Diplotè-diacinesi	36
1.3.2.2. Metafase	36
1.3.2.3. Anafase i telofase	37

1.3.3. Segona divisió meiòtica	38
CAPÍTOL 2: Objectius	39
CAPÍTOL 3: Materials i mètodes	43
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC	45
3.2. MÈTODES	47
3.2.1. Obtenció dels ovaris	47
3.2.1.1. Reactius i equip	47
3.2.1.2. Protocol	47
3.2.2. Processat dels ovaris	47
3.2.2.1. Reactius i equip	48
3.2.2.2. Protocol	48
3.2.3. Cultiu d'estroma ovàric	50
3.2.3.1. Reactius i equip	51
3.2.3.2. Protocol	51
3.2.4. Tinció de les preparacions de cèl·lules en estadi de metafase	54
3.2.4.1. Reactius i equip	54
3.2.4.2. Protocol	55
3.2.5. Extensió d'òocits en fresc per a l'anàlisi citogenètic	55
3.2.5.1. Reactius i equip	55
3.2.5.2. Protocol	56
3.2.6. Amplificació i marcatge de sondes DNA	56
3.2.6.1. Reactius i equip	57
3.2.6.2. Protocol d'amplificació, marcatge i precipitació de la sonda 18q subtelomèrica	57
3.2.6.3. Protocol d'obtenció, amplificació i marcatge de la sonda Pan-centromèrica	58
3.2.7. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent sobre preparacions d'òocits fixats amb carnoy	59
3.2.7.1. Reactius i equip	60
3.2.7.2. Protocol per a sondes WCP Vysis	61
3.2.7.3. Protocol per a sondes WCP no comercials amb marcatge indirecte	62
3.2.7.4. Protocol per a sondes comercials Cambio juntament amb sondes LSI amb marcatge directe	63
3.2.7.5. Protocol per a sondes comercials Cambio juntament amb sondes LSI amb marcatge indirecte	63
3.2.8. Obtenció de preparacions d'òocits amb morfologia nuclear preservada	64
3.2.8.1. Reactius i equip	65
3.2.8.2. Protocol	65
3.2.9. Extensió d'òocits.	66

3.2.9.1. Reactius i equip	66
3.2.9.2. Protocol d'extensió d'òocits a partir de mostres congelades	67
3.2.9.3. Protocol d'extensió d'òocits a partir d'ovaris frescos	67
3.2.10. Immunofluorescència.	68
3.2.10.1. Reactius i equip	68
3.2.10.2. Protocol per a preparacions fresques d'òocits amb morfologia cel·lular preservada	69
3.2.10.3. Protocol per a preparacions congelades en PBS amb el 80% de glicerol d'òocits amb morfologia cel·lular preservada	70
3.2.10.4. Protocol per a extensions fresques d'òocits	70
3.2.10.5. Protocol per a extensions congelades a -20°C d'òocits	70
3.2.11. FISH sobre portes tractats amb IF	70
3.2.11.1. Reactius i equip	71
3.2.11.2. Protocol	71
3.2.12. Inclusió d'ovaris en blocs de parafina	72
3.2.12.1. Reactius i equip	72
3.2.12.2. Protocol	73
3.2.13. FISH sobre talls de parafina	73
3.2.13.1. Reactiu i equip	74
3.2.13.2. Protocol	74
3.2.14. Tècnica de cultiu d'ovaris fetals	75
3.2.14.1. Reactius i equip	75
3.2.14.2. Protocol per a trossos d'ovari congelats.	76
3.2.14.3. Protocol per a ovaris en fresc.	77
CAPÍTOL 4: Resultats	79
4.1.TREBALL 1	83
The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis.	
<b>I. Roig</b> , I. Vanrell, A. Ortega, Ll. Cabero, J. Egozcue i M.Garcia.	
Cytotechnology (2003) 41:45-49.	
4.2.TREBALL 2	91
Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development.	
<b>I. Roig</b> , P. Robles, R. Garcia, M. Martín, J. Egozcue, Ll. Cabero, S. Barambio i M. Garcia.	
Hum. Reprod. (In press).	

4.3.TREBALL 3	121
Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes.	
<b>I. Roig</b> , B. Liebe, J. Egozcue, L. Cabero, M. Garcia i H. Scherthan.	
Chromosoma (2004) 113:22-33.	
4.4.TREBALL 4	135
Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage.	
<b>I. Roig</b> , P. Robles, R. Garcia, I. Martínez-Flores, Ll. Cabero, J. Egozcue, B. Liebe, H. Scherthan i M. Garcia.	
Reproduction (2005) 129:565-575.	
4.5.TREBALL 5	149
Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and chromosome-pairing process	
<b>I. Roig</b> , R. Garcia, P. Robles, R. Cortvrindt, J. Egozcue, J. Smitz i M. Garcia.	
Hum. Reprod. (Submitted).	
CAPÍTOL 5: Discussió	181
5.1. VALORACIÓ DE LES TÈCNIQUES EMPRADES	183
5.1.1. Protocol de cultiu d'estroma ovàric	183
5.1.2. Tècniques de biologia cel·lular	184
5.1.3. Tècnica de cultiu d'ovaris fetals	187
5.2. EVOLUCIÓ DE LA PROFASE MEIÒTICA DURANT EL DESENVOLUPAMENT FETAL HUMÀ	190
5.3. EVOLUCIÓ DE L'APARELLAMENT I DE LA SINAPSI DELS CROMOSOMES HOMÒLEGS EN OÒCITS HUMANS	192
5.3.1. Aparellament dels cromosomes homòlegs en la profase meiòtica d'oòcits humans euploides	192
5.3.1.1. Dinàmica cromosòmica	192
5.3.1.2. Dinàmica de centròmers i telòmers	194
5.3.1.3. Eficiència d'aparellament dels cromosomes homòlegs	195
5.3.2. Evolució de la sinapsi cromosòmica	197
5.3.3. Diferències observades en el desenvolupament de la profase meiòtica en espermatòcits i oòcits humans	198
5.3.3.1. Dinàmica centromèrica i telomèrica	198
5.3.3.2. Sinapsi cromosòmica i organització de les	

---

proteïnes del complex sinapteinemal	199
5.3.3.3. Processament dels DSBs	200
5.4. EFECTES DE LA PRESÈNCIA D'UN CROMOSOMA DE MÉS EN LA PROFASE MEIÒTICA D'OÒCITS HUMANS	202
5.4.1. Aparellament i sinapsi en oòcits aneuploides	202
5.4.2. Aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs implicats en la trisomia	203
5.4.3. Relació d'ATR amb els cromosomes que aparellen tard	204
5.5. RELACIÓ ENTRE LA SINAPSI CROMOSÒMICA I EL PROCÉS DE RECOMBINACIÓ EN HUMANS	206
CAPÍTOL 6: Conclusions	209
CAPÍTOL 7: Bibliografia	215

# Abreviatures

AE	Element axial
BSA	Sèrum boví amb albúmina
CE	Element central del SC
CGP	Cèl·lules germinals primordials
cm, mm, $\mu$ m	Centímetre, mil·límetre, micròmetre
Cy3, Cy5	Cianina 3, cianina 5
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medi Eagle modificat per Dulbeco
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
DMSO	Dimetilsulfòxid
DOP-PCR	Reacció en cadena de la DNA polimerasa que emprava encebadors degenerats
DSB	Trencaments de doble cadena del DNA
dUTP	Desoxiuracil trifosfat
FI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FITC	Fluoresceïna
G	Gravetat
g, mg, $\mu$ g, ng	Gram, mil·ligram, microgram, nanogram
IF	Immunofluorescència
ILE	Interrupció legal de l'embaràs
l, ml, $\mu$ l	Litre, mil·lilitre, microlitre
LE	Element lateral

LSI	Sonda de <i>locus</i> específic
M	Molar
MEM	Medi mínim essencial
MMR	Reparació <i>mismatch</i>
ND	No disjunció
PAR	Regió pseudoautosòmica
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la DNA polimerasa
SC	Complex sinapteinemal
SDS	Dodecil sulfat de sodi
SSC	Citrat sòdic salí
YAC	Cromosoma artificial de llevat
WCP	Sonda de pintat cromosòmic

# Proteïnes estudiades

ATR	Proteïna de la família de les proteïnes semblants a FI3K, implicada en processos de <i>checkpoint</i> de sinapsi i de recombinació a l'estadi de paquitè.
MLH1	Proteïna del sistema de MMR, present en els nòduls de recombinació, que marca punts d'entrecreuament.
RPA	Proteïna d'unió al DNA de cadena senzilla, implicada en els primers estadis de reparació dels DSBs.
REC8	Proteïna membre de les cohesines que intervenen en la meiosi.
SYCP1	Proteïna estructural de l'element central del SC.
SYCP3	Proteïna estructural dels AEs i dels LEs del SC.
TIN2	Proteïna present als telòmers dels cromosomes.
TRF2	Proteïna present als telòmers dels cromosomes.
$\gamma$ H2AX	Forma forforilada de la histona H2AX que apareix en les regions limítrofes dels DSBs.



## Capítol **1**

# Introducció



Oòcit a l'estadi de preleptotè hibridat amb sonda pan-centromèrica (vermell) i pan-telomèrica (verd)

## 1.1. ANEUPLOÏDIES CROMOSÒMIQUES EN HUMANS

### 1.1.1. Incidència i efectes de les aneuploïdies cromosòmiques

Les alteracions del nombre de cromosomes presents en una cèl·lula es coneixen amb el nom d'aneuploïdies cromosòmiques. La majoria de les aneuploïdies es caracteritzen per tenir un cromosoma de més (trisomies) o un cromosoma de menys (monosomies). Els cromosomes afectats poden ser tant els cromosomes sexuals, els gonosomes, com la resta de cromosomes, els autosomes.

Les aneuploïdies cromosòmiques són la causa més freqüent d'avortaments i de defectes en el creixement i desenvolupament mental entre els nadons. En humans, la incidència de les aneuploïdies varia depenent del període vital analitzat (Hassold and Hunt 2001):

- S'estima que entre el 10% i el 30% dels òvuls fecundats presenten un nombre erroni de cromosomes, essent la majoria trisomies o monosomies.
- En avortaments espontanis detectats clínicament entre la sisena i vintena setmana de gestació, la incidència d'aneuploïdies varia segons els estudis analitzats i van des d'un 35% fins a un 87% (Boue et al. 1985; Strom et al. 1992; Ribas 2002; Ferro et al. 2003; Philipp et al. 2003).
- En fetus avortats espontàniament entre la vintena i la quarantena setmana de gestació, la incidència d'aneuploïdies és aproximadament d'un 4%.
- En nounats, la incidència passa a ser d'un 0,3%.

Partint d'aquestes dades, i assumint que un 15% dels embarassos clínicament reconeguts avorten espontàniament i un 1-2% moren en els darrers mesos de l'embaràs, es pot estimar globalment que, en humans, almenys un 5% de les concepcions són aneuploides.

Així com la incidència de les aneuploïdies varia segons el període de desenvolupament estudiat, els cromosomes implicats també varien. En humans, les aneuploïdies més comunes en avortaments espontanis són:

- Monosomia X (45,X0).
- Trisomia 16 (47,XX,+16).
- Trisomia 21 (47,XX,+21).
- Trisomia 22 (47,XX,+22).

En canvi en nounats, les aneuploïdies més comunes són:

- Trisomia 21 o síndrome de Down (47,XX,+21).
- Trisomia 18 o síndrome d'Edwards (47,XX,+18).
- Trisomia 13 o síndrome de Patau (47,XX,+13).
- Trisomia X (47,XXX).
- Disomia XX en mascles o síndrome de Klinefelter (47,XXY).
- Disomia YY en mascles (47,XYY).

A continuació es descriuen alguns dels trets característics de les aneuploïdies autosòmiques més comunes en nadons humans, així com la seva incidència en la població i els seus diferents orígens:

- **Trisomia 21:** La relació entre la trisomia 21 i la síndrome de Down la va establir Lejeune et al. (1959). La seva incidència en països desenvolupats és d'un de cada 750 nadons. Entre el 93% i el 96% del afectats per la síndrome de Down tenen un cariotip 47,XX,+21, la resta es deuen principalment a mosaïcismes o a translocacions desequilibrades del cromosoma 21. La presència d'un cromosoma 21 de més és l'aneuploidia cromosòmica que genera una simptomatologia menys severa; per aquest motiu és l'única aneuploïdia autosòmica compatible amb una esperança de vida significativament inferior, però semblant als individus euploides. Així doncs, aquesta és la causa més freqüent de minusvàlues psíquiques

---

en humans. Els trets més característics són retard mental, hipotonia, estatura baixa, extremitats curtes, un 40-50% pateixen cardiopaties congènites, anomalies intestinals, anomalies del sistema immunitari, etc. L'esperança de vida actualment està al voltant dels 60 anys, tot i que és freqüent l'afectació d'Alzheimer a partir dels 40 anys. La principal causa de mort està relacionada amb problemes cardíacs, càncer i infeccions. L'anàlisi de l'origen del cromosoma extra ha estat un camp en què s'ha investigat molt. Els resultats obtinguts (taula 1.1, pàg. 7) revelen que només en el 8% dels casos estudiats el cromosoma 21 de més provenia del pare; la qual cosa representa el 3% dels casos, errors originats durant la primera divisió de la meiosi, i en el 5% restant, produït per errors de la segona divisió meiòtica. La implicació materna és molt més elevada: el 88% dels casos estudiats, essent el 63% produït per errors en la primera divisió meiòtica i un 23% en la segona. D'altra banda, un 3% dels casos analitzats s'ha vist que són originats per errors en les primeres divisions mitòtiques de l'embrió (Hassold and Hunt 2001).

- **Trisomia 18:** Edwards et al. (1960) van ser els primers a descriure la simptomatologia associada a la trisomia 18. Aquest genotip comporta l'aparició d'anomalies severes del sistema neurològic i cardíac, a més de defectes a d'altres òrgans. Aquesta síndrome també es caracteritza per un retard en el creixement intrauterí. El 80% dels pacients amb síndrome d'Edwards tenen trisomia 18, un 10% són mosaics mentre que el 10% restant tenen trisomies parcials fruit de translocacions desequilibrades del cromosoma 18. Al voltant del 50% dels nadons amb síndrome d'Edwards no sobreviuen al primer més de vida, i només el 10% arriben als 12 mesos, sobretot a causa de les importants anomalies cardíques que presenten. En les societats occidentals, la incidència d'aquesta malaltia és d'un de cada 6000 nadons. En aquest cas, els estudis realitzats per establir l'origen del cromosoma 18 extra han revelat una nul·la implicació de la gametogènesi masculina. Mentre l'11% dels casos es deuen a errors en divisions postzigòtiques, el 89% restant són deguts a disfuncions de la gametogènesi femenina. En concret, un 33% dels

casos són produïts per errors en la primera divisió meiòtica, i un 56% per anomalies de la segona divisió meiòtica (Hassold and Hunt 2001)(taula 1.1, pàg. 7).

- **Trisomia 13:** La simptomatologia associada a aquesta aneuploïdia també es coneix com a síndrome de Patau, ja que van ser (Patau et al. 1960) qui la van descriure per primer cop a principis dels anys 60. En països desenvolupats, la trisomia 13 té una incidència d'un de cada 10000 nadons. Els trets més característics del fenotip són microftàlmia, polidactília postaxial i enfonsaments orofacials. El 90% dels afectats moren durant el primer any de vida, i rarament superen els 2 anys de vida. En aquest cas, la implicació femenina en l'origen del cromosoma extra 13 també és sensiblement major a la masculina. En un 88% dels casos estudiats, el cromosoma 13 de més provenen de l'oòcit, mentre que només en l'11% dels casos, la trisomia és causada per l'espermatozoide (Nicolaidis and Petersen 1998) (taula 1.1, pàg. 7).

### 1.1.2. Origen de les aneuploïdies

Tal com ha quedat explícit en la descripció de les síndromes de Down, d'Edwards i Patau, la majoria de les aneuploïdies es deuen a errors en la meiosi que generen gàmetes amb un cromosoma de més (disòmic) o de menys (nul·lisòmic). Aquests gàmetes seran els causants de l'aneuploïdia quan participin en la fecundació. Tot i això, i tal com ja s'ha citat, els errors en les primeres divisions mitòtiques de l'embrió també poden originar aneuploïdies, tot i que són força menys freqüents.

Com que la majoria de monosomies són incompatibles amb la vida, es disposa de poca informació sobre quin és el seu origen. L'única que s'ha pogut estudiar és la monosomia X (45,X0), i precisament en aquest cas, s'ha observat un origen patern en el 70-80% dels casos (Jacobs et al. 1997). En canvi, la majoria de les trisomies permeten cert grau de desenvolupament fetal, de manera que en les trisomies s'ha pogut estudiar

més àmpliament l'origen del cromosoma extra (taula 1.1, pàg. 7). Tot i la gran variació existent en funció del cromosoma causant de l'aneuploidia, en tots els casos predominen els errors produïts en l'oogènesi, i principalment en la primera divisió meiòtica (vegeu l'apartat 1.3.2). La major participació de la meiosi femenina en l'origen de les aneuploidies es posa de manifest quan s'analitza la proporció d'espermatozoides i d'òcits I i II aneuploides. Mentre que només al voltant d'un 6% dels espermatozoides són aneuploides (Vidal et al. 2001), en òcits II s'ha estimat que la taxa d'aneuploidia és aproximadament d'un 20% (Volarcik et al. 1998); encara que aquests percentatges varien molt en funció de les fonts i l'origen de les mostres.

Trisomia	Origen (%)				
	Patern		Matern		Mitosi postzigòtica
	Meiosi I	Meiosi II	Meiosi I	Meiosi II	
2	28	-	54	13	6
7	-	-	17	26	57
13		12		88	-
15	-	15	76	9	-
16	-	-	100	-	-
18	-	-	33	56	11
21	3	5	65	23	3
22	3	-	94	3	-
XXY	46	-	38	14	3
XXX	-	6	60	16	18

Taula 1.1. Origen de les trisomies en humans, modificada de Nicolaidis and Petersen 1998 i Hassold and Hunt 2001.

### 1.1.3. Errors que condueixen a l'aparició de les aneuploidies cromosòmiques

La meiosi és un procés complex (vegeu l'apartat 1.3) en el qual es dona una sola ronda de replicació del DNA prèvia a dues divisions cel·lulars seguides. La meiosi, entre altres esdeveniments, comporta l'aparellament dels cromosomes homòlegs, la sinapsi, l'intercanvi de material hereditari

(recombinació) i una primera divisió en què se separen cromosomes homòlegs, en lloc de cromàtides germanes com succeeix en la mitosi. La complexitat d'aquests processos fa pensar que la seva evolució i el seu control poden ser susceptibles d'errors que generin gàmetes aneuploides. És a dir, es considera l'origen de gàmetes aneuploides com el possible resultat de defectes en l'aparellament dels cromosomes homòlegs, errors en la recombinació o problemes en la segregació dels cromosomes cap als pols durant l'anafase I o II. En general, la segregació anòmala dels cromosomes homòlegs en una divisió cel·lular es coneix com a no-disjunció (ND).

La principal implicació de la dona en l'origen de les aneuploïdies, així com el marcat efecte de l'edat materna en aquest fenomen, fa de la meiosi femenina un tema d'investigació prioritari, ja que les particularitats de la formació de les gàmetes femenines (vegeu l'apartat 1.2) no permeten l'extrapolació de la informació obtinguda en estudis fets en mascles. És a dir, actualment la recerca s'encamina cap a la detecció de les diferències existents entre la formació dels espermatozoides i dels oòcits per tal d'esbrinar les possibles causes de la major producció de gàmetes aneuploides per part de les dones.

Clàssicament, s'han fet pocs estudis per esbrinar la implicació dels processos d'aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs amb la producció de gàmetes aneuploides. Tot i que alguns treballs de mitjan els 60 relacionen la persistència del nuclèol durant la profase meiótica en oòcits I amb un incorrecte procés d'aparellament dels cromosomes acrocèntrics (Eichenlaub-Ritter 1996), en aquests tipus d'estudis hi va haver poca continuïtat, i avui en dia, pel que fa a l'aparellament dels cromosomes homòlegs, se'n coneix poca cosa de la seva eficiència.

D'altra banda, des de fa temps, en diferents models estudiats (*S. pombe*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* o *M. musculus*) s'ha observat com taxes de recombinació més baixes del que es considera habitual per a aquestes espècies, tendeixen a generar un augment d'errors en la disjunció dels cromosomes homòlegs durant la primera divisió meiótica o de cromàtides germanes en la segona divisió meiótica (Lynn et

al. 2004). Altrament, s'ha vist que no només el nombre de cops que recombinen un parell de cromosomes és important: la posició d'aquests punts de recombinació també intervé a l'hora de permetre la correcta segregació dels homòlegs (Ross et al. 1996). En humans, sembla ser que l'origen de les trisomies podria ser causat tant per l'absència de recombinació en un parell d'homòlegs, com per les disminucions en la taxa de recombinació o en posicions errònies dels punts de recombinació (Lynn et al. 2004).

El procés de recombinació però, en línies generals, és més o menys universal i, per tant, les seves característiques sembla que no puguin explicar la major producció de gàmetes aneuploides per part de la oogènesi en comparació a l'espermatogènesi. Així doncs, quines són les particularitats de gènere que podrien explicar aquest fenomen? Existeixen grans diferències entre la gametogènesi, incloent-hi la meiosi, femenina i masculina (taula 1.2, pàg. 13, i apartats 1.2 i 1.3). Actualment es creu que les causes més importants a l'hora d'explicar l'alta freqüència de producció d'oòcits aneuploides serien l'absència d'un sistema eficient de control de l'evolució de la meiosi en l'oòcit, així com l'envelliment de l'oòcit al llarg de la vida reproductiva de la dona i els desequilibris hormonals al voltant de la menopausa.

Els processos cel·lulars que són crucials per a la supervivència de la cèl·lula, i en últim terme, de l'organisme, tenen uns sistemes de control (*checkpoint*) que garanteixen que el cicle cel·lular no avanci fins que el procés que controlen no s'ha produït segons estava previst. Si aquests detecten un error, aturen la progressió del cicle cel·lular fins que no és reparat. I si això no és possible, poden conduir la cèl·lula cap a una mort programada (apoptosi). La meiosi té sistemes de control durant la profase meiòtica (*checkpoint* de paquitè) i durant la transició metafase/anafase (*checkpoint* de metafase; vegeu l'apartat 1.3.2). Es coneix que aquests processos són funcionals en la meiosi masculina, però, per contra, sembla que aquests no funcionen amb la mateixa eficiència en oòcits (Hunt and Hassold 2002); d'aquesta manera es permet així la generació de gàmetes



aneuploides.

La meiosi en dones comença durant l'etapa fetal i queda bloquejada al final de la profase meiòtica abans del naixement de l'individu. A partir de la pubertat, en cada cicle menstrual, un cert nombre d'oòcits reprendran la meiosi, finalitzarà la primera divisió, començarà la segona divisió meiòtica i el dominant quedarà de nou aturat a l'estadi de metafase II. Aquest oòcit II no completarà la meiosi si no és fecundat per un espermatozoide (vegeu l'apartat 1.2). Així doncs, els oòcits generats durant la vida fetal restaran aturats en la profase meiòtica uns quants anys i aniran reprenent la meiosi durant tota la vida fèrtil de la dona. Això implica que hi haurà oòcits que quedaran bloquejats aproximadament 11 anys mentre que d'altres ho estaran fins a uns 50 anys. Aquest temps que passa l'oòcit aturat sembla que influeix decisivament en l'aparició de les aneuploidies. En aquest sentit, tot indica que el risc de tenir descendència amb alguna trisomia ve incrementat en funció de l'edat materna (Morton et al. 1988). L'efecte de l'edat materna podria ser produït per un procés que requereix dos esdeveniments ("*two hit model*", (Lamb et al. 1996). En el primer, que es donaria durant l'etapa fetal, es produiria un bivalent que no hauria recombinat o que presentaria un punt de recombinació inapropiat, és a dir, un punt de recombinació localitzat en una posició pròxima als telòmers. Aquesta localització de l'entrecruament no és favorable per a la correcta segregació dels cromosomes homòlegs durant la primera divisió meiòtica. El segon esdeveniment seria el processat erroni d'aquest bivalent durant la metafase I, en l'ovari adult. Aquest model suposava que l'ovari més vell era menys eficient ja que segregaria bivalents *conflictius*. Recentment però, alguns grups suggereixen que canvis fisiològics que es donin en l'ovari adult poden alterar els processos de la primera divisió meiòtica (Champion and Hawley 2002). D'aquesta manera, s'entén que el problema no rau en l'edat cronològica de l'ovari, sinó en la proximitat de la dona a la menopausa (Kline et al. 2000) o, dit d'una altra manera, en l'edat *fèrtil relativa* de l'ovari.

---

## 1.2. GAMETOGÈNESI

La gametogènesi és el procés de formació, desenvolupament i maduració de les cèl·lules germinals. Implica una sèrie d'esdeveniments cel·lulars, entre els quals s'inclou la meiosi.

En humans, al voltant dels 20 dies de desenvolupament embrionari es comencen a formar les cèl·lules germinals primordials (CGPs) en el sac vitel·lí. A la sisena setmana de gestació, aquestes migren cap a les crestes genitals, gràcies a fenòmens mecànics, com poden ser moviments ameboides, i fenòmens quimiotàctics. Seguidament, quan l'embrió assoleix una longitud de 7-9 mm, les CGPs comencen a proliferar alhora que envaeixen els plecs genitals de les gònades primordials, la qual cosa comporta, juntament amb una proliferació del teixit somàtic de l'òrgan, un creixement de la gònada indiferenciada.

La diferenciació sexual no comença fins a les 7-10 setmanes de gestació. Aquest procés comporta la diferenciació de les gònades, alhora que les CGPs també es diferencien en cèl·lules germinals de mascle o femella, en funció del sexe de l'embrió.

### 1.2.1. Espermatogènesi

El procés de diferenciació cel·lular pel qual s'obtenen els espermatozoides es coneix com a espermatogènesi, altrament dita gametogènesi masculina. Aquest procés conclou amb l'obtenció d'una cèl·lula altament especialitzada com és l'espermatozoide.

En els mascles dels mamífers, durant els primers estadis de desenvolupament embrionari la gònada es diferencia formant els testicles. Durant aquest estadi, les CGPs es diferencien en espermatogònies. Aquesta diferenciació, però, queda aturada i això significa el final de l'etapa prenatal de l'espermatogènesi cap a les 16-18 setmanes de gestació. Quan s'assoleix la maduresa sexual, i a causa de l'acció de les gonadotropines, les espermatogònies es divideixen mitòticament de manera constant, la qual

cosa afavoreix la producció de gàmetes en l'adult de manera quasi il·limitada. Algunes de les espermatogònies, es transformen en espermatòcits, entren en meiosi, i es generen espermatòcits I. Aquests completen la primera divisió meiòtica (vegeu l'apartat 1.3) i esdevenen espermatòcits II. Un cop han acabat la segona divisió meiòtica, s'anomenen espermàtides. Aquestes cèl·lules ja són haploides i hauran de succeir importants canvis morfològics i de composició citoplasmal i al nucli a fi que les espermàtides es converteixin en espermatozoides. Aquest últim procés es coneix com a espermiogènesi.

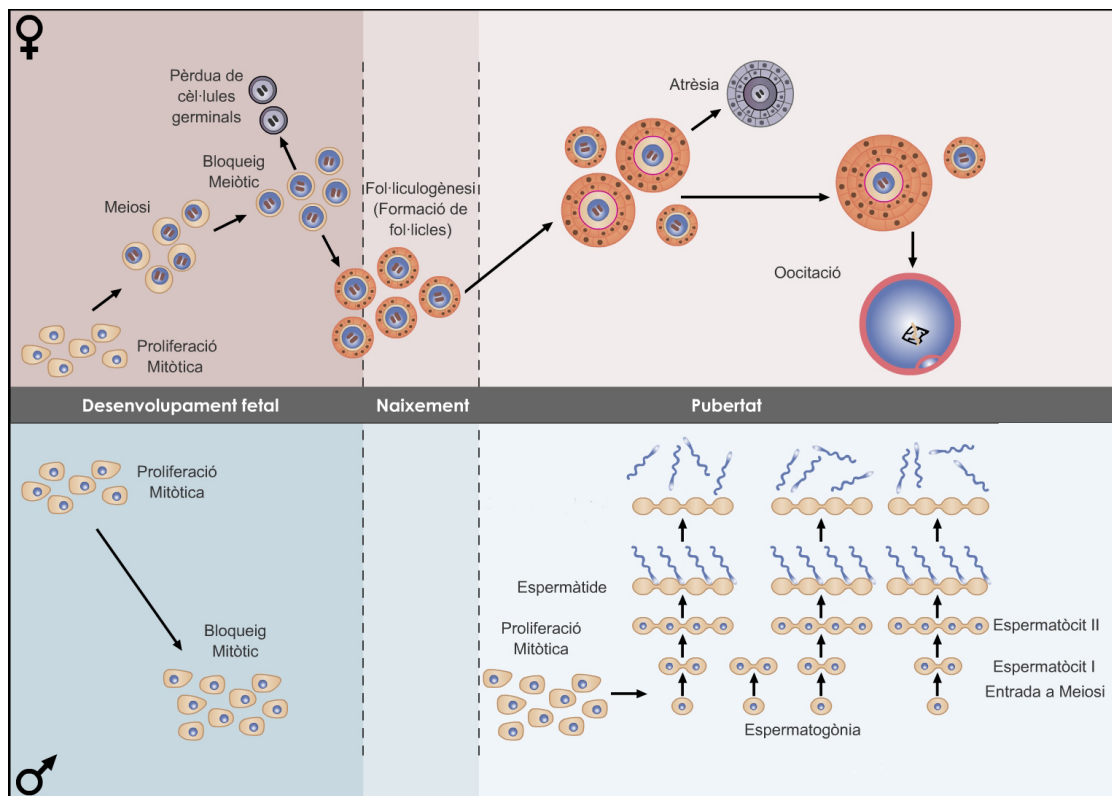


Figura 1.1. Esquema on es mostren algunes de les diferències entre l'oogènesi i l'espermatogènesi en humans. Modificat de Hassold and Hunt 2001.

## 1.2.2. Oogènesi

La producció de gàmetes femenines, o oogènesi, és sensiblement

diferent de l'espermatogènesi, com queda resumit a la taula 1.2 (pàg. 13) i a la figura 1.1 (pàg. 12) En aquest cas, el procés conclou amb l'obtenció d'una cèl·lula molt particular, ja que presenta la paradoxa de ser una cèl·lula altament diferenciada que no ha perdut la seva capacitat totipotent, un cop és fecundat.

En l'oogènesi, l'etapa prenatal és més llarga que en l'espermatogènesi i té una especial importància.

### 1.2.2.1. Etapa prenatal

En les dones, la meiosi comença durant l'etapa fetal (Zuckerman 1951; Ohno et al. 1961).

ESPERMATOGÈNESI	OOGÈNESI
Des de la pubertat, les espermatogònies mantenen la capacitat proliferativa.	Les oogònies perden la capacitat proliferativa durant el període fetal.
Es genera un nombre il·limitat d'espermatozoides.	Es genera un nombre màxim finit d'oòcits, fixat als 6-7 mesos de vida fetal.
La meiosi s'inicia en arribar a la pubertat.	La meiosi s'inicia durant la vida fetal.
Un espermatòcit I genera 4 espermatozoides.	Un oòcit I genera 1 únic oòcit II fecundable.
La meiosi és un procés continu.	La meiosi és discontinua: bloqueig a dictiotè i a metafase II.
Les histones es canvien per protamines.	No existeix canvi d'histones.
Cromosomes sexuals: XY	Cromosomes sexuals: XX
- Inactivats durant la profase I.	- Transcripcionalment actius.
- Homologia restringida a les regions PAR entre els cromosomes X i Y.	- Homologia completa entre ells.

Taula 1.2. Diferències més importants entre l'oogènesi i l'espermatogènesi. Modificat de Martínez-Flores 1997.

Cap a la 9a setmana de gestació, les CGPs comencen a diferenciar-se en oogònies. Al voltant del segon mes de gestació es troben unes 600.000 CGPs i oogònies en les gònades acabades de formar. El nombre de cèl·lules germinals va variant al llarg de l'estadi de desenvolupament de l'individu, essent màxim al voltant dels 5/6 mesos de gestació (quan s'assoleix un pic aproximat de 6.800.000 oòcits). Al final del període fetal s'observa una gran quantitat de fol·licles en degeneració que contenen oòcits atrèsics. Així doncs, al naixement, el nombre d'oòcits es veu dràsticament disminuït fins a 2.000.000 (cal saber que el 50% d'aquestes cèl·lules són també atrèsiques). A l'edat de 7 anys, només sobreviuen uns 300.000 oòcits (Baker 1963). Aquest nombre s'estima que tampoc no es manté constant fins a la menarquia, tot i que existeix certa controvèrsia sobre aquest aspecte (vegeu el final d'aquest mateix apartat).

Cap a les 10 setmanes de gestació les oogònies comencen a dividir-se mitòticament i generen cúmuls de cèl·lules que preserven ponts intercel·lulars que permeten una sincronia regional i la transmissió d'informació durant la gametogènesi entre elles. Actualment, s'entén la interacció entre els oòcits en aquest estadi com una *nurseria*, on es dona una relació de simbiosi entre els oòcits, on les cèl·lules més avançades en el desenvolupament s'encarreguen de guiar les altres en el procés tot facilitant-lo.

Pels volts de l'onzena/dotzena setmana de gestació, les primeres oogònies es diferencien en oòcits I. És a dir, les primeres oogònies es converteixen en oòcits i comencen la meiosi (Ohno et al. 1962; Garcia et al. 1987). A partir d'aquest punt i de manera asincrònica, durant les següents setmanes de gestació les oogònies es van diferenciant en oòcits que entren en meiosi. La primera divisió meiòtica queda aturada, però, al final de la profase (estadi de dictiotè) fins que en l'individu adult s'assoleixi la maduresa sexual (vegeu els apartats 1.2.2.2 i 1.3).

A partir de les 22 setmanes de gestació s'observen els primers fol·licles primordials. Aquests estan formats per oòcits I, aturats a l'estadi de dictiotè, envoltats per una capa de cèl·lules fol·liculars planes no

proliferatives ni diferenciades.

A partir del sisè mes de gestació es deixen d'observar oogònies en l'ovari fetal. És a dir, totes les oogònies s'hauran transformat en oòcits i aquests hauran començat la meiosi. Així doncs, durant el període fetal es comença la gametogènesi femenina i, encara més important, s'estableix el nombre màxim de cèl·lules germinals que una dona tindrà durant la seva vida fèrtil. Tot i això, un estudi recent realitzat en ratolí descriu l'existència d'oogònies actives en ovaris d'individus adults i proposa que gràcies a aquestes gònies es manté la fertilitat de l'individu, ja que les oogònies en l'adult contraresten l'efecte de l'alta atrèsia fol·licular existent en l'ovari postnatal (Johnson et al. 2004). Aquestes observacions, però, encara no ha estat corroborades per cap altre grup i actualment estan sota un important debat, havent-hi posicionaments a favor i en contra (Greenfeld and Flaws 2004; Spradling 2004; Telfer 2004).

### **1.2.2.2. Etapa postnatal**

Després del naixement, la gametogènesi femenina continua. Els fol·licles primordials són reclutats en fol·licles primaris, i posteriorment aquests es transformen en secundaris. El reclutament comporta creixement i diferenciació de les cèl·lules de la granulosa. Aquest procés és independent d'estimulació gonadotròpica, de manera que s'inicia durant l'etapa fetal, s'accentua en la infància de forma paulatina sobretot a partir dels sis anys d'edat, s'incrementa amb la pubertat, s'alenteix amb l'embaràs i la lactància, però no s'interromp fins a l'esgotament de fol·licles primordials formats en l'etapa prenatal de l'oogènesi.

Quan els fol·licles primaris entren en la fase de reclutament, l'oòcit creix i les cèl·lules que l'envolten proliferen i adopten una forma cúbica, són les cèl·lules de la granulosa. Aquest fol·licle s'anomena fol·licle preantral. Fins a aquest punt, la gametogènesi és independent de l'acció hormonal de gonodotropines o hormones esteroïdals. En aquest estadi, l'oòcit encara resta aturat a la primera divisió meiòtica. Tot i això, aquest és un període

de gran activitat metabòlica, en el qual l'oòcit acumula proteïnes, lípids i RNAs. Alhora, a l'ovari es forma una estratificació dels fol·licles, se situen els més madurs en el còrtex intern, mentre els fol·licles primordials estaran a la part més externa del còrtex.

Perquè la gametogènesi femenina continuï, es necessita que, entre d'altres esdeveniments, el fol·licle es faci sensible a les hormones. Això s'aconsegueix amb l'aparició de receptors de la FSH i estradiol en les cèl·lules de la granulosa, així com l'aparició de receptor de la LH en un altre tipus cel·lular del fol·licle, les cèl·lules de la teca, que són les que constitueixen la part més externa del fol·licle.

Durant els primers anys de vida, els ovaris aniran augmentant de pes i mida, principalment a causa del creixement de l'estroma ovàric. Durant aquest temps, els valors plasmàtics de gonadotropines són baixos.

Amb la pubertat, la concentració de gonadotropines en sang augmenta i s'estableixen els cicles hormonals típics de la dona adulta que marcaran l'oogènesi d'aleshores en endavant.

El cicle menstrual comporta la maduració del fol·licle i de l'oòcit I així com la seva capacitat, que el conduirà a continuar la meiosi fins a oòcit II. El nombre de fol·licles que maduraran per cada cicle està en funció del nombre de fol·licles existents. La maduració fol·licular comporta el creixement del fol·licle i la formació d'una cavitat, anomenada antra, en el seu interior. Aquest fet es deu principalment a augments dels nivells FSH en sang. Aleshores, el fol·licle s'anomena fol·licle antral. En aquest estadi l'oòcit també madura, tot i que ja no augmenta de mida. De tots els fol·licles que responen al cicle menstrual, el que sigui més gran serà seleccionat com a fol·licle dominant. Aquest, mitjançant processos de retroinformació negativa, regula la producció de gonadotropines i deixa sense estímuls els altres fol·licles menys desenvolupats. El fol·licle dominant continua, però, madurant fins a convertir-se en un fol·licle preovulatori. Per contra, la resta de fol·licles inicien un procés d'atrèsia.

En aquest moment l'oòcit del fol·licle preovulatori reprèn la meiosi. Això es fa sota l'estímul de les gonadotropines (en concret un pic de l'hormona luteïnitzant, LH). La maduració de l'oòcit es basa en el trencament de la vesícula germinal (definició citològica del nucli de l'oòcit I aturat a dictiotè), l'orientació dels bivalents a la placa metafàsica, la separació dels homòlegs i la compleció de la primera divisió meiòtica, que té com a resultat la formació del primer corpuscle polar. A continuació, comença la segona divisió meiòtica, però de nou, queda bloquejada, aquest cop a l'estadi de metafase II. En aquests moments, l'oòcit està preparat per ser oocitat. Un augment en la proporció de LH fa que l'oòcit II s'alliberi del fol·licle junt amb algunes cèl·lules de la granulosa. Les restes fol·liculars retingudes a l'ovari passen a convertir-se en el cos luti. Aquest serà l'encarregat de mantenir les concentracions hormonals òptimes per permetre la fecundació de l'oòcit i posterior implantació de l'embrió a l'úter matern. En les femelles de mamífers, la meiosi només s'acabarà quan l'oòcit sigui fecundat per un espermatozoide. Això reactivarà novament la segona divisió meiòtica, la qual cosa facilita la separació de les cromàtides germanes i l'expulsió del segon corpuscle polar.



### 1.3. MEIOSI

La meiosi és la divisió reduccional del genoma per la qual s'obtenen gàmetes haploides, provinents d'una cèl·lula diploide, que garanteixen la diploidia de l'espècie en la formació d'un zigot per raó de la fecundació d'un oòcit per un espermatozoide.

La meiosi, tal com ja l'hem definida amb anterioritat, consisteix en una divisió especialitzada en què es produeixen dues divisions cel·lulars precedides per una única ronda de replicació del DNA (figura 1.2, pàg. 18). De les dues divisions destaca la primera, que és en la qual es dona la divisió reduccional del genoma. Al final de la primera divisió meiótica s'obtenen dues cèl·lules haploides ja que se separen cromosomes homòlegs i no cromàtides germanes. La segona divisió, en canvi, és anàloga a una divisió mitòtica clàssica en que se separen cromàtides germanes.

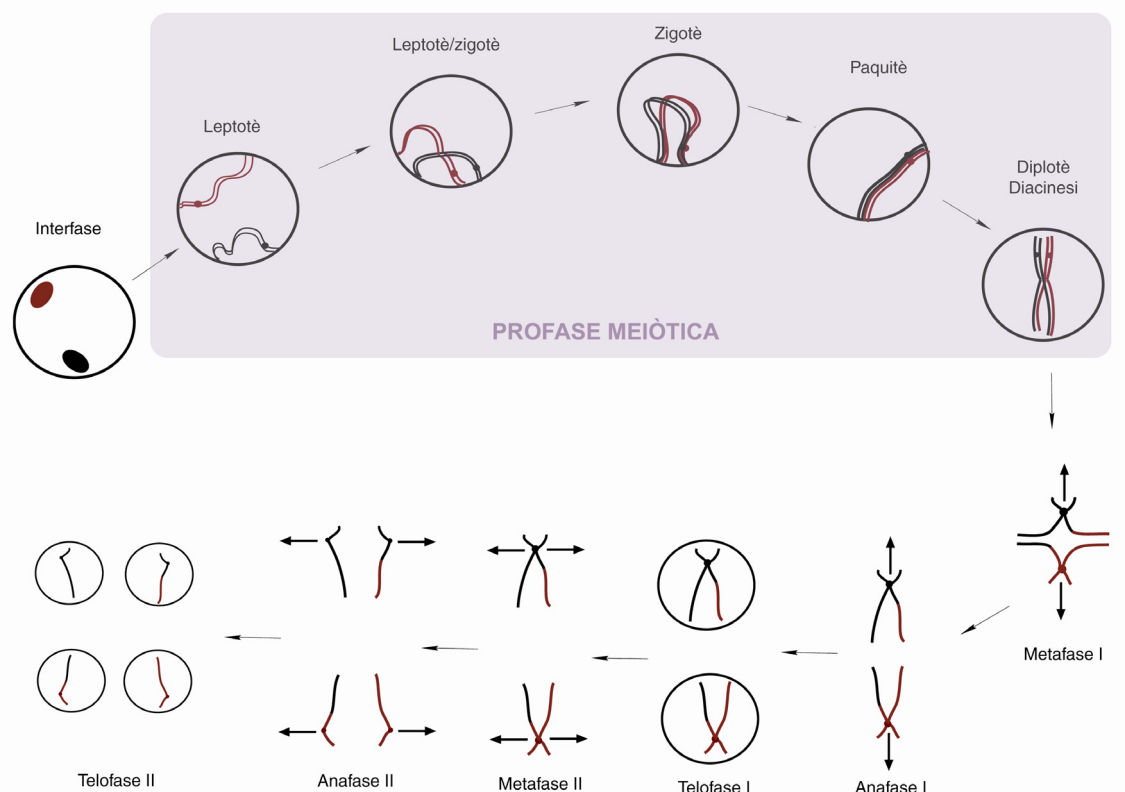


Figura 1.2. Representació esquemàtica de la meiosi.

Aquest és un procés altament conservat en l'evolució, ja que es troba en tots els organismes que es reproduïxen sexualment, com són per exemple els llevats (per exemple: *Saccharomyces cerevisiae*), les plantes (p. ex.: *Arabidopsis thaliana*), els insectes (p. ex.: *Drosophila melanogaster*) o els mamífers (p. ex.: *Mus musculus*).

De totes maneres, i malgrat que es poden trobar algunes diferències entre la manera com diferents espècies duen a terme la meiosi (Champion and Hawley 2002), en tots els casos hi ha uns fenòmens específics d'aquest tipus de divisió cel·lular, com són ara:

1. L'aparellament dels cromosomes homòlegs i la seva sinapsi. Els cromosomes homòlegs entren en contacte físic entre ells gràcies a una estructura proteica anomenada complex sinaptinomal (SC).
2. L'intercanvi de material entre els cromosomes homòlegs, altrament dit recombinació. Mitjançant l'intercanvi de material entre els cromosomes homòlegs s'augmenta la variabilitat genètica de l'espècie. A més, des del punt de vista físic, gràcies a la recombinació, els dos cromosomes homòlegs queden lligats entre ells, la qual cosa facilita la seva segregació en la primera divisió meiótica.
3. La segregació dels cromosomes homòlegs en la primera divisió meiótica. A fi de garantir la correcta segregació dels cromosomes homòlegs en la primera divisió meiótica cap a pols diferents, els centròmers de les dues cromàtides germanes de cada homòleg, al contrari del que passa en la mitosi, han d'orientar-se cap al mateix pol (vegeu l'apartat 1.3.2.2). Amb la segregació independent de cada cromosoma també s'augmenta substancialment la variabilitat de l'espècie.

### **1.3.1. Esdeveniments previs a l'inici de la meiosi**

Alguns dels esdeveniments necessaris per a la correcta execució de la

meiosi es produeixen durant la fase S de l'últim cicle cel·lular anterior a la meiosi. Durant la fase S del cicle cel·lular es produeix la replicació del DNA. En aquest estadi, la cèl·lula germinal té 46 cromosomes i cada cromosoma té una única cromàtide. Amb la replicació del DNA es genera una còpia del genoma de la cèl·lula; al final del procés s'obtenen 46 cromosomes, cadascun amb dues cromàtides idèntiques, anomenades cromàtides germanes. Aquestes es mantenen unides gràcies a una estructura proteica anomenada genèricament amb el nom de cohesines.

Les cohesines són un complex proteic compost de diferents subunitats que uneixen les cromàtides germanes des de la fase S del cicle cel·lular fins a la metafase, que tenen per funció assegurar la correcta segregació de les cromàtides germanes en la divisió cel·lular.

Mantenir les cromàtides germanes unides és necessari per a la correcta segregació cromosòmica tant durant la mitosi com en la meiosi. En la mitosi s'ha observat com la cohesió cromosòmica intervé en el procés d'orientació dels cromosomes en la placa metafàsica, contrarestant la tensió originada pel fus acromàtic (Tanaka et al. 2000). La destrucció de les cohesines quan tots els cromosomes estan correctament alineats a la placa metafàsica condueix a la separació de les cromàtides germanes cap als diferents pols de la cèl·lula en la transició metafase-anafase (Uhlmann et al. 2000).

En les cèl·lules somàtiques el complex de cohesines conté les proteïnes següents (Toth et al. 1999; Tomonaga et al. 2000) (figura 1.3, pàg. 21):

- Heterodímer de SMC1 (Structural Maintenance of Chromosomes 1) i SMC3 (Structural Maintenance of Chromosomes 3). Formen un llaç que atrapa les dues cromàtides germanes.
- SCC1, que presenta un homòleg en humans anomenat RAD21. És la proteïna que tanca tot el complex; la seva destrucció desencadena la separació de les cromàtides germanes.

- SCC3, en humans trobem dos ortòlegs, STAG1 i STAG2. Participa en el complex de cohesines unint-se a RAD21.

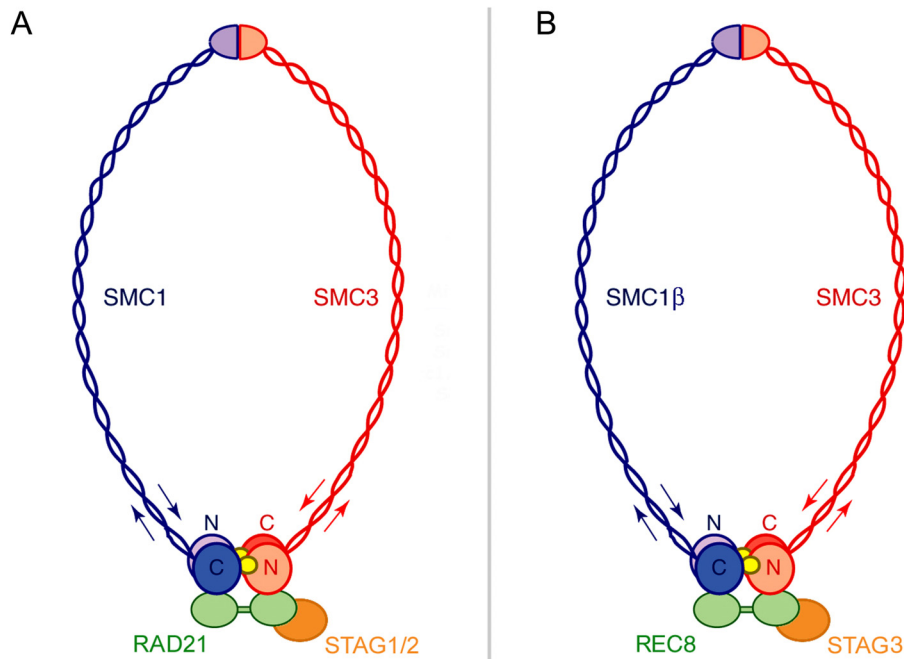


Figura 1.3. Proteïnes que intervien en el complex de cohesines en les cèl·lules somàtiques (A) i en els gàmets (B). N: extrem N terminal. C: extrem C terminal.

Les cohesines es comencen a dissociar dels cromosomes entre els estadis de profase i prometafase, i resten principalment als centròmers dels cromosomes. Al mateix temps, unes altres proteïnes, les condensines, comencen a associar-se a les cromàtides, conferint-li la forma de cromosoma idònia per completar la divisió cel·lular. Les cohesines que es mantenen en els centròmers dels cromosomes són les responsables de mantenir les cromàtides germanes unides mentre els cromosomes s'orienten a la placa metafàsica durant l'estadi de prometafase. Un cop estan orientades correctament en el fus acromàtic s'activa una via enzimàtica que condueix a l'activació de la proteïna separasa, que degrada la RAD21 i allibera el complex de cohesines dels centròmers dels cromosomes. Aquest fet desencadena la transició entre la metafase i l'anafase (Nasmyth 2002) i condueix a la separació de les cromàtides

germanes.

En la meiosi també hi intervenen les cohesines, però no totes són les mateixes (taula 1.3, pàg. 22, i figura 1.3, pàg. 21).

	Subunitats de les cohesines			
<i>S. cerevisiae</i>	SMC1	SMC3	SCC1	SCC3
<i>S. pombe</i>	PSM1	PSM3	RAD21 REC8	PSC3 REC11
<i>C. elegans</i>	HIM1		COH1,2 REC8	
<i>H. sapiens</i>	SMC1 SMC1 $\beta$	SMC3 SMC3	RAD21 RAD21/REC8	STAG1, STAG2 STAG3

Taula 1.3. Subunitats del complex de cohesines descrites en diferents organismes emprades en la mitosi (negre) i la meiosi (blau).

En mamífers, les cohesines *meiòtiques*, SMC1 $\beta$ , SMC3 (Eijpe et al. 2000), REC8 (Eijpe et al. 2003) i STAG3 (Pezzi et al. 2000; Prieto et al. 2001), apareixen durant l'última fase S abans de començar la meiosi i ràpidament, durant el primer estadi de la profase de la primera divisió meiòtica, s'estructuren en uns elements que seran els precursors del complex sinaptnemal (vegeu l'apartat 1.3.2.1).

A més de l'inici dels processos que conduiran a la sinapsi dels cromosomes homòlegs, durant la fase S del cicle cel·lular, s'inicia un altre procés específic de la meiosi, com és la recombinació. En totes les espècies estudiades la recombinació comença gràcies a l'acció d'una transesterasa relacionada amb la topo II, anomenada SPO11, que fa talls de doble cadena de DNA (*Double Strand Breaks*, DSBs) (Bergerat et al. 1997; Keeney et al. 1997; Keeney et al. 1999). Estudis recents han demostrat que, almenys en llevats, SPO11 s'associa al DNA durant l'última fase S del cicle cel·lular que precedeix l'inici de la meiosi (Baarends and Grootegoed 2003), tot i això, tant en llevats com en ratolí, els DSBs no apareixeran fins al principi de la primera divisió meiòtica abans que comenci l'aparellament

(Mahadevaiah et al. 2001; Smith et al. 2001).

### **1.3.2. Primera divisió meiótica**

Aquesta és la divisió més especialitzada de les dues divisions que intervenen en la meiosi. S'hi produeixen els fenòmens característics de la meiosi com són ara l'aparellament dels cromosomes homòlegs, la recombinació i l'orientació dels centròmers de les cromàtides germanes de cada cromosoma cap al mateix pol (figura 1.2, pàg. 18). A causa de tots aquests processos, les cèl·lules resultants de la primera divisió meiótica són haploides, per tant, aquesta és la divisió reduccional del genoma.

En general, en les divisions meiótiques, igual que en les mitòtiques, es poden distingir els estadis de profase, metafase, anafase i telofase.

#### **1.3.2.1. Profase**

La profase de la primera divisió meiótica és un estadi molt especialitzat de la meiosi en el qual els cromosomes homòlegs s'aparellen i recombinen. Per raó de a seva peculiaritat, aquest estadi clàssicament s'ha subdividit en: leptotè, zigotè, paquitè, diplotè i diacinesi (figura 1.2, pàg. 18, i 1.4). Alguns autors defineixen fins i tot un estadi anterior dins la profase meiótica, que és el preleptotè.

##### **1.3.2.1.1. Preleptotè**

Aquest estadi, des del punt de vista citològic, es defineix per l'inici de la compactació dels cromosomes. En espermatòcits humans, durant l'estadi de preleptotè, es dona una reestructuració dels dominis cromosòmics, i això fa que els cromosomes passin de tenir l'aparença globular típica dels nuclis

interfàsics a un aspecte més allargat característic d'aquest estadi (Scherthan et al. 1998). Alhora, en espermatòcits de ratolí i humà, la distribució de les seqüències de DNA repetitiu alfa, situades principalment en els centròmers dels cromosomes, es modifica. En els nuclis interfàsics, aquestes seqüències es troben distribuïdes a l'atzar, mentre que en l'estadi de preleptotè es localitzen a la perifèria del nucli (Scherthan et al. 1996).

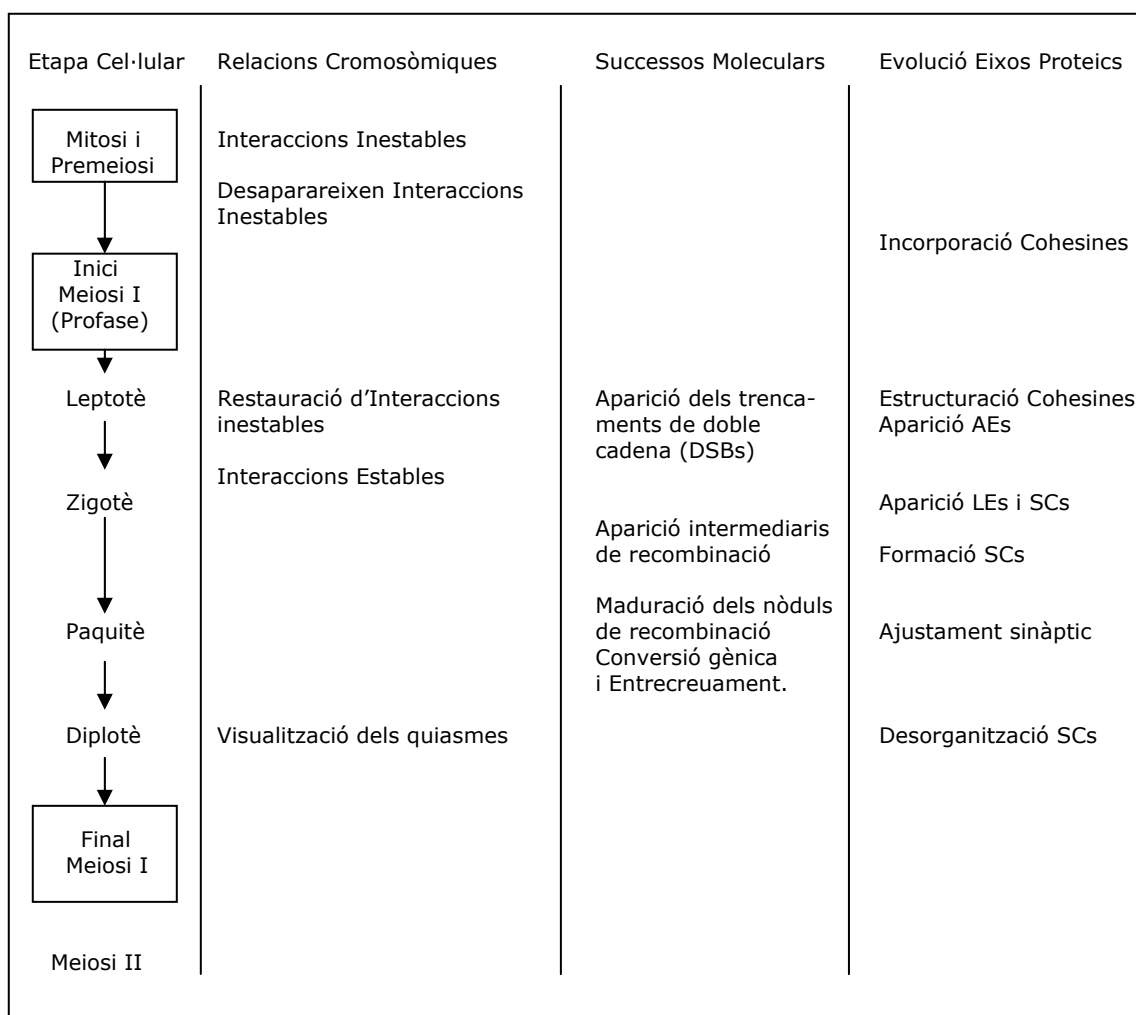


Figura 1.4. Relació dels successos més rellevants durant les primeres etapes de la meiosi. Modificat de Martínez-Flores 1997.

### 1.3.2.1.2. Leptotè

Durant l'estadi de leptotè, els cromosomes homòlegs comencen a

individualitzar-se, és a dir, es passa de la visió de nucli interfàsic compacte, on els cromosomes són indistingibles, a una imatge de nucli on cada cromosoma es pot seguir, mentre confereix al nucli una aparença de cabdell de llana (figura 1.2, pàg. 18). En aquest estadi, els cromosomes són llargs i prims. A mesura que la profase avanci, els cromosomes s'aniran fent més curts i gruixuts.

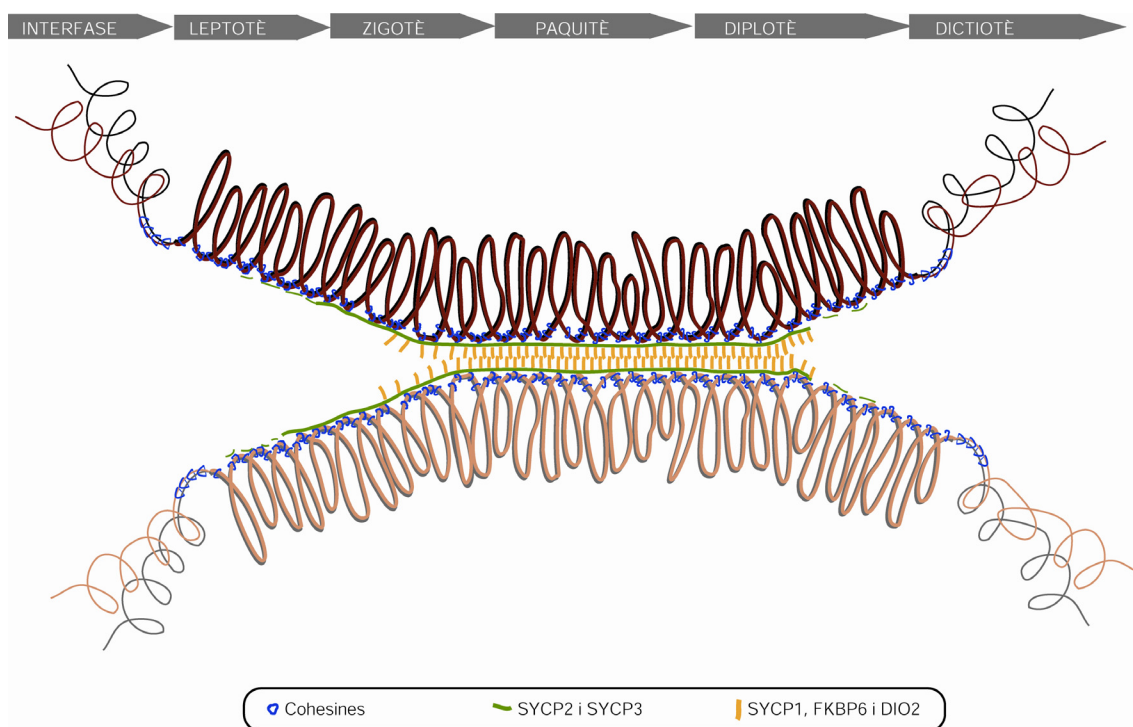


Figura 1.5. Evolució del complex sinapteinemal al llarg de la profase meiótica.

A l'estadi de leptotè, les cohesines de cada cromosoma s'estructuren en forma de filament sobre el qual s'organitzen els element axials (AEs) (Prieto et al. 2004). Els AEs uneixen les cromàtides germanes de manera lineal sobre un eix proteic, del qual surten llaços de cromatina (figura 1.5, pàg. 25). Els AEs estan compostos per una base de cohesines, incorporades a l'última fase S premeiótica (vegeu punt 1.3.1), sobre la qual es dipositen dues proteïnes estructurals: SYCP2 (Synaptonemal Complex Protein 2, també anomenada SCP2, (Offenberg et al. 1998) i SYCP3 (Synaptonemal Complex Protein 3, també dita SCP3, (Lammers et al. 1994). Els elements



axials són la base per a la formació del complex sinapteinemal (SC) en estadis posteriors (Fawcett 1956; Moses 1956) (vegeu l'apartat 1.3.2.1.3). La proteïna SYCP3 és essencial per a la formació dels complexos sinapteinemals, ja que ratolins mascle modificats genèticament en els quals se suprimeix el gen que codifica per a la SYCP3 (*knockout*), la meiosi s'atura a l'estadi de zigotè sense que s'observi la formació dels AEs o del SC (Yuan et al. 2000). Per contra, en ratolins femella deficient de SYCP3, la meiosi es pot completar en absència de AEs, tot i que en aquests casos s'observa una major freqüència de bivalents sense recombinació i d'oòcits II aneuploides (Yuan et al. 2002).

Actualment es creu que les principals funcions dels AEs són les que es descriuen a continuació (Page and Hawley 2004):

- Els AEs promouen la compactació cromosòmica durant la profase meiòtica, ja que els ratolins deficients de SYCP3 tenen cromosomes dos cops més llargs que els ratolins normals (Yuan et al. 2000; Kolas et al. 2004; Liebe et al. 2004).
- Intervenen en l'aparellament dels cromosomes homòlegs. Els espermatòcits de ratolins *knockout* per a SYCP3 presenten un aparellament retardat i mai no assoleixen els nivells d'aparellament observat en ratolins control (Liebe et al. 2004). Aquestes dades, però han estat posades en dubte per altres investigacions que asseguruen que els homòlegs assoleixen un correcte alineament en espermatòcits de ratolins *knockout* per SYCP3 (Kolas et al. 2004).
- Estudis realitzats en *Drosophila melanogaster* suggereixen que els AEs o els elements laterals (LEs, vegeu l'apartat següent) poden intervenir en la reparació del DSBs.
- Alguns autors també proposen la implicació dels AEs o dels LEs en el control de la distribució dels entrecreuaments (fenomen conegut com a interferència, i que descriu que la posició d'un punt d'entrecreuament en un lloc del SC impedeix la localització d'altres entrecreuaments a la vora) (Kleckner et al. 2003).

- Clàssicament es creia que els AEs o els LEs ajudaven a la confecció del SC i permeten l'ensamblatge dels filaments transversals (vegeu l'apartat 1.3.2.1.3). Els estudis realitzats en ratolins *knockout* per a SYCP3 han demostrat, però, que en absència d'AE, i només amb els seus precursors (els eixos de cohesines meiótiques) es pot permetre l'ensamblatge dels filaments transversals i la formació d'un element central (Kolas et al. 2004; Liebe et al. 2004).

Estudis fets en espermatòcits humans han demostrat que durant l'estadi de leptotè els homòlegs estan separats i que, per tant, per tal d'assolir un alineament que permeti el posterior aparellament dels cromosomes homòlegs, es necessiten moviments cromosòmics a gran escala (Scherthan et al. 1998). Una de les estratègies que la cèl·lula usa per afavorir l'aparellament dels cromosomes homòlegs és l'acumulació dels telòmers en una petita regió de l'embolcall nuclear. Aquesta polarització nuclear s'anomena *bouquet* (vegeu la revisió històrica: Scherthan 2001). Igual que en la majoria d'espècies estudiades (Zickler and Kleckner 1998), tant en espermatòcits de ratolí com en humà, aquesta polarització coincideix amb l'inici de l'aparellament cromosòmic. Així doncs, l'aparició del *bouquet* només es pot observar durant la transició entre l'estadi de leptotè i zigotè (Scherthan et al. 1996). En mamífers, la durada del *bouquet* sembla ser espècie específica, ja que, en contrast amb el que passa en humans i ratolins, en espermatòcits de vedell la conformació de *bouquet* és present fins a l'estadi de zigotè tardà (Pfeifer et al. 2001). A més a més, s'ha observat una diferència de la durada del *bouquet* en funció del gènere, ja que en el vedell, el *bouquet* dura més en oòcits que en espermatòcits (Pfeifer et al. 2003).

En mamífers, com en la majoria d'eucariotes, exceptuant-ne mosques i cucs (Champion and Hawley 2002), els processos que conclouran en entrecreuaments comencen a l'estadi de leptotè i, per tant, abans que s'iniciï la sinapsi entre els cromosomes homòlegs. Com ja s'ha dit anteriorment, l'intercanvi de material entre els cromosomes homòlegs comença amb l'aparició dels DSBs produïts per SPO11 (Bergerat et al.

1997; Keeney et al. 1997; Keeney et al. 1999). Estudis realitzats en ratolins *knockout* per SPO11 han demostrat que aquests trencaments són indispensables per a la correcta sinapsi cromosòmica durant la profase meiótica (Romanienko and Camerini-Otero 2000).

En les cèl·lules somàtiques s'ha observat que en les regions limítrofes als DSBs, produïts pel mateix metabolisme cel·lular o per acció d'agents mutàgens, apareix una forma fosforilada de la histona H2AX, que s'anomena  $\gamma$ H2AX, (Rogakou et al. 1999). Així doncs, el seguiment d'aquesta  $\gamma$ H2AX permet la localització de forma indirecta dels DSBs. La fosforilació de la H2AX la fan els membres d'una família de proteïnes amb activitat quinasa, semblants a la fosfatidilinositol-3-quinasa (FI3K). Entre els quals es troben:

- La proteïna mutada en l'atàxia telangectàsia (ATM).
- La proteïna relacionada amb l'ATM i la Rad3 (ATR).
- La proteïna relacionada amb l'ATM quinasa (ATX).
- La proteïna quinasa dependent de DNA (DNA-PK).

Aquestes proteïnes, d'alguna manera, detecten els DSBs i aleshores fosforilen determinats residus de les histones H2AX que envolten el tall (Fernandez-Capetillo et al. 2004). Aquesta fosforilació facilita l'acumulació de proteïnes involucrades en el procés de reparació del DNA a la zona de la lesió. A més, la fosforilació de la H2AX podria fer canviar l'estructura de la cromatina que envolta el DSB a fi de mantenir el extrems del trencament pròxims i evitar possibles reorganitzacions cromosòmiques (Fernandez-Capetillo et al. 2003).

El coneixement de l'aparició de la forma fosforilada de la histona H2AX a la mitosi ha permès detectar l'aparició de DSBs en la meiosi de ratolins (Mahadevaiah et al. 2001). Aquests autors proposen que en espermatoïcits de ratolí existeixen dos tipus de patrons d'aparició de  $\gamma$ H2AX. El primer, relacionat amb la formació de DSBs originada per la proteïna SPO11, on  $\gamma$ H2AX apareix de manera més o menys uniforme en tot el nucli

a l'estadi de leptotè, i a mesura que la profase meiótica avança va desapareixent; el segon patró, que es posa en evidència a l'estadi de paquitè, on només resta  $\gamma$ H2AX a la vesícula sexual, formada pel parell XY. L'aparició d'aquest segon patró de  $\gamma$ H2AX és independent de SPO11 (Mahadevaiah et al. 2001) i sembla estar involucrada en processos de condensació cromosòmica i inactivació transcripcional (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

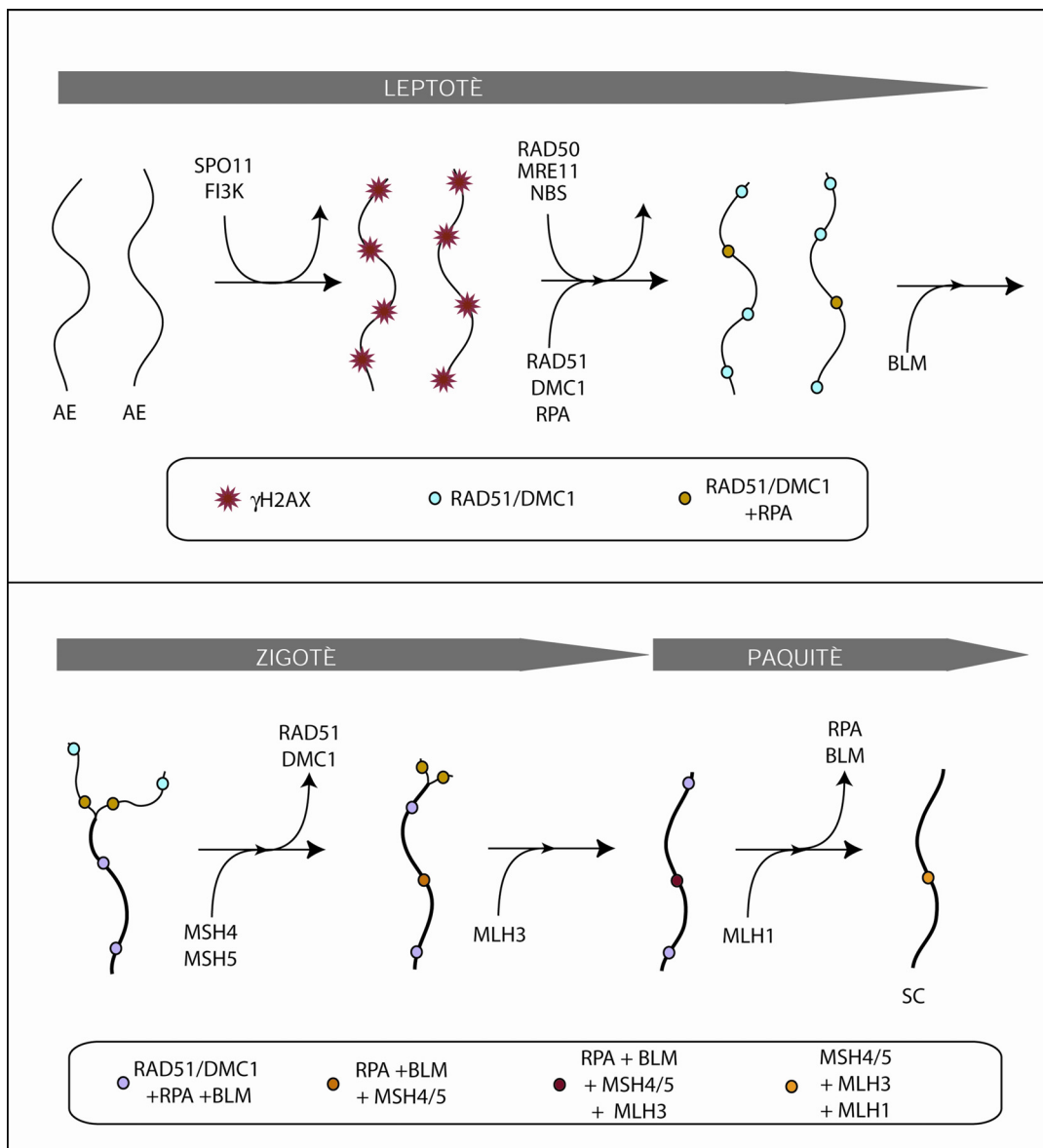


Figura 1.6. Evolució del procés de recombinació en espermatòcits de ratolí.

L'aparició de DSBs a l'estadi de leptotè posa en marxa el procés de reparació del DNA que, en alguns casos, però no tots, conclourà amb la recombinació entre els cromosomes homòlegs. En la resta, es produirà el fenomen de conversió gènica, que no implica intercanvi de material entre els homòlegs. El processament dels DSBs comença amb l'eliminació dels fragments 5' per l'activitat exonucleasa del complex RAD50/MRE11/NBS (Krogh and Symington 2004) (Figura 1.6, pàg. 29), deixant cadenes de DNA senzilles (ssDNA) amb terminacions 3'. Proteïnes homòlogues de RecA (Recombinase A d'*E. coli*), com RAD51 i DMC1, s'uneixen a la cadena senzilla de DNA (Ashley et al. 1995; Terasawa et al. 1995). Aquestes proteïnes s'agrupen formant cúmuls sobre els AEs i, posteriorment, sobre el complex sinaptinomal, que s'anomenen *foci*. En espermatòcits de ratolí, el nombre de *foci* de RAD51 i DMC1 presents a l'estadi de leptotè és d'uns 250. Aquest nombre és 10 cops superior al nombre de punts de recombinació, la qual cosa suggereix que es generen més DSBs que punts de recombinació, i per tant, la majoria d'aquests trencaments seran reparats sense necessitat per exemple de comportar un fenomen d'intercanvi de material entre els homòlegs (Ashley et al. 1995). Seguidament, en el mateix estadi de leptotè, la proteïna RPA (*replication protein A*), que és una altra proteïna d'unió al DNA de cadena senzilla, apareix als llocs on hi ha RAD51 i DMC1 (Plug et al. 1997). Al contrari del que passa amb RAD51 i DMC1, el nombre de *foci* de RPA té un màxim cap a mitjans de zigotè, i es troben fins a 250 *foci* per nucli d'espermatòcit de ratolí (Moens et al. 2001) i després va disminuint progressivament fins a desaparèixer a l'estadi de paquitè. Aquestes proteïnes, en la transició entre el leptotè i l'estadi de zigotè, promouen la invasió de la cadena senzilla de DNA dins de la doble hèlix de l'altre cromosoma homòleg, buscant el màxim grau d'homologia possible. L'associació de proteïnes sobre els cromosomes meiòtics formen els nòduls de recombinació, que en aquest estadi de la profase s'anomenen nòduls de recombinació primerencs.

En llevats, s'ha observat que abans que els homòlegs s'aparellin, aquests estan alineats i units entre ells per unes associacions que contenen

---

RAD51 i DMC1 (Hunter and Kleckner 2001). Aquesta observació sumada al gran nombre de *foci* de RAD51 i DMC1 que es troben en espermatòcits de ratolí (vegeu el paràgraf anterior) comparat amb els punts de recombinació, ha conduït a alguns autors (Moens et al. 1997; Tarsounas et al. 1999) a proposar que els acúmuls de RAD51, DMC1 i RPA participin també en la cerca d'homologia intervenint d'aquesta manera en el procés d'aparellament dels cromosomes homòlegs. Treballs recents fets en llevats (Borner et al. 2004), semblen ratificar aquest fet ja que suggereixen que l'inici de la sinapsi pot ser regida per les interaccions entre els dos homòlegs degudes als processos de reparació del DNA.

La reparació dels DSBs continuarà a l'estadi de zigotè, on se sintetitzarà DNA de reparació, còpia de l'altre cromosoma homòleg. Seguidament a l'estadi de paquitè, l'extrem sintetitzat serà capaç d'unir-se a l'extrem 5' del costat oposat del DSB i d'aquesta manera formarà una doble unió de Holliday (Svetlanov and Cohen 2004). Cap a finals de l'estadi de paquitè, aquesta unió es resoldrà (Page and Hawley 2004). I, depenent de com es resolgui, originarà recombinació, procés que implica intercanvi de material entre els homòlegs, o conversió gènica, que només comporta la còpia per part d'un homòleg de la seqüència de l'altre, sense intercanviar material entre ells.

### **1.3.2.1.3. Zigotè**

Durant l'estadi de zigotè es produeix l'aparellament i la sinapsi dels cromosomes homòlegs. Primerament, els homòlegs es disposen molt pròxims i alineats l'un al costat de l'altre, aquest procés es coneix com aparellament. Seguidament, en les regions aparellades entre els dos homòlegs apareix el complex sinaptinomal (SC) (Fawcett 1956; Moses 1956), d'aquesta manera es completa la sinapsi cromosòmica.

El SC és una estructura proteica tripartida formada per dos elements laterals (LEs, que són els AEs que apareixen a l'estadi de leptotè per cada cromosoma homòleg) i un element central (CE) que actua com de

cremallera unint els dos homòlegs (figura 1.4, pàg. 24). L'element central del SC està format bàsicament per SYCP1 (també anomenada SCP1, (Meuwissen et al. 1992)), tot i que recentment s'han descobert altres proteïnes que també formen part d'aquesta regió del SC, com ara FKBP6 (Crackower et al. 2003) i DIO2 (I. Prieto i J. L. Barbero, resultats no publicats). Els LEs estan compostes per les mateixes proteïnes que fan els AEs, és a dir, SYCP3, SYCP2 disposades sobre una base de cohesines.

La funció bàsica del SC és establir la unió entre els dos homòlegs a mesura que la profase meiótica progressa (Page and Hawley 2003). Tot i això, l'acció del SC no és universal, ja que en determinades espècies, com el llevat *S. Pombe*, aquesta estructura entre els homòlegs no s'organitza (Page and Hawley 2004).

Una altra funció del SC és participar en la maduració dels intermediaris de recombinació a punts d'entrecruament. Estudis recents proposen que el SC proporciona la conformació torcional necessària per permetre l'intercanvi entre els cromosomes homòlegs (Borner et al. 2004).

Els pocs estudis fets en oòcits de mamífers han permès observar que l'inici de l'aparellament és diferent en mascles i femelles. De manera anàloga al que s'ha observat en rata (Martínez-Flores et al. 2003), en espermatòcits humans la sinapsi comença bàsicament per les regions subtelo mèriques (Rasmussen and Holm 1978); mentre que en oòcits l'aparellament, tot i ser bàsicament subterminal, també és intersticial (Bojko 1983; Garcia et al. 1987). Una altra diferència de gènere que es pot observar en mamífers, i que pot tenir a veure amb la particularitat femenina esmentada anteriorment, és la diferent mida dels cromosomes en espermatòcits i en oòcits. Tant estudis de citogenètica clàssica, com estudis de mapatge genètic han demostrat que en els oòcits els cromosomes estan menys condensats que en els espermatòcits (Lynn et al. 2002; Martínez-Flores et al. 2003) amb tot el que aquest fet implica d'interrelacions heteròlogues, entrecruemants, etc.

També segons dades obtingudes a ratolí, el processat dels DSBs

---

continua durant l'estadi de zigotè (com es mostra a la figura 1.6, pàg. 29). La helicasa BLM (proteïna que quan muta causa la síndrome de Bloom) s'uneix als *foci* de RAD51, DMC1 i RPA. El nombre de *foci* de BLM incrementa durant l'estadi de zigotè fins a paquitè mitjà (Moens et al. 2000), mentre que a mesura que avança l'estadi de zigotè, els foci corresponents a RAD51 i DMC1 van desapareixent (Ashley and Plug 1998). En aquest estadi, a aquests nòduls de recombinació se'ls coneix com a nòduls de recombinació tardans. A aquests se'ls uneixen un heterodímer proteic de MSH4-MSH5 imprescindible per tal que el sistema de reparació de *mismatch* (MMR) actuï correctament en futurs estadis (Cohen and Pollard 2001). MSH4-MSH5, juntament amb altres proteïnes del sistema com MLH1 i MLH3 (vegeu l'apartat 1.3.2.1.4), que reconeixen anomalies de la doble hèlix del DNA (Kolas and Cohen 2004), estaran presents fins a l'estadi de paquitè.

En espermatòcits de ratolí, durant l'estadi de zigotè es troben sobre els AEs i els SCs dues quinases, ATM i ATR, que formen part de la família de quinases semblant a la FIKK (vegeu l'apartat 1.3.2.1.1), i que sembla que estan involucrades en processos de control de la progressió del cicle cel·lular. També en espermatòcits de ratolí s'ha intentat relacionar la localització d'ATM i ATR amb la seva funció en la profase meiòtica (Keegan et al. 1996; Moens et al. 1999; Baart et al. 2000), però de moment la seva funció no és del tot clara. Actualment, es creu que ATM és la proteïna que fosforila la histona H2AX (Fernandez-Capetillo et al. 2004) i inicia d'aquesta manera el processat dels DSBs durant la profase meiòtica, ja que ratolins deficients d'ATM (*knockout* d'ATM) presenten alteracions en la localització dels *foci* de RAD51 i DMC1 (Barlow et al. 1996), a més de problemes d'aparellament i un allargament significatiu de l'estadi de *bouquet* (Scherthan et al. 2000a).

Al ratolí mascle a l'estadi de paquitè, ATR es localitza preferentment en els cromosomes que triguen més a aparellar i en la vesícula sexual, el parell XY. Aquestes dades suggereixen que ATR podria exercir la funció de control de la progressió de l'aparellament dels homòlegs durant l'estadi de



zigotè (Keegan et al. 1996; Moens et al. 1999). Altrament i sense que sigui contradictori, un estudi recent (Perera et al. 2004) en el qual es descriu la colocalització d'ATR amb una altra proteïna involucrada en processos de replicació del DNA i que participa en l'activació dels *checkpoints* que controlen els danys al DNA, TOPBP1 (Mäkineniemi et al. 2001), suggereix que ATR, juntament amb TOPBP1, monitorarien la recombinació meiótica i serien necessaris per a l'activació del *checkpoint* de paquitè (vegeu l'apartat 1.3.2.1.4).

### **1.3.2.1.4. Paquitè**

En aquest estadi els cromosomes homòlegs estan completament sinapsats, és a dir, els homòlegs estan units per un SC, i formen els bivalents. En els mascles, els cromosomes sexuals, X i Y, tenen només dues petites regions d'homologia, les regions pseudoautosòmiques (PAR), per les quals s'aparellen.

A l'estadi de paquitè, s'acaba el procés d'intercanvi de DNA entre els homòlegs (figura 1.6, pàg. 29). En espermatòcits de ratolí s'ha observat que, en els nòduls de recombinació tardans, o nòduls meiótics, s'hi uneix la proteïna MLH3 (Lipkin et al. 2002). Aquesta és una proteïna del sistema de MMR (Kolas and Cohen 2004), que actua principalment formant un heterodímer amb altres membres d'aquest sistema de reparació, com MLH1, que s'uneix a MLH3 formant els nòduls meiótics (Baker et al. 1996). En aquest sentit, s'ha observat que MLH1 és un marcador de punts de recombinació, ja que estudis realitzats en espermatòcits de ratolí, estimulats amb àcid ocaidaic per fer progressar la profase meiótica fins a l'estadi de diplotè, es trobaven *foci* de MLH1 en els quiasmes (representació citològica del intercanvis existents entre els homòlegs observables únicament a l'estadi de diplotè, vegeu l'apartat 1.3.2.1.5.) (Marcon and Moens 2003).

Així doncs, el nombre de *foci* de MLH1 que apareixen per bivalent estaria relacionat amb la seva llargada. Ara bé, tots els bivalents han de

presentar almenys un punt de recombinació, la qual cosa fa que els SCs més petits presentin més punts de recombinació del que s'esperaria per la seva mida (Froenicke et al. 2002). En total, es troben de l'ordre de 24 *foci* de MLH1 en espermatòcits de ratolí (Baker et al. 1996; Froenicke et al. 2002) i uns 27 en oòcits de la mateixa espècie (M. Lenzi, A. Svetlanov, N.K. Kolas i P.E. Cohen, dades no publicades). Les diferències de gènere quant al nombre de punts de recombinació són presents en moltes espècies animals. En algunes espècies els espermatòcits tenen més punts de recombinació, per exemple en ovelles, mentre que en altres, són els oòcits els que presenten més, per exemple en gos o porc. A més a més, hi ha espècies en què els nivells de recombinació són semblants en ambdós gèneres, per exemple en vedells (Lynn et al. 2004).

Aquesta diferència de gènere també s'observa en humans. Anàlisis que s'han fet revelen que el nombre mitjà de *foci* de MLH1 en oòcits és superior al que es troba en espermatòcits. En espermatòcits es troben una mitjana de 51.6 *foci* per nucli (Barlow and Hultén 1998), mentre que en oòcits alguns estudis han observat una mitjana de 95 *foci* per oòcit (Barlow and Hultén 1998) mentre que en d'altres estudis, se'n citen uns 70.3 *foci* per cèl·lula (Tease et al. 2002). A més, la seva localització també sembla dependre del gènere. En espermatòcits, els punts de recombinació tendeixen a estar en posicions terminals, pròxims als telòmers, mentre que en oòcits, la majoria de *foci* de MLH1 observats són intersticials (Barlow and Hultén 1998; Tease et al. 2002).

Estudis fets amb ratolins *knockout* han posat de manifest l'existència d'un procés de control pel qual les cèl·lules que no han completat satisfactòriament la profase meiòtica no progressen. Aquest procés ja anomenat es coneix com a *checkpoint* de paquitè. En mamífers, les cèl·lules que activen el *checkpoint* entren en apoptosi i moren (Roeder and Bailis 2000). Sembla que els elements que poden activar el *checkpoint* de paquitè poden ser DSBs no reparats o altres intermediaris de recombinació (Hunt and Hassold 2002), tot i que sembla que, defectes en la sinapsi també hi poden intervenir (Roeder and Bailis 2000). En aquest cas, en mamífers,

també existeix una diferència de l'eficiència del procés en funció del gènere estudiat. El mateix tipus d'alteracions que en els mascles poden conduir a l'activació del *checkpoint* de paquitè i, per tant un bloqueig meiòtic, en les femelles poden no comportar una aturada ni un alentiment de la meiosi (Hunt and Hassold 2002). Això indica que l'oogènesi és més *robusta* que l'espermatogènesi, tot i que aquesta solidesa pugui tenir un cost, que, com s'ha vist a l'apartat 1.1, es pot traduir en un augment en la taxa d'aneuploidies (Hunt and Hassold 2002).

### **1.3.2.1.5. Diplotè-diacinesi**

A l'estadi de diplotè, els cromosomes homòlegs se separen i queden units pels quiasmes, i el SC es desorganitza (figura 1.5, pàg. 25). Tal com ja s'ha comentat, els quiasmes són la manifestació citològica dels llocs on hi ha hagut recombinació. El nombre de quiasmes i la seva localització en els bivalents són imprescindibles per a la correcta segregació dels cromosomes homòlegs durant la primera divisió meiòtica (Lynn et al. 2004).

En les femelles dels mamífers, la gametogènesi és discontinua (vegeu l'apartat 1.2.2). Aquest fenomen també afecta la divisió meiòtica. Així, els oòcits de mamífers queden aturats quan arriben a l'estadi especialitzat de diplotè, anomenat dictiotè, que pot durar fins a uns 50 anys en el cas dels humans. Durant aquest temps, tot i que la meiosi està interrompuda, l'oòcit no està quiescent (vegeu l'apartat 1.2.2); per anomenar alguns dels múltiples processos que tenen lloc durant aquest període, els cromosomes tenen una especial activitat transcripcional.

### **1.3.2.2. Metafase**

En aquest estadi l'embolcall nuclear desapareix, i els cromosomes homòlegs es disposen en la placa equatorial orientant els centròmers dels homòlegs cap a pols diferents. L'orientació cap al mateix pol dels

centròmers de les cromàtides germanes, al contrari del que passa en les divisions mitòtiques, és crucial per a la cosegregació de les cromàtides germanes de cada cromosoma i, per tant, per separar els cromosomes homòlegs al final de la primera divisió meiótica. Aquest procés sembla que és independent de la unió física que existeix entre els homòlegs.

La segregació dels homòlegs durant la metafase I depèn de tres factors:

1. Els homòlegs han d'estar units almenys per un quiasma.
2. Els cinetocors de les cromàtides germanes han de coorientar-se cap al mateix pol.
3. Les cromàtides germanes han d'estar unides mitjançant cohesines.

En aquest estadi també existeix un sistema de control, el *checkpoint* de la transició metafase-anafase. Aquest, és funcional en espermatòcits de mamífers alentint la transició entre la metafase i l'anafase si no es dona una correcta alineació de tots els bivalents a la placa metafàsica (Burke 2000). Sorprenentment, les poques dades que es tenen de femella fins al moment indicarien que aquest sistema de control no funcionaria correctament en els oòcits de mamífers, la qual cosa condueix a la producció d'aneuploidies amb més freqüència que en els mascles (Hunt et al. 1995; LeMaire-Adkins et al. 1997).

### **1.3.2.3. Anafase i telofase**

Durant l'anafase els homòlegs se separen, dirigint-se cadascun cap als pols oposats. Aquest procés està mitjançat per una proteïna, l'APC. L'activació d'aquesta comporta, a través de diferents efectors, la destrucció de REC8 del complex de cohesines dels braços dels cromosomes, i les cohesines només queden a les zones pericentromèriques de cada cromosoma. Això facilita la separació dels homòlegs, però impedeix la

separació de les cromàtides germanes.

Finalment, a la telofase els cromosomes es reagrupen a cadascun dels pols de la cèl·lula i es produeix la citocinesi, és a dir, la divisió de la cèl·lula en dues cèl·lules germanes. Les cèl·lules resultants són haploides, és a dir, cadascuna té 23 cromosomes, però encara cada cromosoma té dues cromàtides germanes.

Posteriorment, les cèl·lules poden entrar en una interfase molt breu, que des del punt de vista genètic es caracteritza per no tenir una fase S de replicació del DNA. En alguns casos, sobretot en femelles de mamífers, es pot donar una transició molt ràpida i directa des de la primera metafase fins a la metafase de la segona divisió meiòtica.

### **1.3.3. Segona divisió meiòtica**

La segona divisió meiòtica, que no presenta profase en femella humana, es caracteritza per ser una divisió anàloga a una mitosi, amb l'única particularitat que la cèl·lula que es divideix, en lloc de tenir 46 cromosomes amb dues cromàtides cadascun, en té 23. Així doncs, al final d'aquesta divisió s'obtenen normalment dues cèl·lules filles amb 23 molècules de DNA, és a dir haploides.

## Capítol 2

# Objectius



Oòcit a l'estadi de leptotè hibridat amb sonda WCP 13

Aquest treball continua la línia de recerca que des de finals dels anys vuitanta s'ha dut a terme a la unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona dirigida a l'anàlisi de l'oogènesi en mamífers; concretament en rata (Pujol et al. 1988; Cusidó et al. 1995; Martínez-Flores et al. 2001; Martínez-Flores et al. 2003) i en humans (Garcia et al. 1987; Garcia et al. 1989). Aquesta línia de recerca té com a objectiu central conèixer com es desenvolupa la profase meiòtica en els oòcits de mamífers.

A causa de les particularitats que presenta la gametogènesi femenina en mamífers (vegeu l'apartat 1.2), la major part de la recerca feta en meiosi de mamífers s'ha fet en espermatòcits. De manera que, fins molt recentment, i sistemàticament, s'han inferit les dades trobades en mascles per explicar la meiosi en femelles. Últimament, però, alguns autors han començat a reivindicar les particularitats de la meiosi femenina que la fan única i impossible d'entendre sense estudiar-la directament (Hunt and Hassold 2002).

A més a més, ja que en humans, la majoria de les aneuploïdies s'originen per errors en l'oogènesi (Hassold and Hunt 2001), i que els estudis meiòtics fets en oòcits humans són molt escassos, l'objectiu principal d'aquest treball ha estat caracteritzar, amb el major detall possible, el procés de l'aparellament i de sinapsi dels cromosomes homòlegs que es dona en la profase meiòtica en oòcits humans, amb la finalitat de poder relacionar els resultats trobats amb el que s'ha descrit en espermatòcits. S'esperaven poder trobar particularitats en el desenvolupament d'algun dels processos que intervenen en la profase meiòtica femenina que poguessin aclarir les grans diferències existents entre mascle i femella en l'origen de les aneuploïdies en humans.

Aquest objectiu general es va concretar en els punts següents:

- 2.1. Estudiar detalladament els processos que condueixen a l'aparellament i la sinapsi dels cromosomes homòlegs durant la profase meiòtica femenina a fi de caracteritzar-la el màxim possible.
- 2.2. Analitzar com es produeix l'aparellament i la sinapsi del cromosomes homòlegs en oòcits humans quan hi ha un cromosoma extra, és a dir, en oòcits aneuploides.
- 2.3. Desenvolupar un mètode de cultiu que promogui la progressió meiòtica dels oòcits facilitant d'aquesta manera l'estudi de la primera divisió meiòtica en oòcits humans.



## Capítol 3

# Materials i Mètodes



Oòcit a l'estadi de leptotè marcat mitjançant immunofluorescència  
SYCP3 (verd) i TIN2 (vermell)

### 3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

Atès que els primers estadis de la gametogènesi femenina es duen a terme durant el segon i tercer trimestre de gestació, per tal d'estudiar la profase meiòtica en oòcits humans s'han d'emprar ovaris fetals.

En aquest estudi s'han fet servir 33 mostres procedents de quatre centres: Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit Brussel de Brussel·les, la Clínica Tutor Mèdica de Barcelona, l'Hospital Clínic de Barcelona i de l'Hospital de la Vall d'Hebron, també de Barcelona. En tots els centres, les mostres han estat recollides prèvia autorització del Comitè d'Ètica de cada centre i el consentiment signat dels progenitors (taula 3.1, pàg. 46).

Les mostres han vingut d'avortaments terapèutics. De cada cas s'ha anotat el diagnòstic que permetia la interrupció de l'embaràs, així com l'edat de gestació, calculada per ecografia o per l'últim període menstrual. La mesura plantar de cada fetus també s'ha apuntat com a marcador de l'estat de desenvolupament fetal. A la taula 3.1 (pàg. 46) es detallen tots els casos que s'han fet servir per aquest treball experimental.

En aquells casos en què encara no es tenien dades sobre la localització d'una proteïna o de la dinàmica d'un determinat esdeveniment en mascle humà, a més de l'anàlisi en oòcits humans, també s'ha realitzat l'estudi en espermatòcits humans procedents d'un individu de fertilitat contrastada (Scherthan et al. 1996). Les mostres han estat recollides i processades pel grup de recerca liderat pel Dr. Harry Scherthan, del Max Planck Institute for Molecular Genetics de Berlin, Alemanya, seguint els protocols descrits en treballs publicats anteriorment (Scherthan et al. 2000b).

Cas	SG	MP	Diagnòstic	Cariotip
F3	17	-	Raó social	46,XX
F15	18	-	Síndrome de Down	47,XX,+21
T10	15	2.0	Raó social	-
T14	16	1.8	Raó social	-
C1	20	2.5	Síndrome de Turner	45,X0
C2	13	1.0	Síndrome de Down	47,XX,+21
C3	18	-	Síndrome d'Edwards	47,XX,+18
C4	15	1.9	Síndrome de Down	47,XX,+21
V44	21	3.3	Raó social	46,XX
V54	19	2.4	Cardiopatologia	-
V55	20	2.8	Polimalformat	-
V56	20	3.0	Anencefàlia	-
V57	19	2.5	Síndrome Arnold Chiari	-
V58	18	2.4	Síndrome de Down	47,XX,+21
V59	21	2.2	46,XX,del(9)(q31-qter)	46,XX,del(9)(q31-qter)
V60	19	-	Síndrome de Down	47,XX,+21
V61	22	3.7	Oligoamnios	-
V62	21	2.5	Síndrome d'Edwards	47,XX,+18
V63	20	2.6	Síndrome d'Edwards	47,XX,+18
V64	22	2.8	Transfusió fetofetal	-
V65	22	4.5	Transfusió fetofetal	-
V66	22	3.2	Síndrome de Turner	45,X0
V67	22	3.9	Transfusió fetofetal	-
V68	22	3.6	Transfusió fetofetal	-
V69	20	3.0	Alteració tub neural	-
V70	19	2.4	Síndrome d'Edwards	47,XX,+18
V80	22	3.5	Polimalformat	46,XX
V84	22	3.9	Polimalformat	46,XX
V93	19	2.8	Osteocondrodisplàsia	46,XX
V94	20	-	Alteració tub neural	46,XX
V98	19	3.2	Distròfia muscular	46,XX
V106	21	-	Encefalocele	46,XX
V107	19	-	Cardiopatologia	46,XX

Taula 3.1. Relació dels casos emprats per a la realització de l'estudi. SG: setmanes de gestació; MP: mesura plantar, expressada en centímetres. F: mostres d'*Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit Brussel*, T: mostres de la Clínica Tutor Mèdica, C: mostres de l'Hospital Clínic i V: mostres de l'Hospital de la Vall d'Hebron. -: sense dades.

## 3.2. MÈTODES

### 3.2.1. Obtenció dels ovaris

L'obtenció de la mostra s'ha dut a terme en les mateixes instal·lacions on es produïa la interrupció de l'embaràs. Normalment, els ovaris han estat recollits en menys de dues hores des de l'expulsió del fetus.

#### 3.2.1.1. Reactius i equip

- PBS (Sigma)
- Penicil·lina/estreptomycina (Gibco-Life Technologies)
- Criotubs (Nunc)
- Pinces de rellotger
- Bisturí
- Tisores de dissecció
- Sutura estèril (Sutures Aragó)

#### 3.2.1.2. Protocol

1. Farem una incisió a uns 2 cm per sobre de cada cresta ilíaca.
2. Accedirem a la cavitat abdominal.
3. Localitzarem i extreurem els ovaris.
4. Dipositarem els ovaris en PBS amb l'1% de penicil·lina/estreptomycina.
5. Suturarem les incisions.
6. Mesurarem la longitud de la planta del peu del fetus.

### 3.2.2. Processament dels ovaris

Un cop s'han obtingut els ovaris, aquests s'han traslladat als

laboratoris de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Unitat Docent de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, on es continua el processament de la mostra. De cada parell d'ovaris i en alguns casos, l'un s'ha destinat a l'extracció dels oòcits en fresc i l'altre s'ha congelat sencer per a ser analitzat posteriorment tal com es mostra a la figura 3.1, pàg. 49.

### 3.2.2.1. Reactius i equip

- Pipetes Pasteur
- Filtres de 22 µm (Milipore)
- Tubs cònics de centrifugadora
- Bisturí
- Pincas de rellotger
- PBS (Sigma)
- Isopentà (Fluka)
- Pot estèril de 50 ml
- Vidre de rellotger
- Microscopi estereoscòpic (Wild Heerbrugg)
- Centrifugadora (Janetzki)
- Agulles entomològiques
- Criotubs (Nunc)

### 3.2.2.2. Protocol

1. Rentarem els ovaris en un vidre de rellotger amb PBS estèril i filtrat.
2. Netejarem els ovaris de les restes de teixits adjacents en el microscopi estereoscòpic.
3. Transferirem els ovaris nets a un altre vidre de rellotger amb PBS estèril i filtrat.

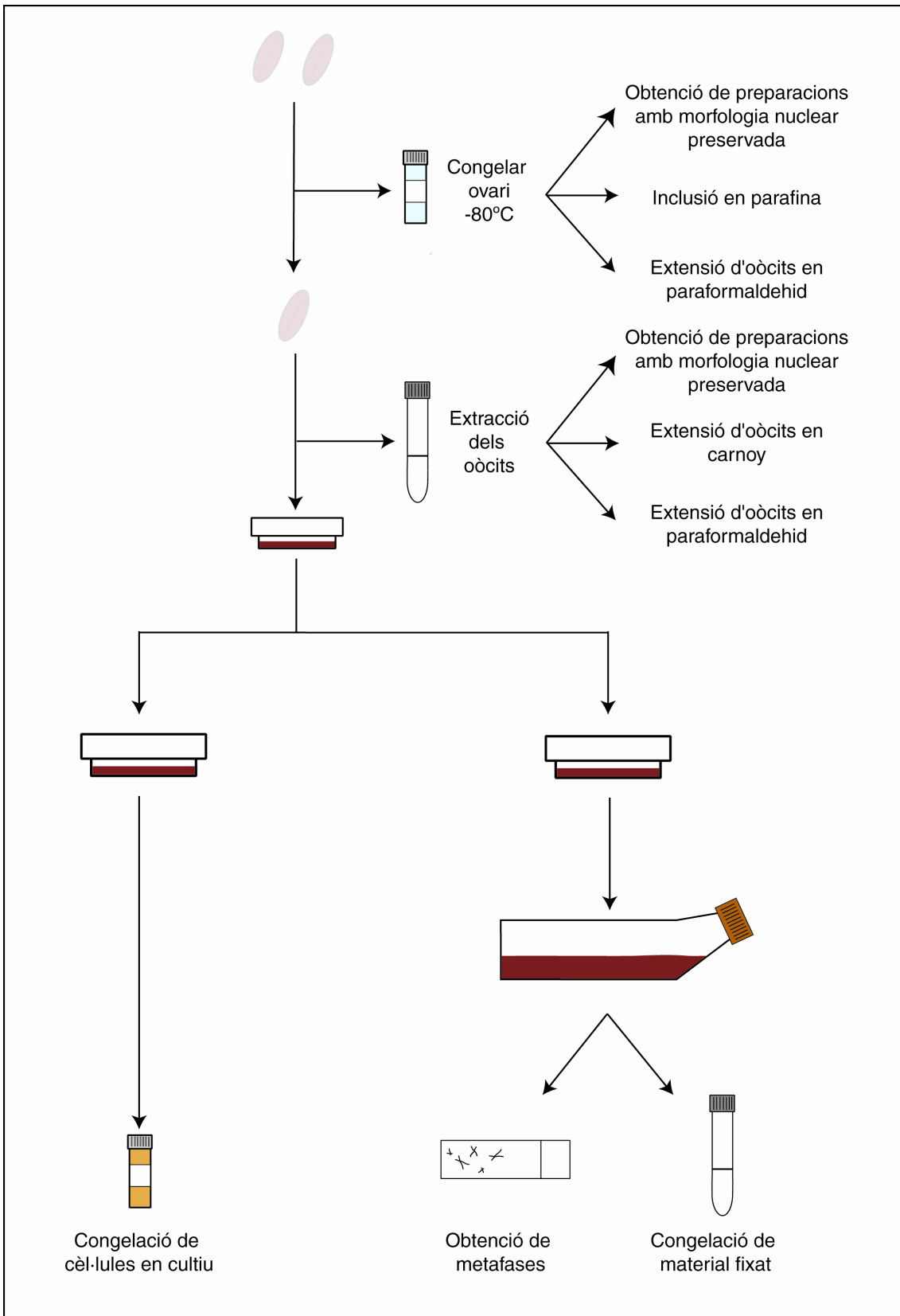


Figura 3.1. Processament habitual dels ovaris fetals al laboratori.

*Si l'ovari es destina a ser congelat, cal:*

1. Transferirem l'ovari a un pot amb isopentà a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
2. Un cop estigui congelat, el transferirem a un criotub rotulat.
3. Emmagatzemarem el criotub a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Si l'ovari es destina a l'obtenció d'oòcits en fresc, cal:*

1. Punxarem l'ovari amb agulles entomològiques.
2. Recuperarem el PBS i els transferirem a un tub de centrifugadora.
3. Afegirem més PBS i punxarem de nou l'ovari.
4. Recuperarem el PBS i els transferirem a un tub de centrifugadora.
5. Repetirem els punts 3 i 4 fins que no s'obtinguin més oòcits. (Mantindrem les restes d'ovari per tal de fer-ne un cultiu d'estroma ovàric; apartat 3.2.3).
6. Centrifugarem la solució cel·lular a 600 G durant 7 minuts.
7. Decantarem el sobrenedant.
8. Resuspendrem el botó cel·lular amb PBS filtrat.

### **3.2.3. Cultiu d'estroma ovàric**

Com que les mostres provenen d'avortaments terapèutics, la possibilitat d'emprar fetus amb anomalies cromosòmiques per caracteritzar el normal desenvolupament de la profase meiòtica en oòcits humans és elevada. Per evitar-ho, s'ha desenvolupat una tècnica de cultiu cel·lular que permet obtenir cèl·lules somàtiques en estadi de metafase a fi de cariotipar cada mostra que forma part de l'estudi i conèixer així la fórmula cromosòmica de cada cas. A la figura 3.1 (pàg. 49) es detalla l'estratègia seguida per obtenir material que permet conèixer el cariotip de cada cas.

### 3.2.3.1. Reactius i equip

- ❑ Pipetes Pasteur
- ❑ Filtres d'esterilització (Milipore)
- ❑ Tubs cònics de centrifugadora
- ❑ Portaobjectes (Knittel glaser)
- ❑ Plaques de Petri (Nunc)
- ❑ Flascons de cultiu (Corning)
- ❑ Bisturís
- ❑ Xeringues
- ❑ Puntetes per a micropipetes
- ❑ Pots estèrils de 50 i 100 ml
- ❑ Criotubs (Nunc)
- ❑ Carnoy (metanol:àcid acètic, 3:1)
- ❑ Clorur de potassi (KCl, Merck)
- ❑ Dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma)
- ❑ Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Life Technologies)
- ❑ AmnioMax™ (Gibco-Life Technologies)
- ❑ Tripsina (Difco)
- ❑ EDTA (Sigma)
- ❑ Sèrum fetal boví (FBS, Gibco-Life Technologies)
- ❑ KaryoMax® (Gibco-Life Technologies)
- ❑ PBS (Sigma)
- ❑ Incubador (Forma Scientific)
- ❑ Centrifugadora (Janetzki)
- ❑ Cambra de flux laminar (Telstar BH-100)
- ❑ Micropipetes (Eppendorf)
- ❑ Microscopi invertit (Olympus CK2 )

### 3.2.3.2. Protocol

1. Precalentarem el medi (AmnioMax™ ) i el PBS a 37°C.
2. Triturarem les restes de teixit ovàric (protocol 3.2.2.2) amb un bisturí amb 200 µl de PBS estèril per obtenir una suspensió



- cel·lular.
3. Recuperarem la suspensió cel·lular amb PBS i la transferirem a un tub de centrifugadora.
  4. Centrifugarem a 600 G durant 10 minuts.
  5. Llençarem el sobrenedant i resuspendrem el botó cel·lular en 0.75 ml de medi de cultiu AmnioMax™.
  6. Sembrarem la mostra en una placa de Petri petita.
  7. Deixarem a l'estufa a 37°C amb el 5% de CO<sub>2</sub> durant tres dies.
  8. Afegirem medi AmnioMax™ fins a un volum final de 2 ml.
  9. Controlarem diàriament l'evolució del cultiu.
  10. Quan assoleix la confluència, rentarem el cultiu amb PBS.
  11. Afegirem 1 ml de tripsina-EDTA.
  12. Observarem al microscopi invertit com es van desprenent les cèl·lules.
  13. Recollirem la solució cel·lular i la transferirem a un tub de centrifugadora.
  14. Hi afegirem 6ml de medi DMEM amb el 10% de FBS.
  15. Repetirem el procés si encara queden cèl·lules adherides a la superfície de cultiu.
  16. Centrifugarem durant 10 minuts a 600 G.
  17. Decantarem el sobrenedant.
  18. Resuspendrem el botó i ho diluïrem amb 6 ml de medi AmnioMax™.
  19. Sembrarem la mostra en dues plaques de Petri mitjanes (3 ml per placa).
  20. Controlarem l'evolució del cultiu.
  21. Quan un dels dos cultius assoleixi la confluència, el rentarem amb PBS.
  22. Afegirem 1 ml de tripsina-EDTA.
  23. Observarem al microscopi invertit com es van desprenent les cèl·lules.
  24. Recollirem la solució cel·lular i la transferirem a un tub de centrifugadora.
  25. Hi afegirem 6ml de medi DMEM amb el 10% de FBS.

26. Repetirem el procés si encara queden cèl·lules adherides a la superfície de cultiu.
27. Centrifugarem durant 10 minuts a 600 G.
28. Decantarem el sobrenedant.
29. Resuspendrem el botó i el diluïrem amb 6 ml de medi AmnioMax™.
30. Sembrarem la mostra en un flascó de cultiu mitjà.
31. Observarem l'evolució del cultiu.

Quan el cultiu assoleix la confluència, s'extreu per tal d'obtenir cèl·lules en estadi de metafase.

1. Afegirem KaryoMax® al cultiu (10 µl per cada 1 ml de medi).
2. Ho deixarem a l'estufa a 37°C durant 2-3 hores.
3. Rentarem el cultiu amb PBS.
4. Afegirem 1 ml de tripsina-EDTA a la placa.
5. Observarem al microscopi invertit com es van desprenent les cèl·lules.
6. Recollirem la solució cel·lular i la transferirem a un tub de centrifugadora.
7. Hi afegirem 6ml de medi DMEM amb el 10% de FBS.
8. Repetirem el procés si encara queden cèl·lules adherides a la superfície de cultiu.
9. Centrifugarem durant 7 minuts a 600G.
10. Decantarem el sobrenedant.
11. Resuspendrem el botó i hi afegirem una solució hipotònica de KCl 0.075 M gota a gota, tenint cura que no s'hi formin grumolls.
12. Deixarem que l'hipotònic actuï a 37°C durant 27 minuts.
13. Centrifugarem 7 minuts a 600 G.
14. Decantarem el sobrenedant.
15. Resuspendrem el botó i ho diluïrem amb carnoy fresc gota a gota, procurant que no es formin grumolls.
16. Centrifugarem 7 minuts a 600 G.
17. Decantarem el sobrenedant.
18. Rentarem dos cops més el botó cel·lular amb carnoy fresc.

19. Farem extensions en cambra humida.
20. Comprovarem la qualitat de les preparacions.
21. Congelarem les extensions i la solució a  $-20^{\circ}\text{C}$ , llevat que s'usi immediatament.

L'altre cultiu es reserva (figura 3.1, pàg. 49) per a ser congelat seguint el protocol següent:

1. Rentarem el cultiu amb PBS.
2. Afegirem 1 ml de tripsina-EDTA a la placa.
3. Observarem al microscopi invertit com es van desprenent les cèl·lules.
4. Recollirem la solució cel·lular i la transferirem a un tub de centrifugació.
5. Afegirem 6 ml de medi DMEM amb el 10% de FBS.
6. Repetirem el procés si encara queden cèl·lules adherides a la superfície de cultiu.
7. Centrifugarem durant 7 minuts a 600 G.
8. Decantarem el sobrenedant.
9. Resuspendrem el botó amb FBS amb el 10% de DMSO.
10. Transferirem la solució cel·lular a criotubs de 2 ml.
11. Emmagatzemarem a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant almenys 4 hores.
12. Transferirem els criotubs al tanc de nitrogen líquid.

### **3.2.4. Tinció de les preparacions de cèl·lules en estadi de metafase**

Amb la finalitat d'extreure el cariotip de cada cas, les preparacions obtingudes a partir del cultiu d'estroma ovàric s'han tenyit mitjançant la tècnica de bandes G descrita per Seabright (1971).

#### **3.2.4.1. Reactius i equip**

- Solució Wright (colorant Wright (Sigma): tampó Sorensen, 1:3)
- 20xSSC (NaCl 0.3M, citrat trisòdic 0.3M en aigua tridestil·lada)

- Aigua
- Bany (Precistern)
- Cubetes de vidre
- Pipetes graduades
- Microscopi de camp clar i fluorescència (Olympus AX70, Olympus Optical Co)
- Cytovision (Applied Imaging)

### **3.2.4.2. Protocol**

1. Envellirem les preparacions 2 o 3 dies a temperatura ambient.
2. Submergirem durant 5 minuts el portaobjectes en 2xSSC a 65°C.
3. Rentarem els portaobjectes amb aigua.
4. Deixarem assecar a l'aire.
5. Tenyirem la preparació amb solució Wright durant 3 minuts.
6. Rentarem els portaobjectes amb aigua.
7. Deixarem assecar a l'aire.
8. Observarem la preparació al microscopi de camp clar i capturarem les imatges desitjades.

### **3.2.5. Extensió d'oòcits en fresc per a l'anàlisi citogenètica**

Els oòcits extrets seguint el protocol descrit anteriorment (secció 3.2.2) s'han processat per a l'obtenció de preparacions per realitzar-hi tècniques de citogenètica molecular.

#### **3.2.5.1. Reactius i equip**

- PBS (Sigma)
- Clorur de potassi (KCl, Merck)
- Carnoy (metanol:àcid acètic; 3:1)
- Aigua tridestil·lada (MiliQ)
- Pipetes Pasteur

- Citocentrifugadora (Hettich)
- Portaobjectes (Knittel glaser)
- Cubetes de vidre
- Xeringues
- Filtres d'esterilització (Milipore)

### 3.2.5.2. Protocol

1. Precalentarem una solució hipotònica de KCl (0,88% en aigua tridestil·lada) a 37°C.
2. Muntarem els portaobjectes dins del complex per anar a la citocentrifugadora.
3. Afegirem vuit gotes de la solució hipotònica de KCl (0,88% a 37°C) i una gota de la suspensió cel·lular obtinguda en el punt 8 del protocol 3.2.2.2.
4. Deixarem reposar durant 25-30 minuts.
5. Citocentrifugarem a 115 G durant 15 minuts.
6. Deixarem reposar 10 minuts.
7. Alliberarem els portaobjectes del complex de citocentrifugació.
8. Deixarem reposar 10 minuts.
9. Immergirem 2 cops els portaobjectes en carnoy fresc durant 10 minuts.
10. Deixarem assecar a l'aire.
11. Congelarem els portaobjectes a -20°C fins a usar-los.

### 3.2.6. Amplificació i marcatge de sondes DNA

En determinats casos, s'han generat sondes per a ser aplicades en protocols d'Hibridació *In Situ* Fluorescent (FISH) a partir de DNA genòmic (sonda pan-centromèrica) o de DNA obtingut de YACs (Yeast Artificial Chromosome) seguint els protocols descrits per Weier et al. (1991) i Telenius et al. (1992) respectivament.

### 3.2.6.1. Reactius i equip

- ❑ Taq DNA polimerasa (Pharmacia)
- ❑ Encebador 6-MW:  
5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'
- ❑ Encebador WA1 i WA2:  
WA1 5'-GAAGCTA (A/T) (C/G)T(C/A)ACAGAGTT(G/T)AA-3'  
WA2 5'-GCTGCAGATC (A/C)C(A/C)AAG(A/T/C)AGTTTC-3'
- ❑ DNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP 2.5mM i dTTP 1.6mM) (Boehringer)
- ❑ Biotin-dUTP (Gibco)
- ❑ Cy3-dUTP (Amersham biosciences)
- ❑ Aigua tridestil·lada (MiliQ)
- ❑ 20x W1 (Sigma)
- ❑ DNA Cot-1 (Vysis)
- ❑ Etanol (Merck)
- ❑ Acetat de sodi (Merck)
- ❑ Tampó d'hibridació (Cambio)
- ❑ Termociclador (Biometra)
- ❑ Bany (Precistern)
- ❑ Eppendorfs
- ❑ Puntetes per micropipetes
- ❑ Micropipetes (Eppendorf)

### 3.2.6.2. Protocol d'amplificació, marcatge i precipitació de la sonda 18q subtelomèrica

L'amplificació i marcatge de la sonda de DNA s'ha fet usant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que empra com a encebadors oligonucleòtids degenerats (tècnica de la DOP-PCR) (Telenius et al. 1992).

1. Farem una mescla de PCR que contingui:
  - 100 ng de DNA del YAC que es vol amplificar i marcar.
  - 2,5 µl de 10x tampó de la taq DNA polimerasa.
  - 1,5 µl de dNTP-Mix.
  - 1 µl de dUTP marcat amb Biotina.

- 2,5 µl d'encebador 6-MW.
  - 1,25 µl de 20xW1.
  - 0,5 µl de taq polimerasa.
  - Afegir-hi aigua tridestil·lada fins a completar un volum final de 25 µl.
2. Farem la PCR en el termociclador seguint els cicles:
    - 1 cicle de 3 minuts a 94°C.
    - 30 cicles de 1 minut a 94°C, 1 minut a 62°C i 1,5 minuts a 72°C.
    - 1 cicle de 8 minuts a 72°C.
  3. Desarem el producte de PCR a -20°C fins que es faci servir.
  4. Barrejarem:
    - X µl del producte de DOP-PCR.
    - X µl de DNA Cot-1.
    - 6X µl d'etanol.
    - 2 µl d'acetat de sodi 3M.
  5. Ho deixarem almenys 90 minuts a -20°C.
  6. Centrifugarem a 10000 G durant 30 minuts.
  7. Decantarem el sobrenedant i assecarem completament el botó.
  8. Afegirem 2X µl de tampó d'hibridació.
  9. Ho deixarem 30 minuts a 45°C.
  10. Ho desarem a -20°C.

### **3.2.6.3. Protocol d'obtenció, amplificació i marcatge de la sonda pan-centromèrica**

L'obtenció de la sonda pan-centromèrica s'ha fet seguint el protocol descrit per Weier et al. (1991) en el qual es fan servir encebadors específics per amplificar les seqüències de DNA repetitiu  $\alpha$ , present en les regions centromèriques del tots els cromosomes.

1. Cal fer una mescla de PCR que contingui:
  - 100 ng del DNA genòmic total.
  - 2,5 µl de 10x Tampó de la taq polimerasa.
  - 1,5 µl de dNTP-Mix.

- 
- 1 µl de dUTP marcat amb Cy3.
  - 2,5 µl d'encebadors WA1.
  - 2,5 µl d'encebadors WA2.
  - 0,5 µl de taq polimerasa.
  - Afegir aigua tridestil·lada fins a completar un volum final de 25 µl.
2. Farem la PCR en el termociclador seguint els cicles:
    - 1 cicle de 3 minuts a 94°C.
    - 30 cicles de 2 minuts a 94°C, 1,5 minuts a 45°C i 2 minuts a 72°C.
  3. Desarem el producte de PCR a -20°C fins que es faci servir.
  4. Barrejarem
    - X µl del producte de DOP-PCR.
    - 6X µl d'etanol.
    - 2 µl d'acetat de sodi 3M.
  5. Ho deixarem almenys 90 minuts a -20°C.
  6. Centrifugarem a 10000 G durant 30 minuts.
  7. Decantarem el sobrenedant i assecarem completament el botó.
  8. Afegirem 2X µl de tampó d'hibridació.
  9. Ho deixarem 30 minuts a 45°C.
  10. Ho desarem a -20°C.

### **3.2.7. Hibridació *in situ* fluorescent sobre preparacions d'òcits fixats amb carnoy**

Per analitzar l'aparellament dels cromosomes homòlegs durant la profase meiótica s'ha utilitzat la tècnica de FISH fent servir llibreries de sondes que comprenen tot un cromosoma (Whole Chromosome Probe; WCP) i sondes que marquen regions específiques de determinats cromosomes (Locus Specific Identification probe, LSI).



### 3.2.7.1. Reactius i equip

- PBS (Sigma)
- Solució BT de bloqueig:
  - Aigua tridestil·lada (MiliQ)
  - 1,24% NaHCO<sub>3</sub> (Merck)
  - 0,05% Tween 20 (Sigma)
  - 0,2% Sèrum amb albúmina bovina (BSA, Sigma)
  - 0,2% Gelatina (Sigma)
- Clorur de magnesi (MgCl<sub>2</sub>, Merck)
- 1xPBD (detergent en tampó fosfat): carbonat sòdic (Sigma)/NP-40 (Sigma)
- Formaldehid (Panreac)
- Formamida (Scharlau)
- 20xSSC (Clorur de sodi 0,3M, citrat trisòdic 0,3M en aigua tridestil·lada)
- Tween 20 (Sigma)
- Etanol (Merck)
- DNA Cot-1 (Vysis)
- WCP 18 (Vysis i Cambio)
- WCP 13 (Vysis, Cambio i no comercial cedida pel Dr. R. Stanyon, NCI, EUA)
- LSI 13q14/21q22 (Oncor)
- LSI 18pter conjugada amb biotina (sonda no comercial; protocol 3.2.6.2)
- Avidina conjugada amb FITC
- Kit de detecció de biotina (Oncor)
- DAPI (Sigma)
- Vectashield (Vector)
- Aigua tridestil·lada (MiliQ)
- Cubetes
- Cobreobjectes (20x20 mm) (Menzer-glaser)
- Cambra humida
- Agitador

- Estufa (Shel lab)
- Centrifugadora (Eppendorf)
- Banys (Precistern)
- Pipetes Pasteur
- Pinces
- Puntetes per micropipetes
- Micropipetes (Eppendorf)
- Microscopi de fluorescència (Olympus AX70, Olympus Optical Co)
- Cytovision (Applied Imaging)

### 3.2.7.2. Protocol per a sondes WCP Vysis

1. Banyarem el portaobjectes (obtingut a l'apartat 3.2.5) en 2,3 ml de  $MgCl_2$  (1M) en 50 ml de PBS en agitació durant 5 minuts.
2. Fixarem 10 minuts el portaobjectes en 2,5 ml de  $MgCl_2$  (1M) i 1,5 ml de formaldehid en 50 ml de PBS en agitació.
3. Banyarem 5 minuts el portaobjectes en PBS en agitació.
4. Desnaturalitzarem el portaobjectes en 70% de formamida en 2xSSC a pH 7-7,2 a 70-71°C durant 3-3,5 minuts.
5. Deshidratarem la preparació en solucions d'etanol a -20°C (70%, 85% i 100%) 1 minut per a cadascuna.
6. Deixarem assecar el portaobjectes a l'aire.
7. Barrejarem 1 µl de sonda amb 2 µl aigua tridestil·lada i 7 µl de tampó d'hibridació.
8. Desnaturalitzarem la sonda a 73±1°C 5 minuts.
9. Afegirem 10 µl de sonda sobre la regió desitjada del portaobjectes.
10. Afegirem un cobreobjectes de 22x22mm.
11. Segellarem el cobreobjectes amb cola.
12. Hibridarem almenys 24 hores a 37°C en cambra humida.
13. Treurem el cobreobjectes.
14. Rentarem amb 0,4xSSC amb el 0,3% de Tween 20 a 73°C durant 2 minuts.
15. Rentarem amb 2xSSC amb el 0,1% de Tween 20 durant 1 minut.

16. Deixarem assecar a l'aire.
17. Afegirem 8 µl d'una solució que contingui 0,1 µg/ml de DAPI en Vectashield.
18. Observarem al microscopi de fluorescència i capturarem les imatges desitjades.

### **3.2.7.3. Protocol per a sondes WCP no comercials amb marcatge indirecte**

1. Barrejarem 2 µl de sonda amb 1 µl de DNA Cot-1 i 11 µl de tampó d'hibridació.
2. Desnaturalitzarem la sonda a 72°C durant 10 minuts.
3. Renaturalitzarem la sonda a 37°C durant 90 minuts.
4. Seguirem el protocol 3.2.7.2. fins al punt 6.
5. Afegirem 13 µl de sonda sobre la regió desitjada del portaobjectes.
6. Afegirem un cobreobjectes de 22x22mm i ho segellarem.
7. Ho deixarem hibridar almenys 24 hores a 37°C en cambra humida.
8. Treurem el cobreobjectes en 2xSSC a 45°C.
9. Rentarem amb 50% de formamida en 2xSSC a 45°C durant 2 minuts.
10. Rentarem amb 2xSSC a 45°C durant 2 minuts.
11. Rentarem amb PBD durant 2 minuts.
12. Afegirem 30 µl del 1er anticòs del kit de detecció de la biotina.
13. Incubarem a 37°C durant 15 minuts en cambra humida.
14. Rentarem dos cops durant 2 minuts en PBD en agitació.
15. Afegirem 30 µl del 2on anticòs del kit de detecció de la biotina.
16. Incubarem a 37°C durant 15 minuts en cambra humida.
17. Rentarem dos cops durant 2 minuts en PBD en agitació.
18. Afegirem 30 µl del 3er anticòs del kit de detecció de la biotina.
19. Incubarem a 37°C durant 15 minuts en cambra humida.
20. Rentarem dos cops durant 2 minuts en PBD en agitació.
21. Deixarem assecar.
22. Afegirem 8 µl d'una solució que contingui 0,1 µg/ml de DAPI en

Vectashield.

23. Observarem al microscopi de fluorescència i capturarem les imatges desitjades.

#### **3.2.7.4. Protocol per a sondes comercials Cambio juntament amb sondes LSI amb marcatge directe**

1. Cal seguir el protocol 3.2.7.2 fins al punt 6.
2. Desnaturalitzarem 10 µl de sonda WCP Cambio i 10 µl de sonda LSI a 75°C durant 5 minuts.
3. Afegirem 10 µl de cadascuna de les sondes sobre la regió desitjada del portaobjectes.
4. Afegirem un cobreobjectes de 22x22mm i ho segellarem amb cola.
5. Ho deixarem hibridar almenys 24 hores a 37°C en cambra humida.
6. Rentarem amb 50% formamida en 2xSSC a 45°C durant 7 minuts.
7. Rentarem amb 2xSSC a 45°C durant 5 minuts.
8. Rentarem amb 4xSSC amb el 0,05% de Tween 20 a 45°C durant 5 minuts.
9. Rentarem amb 4xSSC amb el 0,05% de Tween 20 a temperatura ambient durant 5 minuts.
10. Deixarem assecar a l'aire.
11. Hi afegirem 8 µl d'una solució que contingui 0,1 µg/ml de DAPI en Vectashield.
12. Observarem al microscopi de fluorescència i capturarem les imatges desitjades.

#### **3.2.7.5. Protocol per a sondes comercials Cambio juntament amb sondes LSI amb marcatge indirecte**

1. Cal seguir el protocol 3.2.7.2 fins al punt 6.
2. Desnaturalitzarem 10 µl de sonda LSI a 75°C 5 minuts.
3. Renaturalitzarem la sonda LSI a 37°C durant 30 minuts.

4. Mentrestant, desnaturalitzarem 10 µl de sonda WCP Cambio a 75°C durant 5 minuts.
5. Afegirem 10 µl de cadascuna de les sondes sobre la regió desitjada del portaobjectes.
6. Afegirem un cobreobjectes de 22x22mm i ho segellarem.
7. Ho deixarem hibridar almenys 24 hores a 37°C en cambra humida.
8. Rentarem amb 50% de formamida en 2xSSC a 45°C durant 7 minuts.
9. Rentarem amb 2xSSC a 45°C durant 5 minuts.
10. Rentarem amb 4xSSC amb el 0,05% de Tween 20 a 45°C durant 5 minuts.
11. Rentarem amb 4xSSC amb el 0.05% de Tween 20 a temperatura ambient durant 5 minuts.
12. Rentarem amb solució BT de bloqueig a 37°C durant 10 minuts.
13. Aplicarem 100 µl d'avidina conjugada amb FITC (1/150).
14. Incubarem durant 35 minuts a 37°C.
15. Rentarem tres cops amb solució BT de bloqueig a 37°C durant 10 minuts.
16. Afegirem 8 µl d'una solució que contingui 0,1 µg/ml de DAPI en Vectashield.
17. Observarem al microscopi de fluorescència i capturarem les imatges desitjades.

### **3.2.8. Obtenció de preparacions d'oòcits amb morfologia nuclear preservada**

A fi d'analitzar la dinàmica dels centròmers i de formació del complex sinaptonemal durant la profase meiòtica, s'ha usat una tècnica de fixació cel·lular que preserva l'estructura nuclear.

### 3.2.8.1. Reactius i equip

- ❑ Formaldehid (Merck)
- ❑ Triton X-100 (Sigma)
- ❑ PBS (Sigma)
- ❑ Glicina (Sigma)
- ❑ Glicerol (Sigma)
- ❑ PTBG:
  - PBS (Sigma)
  - 0.2% BSA (Sigma)
  - 0.2% Gelatina (Sigma)
  - 0.05% Tween 20 (Sigma)
- ❑ Portaobjectes Super Frost
- ❑ Puntetes per micropipetes
- ❑ Micropipetes (Eppendorf)
- ❑ Bisturí
- ❑ Cubetes
- ❑ Agitador

### 3.2.8.2. Protocol

(Treballarem a 4°C)

1. Tallarem un tros d'ovari congelat a -80°C sobre un portaobjectes Super Frost.
2. Disgregarem el material.
3. Afegirem 60 µl de PBS amb el 2% de formaldehid i el 0,05% de Triton X-100.
4. Estendrem la solució pel portaobjectes amb l'ajut d'una punta de pipeta.
5. Ho deixarem reposar 15 minuts.

(Treballarem a temperatura ambient)

6. Deixarem assecar fins que estigui pràcticament sec.
7. Rentarem 10 minuts en PBS amb el 0,5% de glicina.
8. Rentarem amb PTBG durant 10 minuts.
9. Farem una immunofluorescència (protocol 3.2.10.2) o

emmagatzemarem el portaobjectes submergit en PBS amb un 80% de glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.9. Extensió d'oòcits

Per observar i caracteritzar l'aparició i el desenvolupament durant la profase meiòtica de les proteïnes del complex sinaptonemal, així com de proteïnes involucrades en el procés de recombinació meiòtica, s'han fet servir mètodes per estendre al màxim els oòcits seguint els protocols descrits per Liebe et al. (2004) si partíem de mostres congelades o per Martínez-Flores et al. (2003) quan partíem d'ovaris en fresc.

#### 3.2.9.1. Reactius i equip

- ❑ Paraformaldehid (Aldrich)
- ❑ Formaldehid (Merck)
- ❑ Sacarosa (Merck)
- ❑ Triton X-100 (Sigma)
- ❑ Lypsol
- ❑ Borat de sodi (Merck)
- ❑ Agepon (Agfa)
- ❑ PBS (Sigma)
- ❑ Aigua tridestil·lada (MiliQ)
- ❑ Portes Super Frost
- ❑ Bisturí
- ❑ Puntetes per micropipetes
- ❑ Micropipetes (Eppendorf)
- ❑ Cubetes
- ❑ Agitador
- ❑ Citocentrifugadora (Hettich)

### 3.2.9.2. Protocol d'extensió d'oòcits a partir de mostres congelades

1. Tallarem un tros d'ovari congelat a  $-80^{\circ}\text{C}$  sobre un portaobjectes Super Frost.
2. Disgregarem el teixit (afegirem aproximadament 20  $\mu\text{l}$  de PBS si és necessari per què no s'assequi).
3. Repartirem aproximadament 5  $\mu\text{l}$  de la solució cel·lular obtinguda pel portaobjectes.
4. Afegirem 80  $\mu\text{l}$  d'una solució hipotònica que contingui un 1% de Lypsol en aigua (10-15 minuts).
5. Afegirem 90  $\mu\text{l}$  fixador (1% de paraformaldehid, 10% de borat de sodi 50 mM i 0,15% de Triton X-100 en aigua a  $\text{pH}=9,8$ ).
6. Assecarem durant almenys 2 hores en cambra humida (no completament tancada).
7. Rentarem 4 cops en 1% d'Agepon en aigua durant un minut.
8. Farem immunofluorescència (protocol 3.2.10.4.) o ho desarem a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.9.3. Protocol d'extensió d'oòcits a partir d'ovaris frescos

1. Afegirem un portaobjectes al complex de citocentrifugació.
2. Afegirem 0,5 ml d'una solució hipotònica de sacarosa 0,1 M i una gota de suspensió cel·lular (punt 8 protocol 3.2.2.2).
3. Centrifugarem a 115 G durant 10 minuts.
4. Treurem el complex de cintocentrifugació i deixarem reposar les preparacions en cambra humida durant almenys 2 hores.
5. Afegirem 0,6 ml de fixador (9% de formaldehid en aigua a  $\text{pH}=10$ ), 10 minuts en cambra humida.
6. Deixarem semiassecar els portaobjectes a temperatura ambient.
7. Rentarem 4 cops en 1% d'Agepon en aigua durant un minut.
8. Farem immunofluorescència (protocol 3.2.10.4.) o ho desarem a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



### 3.2.10. Immunofluorescència

La localització i aparició de determinades proteïnes al llarg de la profase meiótica han estat analitzades mitjançant tècniques d'immunofluorescència (IF).

#### 3.2.10.1. Reactius i equip

- Tween 20 (Sigma)
- Glicina (Sigma)
- Formaldehid (Merck)
- PBS (Sigma)
- PTBG:
  - PBS (Sigma)
  - 0,2% BSA (Sigma)
  - 0,2% Gelatina (Sigma)
  - 0,05% Tween 20 (Sigma)
- Anticossos primaris (dilució i condicions emprades):
  - Anti-MLH1 de ratolí (1/50, tota la nit a 4°C) (BD Pharmingen)
  - Anti-REC8 de ratolí (1/200, tota la nit a 4°C) (anticòs cedit pel Dr. J.L. Barbero, DIO/CNB, Espanya)
  - Anti-RPA de ratolí (1/100, tota la nit a 4°C) (Calbiochem)
  - Anti-TRF2 de ratolí (1/100, tota la nit a 4°C) (Abcam)
  - Anti-TIN2 de ratolí (1/100, tota la nit a 4°C o 3 hores a 37°C) (Imgenex)
  - Anti-SCP3 de conill (1/100, tota la nit a 4°C) (anticòs cedit per la Dra. C. Heyting, WAU, Holanda)
  - Anti-SCP1 de conill (1/100, 3 hores a 37°C o tota la nit a 4°C) (anticòs cedit per la Dra. C. Heyting, WAU, Holanda)
  - Anti- $\gamma$ H2AX de conill (1/100, tota la nit a 4°C) (Upstate)
  - Anti-ATR de conill (1/100, tota la nit a 4°C) (Abcam)
  - Anti-REC8 de conill (1/100, tota la nit a 4°C) (anticòs cedit pel Dr. J.L. Barbero, DIO/CNB, Espanya)

- Anticossos secundaris (tots són de Jackson ImmunoResearch Laboratories) (dilució i condicions emprades):
  - Anticonill FITC de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
  - Anticonill Cy5 de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
  - Anticonill Cy3 de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
  - Antiratolí FITC de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
  - Antiratolí Cy5 de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
  - Antiratolí Cy3 de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
  - Anticonill Cy5 de burro (1/1000, 35 minuts a 37°C)
  - Fragment Fab anticonill de cabra (1/100, 35 minuts a 37°C)
- DAPI (Sigma)
- Vectashield (Vector)
- Cobreobjectes (Menzel-glaser)
- Parafilm (Pechiney)
- Eppendorfs
- Cubetes
- Puntetes per micropipetes
- Micropipetes (Eppendorf)
- Centrifugadora (Janetzki)
- Agitador
- Estufa (Shel lab)
- Nevera
- Microscopi de fluorescència Olympus BX (Olympus Optical Co)
- Programari Smart Capture (Vysis)

### **3.2.10.2. Protocol per a preparacions fresques d'òcits amb morfologia cel·lular preservada**

1. Aplicarem l'anticòs primari (dilució i temps segons l'indicat a l'apartat de reactius, 3.2.10.1).
2. Rentarem 4 cops durant 3 minuts amb PTBG a 37°C en agitació.
3. Aplicarem l'anticòs secundari (dilució i temps segons l'anticòs usat, vegeu l'apartat 3.2.10.1).
4. Rentarem 4 cops durant 3 minuts amb PTBG a 37°C en agitació.

5. Fixarem el senyal amb un 1% de formaldehid en PBS durant 10 minuts.
6. Rentarem amb PBS amb el 0,5% de glicina en PBS durant 5 minuts en agitació.
7. Rentarem 10 minuts en PTBG a 37°C en agitació.
8. Afegirem 30 µl d'una solució que contingui 0,1 µg/ml de DAPI en Vectashield.
9. Ho observarem al microscopi de fluorescència i capturarem les imatges desitjades.

### **3.2.10.3. Protocol per a preparacions congelades en PBS amb el 80% de glicerol d'òocits amb morfologia cel·lular preservada**

1. Rentarem dos cops durant 5 minuts en PBS en agitació.
2. Rentarem durant 15 minuts en PTBG a 37°C en agitació.
3. Seguirem amb el protocol 3.2.10.2.

### **3.2.10.4. Protocol per a extensions fresques d'òocits**

1. Rentarem durant 10 minuts en PTBG a 37°C en agitació.
2. Seguirem amb el protocol 3.2.10.2.

### **3.2.10.5. Protocol per a extensions congelades a -20°C d'òocits**

1. Descongelarem el portaobjectes a temperatura ambient 2-3 minuts.
2. Rentarem 5 minuts en aigua.
3. Rentarem durant 10 minuts en PTBG a 37°C en agitació.
4. Seguirem amb el protocol 3.2.10.2.

### **3.2.11. FISH sobre portes tractats amb IF**

En alguns casos, a fi d'identificar algun cromosoma en concret, s'ha fet una hibridació *in situ* fluorescent sobre preparacions en que prèviament

s'havia practicat immunofluorescència, seguint el protocol descrit per Scherthan et al. (1996) amb lleugeres modificacions.

### 3.2.11.1. Reactius i equip

- ❑ Formamida (Scharlau)
- ❑ 20xSSC (NaCl 0,3M, citrat trisòdic 0,3M en aigua tridestil·lada)
- ❑ Tiocianat de sodi (NaSCN , Merck)
- ❑ Etanol (Merck)
- ❑ Sonda LSI 18qter (protocol 3.2.6.2.)
- ❑ Avidina conjugada amb FITC
- ❑ Aigua tridestil·lada (MiliQ)
- ❑ DAPI (Sigma)
- ❑ Vectashield (Vector)
- ❑ Bany (Precistern)
- ❑ Cambra humida
- ❑ Centrifugadora (Janetzki)
- ❑ Cubetes
- ❑ Puntetes per micropipetes
- ❑ Micropipetes (Eppendorf)
- ❑ Cobreobjectes (Menzel-glasser)
- ❑ Agitador

### 3.2.11.2. Protocol

1. Rentarem el portaobjectes durant dos minuts en aigua.
2. Deixarem assecar a l'aire.
3. Desnaturalitzarem el portaobjectes en 70% de formamida en 2xSSC a 70°C durant 5 minuts.
4. Rentarem un minut en aigua.
5. Aplicarem uns 100 µl de NaSCN 1 M al portaobjectes durant 3 hores en cambra humida a 65°C.
6. Deixarem assecar a l'aire.

7. Desnaturalitzarem el portaobjectes en 70% de formamida en 2xSSC a 70°C durant 5 minuts.
8. Deshidratarem el portaobjectes en solucions del 70%, 80% i 100% d'etanol a -20°C durant 1 minut en cadascuna.
9. Aplicarem la sonda prèviament desnaturalitzada (vegeu els punts 3-5, del protocol 3.2.7.5).
10. Hibridarem a 37°C almenys 72 hores en cambra humida.
11. Rentarem amb 0,05xSSC a 45°C en agitació durant 5 minuts.
12. Seguirem els punts 12-16 del protocol 3.2.7.5.

### **3.2.12. Inclusió d'ovaris en blocs de parafina**

A fi d'observar la situació dels centròmers i telòmers, així com la dinàmica d'aparellament cromosòmic durant la profase meiòtica s'han inclòs trossos de teixit ovàric en parafina, per al posterior processament de la mostra.

#### **3.2.12.1. Reactius i equip**

- Formaldehid (Merck)
- PBS (Sigma)
- 20xSSC (NaCl 0,3M, citrat trisòdic 0,3M en aigua tridestil·lada)
- Etanol (Merck)
- Pentà (Sigma)
- Parafina
- Portaobjectes Super Frost
- Motllos petits
- Pipetes Pasteur
- Eppendorfs
- Estufa (Shel lab)
- Bany (Precistern)
- Micròtom
- Placa calenta (Hybrit, Vysis)

### 3.2.12.2. Protocol

1. Fixarem un tros d'ovari durant 4 hores en 4% de formaldehid en PBS.
2. Rentarem 3 cops durant 5 minuts en PBS.
3. Rentarem 5 minuts en 1xSSC.
4. Deshidratarem el teixit amb banys successius de 30 minuts cadascun en solucions de 70%, 80% i 90% d'etanol.
5. Farem 3 banys de 10 minuts en etanol al 100%.
6. Submergirem la mostra durant 20 minuts en una solució a parts iguals d'etanol i pentà.
7. Submergirem la mostra en pentà durant 20 minuts.
8. Submergirem la mostra en una solució a parts iguals de pentà i parafina a 60°C durant 30 minuts.
9. Submergirem la mostra en parafina a 60°C durant tota la nit.
10. Abocarem la mostra amb nova parafina a 60°C dins un motllo.
11. Deixarem refredar la parafina.
12. Treurem el bloc de parafina del motllo, un cop estigui fred, i ho desarem a 4°C.
13. Tallarem el bloc fent seccions de 5 a 10 µm de gruix.
14. Dipositarem els talls en un bany d'aigua a 37°C.
15. Recollirem els talls sobre un portaobjectes.
16. Deixarem el portaobjectes al damunt d'una placa calenta durant unes hores.
17. Desarem les preparacions a temperatura ambient fins que s'hagin de fer servir.

### 3.2.13. FISH sobre talls de parafina

El processament de les preparacions amb talls de parafina s'ha fet seguint el protocol descrit per Scherthan et al. (1994) amb algunes variacions.

### 3.2.13.1. Reactiu i equip

- ❑ Xilol (Panreac)
- ❑ Isopropanol (Panreac)
- ❑ Etanol (Merck)
- ❑ Aigua tridestil·lada (MiliQ)
- ❑ Tiocianat de sodi (NaSCN, Merck)
- ❑ PBS (Sigma)
- ❑ 20xSSC (NaCl 0,3M, citrat trisòdic 0,3M en aigua tridestil·lada)
- ❑ Formaldehid (Merck)
- ❑ Pepsina (Sigma)
- ❑ Àcid clorhídric (HCl, Merck)
- ❑ Sonda PNA pan-telomèrica conjugada amb FITC (Dako)
- ❑ Sonda pan-centromèrica conjugada amb Cy3 (protocol 3.2.6.3)
- ❑ DAPI (Sigma)
- ❑ Vectashield (Vector)
- ❑ Puntetes per micropipetes
- ❑ Micropipetes (Eppendorf)
- ❑ Bany (Precistern)
- ❑ Estufa (Shel lab)
- ❑ Placa calenta (Hybrit, Vysis)

### 3.2.13.2. Protocol

1. Rentarem dos cops els portes en xilol a 60°C durant 5 minuts.
2. Rentarem amb isopropanol durant 5 minuts.
3. Hidratarem les preparacions amb banys successius de 5 minuts en 100%, 80% i 55% d'etanol en aigua tridestil·lada.
4. Rentarem amb aigua tridestil·lada durant 5 minuts.
5. Aplicarem al porta 100 µl de NaSCN 1 M a 60°C durant 1-2 hores en cambra humida.
6. Rentarem amb aigua tridestil·lada durant 5 minuts.
7. Rentarem amb 1xSSC durant 5 minuts.

8. Rentarem amb aigua tridestil·lada 5 minuts.
9. Digerirem en una solució de HCl (pH=2) a 37°C que contingui pepsina (1 mg/ml) .
10. Aturarem la digestió en PBS durant 5 minuts.
11. Fixarem la preparació en 1% de formaldehid en PBS.
12. Rentarem amb 0,05% de glicina en PBS.
13. Aplicarem 2 µl de la sonda desitjada sobre el tall histològic.
14. Hi posarem un cobreobjectes i ho segellarem amb cola.
15. Desnaturalitzarem el portaobjectes i la sonda alhora en una placa calenta a 75°C durant 5 minuts.
16. Deixarem hibridant a 37°C durant almenys 72 hores.
17. Rentarem la hibridació amb 0,05xSSC a 42°C durant 5 minuts.
18. Afegirem 30 µl d'una solució que contingui 0,1 µg/ml de DAPI en Vectashield.
19. Observarem al microscopi de fluorescència i capturarem les imatges desitjades.

### **3.2.14. Tècnica de cultiu d'ovaris fetals**

S'ha aplicat una tècnica de cultiu, descrita a continuació, amb la finalitat de facilitar l'estudi de la profase meiòtica en oòcits humans.

#### **3.2.14.1. Reactius i equip**

- Medi  $\alpha$ MEM (Gibco BRL)
- Medi L15 (Gibco BRL)
- Sèrum fetal boví (FBS, Sigma)
- Sèrum humà amb albúmina (HSA, Grifols)
- Dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma)
- Penicil·lina/estreptomicina (Gibco BRL)
- Insulina (Gibco BRL)
- Seleni (Gibco BRL)
- Transferrina (Gibco BRL)



- Medi de cultiu llarg:
  - $\alpha$ MEM
  - 2% HSA
  - 5 ng/ml insulina
  - 5  $\mu$ g/ml transferrina
  - 5 ng/ml seleni
  - 1% penicil·lina/estreptomicina
- Plaques cultiu òrgans (Falcon)
- Plaques cultiu teixit (Falcon)
- Tubs de 5 ml (Falcon)
- Estufa (Shel lab)
- Bany (Precistern)

### 3.2.14.2. Protocol per a trossos d'ovari congelats.

1. Prepararem el medi  $\alpha$ MEM amb 10% de FBS i l'equilibrarem a l'estufa a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
2. Treurem el criotub del tanc de nitrogen líquid.
3. Liquarem el tub en un bany a 39°C (màxim 1 minut).
4. Passarem el contingut del tub a medi L15 amb DMSO 1,5M en un bany de gel.
5. Transferirem els trossos d'ovari a medi L15 amb DMSO 1M durant 5 minuts.
6. Transferirem els trossos d'ovari a medi L15 amb DMSO 0,5M durant 5 minuts.
7. Transferirem els trossos d'ovari a medi L15 a 37°C durant 15 minuts.
8. Ho posarem en les plaques de cultiu d'òrgans amb medi  $\alpha$ MEM amb el 10% de FBS a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i deixar-ho tota la nit.
9. Prepararem el *medi de cultiu llarg* abans d'usar-lo i el deixarem equilibrant-se a l'estufa a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
10. Posarem un màxim de 4 trossos d'ovari per tub amb 5 ml de *medi de cultiu llarg* equilibrat, farem tants tubs com el doble de setmanes que es vulgui mantenir els ovaris en cultiu.

11. Ho deixarem a l'estufa a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
12. Passada una setmana, canviarem la meitat del medi de cultiu per medi fresc equilibrat.
13. Extreurem dos tubs per setmana de cultiu i processarem els ovaris en fresc o els congelarem a -80°C.

### **3.2.14.3. Protocol per a ovaris en fresc**

1. Netejarem l'ovari dels teixits adjacents.
2. Fraccionarem cada ovari en uns 10 trossos d'igual mida.
3. Barrejarem els trossos de tots dos ovaris.
4. Introduïrem el trossos d'ovari de dos en dos en els tubs de cultiu amb *medi de cultiu llarg* equilibrat anteriorment, farem tants tubs com el doble de setmanes que es vulgui mantenir el cultiu.
5. Separarem 4 trossos d'ovari per a l'anàlisi de la mostra a temps zero.
6. Continuarem el protocol 3.2.14.2 a partir del punt 11.

## Capítol 4

# Resultats



Oòcit a l'estadi de zigotè marcat mitjançant immunofluorescència  
SYCP1 (verd) i TIN2 (vermell)

Els resultats originats en aquest estudi han conduït a la producció dels següents treballs que han estat publicats en revistes científiques d'àmbit internacional, excepte un manuscrit que en el moment de dipositar la tesi és en període de revisió.

## 4.1.TREBALL 1

**THE USE OF FOETAL OVARIAN STROMAL CELL CULTURE FOR  
CYTOGENETIC DIAGNOSIS.**

**I. Roig, I. Vanrell, A. Ortega, Ll. Cabero, J. Egozcue i  
M.Garcia.**

**Cytotechnology (2003) 41:45-49.**

**Índex d'impacte (2001)=0.703**



## The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. Stromal ovarian culture cytogenetic diagnosis

I. Roig<sup>1</sup>, I. Vanrell<sup>1</sup>, A. Ortega<sup>1</sup>, Ll. Cabero<sup>3</sup>, J. Egozcue<sup>2</sup> and M. Garcia<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Servei de Ginecologia i Obstetrícia, Hospital Materno-infantil de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; \*Author for correspondence (e-mail: montserrat.garcia.caldes@uab.es; phone: +34 935 811 905; fax: + 34 935 811 025)

Received 7 August 2002; accepted in revised form 13 January 2003

**Key words:** Cell culture, Cytogenetics, Foetal stroma, Human oocyte, Karyotype, Meiotic prophase

### Abstract

Some studies have been carried out to analyze human female first meiotic prophase. Most of them use samples from fetuses collected after legal interruption of pregnancy. In some cases, a control population is needed and fetuses aborted for non-chromosomal reasons are used. The assumption of these samples as being euploids could perhaps represent an error. In this article, we describe an easy methodology to certify the euploidy of foetal ovarian tissue using an one-week somatic culture. Using this protocol, we have obtained a primary culture in 88.2% of the studied cases, material usable for being karyotyped in 93.3% of the cases, and a cytogenetic diagnosis was performed in 100% of these cases. Finding the same karyotype in cultured cells in cases in which we had a prenatal cytogenetic diagnosis has validated the technique, and in applying this protocol we have been able to check our prophase meiotic-study control population.

### Introduction

Aneuploidy is one of the most frequent causes of spontaneous abortions and newborns with severe anomalies. Chromosomal aneuploidy has an incidence of 0.3% in newborns (Hassold et al. 1996). It mainly originates before fecundation, during gametogenesis, due to meiosis non-disjunction. Although many differences in terms of maternal-origin percentage have been found regarding the analyzed chromosome (Zaragoza et al. 1994), most of the published studies mention a predominant maternal origin (Hansmann and Probeck 1979; Kupke and Müller 1989; Nöthen et al. 1993; Ya-gang et al. 1993; Zaragoza et al. 1994; Fisher et al. 1995; Eggermann et al. 1996; Bugge et al. 1998; Nicolaidis and Petersen 1998). The cause of this difference in parental-origin in the etiology of some aneuploidies has been a topic of discussion amongst geneticists involved in human reproduction.

To study first meiotic stages or the pairing process of homologous chromosomes in the human female is one way to know about these reasons and implies the use of foetal samples. Meiosis starts around the 12th gestational week and it is blocked when it arrives at the dictyotene stage, also during the foetal time-period. In the majority of the human female meiosis I studies performed, samples are collected from induced therapeutic abortions (Speed 1984; Garcia et al. 1987, 1989; Cheng and Gartler 1994; Cheng et al. 1995; Barlow and Hultén 1997a, 1997b, 1998; Cheng et al. 1998, 1999; Hartshorne et al. 1999; Tease et al. 2002). This means that most of the aborted fetuses have an anatomical, physiological, genetic or chromosomal abnormality. Because a control population is needed (Cheng and Gartler 1994; Cheng et al. 1995; Barlow and Hultén 1997a, 1998; Cheng et al. 1998; Hartshorne et al. 1999; Tease et al. 2002) fetuses aborted for non-chromosomal reasons are used as controls. To assume that fetuses aborted, due to

non-chromosomal reasons, are euploids could cause some errors in the definition of 'normality' by classifying cases which may not be 46,XX as normal.

The aim of this work is to develop a suitable and reproducible technique that would allow us to classify as euploid, samples about whose karyotype we knew nothing, using samples of ovarian tissue available after extraction of oocytes. Cases, where the karyotype was known, were used as controls to check the efficiency of this technique. In addition, the cultures were used to establish cryopreserved stocks of somatic cells for future studies.

## Materials and methods

### Biological material

For the present study 17 fetuses were used (Table 1), all of which were collected after ethical approval for interruption of pregnancy: with permission of the family and according to the Ethical Rules Committee from the *Hospital Vall d'Hebron* and the *Hospital Clínic* of Barcelona, Spain. Gestational age was calculated from the last menstrual period, where available, by foot length and by ecography. In 11 cases a prenatal cytogenetic diagnosis was known.

### Establishment of primary cultures

Ovaries were collected at the hospital in Phosphate Buffer Solution (PBS) 1% penicillin-streptomycin (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) within the first 6 hours after delivery and samples were transported within 30 min to the laboratory. The ovaries were dissected under sterile conditions from adjacent tissues and washed in PBS.

After extracting oocytes by needle puncture (Martínez Flores et al. 2003), the ovaries were disaggregated mechanically in PBS solution. The cellular solution was centrifuged for 7 min at 600 g and the supernatant removed. The cellular pellet was dissolved in pre-warmed AmnioMax™ medium (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) with and without 1% Fungizone (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) (Table 1) and 1.25 ml of the solution was cultured in a Petri dish (Nunc; Roskilde, Denmark) in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37 °C.

Evolution of the culture was observed every day under an Olympus CK2 inverted microscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany). On the second day of culture, new medium was added up to a final volume of 2.5 ml.

### Obtaining material for cytogenetic analysis

After 7–8 days of culture, confluence was reached

*Table 1.* Relation of the cases used to apply the protocol. Origin, foot length, gestation weeks, the culture medium, the therapeutic abortion reason and karyotype obtained from the study of the stromal ovarian culture are shown per each one. Note that in some cases prenatal karyotype was known.

Case	Foot length <sup>a</sup>	G.W.	Culture Medium	Clinical Diagnosis	Stromal Culture Karyotype
V54	2.4	19	AmnioMax™ 1% Fungizone	Cardiopathology	46,XX
V57	2.5	19	AmnioMax™	Arnold Chiari S.	46,XX
V58	2.4	18	AmnioMax™ 1% Fungizone	47,XX,+21	47,XX,+21
V59	2.2	21	AmnioMax™ 1% Fungizone	46,XX,del(9)(q31-qter)	46,XX,del(9)(q31-qter)
V60	–	19	AmnioMax™ 1% Fungizone	47,XX,+21	47,XX,+21
V61	3.7	22	AmnioMax™	Oligoamnios; 46, XX	46,XX
V62	2.5	21	AmnioMax™	47,XX,+18	47,XX,+18
V63	2.6	20	AmnioMax™	47,XX,+18	47,XX,+18
V64	2.8	22	AmnioMax™	Foeto-foetal transfusion	46,XX
V65	4.5	22	AmnioMax™	Foeto-foetal transfusion	46,XX
V66	3.2	22	AmnioMax™	45,X0	45,X0
V67	3.9	22	AmnioMax™	Foeto-foetal transfusion	46,XX
V68	3.55	22	AmnioMax™	Foeto-foetal transfusion	46,XX
C1	2.5	20	AmnioMax™ 1% Fungizone	45,X0	45,X0
C2	1	13	AmnioMax™ 1% Fungizone	47,XX,+21	–
C3	–	18	AmnioMax™ 1% Fungizone	47,XX,+18	–
C4	1.9	15	AmnioMax™ 1% Fungizone	47,XX,+21	–

V: samples from Hospital de la Vall d'Hebron. C: from Hospital Clínic. G.W.: Gestational Weeks. <sup>a</sup>Foot length measured in centimetres.

and the culture was then divided into two parts. A smaller portion (around 30%) was cultured in a Petri dish (Nunc; Roskilde, Denmark) to freeze the cells and the remainder was transferred to a Falcon culture bottle (Corning Coastor Corporation; Cambridge, USA) in order to obtain metaphase stage cells from which to obtain the karyotype. Twenty-four hours after the transfer, extraction of the culture was performed. KaryoMax® Colcemid (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) was first applied for a period of 2 hours to the Falcon culture bottle followed by extraction and processing to obtain metaphase-cell 'spreads' using conventional cytogenetic procedures.

#### *Preservation and recovery of somatic cells*

Once a confluent monolayer was achieved in the Petri dish, extraction of the secondary culture was performed and the cells obtained were suspended in Foetal Calf Serum (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) with 10% dimethyl sulfoxide (Sigma Chemical Co; St. Louis, USA) and aliquotted in cryotubes (Nunc; Roskilde, Denmark). These aliquots were placed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least four hours and then transferred to storage in liquid nitrogen.

Some frozen material was thawed in order to check the survival rate. A cryotube of frozen cellular suspension was thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  and DMEM medium (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) with 10% FCS was added to a final volume of 10 ml. After centrifugation, the cellular pellet was resuspended in fresh, pre-warmed AmnioMax™ (medium and cultured in 5%  $\text{CO}_2$ / 95% air at  $37^{\circ}\text{C}$ ).

The freezing protocol was applied in all cases in which a primary culture had been obtained. The thawing protocol was applied in 4 cases (V54, V57, V64 and C1) to check for survival of frozen cells.

#### *Karyology*

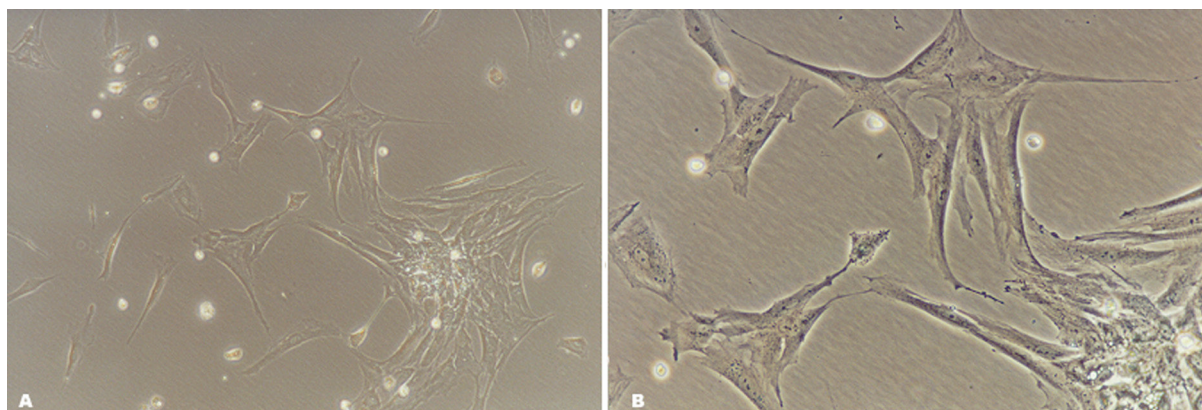
Slides were G-banded as described by Seabright (Seabright 1971) with slight modifications and analyzed in an Olympus AX70 brightfield photomicroscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany). Images were captured and produced by a Cytovision system (Applied Imaging; Sunderland, UK). At least 10 full karyotype cells were analyzed per case.

In some cases, FISH was performed to assess chromosomal abnormalities (V58) or to check chromosome morphology and particular banding pattern (V54), first found in G-banding analysis, using directly labelled whole-chromosome probes (Cambio; Cambridge, UK).

#### **Results**

Using the previously mentioned protocol, a primary culture was obtained from 15 ovaries out of 17 processed cases (88.2%) (Table 1). Morphology of the cultured cells was primarily fibroblast-like (Figure 1), although some round-shaped cells were present.

Material appropriated for karyology was obtained from 93.3% of the cultures performed. In addition a cytogenetic diagnosis was realized in 100% of the



*Figure 1.* Image of a cell culture from case V64, 2 days after thawing, at  $100\times$  magnification (A). Detail of a group of fibroblast-like cells at  $200\times$  magnification (B).



cases for which metaphase spreads were achieved (Table 1).

The efficiency with which primary cultures were obtained in the presence or absence of Fungizone showed significant differences. Efficiency of the culture technique appeared to be enhanced without Fungizone ( $\chi^2=4.098$ ,  $p=0.043$ ). However, other factors controlling primary culture establishment (see Discussion) could also explain these differences.

In general, a minimal cellular concentration of approximately 620,000 cells per milliliter was enough to initiate a primary culture. Attached cells were usually observed on the second or third day of culture. After one week of culture, a monolayer of attached fibroblast-like cells was present in the primary culture Petri dish covering approximately 90% of the surface.

The higher amount of cells in the metaphase stage was captured 24 h after the last transfer to the Falcon culture bottle and after applying colcemid treatment for 2 h.

In all cases in the trial a cryopreserved culture was established. In four cases (V54, V57, V64 and C1) the thawing protocol was applied, yielding a culture covering approximately 90% of the culturing surface in less than 4 d although some non-attached cells were present in the medium (Figure 1).

In all cases (V54 and V58) in which FISH was performed, the same results were achieved using G-banding analysis and chromosome painting.

## Discussion

This paper, describes for the first time a somatic culture protocol to obtain material for Karyology from ovarian stroma collected from foetal samples after legal interruption of pregnancy. This methodology is straightforward, reproducible and suggests that an exact karyotype may be obtained from samples whose chromosome complement is unknown. Although there is still a small risk of diagnostic error originating in the different embryologic origin of somatic ovary cell-lines and germ cells, knowledge of the karyotype from ovarian stromal cells minimizes possible misinterpretation caused by the presence of a mosaicism in cytogenetic studies performed in oocytes I.

The establishment and evolution of the culture are subject to common factors like quality of the sample, cellular density, pH, osmolarity, temperature, chromosome complement of the cultured cells, etc. In this

particular case, some of the more critical factors are cell density and specimen quality.

In order to obtain a successful primary culture a minimal cellular density is needed in order to allow cellular paracrine interactions to work. We have seen that a concentration of about 620,000 cells per milliliter is enough to establish a primary culture. We think this could be one reason to explain why we were unsuccessful in obtaining a primary culture from cases C2 and C4 (Table 1). The availability of a small amount of tissue, due to the early developmental stages, added to a division of the cellular suspension in several fractions in order to perform different kinds of culture techniques (data not shown), did not permit the minimal critical cell density required to establish primary cultures.

In terms of specimen quality, the time between delivery and processing of the sample is an important factor. The ovary, in the foetal stage, is porous and capable of absorbing surrounding solutions. Therefore, once the foetus is expelled, the ovary must be removed as quickly as possible to prevent it from coming into contact with internal solutions, which could damage it irreversibly. These observations agree with what is published announcing the freshness of the ovaries as a critical factor for obtaining a high hybridization efficiency rate in oocyte I when Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) is performed (Cheng and Gartler 1994).

The influence of the presence of Fungizone in the medium is not yet clear. It may seem that the fungicide could be toxic for some cultures, but the data presented here are not sufficient to confirm this. A variety of factors relating to specimen quality and *in vitro* culture may influence data from primary cultures. However, for the diagnosis of our meiotic prophase study samples, we have excluded Fungizone from the culture medium.

The identification of the same karyotype in cells from foetal ovarian stromal cultures and clinical cytogenetic diagnosis (V58, V59, V60, V61, V62, V63, V66 and C1) (Table 1) has enabled us to propose this technique as an easy way to detect the euploidy of samples which enter a female meiotic prophase study.

Using this protocol, we have been able to classify different cases as control, which had an anatomical anomaly (V54, V57, V64, V65, V67 and V68). In this sense, we believe that it is very important to be able to certify the euploidy of a sample in order to define how meiotic prophase takes place in 'wild type'. Moreover, this is the case when an interchromosomal effect

has been postulated to interact with the normal evolution of meiosis in some aneuploidy cases.

This protocol is a further step towards better understanding of what happens in female meiotic prophase. Other developmental, physiological and anatomical factors, which may affect the evolution of first meiotic stages, must be detected in order to increase our knowledge of human female meiotic prophase.

### Acknowledgements

We wish to thank Dr Vicenç Català, Dr Francisca Garcia and Ms Àngels Niubó for their technical assistance, and Dr Joan Antoni Vanrell from the Institut Clínic d'Obstetrícia, Ginecologia i Neonatologia, Hospital Clínic, for providing the samples. This work was carried out by the financial support from FIS 96/1992-02, Fundació Salut 2000-Ayudas Serono and SGR-00201. I. Roig is the recipient of a grant (AP2000) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

### References

- Barlow A.L. and Hultén M.A. 1997a. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I oocytes from normal human females. *Zygote* 6: 27–38.
- Barlow A.L. and Hultén M.A. 1997b. Sequential immunocytogenetics, molecular cytogenetics and transmission electron microscopy of microspread meiosis I oocytes from a human fetal carrier of an unbalanced translocation. *Chromosoma* 106: 293–303.
- Barlow A.L. and Hultén M.A. 1998. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6: 350–358.
- Bugge M., Collins A., Petersen M.B., Fisher J., Brandt C. and Hertz J.M. et al. 1998. Non-disjunction of chromosome 18. *Hum Mol Genet* 7: 661–669.
- Cheng E.Y., Chen Y.J., Bonnet G. and Gartler S.M. 1998. *Cytogenet Cell Genet* 80: 48–53.
- Cheng E.Y., Chen Y.J., Disteche C.M. and Gartler S.M. 1999. Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: non-homologous pairing in pachytene. *Hum Genet* 105: 191–196.
- Cheng E.Y., Chen Y.J. and Gartler S.M. 1995. Chromosome painting analysis of early oogenesis in human trisomy 18. *Cytogenet Cell Genet* 70: 205–210.
- Cheng E.Y. and Gartler S.M. 1994. A fluorescent *in situ* hybridization analysis of X chromosome pairing in early human female meiosis. *Hum Genet* 94: 389–394.
- Eggermann T., Nörthen M.M., Eiben B., Hofmann D., Hinkel K. and Fimmers R. et al. 1996. Trisomy of human chromosome 18: molecular studies on parental origin and cell stage of nondisjunction. *Hum Genet* 97: 218–223.
- Fisher J.M., Harvey J.F., Morton N.E. and Jacobs P.A. 1995. Trisomy 18: studies of the parental and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction. *Am J Hum Genet* 56: 669–675.
- García M., Dietrich M., Freixa L., Vink A.C.G., Ponsa M. and Egozcue J. 1987. Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum Genet* 77: 223–232.
- García M., Dietrich M., Pujol R. and Egozcue J. 1989. Nucleolar structures in chromosome and SC preparations from human oocytes at 1st meiotic prophase. *Hum Genet* 82: 147–153.
- Hansmann I. and Probeck H.D. 1979. The induction of non-disjunction by irradiation in mammalian oogenesis and spermatogenesis. *Mutat Res* 61: 69–76.
- Hartshorne G.M., Barlow A.L., Child T.J., Barlow D.H. and Hultén M.A. 1999. Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture. *Hum Reprod* 14: 172–182.
- Hassold T., Abruzzo M., Adkins K., Griffin D., Merrill M. and Millie E. et al. 1996. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28: 167–175.
- Kupke K.G. and Müller U. 1989. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 18. *Am J Hum Genet* 45: 599–605.
- Martínez Flores I., Cabero Ll., Egozcue J. and García M. 2003. Synaptic process in the rat (*Rattus norvegicus*): Influence of methodology on results. *Microsc Res Tech* 60: 450–457.
- Nicolaidis P. and Petersen M.B. 1998. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13: 311–319.
- Nörthen M.M., Eggermann T., Erdmann J., Eiben B., Hofmann D. and Propping P. et al. 1993. Retrospective study of the parental origin of the extra chromosome in trisomy 18 (Edwards syndrome). *Hum Genet* 92: 347–349.
- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II: 971–972.
- Speed R.M. 1984. Meiotic configurations in female trisomy 21 fetuses. *Hum Genet* 66: 176–180.
- Tease C., Hartshorne G.M. and Hultén M.A. 2002. Patterns of meiotic recombination in human oocytes. *Am J Hum Genet* 70: 1469–1479.
- Ya-gang X., Robinson W.P., Spiegel R., Binkert F., Ruefenacht U. and Schinzel A.A. 1993. Parental origin of the supernumerary chromosome in trisomy 18. *Clin Genet* 44: 57–61.
- Zaragoza M.V., Jacobs P.A., James S.R., Rogan P., Sherman S. and Hassold T. 1994. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet* 94: 411–417.

## 4.2.TREBALL 2

### **EVOLUTION OF THE MEIOTIC PROPHASE AND OF THE CHROMOSOME PAIRING PROCESS DURING HUMAN FETAL OVARIAN DEVELOPMENT.**

**I. Roig, P. Robles, R. Garcia, M. Martin, J. Egozcue, Ll.  
Cabero, S. Barambio i M. Garcia.**

**Hum. Reprod. (In press).**

**Índex d'impacte (2003)=3.125**

**Evolution of the meiotic prophase and of the  
chromosome pairing process during human fetal ovarian  
development.**

Running Title: **Chromosome pairing in human oocytes in prophase I**

Roig I.<sup>1</sup>, Robles P.<sup>1</sup>, Garcia R.<sup>1</sup>, Martin M.<sup>2</sup>, Egozcue J.<sup>1</sup>, Cabero Ll.<sup>3</sup>, Barambio  
S.<sup>4</sup> and Garcia M.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra (SPAIN).

<sup>2</sup> Unitat de Bioestadística, Dept. de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia  
i Medicina preventiva.  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra (SPAIN).

<sup>3</sup> Servei de Ginecologia i Obstetrícia,  
Hospital Materno-infantil de la Vall d'Hebron,  
08035 Barcelona (SPAIN).

<sup>4</sup> Tutor Mèdica  
Berguedà, 19  
Barcelona (SPAIN)

<sup>5</sup> **Corresponding author**  
Montserrat Garcia Caldés  
Unitat de Biologia  
Facultat de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra  
SPAIN  
Phone +34935811905  
FAX +34935811025  
Email [montserrat.garcia.caldes@uab.es](mailto:montserrat.garcia.caldes@uab.es)

## **SUMMARY**

**BACKGROUND:** Studies on human oocytes in prophase I are limited due to the difficulty of obtaining the sample. However, a complete study of meiotic prophase evolution and the homolog pairing process is necessary to try to understand oogenesis implication in the origin of human aneuploidy.

**METHODS:** In this paper a complete analysis of meiotic prophase progression comprising the long developmental time-period during which meiotic prophase takes place, based on the analysis of a total of 8603 oocytes in prophase I from 15 different cases is presented. The pairing process of chromosomes 13 and 18 is also described.

**RESULTS:** Results significantly relate for the first time the evolution of the meiotic prophase to fetal development. Although for both chromosomes 13 and 18 a high pairing efficiency is found, pairing failure at the pachytene stage has been observed in 0.1% of oocytes. However, errors at the diplotene stage are substantially increased, suggesting that complete, premature disjunction of the homologs commonly occurs. Moreover, pre-meiotic errors are also described.

**CONCLUSIONS:** Our findings show that homologous chromosomes pair very efficiently, but the high frequency of complete, premature homolog separation found at diplotene suggests that mechanisms other than the pairing process could be more likely to lead to the high aneuploidy rate observed in human oocytes.

**KEY WORDS:** human oocytes, fetal development, meiosis, aneuploidy and synapsis.

## INTRODUCTION

Gametogenesis implies the reduction of the chromosome complement to haploidy, to restore diploidy after fertilization. This process is accomplished by meiosis, in which the search for homology, recognition and exchange of genetic material occurs between homologous chromosomes.

In the human female, meiosis starts during the fetal stage. Therefore, samples are seldom available. For this reason studies performed in human oocytes in prophase I have been scarce. However, the involvement of oogenesis in the origin of aneuploidy is crucial (Hassold and Hunt, 2001). Several researchers have studied the early meiotic stages in human female gametogenesis using classical approaches (Ohno *et al.*, 1962; Baker, 1963; Blandau, 1969; Kurilo, 1981; Bojko, 1983; Speed, 1985; Garcia *et al.*, 1987; Garcia *et al.*, 1989), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (Cheng and Gartler, 1994; Cheng *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1999; Cheng and Naluai-Cecchini, 2004) and more recently, immunofluorescence (IF) (Barlow and Hultén, 1997; Hartshorne *et al.*, 1999; Tease *et al.*, 2002; Roig *et al.*, 2004; Lenzi *et al.*, 2005; Roig *et al.*, 2005). These studies have allowed the observation of diverse female meiotic particularities which may be responsible for the high rate of chromosome non-disjunction found in human oocytes.

The main goal of this study is to analyze meiotic prophase over a long period of fetal developmental to characterize meiotic prophase timing in

depth. Synapsis of chromosomes 13 and 18 has also been studied in human oocytes.



## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Biological material***

For the present study, 15 fetuses were used (Table I), all of them collected after legal interruption of pregnancy. Informed consent was obtained from the parents according to the Ethical Rules Committee of the Hospital Vall d'Hebron and Clínica Tutor Médica, Barcelona, Spain. Gestational age was calculated based on the last menstrual period, foot length and echography, when available.

### ***Oocyte spreading***

Ovaries were collected at the hospital in Phosphate Buffer Solution (PBS) with 1% penicillin-streptomycin (Gibco-Life Technologies; Paisley, UK) within the first 6 hours of delivery and transported within 30 minutes to the laboratory. Under sterile conditions, ovaries were dissected from adjacent tissues and washed in PBS.

Spreading of the oocytes was performed as previously described (Roig *et al.*, 2005). In order to know the karyotype of the sample, in most of the cases (12/15) a somatic culture of the stromal ovarian tissue was performed after extracting the oocytes, following the protocol set up in our laboratory (Roig *et al.*, 2003).

### ***Fluorescent “in situ” Hybridization***

Chromosome painting was performed in all cases using different commercial (Vysis; Groove, USA, and Cambio; Cambridge, UK) and non-commercial

(kindly donated by Dr. R. Stanion) whole-chromosome 13 and 18 probes and Locus Specific Identification (LSI) probe 13/21 (Oncor; Gaithersburg, USA). Hybridization protocol was performed as described in a previous, published study (Roig *et al.*, 2005). DNA was counterstained applying an antifade solution (Vector Laboratories; Peterborough, UK) containing 0.1 $\mu$ g/ml of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma; Tres Cantos, Spain).

Oocytes were sub-staged according to morphological criteria described in previous articles (Garcia *et al.*, 1987; Roig *et al.*, 2005). In summary, at leptotene, oocytes start condensation and individualization. At the zygotene stage, homologs pairing starts and thickening of the bivalents is visible where synapsis is completed. At pachytene, bivalents are completely paired, and thus they appear thicker than in the rest of the stages. Finally, at diplotene, homologs separate and remain close only joined by the chiasmata.

### ***Microscopy and Image Analysis***

Slides were analyzed in an Olympus AX70 fluorescent photomicroscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany). Images were captured and produced by a Cytovision system (Applied Imaging; Sunderland, UK), and were processed using Adobe Photoshop for publishing purposes.

## RESULTS

### ***Ovarian culture reveals a euploid karyotype of the cases studied.***

In all cases where an ovarian culture was set up (Table 1), a euploid karyotype (46,XX) was obtained, validating these cases as chromosomally normal in order to be used as controls to study the normal meiotic progression and homolog synapsis in human oocytes in prophase I.

### ***Meiotic prophase progresses as the ovary develops.***

In this study, fetal foot length was used as a developmental marker. For fetuses aged between 15 and 22 weeks of gestation, foot length ranged from 1.8cm to 4.5cm (Table 1 and Figure 1).

The proportion of meiotic prophase substages was scored for each case on the basis of morphological criteria described before (see above). In total, 8603 oocytes were analyzed. Oocytes at the different stages of meiotic prophase were found in all cases, except for T10, where there was an absence of oocytes at the diplotene stage (Fig 1.) Results, shown in Figure 1, clearly demonstrate that the values obtained for each meiotic prophase substage can be significantly related to the fetal developmental stage. Thus, in this particular time-frame, the leptotene percentage significantly follows an inverse correlation to foot length (Fisher  $F=31.208$ ;  $p=0.0001$ ) leading to a decrease of the leptotene proportion as the ovary develops. The pachytene stage significantly increases with time, adjusting to a cubic plot ( $F=12.544$ ;  $p=0.0007$ ), achieving a maximum percentage at the end of the period analyzed, around 4.5 cm foot-length. Diplotene stage percentages

also increase with time, but following a logarithmic curve ( $F=10.402$ ;  $p=0.0066$ ), suggesting that the maximum percentage of the diplotene stage in meiotic prophase does not coincide with this time-frame.

Zygotene proportions are similar in all cases analyzed; percentages range from 19% to 34%. However, zygotene figures do not significantly adjust to any curve. Nevertheless, the best correlation is obtained using a quadratic curve ( $F=1.778$ ;  $p=0.2106$ ). According to this correlation, a maximum proportion of zygotene cells is found when the fetus foot length is around 3cm, coinciding with the decrease of the leptotene-stage proportion and the increase of the pachytene-stage proportion.

### ***Chromosome-13 and -18 pairing distribution throughout meiotic prophase.***

In cases T14, T10, V54, V56, V44 and V61, the pairing process of chromosomes 13 and 18 was analyzed in a total of 4885 oocytes (Figure 2 and Table 2).

For chromosome 13, at leptotene, 92% of the oocytes have two separate chromosomes (two chromosome 13 signals)(Figs. 2A-B); the remaining 8% of the studied oocytes at this stage had an already-paired bivalent 13 (one chromosome 13 signal).

At zygotene, 41% of the oocytes had two separate chromosome 13s (Fig. 2C), while the other 59% had an already-paired or a still-pairing bivalent 13 (one signal)(Fig. 2D). At pachytene, almost all oocytes showed a bivalent 13 (Fig. 2E). However, we found one oocyte out of 1231, representing 0.1% of the studied pachytenes, in which both chromosome 13s failed to pair. At

diplotene, all oocytes studied had a desynapsing bivalent 13 (recorded as a single signal in Table 2)(Fig. 2F).

Chromosome 18 results were not statistically different from the ones obtained for chromosome 13, with the exception of the leptotene stage in which 86% of the analyzed oocytes had two separated chromosome 18s, 13% an already-paired bivalent 18 and, surprisingly, 0.6% had three chromosome 18s. These results are significantly different from those described before for chromosome 13 ( $\chi^2=12.757$ ;  $P=0.002$ ). At zygotene, 37% of the oocytes had two separated chromosome 18s, while the majority (63%) had an already-paired bivalent 18. At pachytene 99.8% of the oocytes had a bivalent 18, while 0.2% failed to produce the bivalent. No trisomic oocytes were observed at this stage. At diplotene, 97% of the oocytes showed a desynapsing bivalent 18, and 3% had two separated chromosome 18s.

### ***Chromosome 13 pairing-process dynamics***

Once chromosome 13 distribution through the meiotic prophase had been analyzed, the dynamics of the chromosome-13 pairing process during the zygotene stage was studied in depth. Thus, we classified how chromosome 13s behaved during the zygotene stage in all cases studied. Oocytes with two separated chromosomes 13 (unpaired) were found (Fig. 2C), some in which chromosome 13 synapsis had started (the synapsed portion of the chromosome was less than half; these were classified as “started pairing” in Table 3), some in which synapsis had almost finished (Fig. 2D), and finally oocytes with a completely paired bivalent 13. Results, presented in Table 3,

show that there is no relationship between the pairing process and foot length or percentage of oocytes at the zygotene stage.

## DISCUSSION

In this paper, results covering most of the developmental frame in which human female meiotic prophase takes place are presented. The range of samples used in this study was defined for the accessible material. The low availability of fetuses younger than 15 weeks and the legal limitation existing in Spain to interrupt pregnancy within the first 22 weeks of gestation limited the developmental frame in which the study was performed.

Data presented in this study can be extremely useful as a guide to understand how meiotic prophase evolves in the human ovary during fetal development. Moreover, this is the first study in which a statistically significant relationship between distribution of meiotic prophase substages in the ovary can be related to the fetal developmental stage. In this sense, foot length, instead of gestational age, was found to be a better marker for fetal developmental stages (see above). Although most of the samples had pathologies, all fetuses were found to follow a normal fetal development (data not shown).

In the developmental frame studied herein, the proportion of leptotene tends to decrease from 49.5% to 12%. Absence of leptotene oocytes was not detected in any ovary, suggesting that initiation of meiosis starts before the 15th week of gestation, in agreement with previous studies where leptotene was first found at around 11-12 weeks of gestation (Ohno *et al.*, 1962; Baker, 1963; Garcia *et al.*, 1987). Our data also suggest that

leptotene oocytes are still present beyond the 22nd week of gestation, as suggested before (Speed, 1985; Baker *et al.*, 1996).

The proportion of zygotene oocytes tends to be similar in all developmental times studied, ranging from 20% to 35%, with a slight tendency to achieve a peak at around 20-21 weeks of gestation. For this reason, no significant statistical correlation was found between the zygotene-stage proportion and the fetal developmental stage. On the contrary, the pachytene-stage proportion was clearly found to increase with foot length. In young fetuses, the pachytene proportion was low (around 25%); in older ones the proportion reached 58.5%. These figures suggest that the first pachytene oocytes can be observed before 15 weeks of gestation, in agreement with what has been published (Ohno *et al.*, 1962; Baker, 1963; Garcia *et al.*, 1987). Results also suggest that the maximum pachytene proportion is not achieved in this developmental frame, in contrast with Baker (1963), who described this phenomenon at the fifth month of gestation (around 21-22 weeks). This point would be clarified if studies in older fetuses could be performed. However, the need of collecting samples as fresh as possible, because this is a critical factor to obtain informative preparations, prevents us from working with spontaneous abortions.

Surprisingly, diplotene-stage oocytes were commonly found in the present study, even in young fetuses, in contrast with what had been published before (Ohno *et al.*, 1962; Baker, 1963; Wallace and Hulten, 1985). The diplotene-stage proportion in the time-period analyzed is always low (around 10%), but a significant progression can be observed with the fetal developmental stage, increasing from 2% to 10%. Our results imply that



the first diplotene oocytes would appear around the 15th-16th week of gestation, in agreement with a previous study (Garcia *et al.*, 1987), but in contrast with other studies in which the first diplotene oocytes were seen at the 17th (Baker, 1963), 18th (Wallace and Hulten, 1985) and 19th gestation weeks (Speed, 1985).

Results obtained in this study and in the other published studies (Ohno *et al.*, 1962; Baker, 1963; Speed, 1985; Wallace and Hulten, 1985; Garcia *et al.*, 1987; Cheng and Gartler, 1994) show a high heterogeneity of meiotic prophase evolution related to fetal age. This can be easily explained if we take into account that most of the studies are performed on therapeutically aborted fetuses, which may have a developmental delay due to their pathology. However, if an objective parameter that describes fetal developmental progression, like foot length, is used, a better statistical correlation between meiotic prophase substages and fetal development can be achieved. Nevertheless, inter-individual differences have been clearly observed in this study, as demonstrated by the different meiotic prophase-stage proportions found in cases V55 and V64, or cases V84 and V67, which have the same foot length (Figure 1).

The pairing process of chromosome 13 was studied in detail because it causes the third most common autosomal trisomy in live births, and a complete analysis of this chromosome-pairing process during meiotic prophase had not been previously performed. The meiotic pairing process of chromosome 18, however, has been published (Cheng *et al.*, 1995); thus, this chromosome was chosen as a marker in order to compare data obtained in our laboratory with previously published data.

The pairing process of chromosomes 13 and 18 demonstrates the existence of a high pairing efficiency, coinciding with what has been reported in studies that used FISH (Cheng and Gartler, 1994; Cheng *et al.*, 1998), but in contrast with other observations in which synaptonemal complexes (SC) were analyzed (Speed, 1985). Differences found between these studies may be due to the different technical approaches used.

For both chromosomes 13 and 18, pairing was observed to start during the leptotene stage (Table 2). This phenomenon, which has already been described for chromosome 18 (Cheng *et al.*, 1995), confirms a recent study that found bouquet topology (known to facilitate homolog synapsis) at the leptotene/zygotene transition (Roig *et al.*, 2004). Nonetheless, Cheng *et al.* (1995) found a large proportion (48%) of leptotene-stage oocytes with an already-paired bivalent, which substantially differs from our data (13%).

The proportion of paired chromosome 18s at the zygotene stage found in this study also differs from published results (63% and 93%, respectively). All of these differences may be attributable to inter-individual differences, but different sub-staging criteria cannot be excluded.

The pairing process of chromosome 13 seems to be analogous to that described for chromosome 18. However, a lower proportion of paired chromosome 13s at leptotene was found when compared to chromosome 18 (8% and 13%, respectively; Table 2). This may be related to the different length of chromosomes which would enable the shorter chromosome 18 to pair faster than the longer chromosome 13.

In any case, this different pairing speed observed does not affect the pairing efficiency of any of the chromosomes studied. Pairing anomalies found for

chromosomes 13 and 18, like pachytene oocytes with unpaired chromosomes, are not statistically different. These are present in 0.13% of the total number of oocytes analyzed for both chromosomes (n=2352). These numbers are consistent with results found by Cheng et al. (1994; 1998) for the X chromosome and for chromosome 21, but differ from results obtained for chromosome 18 (0%), although this could be related to the low number of oocytes analyzed by Cheng et al. (1995) as compared to this study.

Surprisingly, anomalies found at the diplotene stage (2 out of 149 studied diplotene-stage oocytes, representing 1.3%) are significantly higher than at pachytene. This figure includes oocytes that have failed to pair their homologs and oocytes in which premature homolog disjunction has occurred, either by failure to establish chiasmata, or by the precocious resolution of chiasmata.

The presence of two univalents implies independent segregation of the homologs at the first meiotic division which may lead to unbalanced oocytes.

The ten-fold-higher pairing-anomaly rate found at the diplotene stage compared to the one found at the pachytene stage means that premature homolog disjunction at diplotene is a more important factor in terms of producing abnormal chromosome segregation during meiosis rather than bivalent formation during the zygotene and the pachytene stages. In fact, in the male the most common anomalies limited to the germ-cell line are the complete (presence of univalents) or partial (desynaptic bivalents) separation of homologs at diplotene (Egozcue *et al.*, in press).

The anomaly rate found at the diplotene stage is similar to the frequency of aneuploid pregnancies found in young mothers (approximately 2% in women under the age of 25; Hassold and Hunt, 2001), suggesting that this phenomenon, observed in the present study, may be an important factor in promoting aneuploidy in humans.

Bivalent 18 was found to be more prone to complete disjunction at the diplotene stage than bivalent 13 (Table 2). This may be due to the fact that the long arms of the acrocentric chromosomes (13, 14 and 15) typically have two chiasmata (the cytological image of a crossing-over). Moreover, these chromosomes have a higher recombination frequency than similar-sized non-acrocentric chromosomes (reviewed by Lynn *et al.*, 2004). This fact supports previous findings leading to the conclusion that the high aneuploidy rate found in human oocytes seems to be attributable to recombinational errors rather than to an inefficient homolog-pairing process. In fact, our data suggest that pairing errors seem to affect all chromosomes similarly, while some chromosomes seem to be more susceptible to recombinational errors, as has already been proposed by Lynn *et al.* (2004). Surprisingly, we found four leptotene-stage oocytes (0.6%) with three chromosome 18s. The presence of aneuploid oocytes in euploid fetuses has also been observed for the X chromosome (Cheng and Gartler, 1994). Nevertheless, this phenomenon was not observed for chromosome 13. The extra copy of chromosome 18 seems to come from a pre-meiotic non-disjunction, and suggests an increased tendency to non-disjunction for chromosome 18 as compared to chromosome 13. This excess could indicate that cells with a trisomy 18 are subject to a less negative selection than

cells with a trisomy 13, which agrees with the milder symptomatology presented in Edward's syndrome (trisomy 18) compared to Patau's syndrome (trisomy 13).

Results from chromosome 13 pairing-process dynamics show that pairing occurs quickly, as demonstrated by the preferential finding of oocytes with unpaired or completely paired chromosome 13s instead of bivalents in which the pairing process is underway. In this sense, we have not been able to relate the dynamics of the chromosome 13 pairing process to either foot length or percentage of oocytes at the zygotene stage, suggesting that the pairing process of chromosome 13 may be related to other factors. More studies should be carried out in order to clarify these questions.

Results obtained in this study show that chromosomes pair efficiently. The pairing process in human female oocytes has also been studied in abnormal cases where there was the presence of an extra chromosome (Speed, 1984; Cheng *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1998; Roig *et al.*, 2005) or reorganized genomes (Cheng *et al.*, 1999). These studies found that even in these circumstances, homologs complete the pairing process, some of them with an efficiency similar to that described here (Roig *et al.*, 2005). Our findings, together with the data obtained in aneuploid oocytes, suggest that pairing-process fidelity seems sufficient to ensure bivalent formation at the pachytene stage. The ten-fold-higher anomaly rate found at the diplotene stage suggests that complete, premature homolog disjunction may play an important role in the origin of the high aneuploidy rate observed in human

oocytes (Hassold and Hunt, 2001). More studies on human female oocytes should be performed to better understand the cause of this problem.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank all the staff of the Clínica Tutor Médica and the Hospital de la Vall d'Hebron for sample-collection help. I.R. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2000-0992), R. G. has a fellowship from the Generalitat de Catalunya (2004FI 00953) and P. R. has a fellowship from a Ministerio de Sanidad grant (FIS 02/0297). This work has been funded with a project from the Spanish Ministerio de Sanidad (FIS 02/0297). The English of this manuscript has been corrected by a native English-speaking Instructor of English of our University.

## REFERENCES

- Baker, SM, Plug, AW, Prolla, TA, Bronner, CE, Harris, AC, Yao, X, Christie, DM, Monell, C, Arnheim, N, Bradley, A, et al. (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat. Genet.* 13, 336-42.
- Baker, TG (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* 158, 417-433.
- Barlow, AL and Hultén, MA (1997) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I oocytes from normal human females. *Zygote* 6, 27-38.
- Blandau, RJ (1969) Observations on living oogonia and oocytes from human embryonic and fetal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 104, 310-319.
- Bojko, M (1983) Human Meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlsberg Res. Commun.* 48, 457-483.
- Cheng, EY, Chen, YJ, Bonnet, G and Gartler, SM (1998) An analysis of meiotic pairing in trisomy 21 oocytes using fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 80, 48-53.
- Cheng, EY, Chen, YJ, Disteché, CM and Gartler, SM (1999) Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum. Genet.* 105, 191-196.
- Cheng, EY, Chen, YJ and Gartler, SM (1995) Chromosome painting analysis of early oogenesis in human trisomy 18. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 205-210.
- Cheng, EY and Gartler, SM (1994) A fluorescent in situ hybridization analysis of X chromosome pairing in early human female meiosis. *Hum. Genet.* 94, 389-394.
- Cheng, EY and Nalwai-Cecchini, T (2004) FISHing for acrocentric associations between chromosomes 14 and 21 in human oogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 1781-1785.
- Egozcue, J, Sarrate, Z, Codina-Pascual, M, Egozcue, S, Oliver-Bonet, M, Blanco, J, Navarro, J, Benet, J and Vidal, F Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet. Genome Res.* In press,
- Garcia, M, Dietrich, M, Freixa, L, Vink, ACG, Ponsa, M and Egozcue, J (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum. Genet.* 77, 223-232.



Garcia, M, Dietrich, M, Pujol, R and Egozcue, J (1989) Nucleolar structures in chromosome and SC preparations from human oocytes at 1st meiotic prophase. *Hum. Genet.* 82, 147-153.

Hartshorne, GM, Barlow, AL, Child, TJ, Barlow, DH and Hulten, MA (1999) Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture\*. *Hum. Reprod.* 14, 172-182.

Hassold, T and Hunt, P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2, 280-291.

Kurilo, LF (1981) Oogenesis in antenatal development in man. *Hum. Genet.* 57, 86-92.

Lenzi, ML, Smith, J, Snowden, T, Kim, M, Fishel, R, Poulos, BK and Cohen, PE (2005) Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet* 76, 112-27.

Lynn, A, Ashley, T and Hassold, T (2004) Variation in human meiotic recombination. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5, 317-349.

Ohno, S, Klinger, HB and Atkin, NB (1962) Human oogenesis. *Cytogenetics* 1, 42-52.

Roig, I, Liebe, B, Egozcue, J, Cabero, L, Garcia, M and Scherthan, H (2004) Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* 113, 22-33.

Roig, I, Robles, P, Garcia, R, Martínez-Flores, I, Egozcue, J, Liebe, B, Scherthan, H and Garcia, M (2005) Chromosome 18 behaviour in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage. *Reproduction* 129, 565-575.

Roig, I, Vanrell, I, Ortega, A, Cabero, L, Egozcue, J and Garcia, M (2003) The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. *Cytotechnology* 41, 45-49.

Speed, RM (1984) Meiotic configurations in female trisomy 21 fetuses. *Hum. Genet.* 66, 176-180.

Speed, RM (1985) The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 69, 69-75.

Tease, C, Hartshorne, GM and Hultén, MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1469-1479.

Wallace, BMN and Hulten, MA (1985) Meiotic chromosome pairing in the normal human female. *Ann. Hum. Genet.* 49, 215-226.

## TABLES AND FIGURES

Table 1.- Biological material, age, developmental stage as measured by foot length (F.L.), diagnosis and karyotype.

Case	G.W.	F. L. <sup>a</sup>	Abortion Reason	Karyotype
T14	16	1.8	Social	n. a.
T10	15	2.0	Social	n. a.
V54	19	2.4	Cardiopathology	46,XX <sup>b</sup>
V57	19	2.5	Arnold Chiari Syndrome	46,XX <sup>b</sup>
V55	20	2.8	Polymalformation	46,XX <sup>b</sup>
V64	22	2.8	Feto-fetal transfusion	46,XX <sup>b</sup>
V56	20	3.0	Anencephaly	46,XX <sup>b</sup>
V69	20	3.0	Neural tube alteration	46,XX <sup>b</sup>
V44	21	3.3	Maternal psychiatric disease	46,XX <sup>c</sup>
V80	22	3.5	Polymalformation	46,XX <sup>b</sup>
V68	22	3.6	Feto-fetal transfusion	46,XX <sup>b</sup>
V61	22	3.7	Oligoamnios	46,XX <sup>b</sup>
V84	22	3.9	Polymalformation	46,XX <sup>b</sup>
V67	22	3.9	Feto-fetal transfusion	46,XX <sup>b</sup>
V65	22	4.5	Feto-fetal transfusion	46,XX <sup>b</sup>

G.W.: gestational weeks; <sup>a</sup>Foot length in centimeters; <sup>b</sup>karyotype obtained from fetal ovarian culture; <sup>c</sup> Karyotype obtained from prenatal diagnosis; n. a.: not analyzed.

Table 2.- Distribution of chromosome 13 and 18 signals throughout meiotic prophase in T14, T10, V54, V56, V44 and V61.

	Chromosome 13			Chromosome 18		
	1 signal % (n)	2 signals % (n)	3 signals % (n)	1 signal % (n)	2 signals % (n)	3 signals % (n)
Leptotene	8.1 (55)	91.9 (623)	0.0 (0)	13.0 (90)	86.4 (599)	0.6 (4)
Zygotene	59.5 (300)	40.5 (204)	0.0 (0)	63.1 (321)	36.9 (188)	0.0 (0)
Pachytene	99.9 (1230)	0.1 (1)	0.0 (0)	99.8 (1119)	0.2 (2)	0.0 (0)
Diplotene	100.0 (72)	0.0 (0)	0.0 (0)	97.4 (75)	2.6 (2)	0.0 (0)

Table 3.- Chromosome 13 pairing process in zygotene-stage oocytes.

Case	F. L.	Zygotene (%)	Paired (%)	Finished pairing (%)	Started pairing (%)	Unpaired (%)
T14	1.8	23.6	60.38	3.77	1.89	33.96
T10	2.0	20.9	28.44	14.68	0.92	55.96
V54	2.4	22.0	50.55	15.38	4.40	29.67
V57	2.5	28.7	66.37	7.08	1.77	24.78
V55	2.8	31.6	60.47	8.53	0.00	31.01
V64	2.8	30.6	63.55	12.15	4.67	19.63
V56	3.0	19.0	27.78	20.37	5.56	46.30
V69	3.0	34.4	60.71	10.71	10.71	17.86
V44	3.3	22.6	45.24	17.86	1.19	35.71
V80	3.5	31.2	42.11	18.42	13.16	26.32
V68	3.6	32.4	45.45	9.09	9.09	36.36
V61	3.7	20.5	39.29	20.54	1.79	38.39
V84	3.9	30.8	33.33	16.67	6.67	43.33
V67	3.9	19.2	67.40	10.50	1.10	21.05
V65	4.5	19.3	81.01	5.06	1.27	12.66

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1.- Meiotic prophase sub-stage distribution for the different cases analyzed. Correlation of leptotene, zygotene, pachytene and diplotene percentages (A, B, C and D, respectively) and foot length are shown. G.W.= Gestation Weeks, F.L.= Foot Length (measured in centimeters).

Figure 2.- Images from hybridized oocytes with whole-chromosome probe 13 (red lines) and dual locus-specific probes 13 (green) and 21 (red). Oocyte at early leptotene (A) stage with two condensing chromosome 13s and two separate signals for chromosome 21s. Late leptotene oocyte (B) in which chromosome 13s are separated: note that each chromosome 21 signal is close to a chromosome 13, chromosome 13 and 21 associations have been commonly found. Zygotene-stage oocyte (C) in which alignment of chromosome 13s has already started; chromosome 21s seem to be pairing. Zygotene oocyte (D) in which pairing of chromosome 13 is ending while chromosome 21 seems to have already paired. Pachytene-stage oocyte (E) showing bivalents 13 and 21. Diplotene-stage oocyte (F) with a desynapsing bivalent 13; chromosome 21 signals are not separate, meaning that these chromosome regions are not desynapsed.

Figure 1

Case	G.W.	F. L.	Leptotene	Zygotene	Pachytene	Diplotene	n
T14	16	1.8	49.5	23.6	24.8	2.2	552
T10	15	2.0	43.9	20.9	35.2	0.0	1108
V54	19	2.4	25.8	22.0	50.7	1.5	950
V57	19	2.5	12.9	28.7	54.5	4.0	505
V55	20	2.8	16.0	31.6	48.9	3.6	507
V64	22	2.8	17.6	30.6	42.6	9.2	467
V56	20	3.0	21.5	19.0	56.7	2.8	1014
V69	20	3.0	15.2	34.4	46.4	4.0	125
V44	21	3.3	23.1	22.6	51.9	2.4	862
V80	22	3.5	22.7	31.2	43.5	2.6	154
V68	22	3.6	13.8	32.4	49.0	4.8	145
V61	22	3.7	20.4	20.5	51.4	7.7	1130
V84	22	3.9	8.7	30.8	45.2	15.4	104
V67	22	3.9	12.1	19.2	50.4	8.3	472
V65	22	4.5	12.0	19.3	58.5	10.2	508

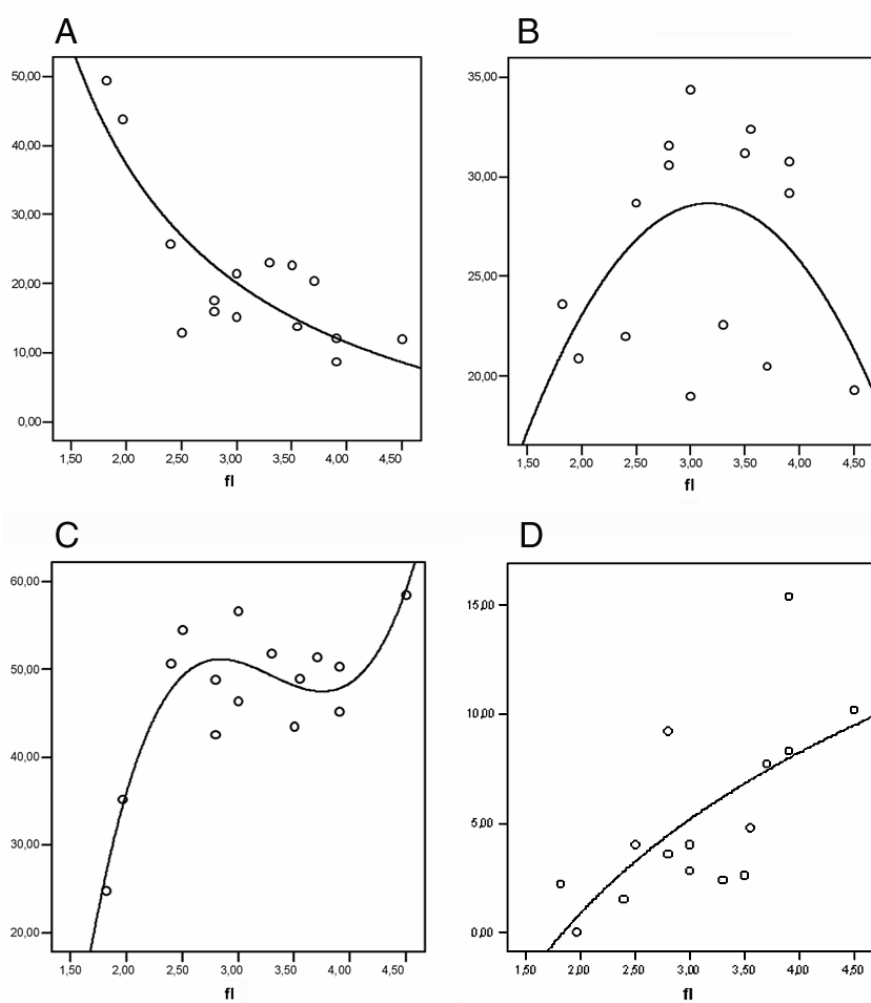
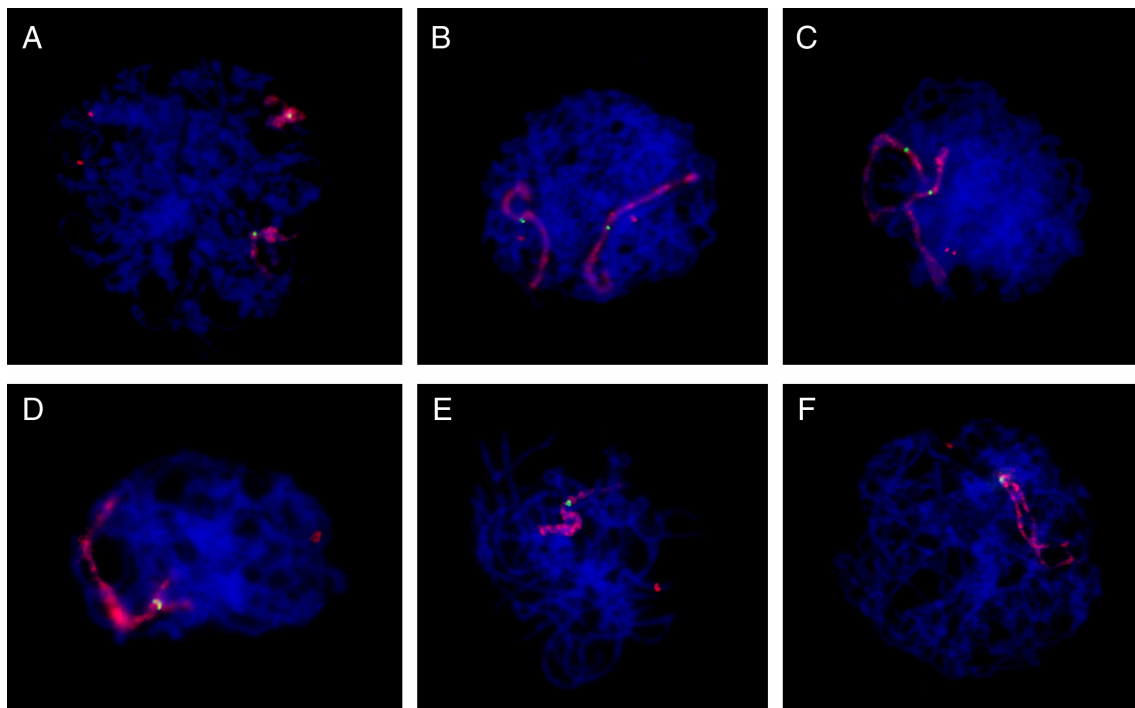


Figure 2

### 4.3.TREBALL 3

**FEMALE-SPECIFIC FEATURES OF RECOMBINATIONAL DOUBLE-STRANDED DNA REPAIR IN RELATION TO SYNAPSIS AND TELOMERE DYNAMICS IN HUMAN OOCYTES.**

**I. Roig, B. Liebe, J. Egozcue, L. Cabero, M. Garcia i H. Scherthan.**

**Chromosoma (2004) 113:22-33.**

**Índex d'impacte (2002)=2.829**



I. Roig · B. Liebe · J. Egozcue · Ll. Cabero · M. Garcia ·  
H. Scherthan

## Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes

Received: 23 April 2004 / Revised: 6 May 2004 / Accepted: 7 May 2004 / Published online: 3 July 2004  
© Springer-Verlag 2004

**Abstract** Chromosome segregation errors are a significant cause of aneuploidy among human neonates and often result from errors in female meiosis that occur during fetal life. For the latter reason, little is known about chromosome dynamics during female prophase I. Here, we analyzed chromosome reorganization, and centromere and telomere dynamics in meiosis in the human female by immunofluorescent staining of the SYCP3 and SYCP1 synaptonemal complex proteins and the course of recombinational DNA repair by IF of phospho-histone H2A.X ( $\gamma$ -H2AX), RPA and MLH1 recombination proteins. We found that SYCP3, but not SYCP1, aggregates appear in the preleptotene nucleus and some persist up to pachytene. Telomere clustering (bouquet stage) in oocytes lasted from late-leptotene to early pachytene—significantly longer than in the male. Leptotene and zygotene oocytes and spermatocytes showed strong  $\gamma$ -H2AX labeling, while  $\gamma$ -H2AX patches, which colocalized with RPA, were present on SYCP1-tagged

pachytene SCs. This was rarely seen in the male and may suggest that synapsis installs faster with respect to progression of recombinational double-strand break repair or that the latter is slower in the female. It is speculated that the presence of  $\gamma$ -H2AX into pachytene highlights female-specific peculiarities of recombination, chromosome behavior and checkpoint control that may contribute to female susceptibility for aneuploidy.

### Introduction

Aneuploidy represents the leading genetic cause of developmental disabilities and mental retardation among neonates, with ~30% of all miscarriages being aneuploid—a major cause of pregnancy loss (Hassold and Hunt 2001). Chromosome rearrangements and missegregation that are transmitted to the offspring often occur during meiotic differentiation. Meiosis is the special cell division occurring during gametogenesis in which the chromosome complement is reduced to haploidy in order to restore diploidy at fertilization. During the first meiotic prophase spatially separate homologous chromosomes (homologs) undergo changes in morphology, homolog search and pairing (Scherthan et al. 1998). The latter is fortified by the assembly of the protein ribbon of the synaptonemal complex (SC) between the homologs (Fawcett 1956; Moses 1956).

At the onset of the first meiotic prophase the SC proteins SYCP2 and SYCP3 (Lammers et al. 1994; Offenberg et al. 1998; Yuan et al. 2000) are layered onto cohesin protein threads that form along replicated meiotic chromosomes and consist of mitotic and meiosis-specific cohesins (such as SMC1 $\beta$ , SMC3, STAG3 and Rec8) (Eijpe et al. 2000, 2003; Pezzi et al. 2000; Prieto et al. 2004). This process forms the axial element (AE) (for review see Jessberger 2002). Upon immunofluorescent staining (IF), AEs become visible as thin threads along replicated sister chromatids at the leptotene stage, while at the zygotene stage, the transverse filament protein SYCP1 (Meuwissen et al. 1992; Dobson et al. 1994) is assembled

Communicated by E.A. Nigg

I. Roig and B. Liebe made an equal contribution to this work

I. Roig · J. Egozcue · M. Garcia (✉)  
Dept. de Biol. Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Univ.  
Autònoma de Barcelona,  
08193 Bellaterra, Spain  
e-mail: montserrat.garcia.caldes@uab.es

B. Liebe · H. Scherthan  
Max Planck Institute for Molecular Genetics,  
Ihnestrasse 73,  
14195 Berlin, Germany

L. Cabero  
Servei de Ginecologia i Obstetrícia, Hospital Materno-Infantil  
de la Vall d'Hebron,  
Barcelona, Spain

H. Scherthan (✉)  
Inst. for Radiation Biology Bundeswehr,  
Neuherbergstrasse 11,  
80937 Munich, Germany  
e-mail: scherth@web.de

between congressed AEs (now called lateral elements, LEs) of homologs forming mature SC. At the pachytene stage, all homolog pairs are tightly connected by the SC, which dissolves during the diplotene stage (for review see von Wettstein et al. 1984).

Mammalian meiosis is endowed with a gender difference. In the human male, meiosis continuously produces haploid germ cells throughout the lifetime of the individual. In the female, meiosis is initiated during early fetal life and progresses through most of first meiotic prophase to undergo dictyate arrest prior to the first meiotic division. This oocyte arrest is maintained from fetal life until puberty. From thereon preovulatory luteinizing hormone stimulates one oocyte per estrous cycle to complete the first reductional division, being blocked again at metaphase II until fertilization ensues (for a review see Tunquist and Maller 2003). The protracted arrest of oocytes and gender-specific features of female meiosis are thought to render female meiosis error prone (reviewed by Hunt and Hassold 2002). Studies on particular features of female meiosis, especially in the human, are generally complicated by its occurrence in early fetal life. Therefore, much of our current knowledge on homolog pairing and recombination has been obtained in model species, and in mammals predominantly in the male sex (for reviews see Hunt and Hassold 2002; Cooke and Saunders 2002; Page and Hawley 2003). Here, we set out to study the dynamic redistribution of meiotic chromosomes and its relation to the progress of recombinational DNA repair in the human female.

Classical and molecular cytogenetics studies as well as genetic-mapping studies in human female meiosis have revealed that SC and genetic map length are much longer in female than in male meiocytes (Lynn et al. 2002; Martínez-Flores et al. 2003). Also, the location and number of crossovers are different between the sexes, with oocyte chromosomes having more and disperse crossovers, while spermatocytes have fewer and more terminal exchanges (Rasmussen and Holm 1978; Baker et al. 1996; Robinson 1996; Barlow and Hultén 1998).

Recently, a study addressing the three-dimensional redistribution of telomeres and centromeres during mammalian female meiosis has revealed the sex-specific duration of chromosome polarization (Pfeifer et al. 2003). Chromosome polarization (bouquet stage) is detected as telomere clustering and coincides with the initiation of synapsis in most species (Scherthan 2001; Zickler and Kleckner 1998). Recent analysis of bouquet occurrence and persistence in different model systems suggests that this peculiar nuclear topology facilitates homolog pairing and homologous synapsis in a timely manner (Golubovskaya et al. 2002; MacQueen et al. 2002; Trelles-Sticken et al. 2000; Scherthan et al. 1996). In mammals, persistence of the bouquet stage seems to be species specific, because in male cattle, mouse and human it appears at the leptotene/zygotene transition and rapidly dissolves thereafter in the latter two species (Scherthan et al. 1996), while it lasts up to late zygotene in bovine males, with the length of bouquet duration likely relating to increased chromo-

some number in this species (Pfeifer et al. 2001). In mutants that are compromised in the onset, survey or progression of recombinational DNA repair, bouquet stage duration is extended (Trelles-Sticken et al. 1999; Pandita et al. 1999, Fernandez-Capetillo et al. 2003a; Storlazzi et al. 2003; Liebe et al. 2004).

A gender difference in bouquet stage duration has been observed in cattle and rat prophase I: telomere clustering commences during the female leptotene stage, while it occurs in early zygotene in males and persists longer in the female (Pfeifer et al. 2003; Martínez-Flores et al. 2003). Finally, synapsis in the human and bovine female initiates terminally and interstitially (Bojko 1983; Pfeifer et al. 2003), while in males synapsis predominantly commences terminally (Rasmussen and Holm 1978; Pfeifer et al. 2001).

Meiotic chromosome pairing depends on the formation of double-stranded DNA breaks (DSBs) by the conserved topo II-related transesterase SPO11 (for a review see Keeney 2001). Double-strand break formation precedes SC assembly in yeast and mice (Padmore et al. 1991; Mahadevaiah et al. 2001). Appearance of meiotic DSBs can be monitored by staining for phosphorylated histone H2A.X ( $\gamma$ -H2AX) (Mahadevaiah et al. 2001), which is known to mark sites of DSBs in somatic cells (Rogakou et al. 1999). However, SPO11-induced DSBs are not the only source of  $\gamma$ -H2AX formation, since a number of  $\gamma$ -H2AX foci can be detected in SPO11-deficient mice (Libby et al. 2003) and in the sex body (Mahadevaiah et al. 2001) where it is linked to male sex chromosome inactivation (Fernandez-Capetillo et al. 2003b). In the mouse,  $\gamma$ -H2AX is detected throughout the chromatin of leptotene spermatocytes. Dephosphorylation of  $\gamma$ -H2AX is then temporally and spatially correlated with progression of synapsis (Hunter et al. 2001; Mahadevaiah et al. 2001).

Male and female germ cells also display a dimorphic response to deficiency of proteins required for recombinational DSB repair, with the female being more tolerant of failure of progression or completion of recombination (Cohen and Pollard 2001; Hunt and Hassold 2002). This different checkpoint strength may underlie sex differences in the etiology of aneuploidy (Hassold and Hunt 2001).

Due to difficulties in obtaining material, little is known about the course of chromosome and telomere behavior in early prophase I in the human female. The progress of DSB repair in meiotic prophase seems to modulate the duration of the bouquet stage in prophase I of yeast and mammals (for a review see Scherthan 2003) and chromosome polarization shows sex-specific duration in cattle (Pfeifer et al. 2003). This prompted us to study the occurrence and coordination of the progression of DSB repair by IF to  $\gamma$ -H2AX, RPA and MLH1, (markers of occurrence, progress or completion of recombinational DSB repair, respectively) in relation to the duration of chromosome polarization and telomere clustering in human fetal oocytes.

## Materials and methods

### Tissue origin and processing

For this study three fetuses, V64, V65 and V76, were collected after legal interruption of pregnancy and with the permission of the family according to the Ethics Rules Committee of the Hospital de la Vall d'Hebron of Barcelona, Spain. Gestational age was calculated from the last menstrual period, where available, and by foot length and ecography (Table 1).

Ovaries were removed within 1 h of delivery in the hospital and transported in phosphate buffered saline (PBS), 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) for 30 min to the university laboratories. In each case, one ovary was subsequently frozen by immersion in isopentane pre-chilled on dry ice and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The contralateral ovary in each case was subjected to ovarian stromal somatic culture (Roig et al. 2003) for establishment of the karyotype of the respective case.

Spermatocytes from a human male of proven fertility (Table 1) were processed for IF as described earlier (Scherthan et al. 2000).

### Histological preparations

For each case, a piece of frozen ovary was fixed for 4 h in 4% formaldehyde, PBS, followed by embedding in paraffin as described (Scherthan and Cremer 1994). Five or ten micrometer sections were cut from each block and floated on water, 10% ethanol at  $60^{\circ}\text{C}$ , picked up with Super Frost Plus slides (Roth), air dried for a minimum of 40 min at  $60^{\circ}\text{C}$  and stored at room temperature until use.

### Nuclear suspensions

To obtain structurally preserved nuclei for three-dimensional analysis, a piece of frozen ovary per case was minced with scalpels directly onto a Super Frost Plus slide at  $-20^{\circ}\text{C}$  and mixed, at  $4^{\circ}\text{C}$ , with fixative (2% formaldehyde, 0.015% Triton X-100, PBS) and allowed to dry briefly. After air drying, slides were washed in PBS, 0.5% glycine and finally blocked for unspecific antibody binding by a 10 min incubation in PBTG (PBS, 0.2% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20, 0.1% gelatin). Spermatocyte preparations were obtained as described previously (Scherthan et al. 2000).

### Oocyte spreading

Nuclear spreading of spermatocytes and oocytes was performed according to the protocol of Liebe et al. (2004) with the following modifications for oocytes: first a cell suspension was obtained by mincing a small piece of ovary in approximately 10  $\mu\text{l}$  of PBS on a clean slide. This suspension was mixed with 80  $\mu\text{l}$  1% Lipsol in water. After 10 min, 90  $\mu\text{l}$  of fresh fixative solution (1% *p*-formaldehyde, 10% 50 mM  $\text{NaBH}_3$ , 0.15% Triton X-100, pH 9.2) was applied and the suspension was air dried for more than 1 h in a

humid box. After four 1 min washes in 1% Agepon (Agfa) in water, slides were immunostained or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### DNA probes and labeling

Pericentromeric regions of human chromosomes were detected by fluorescent in situ hybridization (FISH) with  $\alpha$ -satellite DNA sequences, as obtained by alphoid-specific polymerase chain reaction from genomic human DNA (Weier et al. 1991) and labeling with Cy3-dUTP using a random priming kit (Invitrogen). Telomeres were stained by FISH with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated ( $\text{C}_3\text{TA}_2$ ) peptide nucleic acid (PNA) telomere probe (DAKO).

### Fluorescent in situ hybridization to tissue sections

Pre-treatment and FISH on tissue sections were performed as described previously (Scherthan and Cremer 1994). Hybridization was carried out for at least 72 h, and post-hybridization washes were performed in  $0.05\times\text{SSC}$  at  $45^{\circ}\text{C}$  for 5 min for centromere and telomere probes. DNA was counterstained applying an antifade solution (Vector Laboratories) containing 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma).

### Immunostaining

Immunofluorescent staining of meiocytes was performed as described previously (Scherthan et al. 2000) using the following antibodies: a mouse monoclonal antibody against TIN2 (Imgenex) for telomeres, a rabbit polyclonal serum against SYCP3, a rabbit polyclonal serum against SYCP1 (both kind gifts of C. Heyting, Wageningen), a mouse monoclonal antibody against MLH1 (BD PharMingen), a mouse monoclonal antibody against RPA (Calbiochem), a mouse monoclonal antibody against  $\gamma$ -tubulin (Sigma) and a rabbit polyclonal serum against  $\gamma$ -H2AX (Upstate).

Primary antibodies were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  applying a 1/100 dilution for all sera and antibodies used, except for SYCP1 where incubation was done at 1:350 for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ .

After removal of excess antibodies with four 3 min washes in PBTG, detection was performed applying fluorochrome-conjugated secondary antibodies (all Jackson ImmunoResearch Laboratories): goat anti-rabbit Cy3 (diluted 1:1,000 in PBTG), goat anti-rabbit FITC antibody (diluted 1:250 in PBTG), goat anti-rabbit Cy5 (diluted 1:1,000 in PBTG), goat anti-mouse Cy3 antibody (diluted 1:1,000 in PBTG) and a donkey anti-mouse Cy5 antibody (diluted 1:1,000 in PBTG). All of them were incubated for 35 min at  $37^{\circ}\text{C}$ .

Four 3 min washes were applied in order to remove excessive antibodies. Fixation of the first layer of antibodies in 1% formaldehyde in PBS for 10 min was performed between staining that sequentially used primary rabbit antibodies. Aldehyde groups were quenched by rinsing slides in PBS, 0.5% glycine after each staining. When a slide was sequentially incubated with two primary antibodies from rabbit, unsaturated rabbit antigens remaining after first signal detection were blocked by incubation with unlabeled

**Table 1** Tissue origin. (GW gestational weeks, na not applicable)

Case no.	GW	Foot length (cm)	Diagnosis	Karyotype <sup>a</sup>	Oocytes at bouquet stage (%)	Spermatocytes at bouquet stage (%)
V64	22	2.8	Feto-fetal transfusion	46,XX	33.33 ( $n=81$ )	na
V65	22	4.5	Feto-fetal transfusion	46,XX	42.11 ( $n=76$ )	na
V76	21	3.5	Kidney malformation	46,XX	30.67 ( $n=75$ )	na
Testis biopsy	na	na	Orchidectomy <sup>b</sup>	na	na	4.9 ( $n=1027$ )

<sup>a</sup>Karyotype as obtained from ovarian stromal somatic culture

<sup>b</sup>Case as described in Scherthan et al. (2000)

goat anti-rabbit Fab fragments (diluted 1:100 in PBTG; Jackson Immuno Research Laboratories) for 35 min at 37°C. Finally, nuclear DNA was counterstained by embedding in antifade solution containing DAPI (VectaShield, Camon).

### Microscopy and image analysis

Preparations were evaluated using a Zeiss Axioskop epifluorescence microscope (Carl Zeiss) equipped with single-band pass filters for excitation of green, red, blue and infrared, and a double-band pass filter for simultaneous excitation of red and green fluorescence (Chroma Technologies) and 63× and 100× plan-neofluor lenses. Digital black-and-white images were recorded with a cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics) and merged to RGB images by the ISIS fluorescence image analysis system (MetaSystems). Some images were recorded using an Olympus BX microscope equipped with a CCD camera and the Smart Capture software. Some of the images recorded with the latter setup were further processed using Adobe Photoshop to match the fluorescence intensity seen in the microscope.

## Results

### Sample karyotypes

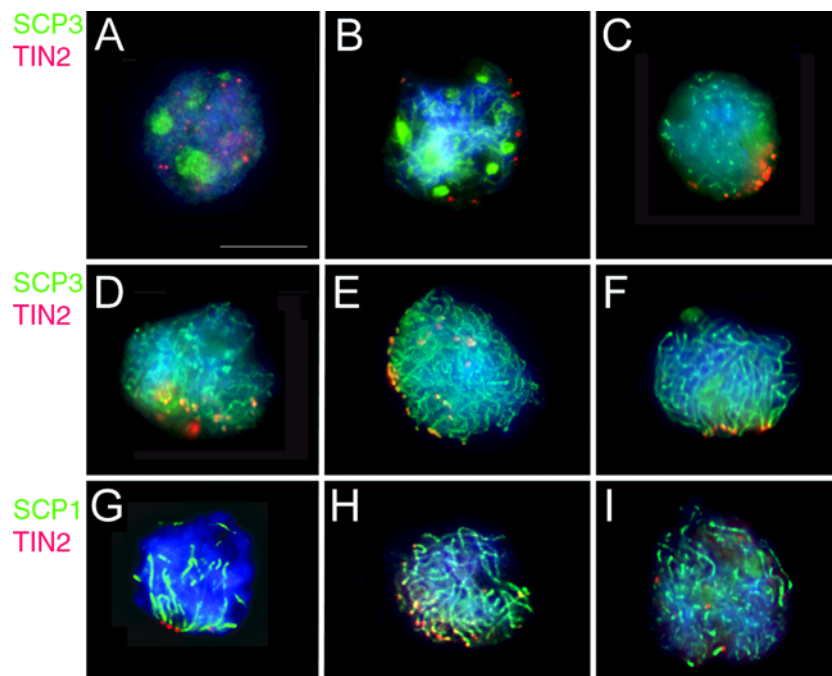
In all cases studied (V64, V65 and V76), we first established a stromal ovarian somatic culture (Roig et al. 2003) to test their ploidy. All displayed an euploid karyotype (46,XX) (Table 1), thereby excluding the

possibility that chromosome anomalies could influence our analysis.

### Synaptonemal complex protein dynamics during human meiotic prophase

First we set out to stage telomere dynamics in human female meiosis. To this end, we investigated appearance and spatial distribution of the SC proteins SYCP3 and SYCP1 by IF. Telomeres were co-stained with the TRF1-interacting protein TIN2 (Kim et al. 1999) (Fig. 1). Staging of oocytes in a first set of experiments was done according to DAPI morphology and by comparison with data reported previously from other mammals (Scherthan et al. 1996; Pfeifer et al. 2003).

Immunofluorescent staining with SYCP3/TIN2 revealed that preleptotene oocytes displayed two to five SYCP3 aggregates (Fig. 1a) that colocalized with DAPI-negative nuclear regions, which represent nucleoli (Pfeifer et al. 2003; Prieto et al. 2004), while telomere signals displayed no apparent order. SYCP3-positive aggregates of variable morphology and number (one to five) were detected in most leptotene and zygotene nuclei ( $n=14$ , 12; respectively), while pachytene nuclei had none (40% out of 45), one (42%) or three to four SYCP3 clusters (18%). This contrasts with a recent study that observed that SYCP3 aggregates disappeared at zygotene in the human



**Fig. 1a–i** Immunofluorescent staining (IF) of SYCP3 (axial elements, AEs, *green*), SYCP1 (synaptonemal complex, SC, *green*) and TIN2 (telomeres, *red*) in human oocytes. **a** Preleptotene oocyte showing SYCP3 aggregates and telomeres distributed throughout the nucleus (focus at nuclear equator). **b** Leptotene oocyte with SYCP3 stretches and aggregates. Telomeres are scattered over the nuclear periphery. The nuclear equator is shown. **c** Oocyte at the leptotene/zygotene transition displaying tight telomere clustering (tight bouquet); nuclear equator shown. **d**

Zygotene oocyte with telomere clustering. Focus near the nuclear top. **e** Zygotene oocyte with bouquet topology; focal plane near nuclear equator. **f** Pachytene oocyte with distinct bouquet topology. **g** SYCP1-stained zygotene oocyte with tight telomere clustering and synapsis in progress. **h** Pachytene oocyte with telomeres restricted to one-half of the nuclear periphery (loose bouquet). **i** Diplotene oocyte showing disintegrating SCs and dispersed telomeres. (*Bar* in **a** represents 10  $\mu\text{m}$ ; it applies to all panels)

female (Prieto et al. 2004), the difference likely relating to preparation technique, age of material and/or rapid loss of the antigen from the nucleoli. In our preparations we noted disappearance of nucleolar signals after extended storage of the stained preparations (not shown).

At the leptotene stage, fine SYCP3 threads were seen in addition to the protein aggregates (Fig. 1b) and telomere signals located at the nuclear periphery. In some nuclei, telomeres were tightly clustered, forming a bouquet (Fig. 1c). Since different degrees of telomere clustering were observed, we addressed bouquet topology when all visible telomeres were restricted to one half of the nuclear periphery (loose bouquet; e.g., Fig. 1d,e); tight bouquet was addressed when telomeres formed a small patch on the nuclear periphery (e.g., Fig. 1c,f). In leptotene/zygotene transition oocytes, telomeres were clustered in a restricted area of the nuclear periphery (Fig. 1d). Of 16 bouquet nuclei at the zygotene stage, nine showed tight telomere clustering, while the other seven displayed loose telomere grouping (Fig. 1e). At this stage SYCP3 threads appeared thicker than before (Fig. 1e). Chromosome polarization was still apparent in pachytene oocytes, sometimes in a tight bouquet (Fig. 1f).

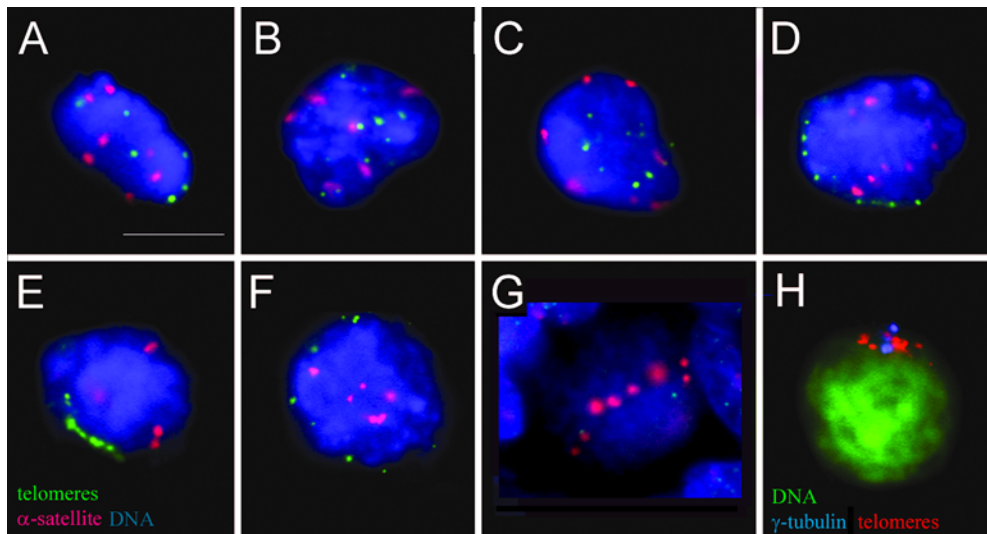
When we applied SYCP1 staining in conjunction with TIN2 telomere staining, it was observed that SYCP1 threads often appeared near subtelomeric sites (Fig. 1g). Pachytene oocyte nuclei displayed SYCP1-positive SC threads that often remained polarized, with the bouquet base usually being wider (loose bouquet) (Fig. 1h). Late pachytene oocyte nuclei showed telomere signals dispersed over the nuclear periphery (not shown). Diplotene/

dictyotene oocytes exhibited fragmented and dissolving SYCP1 fibers with telomeres being scattered (Fig. 1i).

Altogether, this indicates that telomeres congregate into a tight cluster at the leptotene/zygotene transition, as is the case in human males (Scherthan et al. 1996). Taking into account that prophase I up to diplotene takes about 4 weeks in both human genders (Garcia et al. 1987, and references therein), it appears that the clustering of telomeres lasts significantly longer in prophase I of the human female, because it can be detected up to early pachytene stage.

#### Centromere and telomere movements during female prophase I

During the onset of meiotic prophase of the human male centromeres and telomeres undergo a specific sequence of global movements with centromeres and then telomeres moving to the nuclear envelope (NE) (Scherthan et al. 1996). While centromeres of metacentric chromosomes thereafter reposition to the nuclear interior, telomeres remain attached to the NE and subsequently cluster transiently during the leptotene/zygotene transition (Rasmussen and Holm 1978; Scherthan et al. 1996). While general hallmarks of telomere positioning have been noted in human oocytes (Bojko 1983), little is known about the dynamic sequence of centromere and telomere movements in the human female. Thus we studied telomere and centromere dynamics in female meiosis by FISH with a pan-centromeric  $\alpha$ -satellite (Weier et al. 1991) and a pan-telomeric DNA probe to ovary tissue sections (Fig. 2).

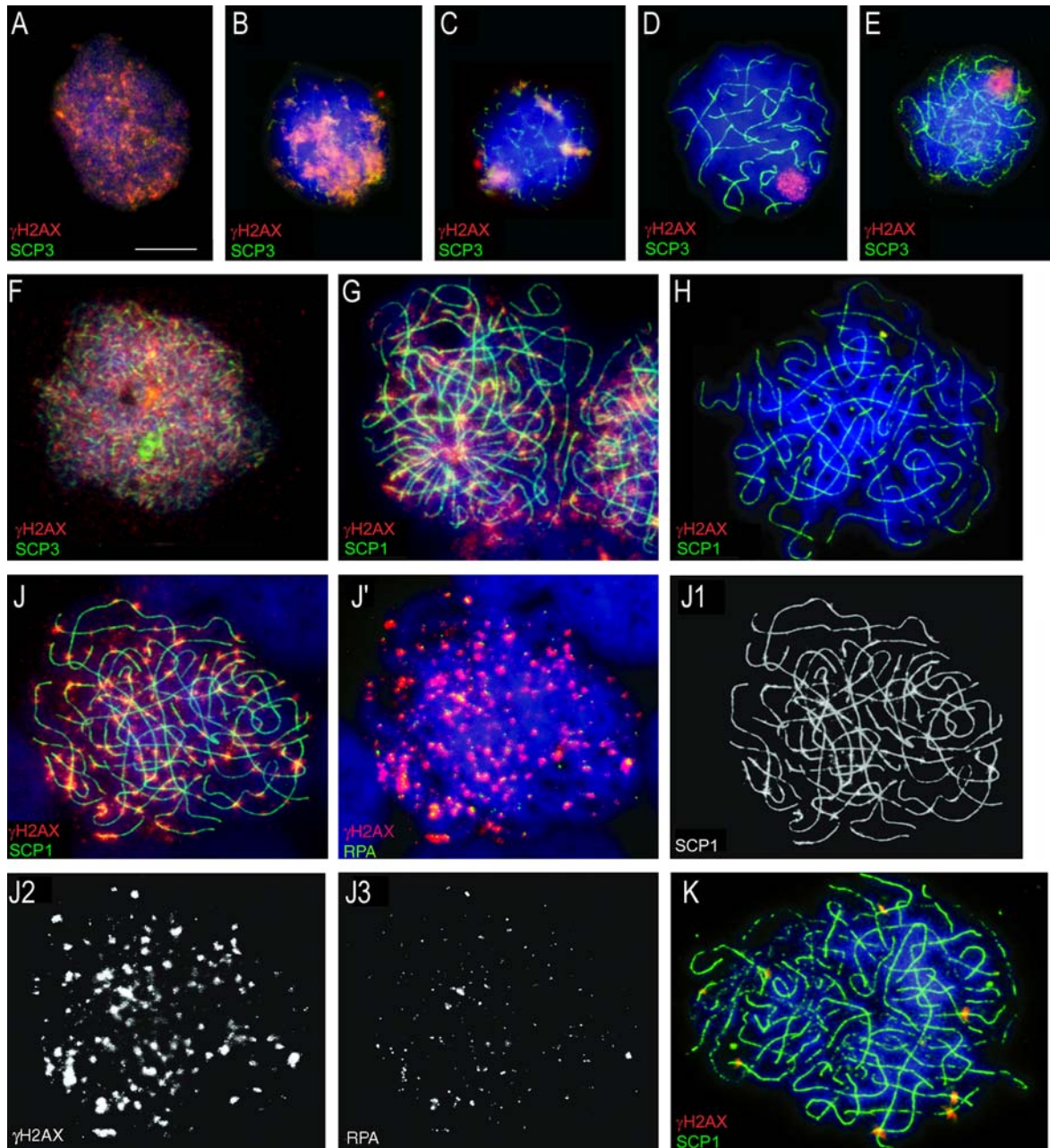


**Fig. 2a–h** Telomere ( $T_2AG_3$ ) and centromere ( $\alpha$ -satellite) distribution in different female premeiotic and meiotic prophase I nuclei (focal plane at nuclear equator). **a,b** Somatic nuclei with centromeres (red) and telomeres (green) scattered throughout the nucleus. **c** Preleptotene oocyte showing centromeres at the nuclear surface, while most telomeric signals in this focal plane are inside the nucleus. **d** Leptotene oocyte with telomere signals restricted to one side of the nuclear surface and centromeres inside the nucleus. **e** Leptotene/zygotene oocyte with tight telomere clustering at the

nuclear periphery. Centromere signals are seen in the nuclear interior. **f** Pachytene oocyte with telomeres dispersed over the nuclear periphery and centromeres inside the nucleus. **g** Diplotene/dictyotene oocyte surrounded by granulosa cell nuclei with a few large centromere signals forming a line across the cell. **h** Bouquet stage oocyte nucleus (DNA pseudo-colored in green) displaying telomeres (red) tightly clustered near the centrosome (blue,  $\gamma$ -tubulin staining). Bar represents 10  $\mu$ m

In premeiotic and somatic ovary cells telomeres and centromeres were scattered throughout the nucleus (Fig. 2a,b). In preleptotene stage oocytes a few telomeres were still inside the nucleus, while centromere signals were distributed over the nuclear periphery (Fig. 2c)—this

mirrors the distribution patterns seen in the human male (Scherthan et al. 1996). Leptotene oocytes had their telomeres dispersed over the nuclear periphery, while centromere signals were predominantly inside the nucleus;



**Fig. 3** Staining for SYCP1 (g–k; green) or SYCP3 (a–f; green) and  $\gamma$ -H2AX (red) in spread human spermatocytes (a–e) and oocytes (f–k). **a** Leptotene spermatocyte with weak SYCP3 staining and strong overall  $\gamma$ -H2AX staining. **b** Early zygotene spermatocyte with patchy  $\gamma$ -H2AX staining and SYCP3 threads. Note: Despite intervening fixation steps and other precautions sometimes there was cross-talk between the secondary anti-rabbit antibodies, which made the  $\gamma$ -H2AX signal appear orange. **c** Late zygotene spermatocyte with long SYCP3 threads (faint due to strong 4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI] signal) and a few  $\gamma$ -H2AX patches. **d** Pachytene spermatocyte with  $\gamma$ -H2AX staining restricted to the XY body. **e** Diplotene spermatocyte with  $\gamma$ -H2AX staining at the XY

body and dissolving synaptenomal complexes (SCs). **f** Leptotene oocyte displaying numerous thin SYCP3 threads and strong  $\gamma$ -H2AX staining. **g** Late zygotene oocyte showing polarized SYCP1 threads (bouquet topology) and numerous SC-associated  $\gamma$ -H2AX patches. **h** Pachytene oocyte showing complete synapsis and no  $\gamma$ -H2AX signals. **j** Pachytene oocyte with  $\gamma$ -H2AX patches along SYCP1-stained SCs. **j'** Same oocyte showing RPA foci (green—false-colored Cy5 signals) that colocalize with  $\gamma$ -H2AX patches (red). **j1** SYCP1 channel, **j2**  $\gamma$ -H2AX and **j3** RPA channels. **k** Early diplotene oocyte with fragmenting SYCP1 fibers and a few dot-like  $\gamma$ -H2AX signal patches (orange). Bar represents 10  $\mu$ m

with some oocytes displaying telomeres on one hemisphere of the nuclear periphery (Fig. 2d).

Tight bouquet formation was observed during zygotene with centromere signals locating predominantly inside the nucleus (Fig. 2e). This tight clustering of telomeres occurred at the microtubule organizing center near the cytoplasmic NE, as revealed by  $\gamma$ -tubulin staining (Fig. 2h). The frequency of bouquet stage nuclei was similar in all ovaries analyzed (mean 35%, range 31–42%; Table 1). Therefore, and due to the limited material available, the relation of bouquet proportion to gestation weeks or foot length could not be established.

As compared with the frequency of bouquet stage nuclei detected in a human testes sample (4.9%) there is a highly significant difference ( $\chi^2$ ,  $p < 0.0001$ ) from the elevated female bouquet frequencies (Table 1). The telomere/centromere FISH data and the maintenance of chromosome polarization into female pachytene but not male pachytene (see above) indicate an extended duration of the bouquet stage in the female, which mirrors the situation in cattle (Pfeifer et al. 2001, 2003).

At late pachytene polarization of nuclei was no longer apparent—telomeres were scattered over the nuclear periphery, while most centromeres were dispersed throughout the nucleus (Fig. 2f). At the diplotene stage centromeres were often clustered, resulting in a few large  $\alpha$ -satellite FISH signals that were sometimes arranged in a row, while telomere signals were dispersed (Fig. 2g). Centromere clustering in oocytes has also been seen before (Hodges et al. 2001; Prieto et al. 2004). At this stage, the oocyte is located in a primary follicle where it remains arrested in differentiation before the first meiotic division.

The data above suggest that chromosome polarization in the human female, as in other mammals, often persists from the leptotene/zygotene transition up to early pachynema, while in the male it is restricted to leptotene/zygotene (Rasmussen and Holm 1978; Scherthan et al. 1996).

### Recombinational DSB repair in human meiosis

Data in yeast, *Sordaria* and mouse suggest that bouquet resolution correlates to some extent with changes in chromatin state as well as the progress of DSB repair (Trelles-Sticken et al. 1999; Fernandez-Capetillo et al. 2003a; Storlazzi et al. 2003). The course of recombinational DNA repair can be traced in meiocytes (Mahadevaiah et al. 2001) by the occurrence and disappearance of the phosphorylated form of histone H2A.X ( $\gamma$ -H2AX; Rogakou et al. 1998). In mouse meiocytes  $\gamma$ -H2AX appears at the onset of prophase I (leptotene) as a response to meiotic DSBs and is found throughout leptotene nuclei (Mahadevaiah et al. 2001). With the progression of prophase I,  $\gamma$ -H2AX disappears from regions where synapsis has been initiated or is in progress. In the male,  $\gamma$ -H2AX persists in the chromatin of the inactivated XY chromosome pair (sex body) (Mahadevaiah et al. 2001;

Fernandez-Capetillo et al. 2003b) and a few foci elsewhere (Libby et al. 2003).

We first studied SYCP3 and  $\gamma$ -H2AX distribution in human male meiosis. It was observed that  $\gamma$ -H2AX IF labeled early leptotene spermatocytes all over (Fig. 3a), suggesting that DSBs precede homolog pairing in the human male as well. During the zygotene stage an overall intense  $\gamma$ -H2AX fluorescence appeared to be reduced in regions where synapsis was apparent (Fig. 3b,c). Pachytene and early diplotene spermatocytes generally lacked  $\gamma$ -H2AX signals, with the exception of the heavily labeled XY body (Fig. 3d,e). In the majority of spermatocytes at later diplotene stages, the  $\gamma$ -H2AX staining at the XY body was diminished or no longer detectable (data not shown). These results are reminiscent of the H2AX phosphorylation/dephosphorylation cycle during prophase I of the male mouse (Mahadevaiah et al. 2001). In addition, we found that 14.2% of human pachytene spermatocytes studied ( $n=106$ ) displayed small  $\gamma$ -H2AX foci that were associated with SCs (not shown; see below).

Staining for RPA, a marker for intermediate steps in recombinational repair (i.e., strand exchange; Alani et al. 1992; Gasior et al. 1998; Plug et al. 1998; Moens et al. 2001), showed that the 14% of pachytene spermatocytes with prevailing  $\gamma$ -H2AX patches on SCs also displayed RPA dots colocalizing with the  $\gamma$ -H2AX patches (data not shown; see Fig. 3j for a comparable situation in female meiosis). Except for the  $\gamma$ -H2AX-positive XY body, 86% of pachytene spermatocytes had lost  $\gamma$ -H2AX staining, recapitulating observations in the mouse (Mahadevaiah et al. 2001). Since the strong  $\gamma$ -H2AX fluorescence of the sex body precluded substaging of pachytene according to XY SYCP3 axes, it remains to be determined whether the few spermatocytes with persisting  $\gamma$ -H2AX patches are delayed in the progress of recombination, or whether these spermatocytes are aberrant and doomed to arrest.

### Dephosphorylation of $\gamma$ -H2AX relative to synapsis proceeds with a sex-specific bias

In the human female, intense  $\gamma$ -H2AX IF signals were observed throughout the chromatin of leptotene oocytes (Fig. 3f), indicating that also in this gender DSBs precede synapsis. During zygotene, the  $\gamma$ -H2AX IF signals became patchy and the labeling was further reduced (not shown). Most pachytene oocytes (68.8%;  $n=109$ ), however, displayed small  $\gamma$ -H2AX patches along SYCP1-stained SCs (Fig. 3g,j), with the mean number of  $\gamma$ -H2AX foci per pachytene oocyte being 72.7 (range 38–153; SD=31.7;  $n=26$ ). Some of the oocytes displayed polarization of chromosome cores (Fig. 3g) verifying persistence of the bouquet stage and H2AX phosphorylation into pachytene. Only a small portion of oocytes were free of  $\gamma$ -H2AX signal (Fig. 3h). Furthermore, a few  $\gamma$ -H2AX spots were also detected in diplotene oocytes (Fig. 3k).

Since few  $\gamma$ -H2ax foci can be seen in the *Spo11* knockout mouse which lacks DSBs (Mahadevaiah et al. 2001; Libby et al. 2003), we determined whether the  $\gamma$ -

H2AX dots seen in human oocytes mark regions of DSB repair and investigated the colocalization with RPA—a marker for intermediate steps in DSB repair (Plug et al. 1998, see above). Immunofluorescent co-staining of RPA and  $\gamma$ -H2ax in pachytene oocytes ( $n=7$ ) revealed small RPA foci that colocalized with the patches of  $\gamma$ -H2AX on SCs (Fig. 3j) in 89% of 1,120 RPA foci. In pachytene spermatocytes ( $n=106$ ), however, co-localization of  $\gamma$ -H2AX and RPA was only seen in 18% of 1,105 RPA foci, with the differences between male and female being statistically significant ( $p \ll 0.0001$ ). This suggests that progression of DSB repair in the male is rapid and associated with  $\gamma$ -H2AX dephosphorylation. Given a similar overall duration of prophase I in both genders (Garcia et al. 1987), this suggests that DSB repair in pachytene oocytes may be progressing more slowly through intermediate steps of recombinational DNA repair relative to synapsis, or that dephosphorylation of  $\gamma$ -H2AX is delayed relative to progress of synapsis.

#### Dephosphorylation of $\gamma$ -H2AX relative to MLH1 foci

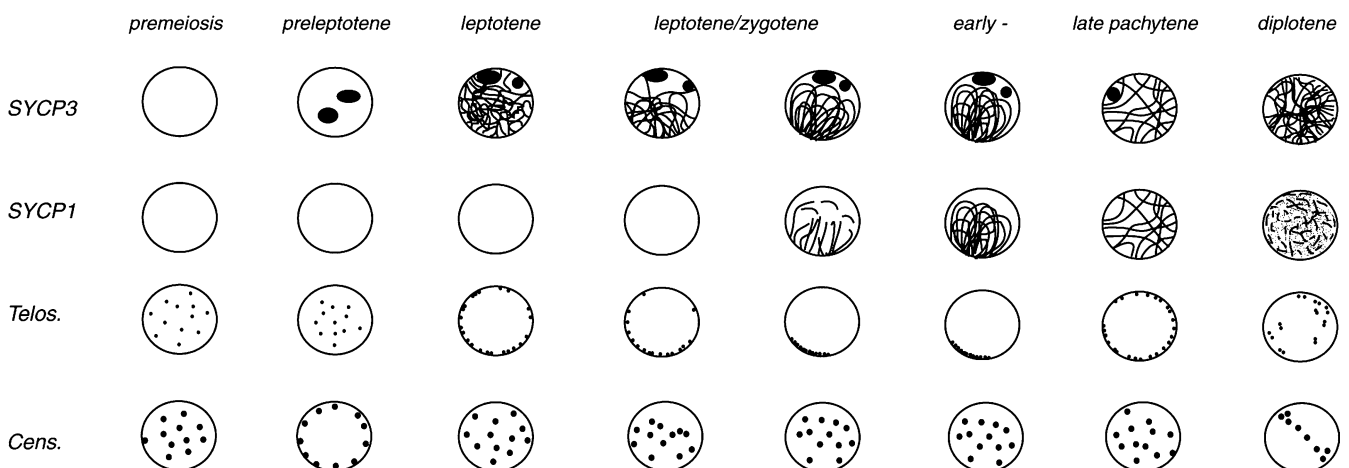
To determine further whether dephosphorylation of H2AX and progress of recombination occurs with a delay in the female, we next stained for MLH1, a protein component of late recombination nodules and a marker for crossing over (Plug et al. 1998; Anderson et al. 1999; Marcon and Moens 2003) and determined the fraction of MLH1 foci that co-localized with  $\gamma$ -H2ax patches in late pachytene oocytes. It was found that 26.5% of 751 MLH1 foci (derived from 12 oocytes) showed colocalization with  $\gamma$ -H2AX patches, while 73.5% of MLH1 foci did not display  $\gamma$ -H2AX immunofluorescence (not shown).

In the male, 90% of pachytene spermatocytes displayed MLH1 foci that were completely free of  $\gamma$ -H2AX signals ( $n=654$  MLH1 foci from 13 spermatocytes), while only 10% of MLH1 foci contained a small halo of  $\gamma$ -H2AX (not shown). Thus, it may be speculated that MLH1 is

installed at sites where H2AX has been dephosphorylated and recombination has progressed. This suggests that  $\gamma$ -H2AX is dephosphorylated about the time when MLH1 is incorporated in recombination nodules. Thus, it will be interesting to investigate co-localization of Rad51 and  $\gamma$ -H2AX foci in human meiocytes.

#### Phosphorylation of H2AX and bouquet topology

Since recent data in mouse meiosis suggest that H2AX and its phosphorylation/dephosphorylation state may be involved in the signaling cascade linking the progress of DNA repair to exit from the bouquet stage (Fernandez-Capetillo et al. 2003a; Scherthan 2003), we investigated chromosome polarization in nuclei with persistent  $\gamma$ -H2AX signals. Triple IF staining for  $\gamma$ -H2AX, SYCP1 and the telomere protein TIN2 (Kim et al. 1999) to structurally preserved oocyte nuclei revealed an overall distribution of  $\gamma$ -H2AX in leptotene and a patchy  $\gamma$ -H2AX pattern in zygotene bouquet oocytes and spermatocytes (not shown). Of the mid-pachytene oocytes ( $n=15$ ) with a few persisting  $\gamma$ -H2AX foci, telomere clustering was relaxed, which suggests that a small number of persistent  $\gamma$ -H2AX foci in oocytes do not prevent resolution of telomere clustering. In most male bouquet nuclei  $\gamma$ -H2AX was present in a few patches, while at pachytene there was absence of  $\gamma$ -H2AX (in autosomal chromatin) and of bouquet topology. Thus, there remains the possibility that  $\gamma$ -H2AX dephosphorylation shows a temporal correlation with dissolution of bouquet topology in mammals. It would therefore be interesting to investigate a larger population of bouquet oocytes and to study the sequence of events in live cells.



**Fig. 4** Scheme outlining the major hallmarks of the dynamic redistribution of the axial/lateral element protein SYCP3 and the transverse filament protein SYCP1 in relation to telomeres (*Telos.*)

and centromeres (*Cens.*,  $\alpha$ -satellite) during human female prophase I. For a scheme displaying the dynamics in human male prophase I see Scherthan et al. (1996)



## Discussion

By studying fetal ovaries we have obtained a first insight into the dynamic redistribution of SC proteins, telomeres and centromeres (for a schematic overview see Fig. 4) and its correlation with markers for sub-stages of recombinational DSB repair during first meiotic prophase in the human female.

### Centromere and telomere dynamics in the human female

Based on analysis of cattle gonads it has been suggested that the bouquet stage lasts longer in mammalian females than in males (Pfeifer et al. 2003), in the latter, telomere clustering is usually restricted to the leptotene/zygotene transition (Scherthan et al. 1996; Pfeifer et al. 2001). It may well be that the prolonged bouquet stage observed in the female is beneficial to the pairing of the twofold longer prophase I chromosomes that are present in mammalian oocytes (Barlow and Hultén 1998; Martínez-Flores et al. 2003). An extended bouquet stage, as expressed by polarized SCs and clustering of telomeres, could thus relate to reduced condensation of prophase I chromosome axes. However, male *H2ax* knockout mice display normal synapsis and bivalent condensation but still retain bouquet topology up to pachytene (Fernandez-Capetillo et al. 2003a; Scherthan 2003). An enduring bouquet stage in the human female may therefore be linked to retarded progression of intermediate steps of DNA repair, since mice and yeasts with defects in meiotic recombinational DNA repair display an enduring bouquet stage (Pandita et al. 1999; Trelles-Sticken et al. 1999). However, this feature is difficult to tease apart from the synapsis and other defects seen in the mutants. Additionally, it is possible that a signal relaying the state of recombination to the cell is weak or absent in oocytes. Finally, chromatin modifications like histone phosphorylation/dephosphorylation cycles may influence the resolution of meiotic telomere clustering (for review see Scherthan 2003).

### Assembly of SC proteins into female chromosome cores

At the onset of prophase I, human oocytes develop cohesin cores (I. Roig and M. Garcia-Caldes, unpublished; Prieto et al. 2004), while SYCP3 aggregates appear in clusters in the preleptotene oocyte. SYCP3 clusters persist up to pachytene, likely in nucleoli as is the case in female rat, cattle and human (Dietrich et al. 1992; Pfeifer et al. 2003). In males of humans, mice and cattle, SYCP3 clusters disappear during zygotene (Scherthan et al. 1996; Pfeifer et al. 2001; Scherthan and Schonborn 2001). The persistence of SYCP3 aggregates in pachytene oocytes has not been observed in another human study (Prieto et al. 2004), which may probably be due to technical reasons (see Results). It has been noted that SYCP3-stained AEs of

oocytes are usually fainter than in comparable preparations of spermatocytes (this investigation, Barlow and Hultén 1997; Pfeifer et al. 2003). Therefore, it may be that less SYCP3 protein is deposited in the AE/LE, which could be linked to longer SC length in the female. This implies that SYCP3 may be involved in chromosome condensation, which agrees with the observation that SYCP3-deficient oocytes and spermatocytes display twofold elongated SCs/chromosomes as compared with the wild type (Yuan et al. 2002; Liebe et al. 2004). Since the axial core of the SC may be involved in a crossover versus non-crossover decision (Blat et al. 2002; Tsubouchi and Roeder 2003), the poor saturation of cohesin cores with SYCP3, as observed in the mammalian female, may lead to less condensed chromosomes and different properties of the LE/AE, and consequently crossover control. This may in turn lead to elevated chiasma frequencies seen in the female sex.

### Progression of recombination differs in human oocytes versus spermatocytes

Crossovers result from recombinational repair of a regulated number of DSBs, which are detected as chiasmata in metaphase I (for a review see Kleckner et al. 2003). When we tested for a possible link between progress of DNA repair marker appearance/disappearance and bouquet duration, we noted  $\gamma$ -H2AX appearance in leptotene and commencement of  $\gamma$ -H2AX dephosphorylation during zygotene. Bouquet topology in oocytes was detected from the leptotene/zygotene transition up to mid-pachytene, while bouquet topology dissolved during zygotene in the male. Interestingly, in the female two substages of pachytene oocytes were observed: one abundant population (69%) with complete synapsis and patchy  $\gamma$ -H2AX signals distributed along SCs and a minor fraction (31%) with complete synapsis and no  $\gamma$ -H2AX foci (Fig. 3). In female pachytene nuclei SC-associated  $\gamma$ -H2AX patches were found to co-localize with RPA foci in 89% of cases (a marker for progression of meiotic DSB repair; Gasior et al. 1998; Moens et al. 2001), while in the male this was only the case for 18% of RPA foci.

When we further determined the frequency of colocalization of  $\gamma$ -H2AX with MLH1 foci (markers for late recombination nodules and strand exchange (Baker et al. 1996; Plug et al. 1998; Marcon and Moens 2003)) it was found that most late-pachytene nuclei in both sexes did not contain  $\gamma$ -H2AX at MLH1 foci (90% in male and 80% in female). The abundant colocalization of RPA foci with  $\gamma$ -H2AX signal in female pachytene but not in male pachytene and the absence of  $\gamma$ -H2AX from most MLH1 foci in both sexes suggests that recombination proceeds through early steps of DSB repair more slowly in the female. Alternatively,  $\gamma$ -H2AX dephosphorylation may progress at a slower rate in oocytes (see below). Unfortunately, the shortage of oocyte material prevented further experimentation and more insight into this question.

The mean number of  $\gamma$ -H2AX foci per pachytene cell (72.7) observed in our study fits with the mean number of MLH1 foci per oocyte reported previously (77.3; 71.6 and 70.3 per case; Tease et al. 2002). In contrast, the range of  $\gamma$ -H2AX patches was in excess of the range of MLH1 foci in the three different cases investigated: 38–153 for  $\gamma$ -H2AX and 62–94, 53–87 and 48–102 for MLH1. The presence of short SCs with four or even more  $\gamma$ -H2AX foci, some of them really close, suggests that there are more DSB repair intermediates present in early pachytene than MLH1-marked recombination events observed at late pachytene stage and that the former are subject to positive interference as crossovers are matured. This agrees with DSBs and conversion events being formed in excess of crossovers (Terasawa et al. 1995; Ashley et al. 1995; Franklin et al. 1999; Tarsounas et al. 1999; Tease et al. 2002).

Nearly 50% of the few human diplotene/dictyotene oocytes in the fetal ovary showed a few persisting  $\gamma$ -H2AX foci. This persistence of a DSB marker that has been reported to disappear with progression of synapsis and repair (Mahadevaiah et al. 2001) may point to synapsis being installed/progressing faster in the human female relative to the progression of recombination. In mammalian females there is a higher rate of recombination/crossing over. Recently, it has been observed that mutations in the Sgs1 helicase of *Saccharomyces cerevisiae* also increase the rate of synapsis and progression of recombination (Rockmill et al. 2003). It will thus be interesting to investigate in oocytes the abundance and localization of RecQ helicase family members, like the human Bloom syndrome helicase BLM, which is required for human fertility and is associated with Rad51/DMC1 and RPA foci in mammalian spermatocytes (Walpita et al. 1999; Moens et al. 2000).

Furthermore, female meiosis is more tolerant of the presence of mutations in genes that have a role in recombination. While spermatocytes of such mutants undergo arrest during mid-prophase, female meiocytes often progress to metaphase I (for review see Keeney 2001; Hunt and Hassold 2002). Persistent  $\gamma$ -H2AX foci in female pachytene may hence be indicative that the progress of recombination and associated chromatin changes may follow a different timing relative to prophase I progression leading to gender differences in checkpoint strength and meiotic telomere clustering.

Because the pachytene stage has been implied as a time frame that sees massive oocyte death in the fetal ovary, where oocyte population is reduced from 7 million (maximum achieved around 5 months of gestation) to 2 million at birth (Baker 1963), it will be interesting to determine whether the pachytene/diplotene oocytes with persistent  $\gamma$ -H2AX/RPA foci are associated with atresia. Further studies in this direction will have to await the recovery of more oocyte material.

**Acknowledgements** We thank Dr. C. Heyting for kindly providing SYCP antibodies. This work was carried out with financial support from FIS 02/0297, Fundación Salud 2000-Ayudas Serono and SGR-00201. I.R. is the recipient of a grant (AP2000) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. We are grateful to unidentified reviewers for their stimulating comments on an earlier draft of this paper. H.S. thanks H.H. Ropers (MPI-MG, Berlin) and the DFG (Grant no. SCHE 350/8-4) for support.

## References

- Alani E, Thresher R, Griffith JD, Kolodner RD (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of v-RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* 227:54–71
- Anderson LK, Reeves A, Webb LM, Ashley T (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151:1569–1579
- Ashley T, Plug AW, Xu J, Solari AJ, Reddy G, Golub EI, Ward DC (1995) Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* 104:19–28
- Baker TG (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158:417–433
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* 13:336–342
- Barlow AL, Hultén MA (1997) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I oocytes from normal human females. *Zygote* 6:27–38
- Barlow AL, Hultén MA (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6:350–358
- Blat Y, Protacio RU, Hunter N, Kleckner N (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasmata formation. *Cell* 111:791–802
- Bojko M (1983) Human meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlsberg Res Commun* 48:457–483
- Cohen PE, Pollard JW (2001) Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* 23:996–1009
- Cooke HJ, Saunders PT (2002) Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 3:790–801
- Dietrich AJ, Kok E, Offenberger HH, Heyting C, de Boer P, Vink AC (1992) The sequential appearance of components of the synaptonemal complex during meiosis of the female rat. *Genome* 35:492–497
- Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 107:2749–2760
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R (2000) Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 113:673–682
- Eijpe M, Offenberger H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SCM1 $\beta$  and SMC3. *J Cell Biol* 160:657–670
- Fawcett DW (1956) The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 2:403
- Fernandez-Capetillo O, Liebe B, Scherthan H, Nussenzweig A (2003a) H2AX regulates meiotic telomere clustering. *J Cell Biol* 163:15–20

- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko P, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A (2003b) H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4:497–508
- Franklin AE, McElver J, Sunjevaric I, Rothstein R, Bowen B, Cande WZ (1999) Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. *Plant Cell* 11:809–824
- Garcia M, Dietrich M, Freixa L, Vink ACG, Ponsa M, Egozcue J (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum Genet* 77:223–232
- Golubovskaya IN, Harper LC, Pawlowski WP, Schichnes D, Cande WZ (2002) The *pam1* gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 162:1979–1993
- Gasior SL, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK (1998) Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev* 12:2208–2221
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Genet* 2:280–291
- Hodges CA, LeMaire-Adkins R, Hunt PA. (2001) Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J Cell Sci* 114:2417–2426
- Hunt PA, Hassold T (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181–2183
- Hunter N, Valentin Borner G, Lichten M, Kleckner N (2001) Gamma-H2AX illuminates meiosis. *Nat Genet* 27:236–238
- Jessberger R (2002) The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:767–778
- Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 52:1–53
- Kim S, Kaminker P, Campisi J (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23:405–412
- Kleckner N, Storlazzi A, Zickler D (2003) Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends Genet* 19:623–628
- Lammers JH, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14:1137–1146
- Libby BJ, Reinholdt LG, Schimenti J (2003) Positional cloning and characterization of *Mei1*, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15706–15711
- Liebe B, Alsheimer M, Hoog C, Benavente R, Scherthan H (2004) Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell* 15:827–837
- Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA, Hassold TJ (2002) Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296:2222–2225
- MacQueen AJ, Colaiacovo MP, McDonald K, Villeneuve AM (2002) Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2428–2442
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner W, Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27:271–276
- Marcon E, Moens P (2003) MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. *Genetics* 165:2283–2287
- Martínez-Flores I, Egozcue J, García M (2003) Synaptic process in rat (*Rattus norvegicus*): influence of the methodology on the results. *Microsc Res Tech* 60:450–457
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11:5091–5100
- Moens PB, Freire R, Tarsounas M, Spyropoulos B, Jackson SP (2000) Expression and nuclear localization of BLM, a chromosome stability protein mutated in Bloom's syndrome, suggest a role in recombination during meiotic prophase. *J Cell Sci* 113:663–672
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B (2001) The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA–DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115:1611–1622
- Moses MJ (1956) Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 2:215–218
- Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RLJ, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C (1998) SYCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 26:2572–2579
- Padmore R, Cao L, Kleckner N (1991) Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 66:1239–1256
- Page SL, Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789
- Pandita TK, Westphal CH, Anger M, Sawant SG, Geard CR, Pandita RK, Scherthan H (1999) Atm inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol Cell Biol* 19:5096–5105
- Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Perez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez AC, Barbero JL (2000) STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *Faseb J* 14:581–592
- Pfeifer C, Thomsen PD, Scherthan H (2001) Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet* 93:304–314
- Pfeifer C, Scherthan H, Thomsen PD (2003) Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev Biol* 255:206–215
- Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martínez A, Martínez-A C, Hultén MA, Barbero JL (2004) Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* 12:197–213
- Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T (1998) Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci* 111:413–423
- Rasmussen SW, Holm PB (1978) Human meiosis II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlberg Res Commun* 43:275–327
- Robinson WP (1996) The extent, mechanism, and consequences of genetic variation, for recombination rate. *Am J Hum Genet* 59:1175–1183
- Rockmill B, Fung JC, Branda SS, Roeder GS (2003) The Sgs1 helicase regulates chromosome synapsis and meiotic crossing over. *Curr Biol* 13:1954–1962
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858–5868
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner W (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905–915
- Roig I, Vanrell I, Ortega A, Cabero L, Egozcue J, Garcia M (2003) The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. *Cytotechnology* 41:45–49
- Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:621–627
- Scherthan H (2003) Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics. *Cytogenet Genome Res* 103:235–244

- Scherthan H, Cremer T (1994) Methodology of non isotopic in situ hybridization in embedded tissue sections. *Methods Mol Genet* 5:223–238
- Scherthan H, Schonborn I (2001) Asynchronous chromosome pairing in male meiosis of the rat (*Rattus norvegicus*). *Chromosome Res* 9:273–282
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134:1109–1125
- Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H, Jauch A (1998) Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J Cell Sci* 111:2337–2351
- Scherthan H, Jerratsch M, Li B, Smith S, Hulten M, Lock T, de Lange T (2000) Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell* 11:4189–4203
- Storlazzi A, Tessé S, Gargano S, James F, Kleckner N, Zickler D (2003) Meiotic double-strand breaks at the interface of chromosome movement, chromosome remodeling, and reductional division. *Genes Dev* 17:2675–2687
- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* 147:207–220
- Tease C, Hartshorne GM, Hultén MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human oocytes. *Am J Hum Genet* 70:1469–1479
- Terasawa M, Shinohara A, Hotta Y, Ogawa H, Ogawa T (1995) Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of the lily at various meiotic stages. *Genes Dev* 9:925–934
- Trelles-Sticken E, Loidl J, Scherthan H (1999) Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J Cell Sci* 112:651–658
- Trelles-Sticken E, Dresser ME, Scherthan H (2000) Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *J Cell Biol* 151:95–106
- Tsubouchi H, Roeder GS (2003) The importance of genetic recombination for fidelity of chromosome pairing in meiosis. *Dev Cell* 5:915–925
- Tunquist BJ, Maller JL (2003) Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 17:683–710
- Walpita D, Plug AW, Neff NF, German J, Ashley T (1999) Bloom's syndrome protein, BLM, colocalizes with replication protein A in meiotic prophase nuclei of mammalian spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5622–5627
- Weier HU, Kleine HD, Gray JW (1991) Labeling of the centromeric region on human chromosome 8 by in situ hybridization. *Hum Genet* 87:489–494
- von Wettstein D, Rasmussen SW, Holm PB (1984) The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet* 18:331–413
- Yuan L, Liu JG, Zaho J, Brundell E, Daneholt B, Höög C (2000) The murine SYCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5:73–83
- Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Höög C (2002) Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SYCP3. *Science* 296:1115–1118
- Zickler D, Kleckner N (1998) The leptotene–zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32:619–697

## 4.4.TREBALL 4

**CHROMOSOME 18 PAIRING BEHAVIOR IN HUMAN TRISOMIC OOCYTES. PRESENCE OF AN EXTRA CHROMOSOME EXTENDS BOUQUET STAGE.**

**I. Roig, P. Robles, R. Garcia, I. Martínez-Flores, Ll. Cabero, J. Egozcue, B. Liebe, H. Scherthan i M. Garcia.**

**Reproduction (2005) 129: 565-575.**

**Índex d'impacte (2003)=2.606**

# Chromosome 18 pairing behavior in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage

I Roig<sup>1</sup>, P Robles<sup>1</sup>, R Garcia<sup>1</sup>, I Martínez-Flores<sup>1</sup>, Ll Cabero<sup>2</sup>, J Egozcue<sup>1</sup>, B Liebe<sup>3</sup>, H Scherthan<sup>3,4</sup> and M Garcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain, <sup>2</sup>Servei de Ginecologia i Obstetrícia, Hospital Materno-infantil de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Ihnestrasse 73, D-14195 Berlin, Germany and <sup>4</sup>Institute of Radiation Biology Bw Neuherbergstr. 1180937, München, Germany

Correspondence should be addressed to M Garcia, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain; Email: montserrat.garcia.caldes@uab.es

## Abstract

Little is known about the first meiotic prophase stages in the human female because these occur during fetal life, and only a few studies have addressed aneuploid human oocytes. In this paper, the synaptic process in the meiotic prophase in three 47, XX + 18 cases is analyzed. A complete study of the dynamics of centromeres and telomeres, cohesin core and synapsis development in aneuploid female meiosis was performed. Investigation of chromosome dynamics in prophase of trisomy 18 oocytes show that these events follow the major patterns seen earlier in euploid oocytes. However, there is a significant delay in the resolution of bouquet topology which could relate to the presence of a surplus chromosome 18 axial element in zygotene oocytes. Pachytene oocytes displayed normal synapsis among the three chromosome 18s. However, in some oocytes the surplus chromosome 18 core was aligned to the bivalent 18. As ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase (ATR) has been described as a marker for late-pairing chromosomes in mice, ATR distribution was analyzed in human meiocytes – spermatocytes, euploid oocytes and trisomic oocytes. In contrast to the observations made in mice, no preferential staining for late-pairing chromosomes was observed in humans. In the cases studied, bivalent synapses progressed as in a normal ovary, contrasting with the hypothesis that a surplus chromosome can modify pairing of other chromosomes.

*Reproduction* (2005) **129** 565–575

## Introduction

Meiosis is the special cell division by which a chromosome complement is reduced to the haploid number in order to preserve diploidy at fertilization. During first meiotic prophase, homologous chromosomes pair and exchange material between them. Paired homologs develop a tripartite structure between them, the synaptonemal complex (SC) (Fawcett 1956, Moses 1968, Schmelkel & Daneholt 1995). The SC is formed by SYCP proteins (Synaptonemal Complex Proteins, SYCP/SCP; Heyting 1996). SYCPs are laid down on a cohesin scaffold which is established during the pre-meiotic S-phase (Eijpe *et al.* 2000, 2003, Pezzi *et al.* 2000, Pelttari *et al.* 2001, Prieto *et al.* 2001, 2002, 2004).

At the leptotene stage, SYCP3 and SYCP2 form an axial element (AE) along each chromosome (Lammers *et al.* 1994, Offenbergh *et al.* 1998). During this stage, initiation of recombination can be monitored by immunostaining of

the phosphorylated version of histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) (Mahadevaiah *et al.* 2001, Roig *et al.* 2004, Lenzi *et al.* 2005). At the zygotene stage, homolog pairing starts and SYCP1 organizes the central element of the SC by developing transverse filaments between closely aligned regions of AEs (Meuwissen *et al.* 1992); from this time on, AEs are called lateral elements (LEs). In order to promote homologous synapsis, chromosome ends (telomeres) cluster at a limited portion of the nuclear envelope, known as bouquet topology (for reviews see Scherthan 2001 and Harper *et al.* 2004). Studies in cattle and human have revealed that bouquet topology lasts longer in the mammalian female than in the male (Bojko 1983, Pfeifer *et al.* 2003, Roig *et al.* 2004). At pachytene, all homologs are completely paired (bivalents). Finally, at diplotene, SCs almost completely dissolve. The substages of prophase I are characterized by the initiation and progression of recombination which can be followed by the dynamic turnover

of repair proteins (reviewed in Cohen & Pollard 2001, Moens *et al.* 2001).

In mammalian males meiosis is a continuous process, while in the female meiotic prophase occurs during early fetal life, and arrests before birth at a specialized diplotene–dictyotene stage. The meiotic division is blocked until the female enters puberty. Despite the difficulties associated with the study of human female meiotic prophase, some aneuploid ovaries have been studied using classical staining techniques (Luciani *et al.* 1976, Wallace & Hulten 1983, Speed 1984), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (Cheng *et al.* 1995, 1998) or immunofluorescent (IF) (Barlow *et al.* 2002) techniques.

In these studies, pairing anomalies implying the presence of the extra chromosome are described. Nevertheless, in all cases, at least two homologs seem to pair normally forming a bivalent, and even pairing of the three homologs (trivalent formation) has been described in all studied cases, with different efficiency (Luciani *et al.* 1976, Wallace & Hulten 1983, Speed 1984, Cheng *et al.* 1995, 1998, Barlow *et al.* 2002). In some of these papers a disturbing effect of the extra chromosome on the pairing process of other homologs is suggested (Cheng *et al.* 1998).

In those studies in which the pairing process is analyzed in silver-stained preparations (Wallace & Hulten 1983, Speed 1984), a thickening of the unpaired axial element (univalent) of the extra chromosome is seen, suggesting a different proteinaceous composition. This phenomenon is not restricted to humans, and has also been observed in rat meiocytes (Martínez-Flores *et al.* 2001). However, recent studies in which IF techniques have been applied to stain SYCP3 in human trisomic 21 oocytes have not observed any univalent thickening, suggesting that SYCP3 is not implicated in this phenomenon (Barlow *et al.* 2002).

Trisomy 18 syndrome, also known as Edwards' syndrome, has a meiotic maternal origin in 89% of cases (Hassold & Hunt 2001) and causes major physical abnormalities, growth delay and severe mental retardation. Very few affected children survive beyond their first year.

The aim of the present study was to analyze the pairing process of homologs in ovaries from three trisomic

18 fetuses in order to assess the effect of the presence of an extra chromosome 18 on the progress of chromosomal events in the female meiotic prophase I. To this end, immunofluorescent staining (IF) to SYCP1 and SYCP3 proteins, chromosome painting, and centromere and telomere FISH were performed. As it has been recently described that human SCs are also formed of a cohesin axis (see above), analysis of a specific meiotic cohesin REC8 (Prieto *et al.* 2004) was performed in order to check whether cohesins are responsible for the unpaired univalent thickening observed in previous studies (Wallace & Hulten 1983, Speed 1984, Martínez-Flores *et al.* 2001).

Furthermore, as ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase (ATR) has been described as a marker for late-pairing chromosomes in mouse pachytene spermatocytes (Moens *et al.* 1999, Baart *et al.* 2000), IF to ATR was performed to investigate its distribution in aneuploid oocytes. Due to the absence of any published data about ATR in humans, ATR distribution in human euploid spermatocytes and oocytes is also described.

## Materials and Methods

### Tissue origin and processing

Three fetal cases prenatally diagnosed as Edwards' syndrome (V62, V63 and V70) and six euploid cases (V54, V93, V94, V98, V106 and V107) (Table 1) were used after legal interruption of pregnancy according to the Ethics Rules Committee of the Hospital de la Vall d'Hebron of Barcelona, Spain. The age of each case was calculated from the last menstrual period and from echography.

Ovaries were processed as described by Roig *et al.* (2003) in order to obtain a somatic karyotype of the sample. Paraffin embedding, tissue sections, structurally preserved nuclei preparations and oocyte spreads for IF and FISH purposes were performed as recently described (Martínez-Flores *et al.* 2003, Roig *et al.* 2004). Human testis from an adult male with proven fertility was processed as previously described (Scherthan *et al.* 1996).

**Table 1** Biological material, karyotype and bouquet frequencies.

Case	Gestational weeks	Diagnosis	Karyotype	Oocytes at bouquet stage
V54	19	Cardiopathology	46,XX <sup>a</sup>	NA
V93	19	Osteochondrodysplasia	46,XX <sup>b</sup>	36.48% (n = 74)
V94	20	Neural tube defect	46,XX <sup>b</sup>	28.00% (n = 75)
V98	19	Muscular dystrophy	46,XX <sup>b</sup>	34.21% (n = 76)
V106	21	Encephalocoele	46,XX <sup>b</sup>	35.61% (n = 73)
V107	19	Cardiopathology	46,XX <sup>b</sup>	37.66% (n = 77)
V62	21	Edwards' syndrome	47,XX + 18 <sup>a</sup>	47.06% (n = 102)
V63	20	Edwards' syndrome	47,XX + 18 <sup>a</sup>	56.00% (n = 75)
V70	19	Edwards' syndrome	47,XX + 18 <sup>a</sup>	54.67% (n = 75)

<sup>a</sup> Karyotype obtained from ovarian stromal somatic culture. <sup>b</sup> karyotype obtained from prenatal diagnosis. NA, not analyzed.

### DNA probes and labeling

Centromeres of all human chromosomes were detected by FISH with alpha satellite-DNA sequences (pan-centromeric probe), as obtained by alphoid-specific PCR from genomic human DNA (Weier *et al.* 1991) and were labeled with Cy3-dUTP by random priming. All chromosome telomeres were detected after applying FISH with an Fluorescein (FITC)-conjugated (CCCTAA<sub>3</sub>) peptide nucleic acid (PNA) telomere probe (DAKO, Glostrup, Denmark; pan-telomeric probe).

Commercial Whole Chromosome 18 Probe (WCP) Cy3-conjugated and Whole Chromosome 13 Probe Cy3-conjugated (Cambio, Cambridge, UK), as well as a dual locus-specific identification (LSI) probe 13/21 (Oncor, Qbiogene, Irvine, CA, USA) and a locus-specific biotinylated probe for the 18q subtelomeric region (YAC 932Q10) were used to analyze the homolog-pairing process.

DNA was counterstained applying an antifade solution (Vector Laboratories) containing 0.1 µg/ml DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma).

### Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on methanol:acetic acid spread oocytes

In order to study the homolog chromosome 18 pairing process, FISH was performed on methanol:acetic acid spread oocytes as described before with slight modifications (Barlow & Hultén 1997). Slides were post-fixed in a formaldehyde solution and denatured in 70% formamide in 2 × SSC at 69°C for 4 min. Probe denaturation was performed as described by the manufacturer and the denatured probe was applied after slide dehydration. Three post-hybridization washes were performed in 50% formamide in 2 × SSC, 2 × SSC and 0.4 × SSC 0.05% Tween 20 at 45°C. LSI 18 probe detection was performed applying Avidin FITC-conjugated antibody (1/150) for 1 h at 37°C.

In this part of the study 719 oocytes were analyzed. Oocyte staging was performed according to the morphological criteria previously described (Garcia *et al.* 1987).

### Immunofluorescent (IF) staining

The axial elements of the SCs were identified with a rabbit polyclonal serum against SYCP3 (Meuwissen *et al.* 1992). Homolog synapsis was tracked by marking the central element of the SC with a rabbit polyclonal serum against SYCP1 (Lammers *et al.* 1994) (both were kind gifts of Christa Heyting, Wageningen, The Netherlands). The cohesin axis was detected using a mouse polyclonal serum against cohesin REC8 (Prieto *et al.* 2004, a kind gift of José Luís Barbero, DIO/CNB, Trescantos, Madrid, Spain). Staining of all chromosome telomeres was performed applying a mouse monoclonal antibody (Imgenex, San Diego, CA, USA) against telomeric protein TIN2 (Kim *et al.* 1999). Finally, ATR dynamics were described using a rabbit polyclonal antibody against ATR (Abcam, Cambridge, UK).

IF staining was performed as described by Roig *et al.* (2004). Primary antibodies were diluted in PTBG (PBS, 0.2% BSA, 0.2% gelatin, 0.05% Tween 20) and incubated overnight at 4°C in a humid chamber.

After washing away unattached antibodies with PBTG, detection was performed using some of the following fluorochrome-conjugated secondary antibodies (diluted in PTBG; all Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA): goat anti-rabbit Cy3, goat anti-rabbit FITC antibody, goat anti-rabbit Cy5, a goat anti-mouse Cy3 antibody, a goat anti-mouse FITC antibody and a goat anti-mouse Cy5 antibody. Secondary antibodies were incubated for one hour at 37°C in a humid chamber. Later, excess secondary antibodies were washed off with PBTG and the fluorescent signals were fixated with 1% formaldehyde in PBS. DNA was counterstained as mentioned above.

### FISH on immunostained preparations

IF stained preparations were hybridized with an 18q subtelomeric probe as described by Scherthan *et al.* (1996) with modifications. DAPI staining was removed by washing for 5 min in water. A first denaturation of the slide was performed in 70% formamide in a 2 × SSC solution for 5 min at 70°C. The slide was then washed in water and a 3-h NaSCN (Sodium Thiocyanate) 1 M treatment was applied at 65°C. A second denaturation was then performed as mentioned before. Dehydration of the slide was carried out before applying the denatured probe to the slide. Hybridization was performed at 37°C in a humid chamber for at least 48 h. Slide washes and probe detection were performed as described above.

### Microscopy and image analysis

Preparations were evaluated using an Olympus BX70 fluorescence microscope (Olympus Optical Co.). Images were captured and produced by Smart Capture software. (Vysis, Grove, IL, USA) Images were further processed using Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, USA) to match the fluorescent intensity seen in the microscope.

## Results

### Sample karyotypes obtained from stromal ovarian culture agree with prenatal diagnosis

For the cases V54, V62, V63 and V70, a stromal ovarian culture was established as described before (Roig *et al.* 2003) in order to certify prenatal diagnosis and the karyotype of the respective case. In all of the Edwards' syndrome cases, ovarian cultures revealed a 47, XX + 18 karyotype (Table 1). The karyotype of V54 obtained from the somatic culture was 46, XX, thus validating this sample as a control case (Table 1).

### Chromosomal dynamics in trisomy 18 oocytes

IF staining for SYCPs, telomeric proteins, as well as a dual-color FISH applying pan-centromeric and pan-telomeric



probes performed on structurally preserved oocyte preparations and ovary sections respectively, were carried out in order to check for pairing progression in trisomy 18 oocytes. These experiments revealed the same chromosome and protein dynamics as described in euploid oocytes (Fig. 1) (Roig *et al.* 2004).

SYCP3 first appeared at the preleptotene stage as aggregates in DAPI-negative regions, most likely nucleoli. At this stage, centromeres were located at the periphery of the nucleus, while telomeres were found inside the nucleus. At the leptotene stage, telomeric signals were located at the nuclear periphery, while SYCP3 started forming curly threads. At the leptotene/zygotene transition, telomeric clustering was first observed (Fig. 1A). However, tight telomeric clustering was not found until the zygotene stage (Fig. 1B). At this stage, synapsis was initiated and the first SYCP1 fibers were seen mainly near the bouquet base, although some interstitial pairing was also seen (Fig. 1C). At the pachytene stage nuclear polarization was resolved and complete pairing existed and SYCP1 was found along the entire length of the synaptonemal complex. At the diplotene/diacytote stage, SYCP1 was found as little dots and SYCP3 as small threads, telomeres were found inside the nuclei and centromeres were sometimes seen in a line-like organization, as was reported in the euploid human oocytes (Roig *et al.* 2004).

### Bouquet topology is increased in trisomic oocytes

In order to compare meiotic prophase progression in aneuploid and euploid cases, the percentage of oocytes displaying a bouquet topology in each case was analyzed. In the trisomic 18 cases, 47%, 56% and 55% of the oocytes (Table 1) had their telomeres clustered in a limited sector of the nuclear periphery (bouquet topology; Fig. 1). In euploid cases of a similar developmental stage, the bouquet proportion was 36%, 28%, 34%, 36% and 38% (Table 1). Thus, a statistically significant ( $P < 0.0001$ ) increase in the proportion of the bouquet stage oocytes per ovary in trisomy 18 cases was observed.

As noted before in euploid oocytes (Table 1 and Roig *et al.* 2004), the trisomy 18 oocyte bouquet frequencies



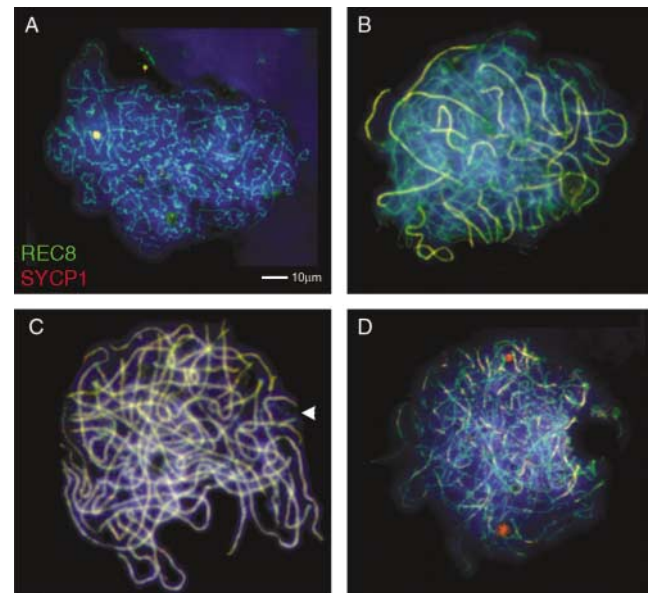
**Figure 1** 3D structure-preserved (A–C) trisomic oocytes displaying all centromeres and all telomeres obtained by FISH (A) and SYCPs and all telomeres (TIN2) revealed by IF (B–C). (A) Equatorial plane of a leptotene-zygotene transition oocyte FISHed with pan-centromeric (red) and pan-telomeric (green) probes showing initiation of telomeric clustering. In this focal plane just some telomere and centromere signals are present. (B) Focal plane of a zygotene oocyte displaying a tight telomeric clustering, that is, the bouquet. (C) Zygotene oocyte showing initiation of synapsis as visualized by the appearance of the first SYCP1 threads (green). Bar, 10  $\mu$ m.

were statistically significantly increased ( $P < 0.0001$ ) over those observed in human spermatogenesis.

### Cohesin core and SC organization during aneuploid meiotic prophase

Silver-stained preparations of trisomic oocytes revealed a significant thickening of the unpaired univalent (Wallace & Hulten 1983, Speed 1984). Thus, REC8 distribution throughout the meiotic prophase in trisomic 18 oocytes was analyzed to see whether this phenomenon was caused by cohesin proteins and whether aneuploidy could affect organization of cohesin cores. In order to properly follow homolog synapsis, IF staining was also performed on the major component of the central element of the SC (SYCP1).

REC8 first appeared at the preleptotene stage as a diffuse signal throughout the nucleus (not shown). At the leptotene stage, REC8 was organized as thin, curly threads (Fig. 2A). At the zygotene stage, REC8 was present as thin threads in unsynapsed regions and as thicker threads which colocalize with SYCP1 corresponding to synapsed regions between homologs (Fig. 2B). At the pachytene stage, complete colocalization of REC8 and SYCP1 was seen in the majority of the oocytes (Fig. 2C, see below). At the diplotene stage, SYCP1 started to disappear and



**Figure 2** Dual color IF against REC8 (green) and SYCP1 (red) was performed on trisomic 18 oocytes in order to analyze cohesin REC8 distribution along the meiotic prophase. (A) Leptotene oocytes displaying long, thin, curly REC8 threads. (B) Zygotene oocyte with REC8 and SYCP1 colocalization at synapsed regions of the homologous chromosomes. (C) Pachytene oocyte in which complete colocalization of SYCP1 and REC8 was found along the synapsed chromosomes; note that this oocyte presents an unsynapsed AE (arrowhead), most likely a chromosome 18. (D) Diplotene oocyte presenting unsynapsed regions and still some synapsed regions, where colocalization between SYCP1 and REC8 persists; note that two small SYCP1 aggregates are present.

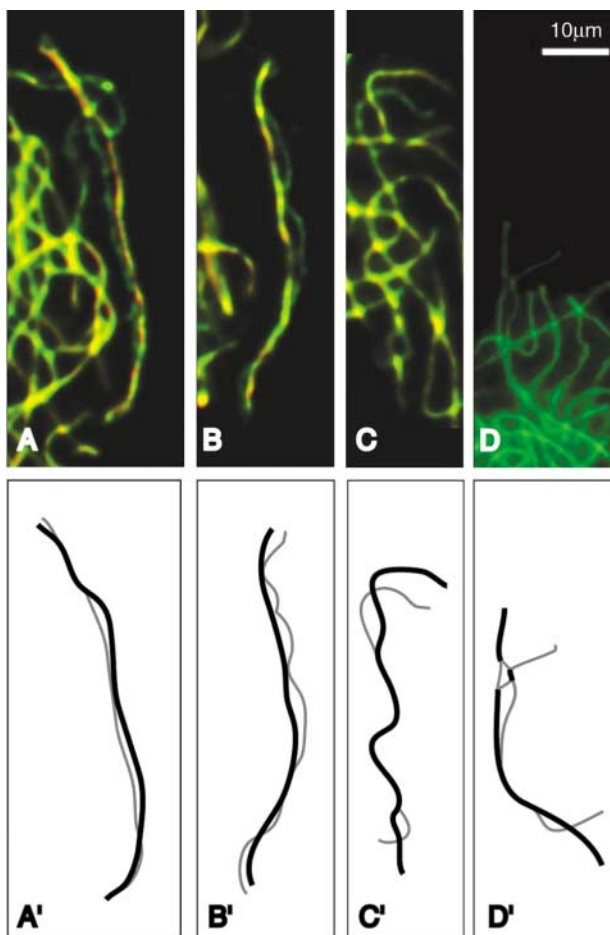
REC8 persisted as long, thin threads in SYCP1-devoid regions (Fig. 2D).

When analysis of REC8 and SYCP1 distribution in trisomic 18 oocytes was performed, some pachytene-stage oocytes displaying complete synapsis of the homologs while the three chromosome 18 cores were partially aligned with synapsed and asynapsed regions, were found (Fig. 3).

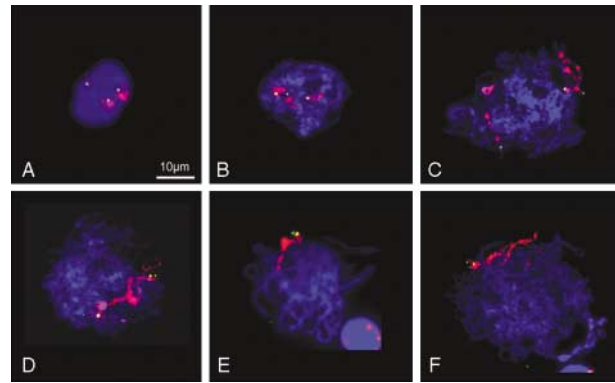
### Pairing and synapsis of the three chromosome 18s during the meiotic prophase

In order to analyze the pairing process of the chromosome 18s in more detail, dual-color FISH using a WCP 18 and a subtelomeric 18q probe was performed on methanol:acetic acid oocyte preparations (Fig. 4, Table 2). In total, 193 oocytes were analyzed.

At the leptotene stage (Fig. 4B), most oocytes (71.43%) displayed three independent signals for the paint and the subtelomeric region. The remaining oocytes displayed two signals, one corresponding to two joint subtelomeric



**Figure 3** Different associations between the homolog 18s observed in pachytene-stage oocytes. IF against REC8 (green) and SYCP1 (red) (A, B and C) and SYCP3 (green) (D) is shown. A schematic drawing is also shown (A', B', C' and D'); black, paired regions; gray, unpaired regions. Image D is a fusion of two focal planes.



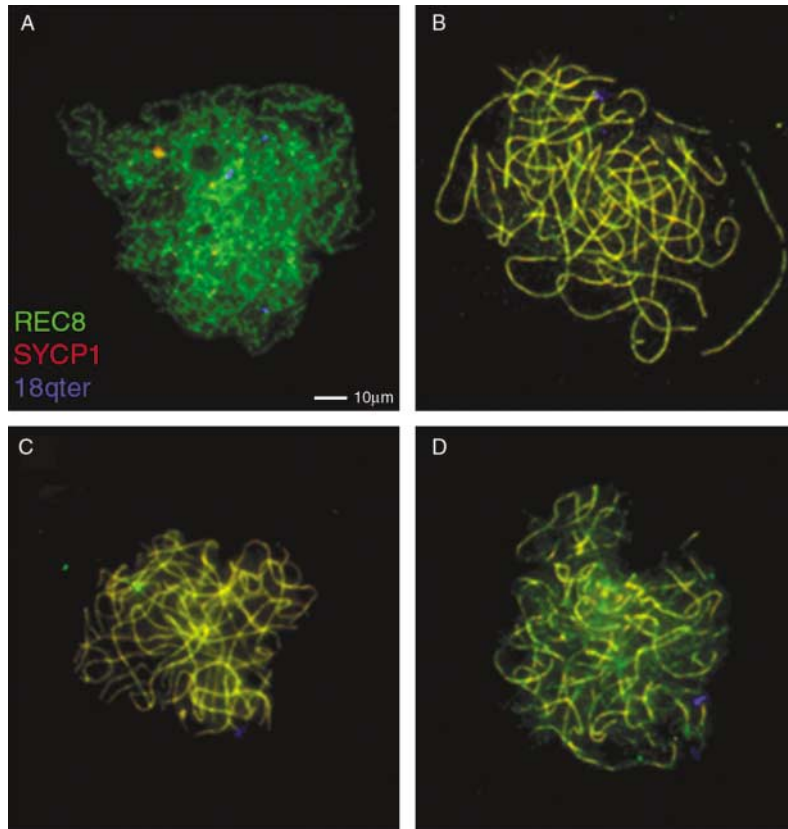
**Figure 4** Pairing process of the homolog 18s analyzed by applying FISH with WCP 18 (red) and LSI 18 (green) on methanol:acetic acid spread oocytes. (A) Interphase nucleus. (B) Early leptotene stage with three independent signals. (C) Zygotene-stage oocyte with two homolog 18s pairing and the other one separate. (D) Zygotene-stage oocyte in which the trivalent 18 is forming; note that one chromosome 18 (left) is pairing with an existing bivalent (right). (E) Pachytene oocyte showing a trivalent 18. (F) Diplotene oocyte where the three chromosome 18s remain joined, presumably by the chiasmata.

signals colocalizing with one paint 18 signal (consistent with an already paired bivalent 18) and the other was the unpaired third chromosome 18 (univalent 18). During the zygotene stage (Fig. 4C,D), 22% of oocytes had three signals (unpaired chromosome 18). Two signals (bivalent plus univalent) were seen in 37% of oocytes. Finally, one single signal comprising all three chromosome 18 paired (trivalent) was seen in 42% of oocytes. At the pachytene stage, the vast majority of the oocytes analyzed (92%) displayed a trivalent (Fig. 4E). The remaining 8% of oocytes showed two separate signals corresponding to a bivalent plus a univalent. Diplotene-stage oocytes generally displayed only one signal (83.33%) (Fig. 4F), but oocytes with two separate chromosome 18 signals were also observed.

The high frequency of single signals observed at the pachytene stage contrasted with previous studies performed on trisomic 21 oocytes (Luciani *et al.* 1976, Wallace & Hulten 1983, Speed 1984, Barlow *et al.* 2002). Single signals observed in methanol:acetic acid preparations at the pachytene stage could either come from synapsed chromosomes or from aligned homologs. Thus, to determine if pairing or alignment of the extra chromosome existed, FISH, using a subtelomeric 18q probe on REC8 and SYCP1 IF preparations, was performed (Fig. 5). All the pachytene oocytes analyzed ( $n = 10$ )

**Table 2** Distribution of chromosome 18 signals in methanol:acetic acid spread oocytes from case V70.

Stage	Oocytes with a trivalent (n (%))	Oocytes with a bivalent and a univalent (n (%))	Oocytes with 3 univalents (n (%))
Leptotene	0 (0.00)	8 (28.57)	20 (71.43)
Zygotene	22 (41.67)	25 (36.67)	13 (21.67)
Pachytene	91 (91.92)	8 (8.08)	0 (0.00)
Diplotene	5 (88.33)	1 (16.67)	0 (0.00)



**Figure 5** Human oocytes stained for REC8 (green) and SYCP1 (red) were FISHed with an 18q subteleric probe (pseudocolored blue). (A) Leptotene oocyte displaying three univalent 18s. (B) Late-zygotene oocyte having a bivalent (seen in yellow due to the colocalization of the SYCP1 and REC8) plus a univalent 18. (C) Pachytene oocyte with a trivalent 18. (D) Diplotene oocyte with two separate signals for the subteleric 18q region. Note that there are still portions where the three chromosome 18s are still paired.

showed a single 18q subteleric signal matching with a SYCP1 thread (Fig. 5C). Despite the small number of nuclei studied, this value is almost the same as that observed by FISH in the previous experiment on methanol:acetic acid spread preparations (Table 2). Similarly, all the leptotene oocytes ( $n = 5$ ) presented three unsynapsed chromosome 18s (Fig. 5A). Fifty percent of the zygotene oocytes analyzed ( $n = 40$ ) displayed a bivalent 18 plus a univalent 18 (Fig. 5B). Only two diplotene oocytes could be analyzed – one showed a bivalent plus a univalent configuration, the other presented a desynapsed trivalent (Fig. 5D).

#### **Does the presence of an extra chromosome affect the pairing process of other homologs?**

In order to analyze the effect of the presence of three chromosome 18s in the nucleus and to see if this phenomenon affects the pairing of other homolog pairs, FISH was performed using a WCP 13 plus an LSI 13/21 to follow the chromosome 13 pairing process in trisomy 18 oocytes (V70). The results (Table 3) showed that chromosome 13s were not paired at leptotene – 100% of the studied oocytes had two univalents. Chromosome 13s paired during the zygotene stage, where we observed 70% of the oocytes displaying one bivalent signal. At the pachytene stage, all nuclei analyzed displayed one chromosome 13 bivalent.

The same experiment was performed in a euploid case from a similar developmental stage (V54) (Table 1).

The results showed no significant differences to those obtained in trisomic 18 oocytes. Almost all leptotene oocytes analyzed displayed two chromosome 13 univalents (91%). Seventy percent of the zygotene oocytes showed one chromosome 13 bivalent. All pachytene and diplotene oocytes showed only one chromosome 13 bivalent.

#### **ATR location in human meiosis**

It has been proposed that ATR controls the correct pairing of the homologs in the male mouse, as has been found preferentially in late-pairing chromosomes in pachytene-stage spermatocytes (Keegan *et al.* 1996, Moens *et al.* 1999). Therefore, and given the delayed formation of the trivalent 18 (Fig. 3), the ATR dynamics in trisomic 18 oocytes were studied.

#### **ATR distribution in euploid human spermatocytes**

As ATR detection has only been performed on mouse spermatocytes, ATR distribution in human spermatocytes was first analyzed in order to characterize the location of this protein during male meiotic prophase (Fig. 6). Spermatocyte staging was performed according to parameters described previously (Solari 1980).

ATR was first seen in human spermatocytes at the leptotene stage as a few foci on the AEs. At zygotene, the number of ATR foci substantially increased and were located in unsynapsed and synapsed regions up to early

**Table 3** Distribution of chromosome 13 signals in methanol:acetic acid spread oocytes from cases V70 and V54.

Stage	V70			V54		
	Sub-stage proportion (%)	Oocytes with a bivalent (n (%))	Oocytes with two univalents (n (%))	Sub-stage proportion (%)	Oocytes with a bivalent (n (%))	Oocytes with two univalents (n (%))
Leptotene	15.6	0 (0.00)	13 (100.0)	23.0	8 (8.4)	87 (91.6)
Zygotene	33.3	25 (69.4)	11 (30.6)	21.4	63 (70.0)	27 (30.0)
Pachytene	48.1	41 (100.0)	0 (0.0)	53.6	241 (100.0)	0 (0.0)
Diplotene	2.9	0 (0.0)	0 (0.0)	2.0	10 (100.0)	0 (0.0)

pachytene (Fig. 6A1–A2), where ATR was seen to decorate almost the entire length of the SC (Fig. 6B). At late pachytene, ATR was predominantly located at the sex body and some ATR foci persisted on SCs, some of them marking telomeres (Fig. 6C). At the diplotene stage, a few ATR foci were present on the SCs.

### ATR distribution in human oocytes

When ATR distribution in euploid oocytes was analyzed, it appeared that ATR distribution was similar to that in human spermatocytes described above. In euploid oocytes, ATR first appeared at leptotene as a few foci. At the zygotene stage, ATR was present at the unsynapsed and synapsed regions of the chromosomes. No remarkable differences in ATR staining were observed between 'late pairing' and 'synapsed' homologs at the late zygotene stage/early pachytene stage, mirroring the situation found in human spermatocytes. At early pachytene, ATR foci were present along the whole length of the SCs. At late pachytene, ATR foci remarkably decreased; some of them were located at the telomeres. Finally, oocytes at the diplotene stage had few ATR foci.

The same ATR distribution was found in trisomic 18 oocytes (Fig. 6D) and apparently no differential ATR staining was observed for the trivalent 18 at late zygotene/early pachytene.

## Discussion

### Chromosomal dynamics in trisomic oocytes fit with dynamics described in euploid oocytes

In this paper, a study of the dynamics of centromeres and telomeres, cohesin core and synapsis development in aneuploid female meiosis was performed.

According to previous observations made in human euploid oocytes (Prieto *et al.* 2004), development of REC8 chromosome cores and synapsis progression was not clearly found to be overtly altered in the presence of an extra copy of human chromosome 18, thus suggesting that cohesin core organization is not affected by the presence of an extra chromosome. The sequence of chromosomal events also mirrored those of euploid human oocytes (Roig *et al.* 2004). Therefore, it seems aneuploidy does not grossly affect chromosome core and SC formation, which

agrees with previous reports (Luciani *et al.* 1976, Wallace & Hulten 1983, Speed 1984, Cheng *et al.* 1995, 1998, Barlow *et al.* 2002).

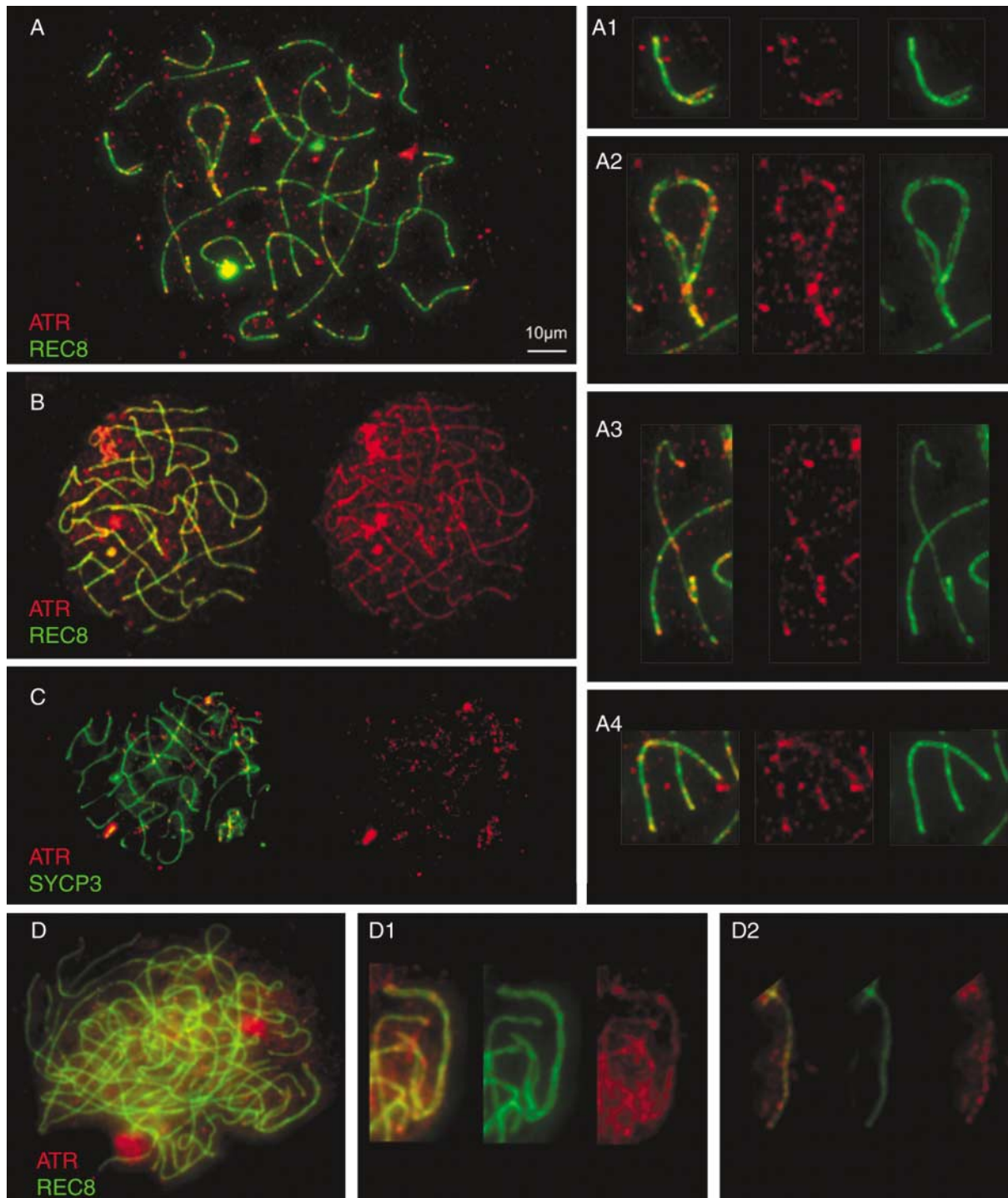
The results of trivalent formation are similar to those described earlier for trisomic cases in human trisomy 21 oocytes (Wallace & Hulten 1983, Speed 1984, Barlow *et al.* 2002) and in the rat (Martínez-Flores *et al.* 2001). However, thickening of the asynapsed chromosome core was not observed in preparations stained with REC8 and SYCP1, contrasting with previous observations made with electron microscopy (Wallace & Hulten 1983, Speed 1984, Martínez-Flores *et al.* 2001). These results indicate that the different proteinaceous composition of the unpaired univalent is not related to meiotic cohesin REC8. IF data also corroborate the absence of SYCP3 and SYCP1 implication in this phenomenon, agreeing with previous observations (Barlow *et al.* 2002).

### An extra chromosome 18 does not alter pairing of other chromosomes

Studies performed on Down's syndrome oocytes suggest that an extra chromosome may alter the pairing of other homologs (Cheng *et al.* 1998). When a comparison was made of the chromosome 13 pairing process found in Edwards' syndrome oocytes with control oocytes from a case at the same developmental stage, no obvious differences were found. Moreover, similar timing was presented. In contrast, Cheng *et al.* (1998) reported that chromosome 13 suffered a pairing delay in trisomy 21 oocytes. The differences in chromosome 13 pairing found between trisomy 21 and trisomy 18 oocytes may be caused by the frequent association existing between acrocentric NOR-bearing chromosomes 13 and 21, which is commonly observed both in euploid and aneuploid oocytes (I Roig and M Garcia, data not published).

Moreover, normal SYCP1 dynamics obtained in SYCP1 IF experiments also provide evidence that general chromosome synapsis progresses with no obvious differences compared with euploid oocytes (Roig *et al.* 2004).

Cheng *et al.* (1998) suggested that the possible interference caused by the extra chromosome 21 was diminished by the formation of a trivalent 21, mirroring observations made by other authors (Speed 1984, Rodríguez & Burgoyne 2000). Thus, the high trivalent-18 formation efficiency observed in this study could explain the absence of an



**Figure 6** ATR distribution in human spermatocytes (A–C) and in a human trisomic 18 oocyte (D). (A) Late-zygotene spermatocyte in which almost all bivalents are paired. Some of the spermatocyte bivalents are enlarged (A1–A4) in order to show that ATR foci are present at the unpaired bivalents (A1 and A2), the sex body (A3) and the already-paired bivalents (A4); note that the ATR foci are present in both synapsed and asynapsed regions. (B) Early-pachytene spermatocyte having almost the whole length of the SCs covered with ATR; note the different brightness of the ATR foci and the telomeric position of some of them. (C) Late-pachytene spermatocyte showing that the number of ATR foci has decreased substantially, being at some telomeric and interstitial sites. ATR shows preferential staining for the sex body. (D) Late-zygotene oocyte mirroring the situation found in spermatocytes. A late-pairing bivalent (D1) presents a similar staining pattern to that of an already-paired bivalent (D2, only a fragment of the whole bivalent is zoomed).

interfering effect of the extra chromosome in the other chromosome-pairing processes.

### **Presence of an extra chromosome 18 delays bouquet resolution in trisomic oocytes**

The bouquet has been implied as a mediator of chromosome pairing (Loidl 1990, Scherthan 2001). A prolonged bouquet stage has been found between species with a similar genome size, but different chromosome complement (mouse vs cattle, where the latter has more chromosomes and thus a longer bouquet stage; see Pfeifer *et al.* 2001 for discussion) and disomic yeast strains (Rockmill & Roeder 1998). The significant increase in bouquet frequency in trisomy 18 oocytes as compared with that of euploid cases of similar stage (Table 1) suggests that the oocyte modulates the bouquet stage in response to an extra chromosome.

Results obtained in methanol:acetic acid spreads suggest that chromosome-18 pairing is an efficient process to achieve the trivalent condition. Trivalent formation is preceded in leptotene and zygotene by the formation of a bivalent plus a univalent, since the portion of oocytes with bivalent plus univalent was higher at leptotene and zygotene than in later stages (Table 2). Moreover, late-pairing trivalent 18s shown in Fig. 3 reflect the fact that normally a trivalent is formed from a bivalent plus a univalent. In all of the images, there seems to be an already-paired bivalent (black) to which the univalent (gray) tries to pair. This observation may reflect the requirement to form a trivalent due to the cell being allowed to pass a pachytene-pairing checkpoint (Roeder & Bailis 2000). It may be that the time required for bringing about the encounter of surplus chromosomes takes longer, and therefore bouquet topology lasts longer in aneuploid cells compared with euploid oocytes. It may also be that trivalent formation is a late event in prophase I and that the cells spend more time until pairing is finally achieved.

REC8-SYCP1 IF studies have revealed that the three chromosome 18 cores were not perfectly aligned in some early pachytene oocytes (Fig. 3), thus mirroring the findings of Barlow *et al.* (2002). Therefore, it could be that the bouquet also serves a role in mediating and/or maintaining homolog alignment. Alternatively, the presence of proteins involved in the recombination process, such as Replication Protein A (RPA) at the trivalent 18 which is formed at early pachytene (not shown) may reflect the fact that delayed recombination may have the potential to elicit a bouquet prolongation (Scherthan 2003, Roig *et al.* 2004).

Nevertheless, Edwards' syndrome is characterized by a general developmental delay, which could not be excluded as playing a role in the origin of the delayed bouquet resolution found in trisomic 18 oocytes. However, this seems unlikely since prophase sub-stage frequencies found in trisomy 18 (V70) and euploid (V54) cases were similar (Table 3). In the same way, preliminary

results obtained in Down's syndrome oocytes (Robles P, Roig I, Garcia R, Egozcue J and Garcia M, unpublished data) seem to support the hypothesis that the extended bouquet could be due mainly to the presence of an extra chromosome.

### **ATR in aneuploid oocytes**

The specific ATR decoration of the late-pairing bivalents found in mouse spermatocytes (Keegan *et al.* 1996, Moens *et al.* 1999, Baart *et al.* 2000) was not observed in human spermatocytes or oocytes in this study. Moreover, in the cells with late-pairing bivalents, ATR was most often located at the synapsed regions rather than at the asynapsed regions (Fig. 6A1 and A2). In this case, late zygotene spermatocytes showed that ATR was located mostly at the paired region of the XY bivalent (Fig. 6A3). This is in contrast to what has been reported for the male mouse where ATR was largely seen in asynapsed regions at the late zygotene stage and no ATR staining was observed at the pachytene stage except for the sex body (Keegan *et al.* 1996, Moens *et al.* 1999, Baart *et al.* 2000). A recent study performed on male mouse spermatocytes suggests a pachytene checkpoint function for ATR, which could be related to recombination rather than to synapsis (Perera *et al.* 2004). Our results seem to be in agreement with the latter hypothesis.

This is the first study in which a combination of FISH and IF techniques have been used in order to analyze homolog pairing in human trisomic oocytes. The usage of a dual approach enables the study of a large number of oocytes with accurate precision. Our results show that even in the presence of an extra chromosome the pairing process in human oocytes is generally completed, yielding evidence of the reliability of the homolog-chromosome pairing process in human female meiosis. However, further analysis in human euploid and aneuploid oocytes and their peculiarities in homolog pairing is required in order to gain deeper insights into the occurrence of this phenomenon in the human species.

### **Acknowledgements**

We thank Dr I Prieto and Dr J L Barbero for antibody donation and comments and discussion about the manuscript. The authors also thank Dr F Vidal for her invaluable help. Finally, we would also like to thank Dr C Heyting for kindly donating SYCP3 and SYCP1 antibodies. I R is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2000-0992), P R has a fellowship from the Ministerio de Sanidad, Grant FIS 02/0297 and R G has a fellowship from the Generalitat de Catalunya (2004FI 00953). This work was supported by a Ministerio de Sanidad grant, FIS 02/0297.

The English of this manuscript has been revised by a native English speaking instructor of English of this University.

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

## References

- Baart EB, de Rooij DG, Keegan KS & de Boer P 2000 Distribution of ATR protein in primary spermatocytes of a mouse chromosomal mutant: a comparison of preparation techniques. *Chromosoma* **109** 139–142.
- Barlow AL & Hultén MA 1997 Sequential immunocytogenetics, molecular cytogenetics and transmission electron microscopy of microspread meiosis I oocytes from a human fetal carrier of an unbalanced translocation. *Chromosoma* **106** 293–303.
- Barlow AL, Tease C & Hultén MA 2002 Meiotic chromosome pairing in fetal oocytes of trisomy 21 human females. *Cytogenetics and Genome Research* **96** 45–51.
- Bojko M 1983 Human meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlsberg Research Communications* **48** 457–483.
- Cheng EY, Chen YJ & Gartler SM 1995 Chromosome painting analysis of early oogenesis in human trisomy 18. *Cytogenetics and Cell Genetics* **70** 205–210.
- Cheng EY, Chen YJ, Bonnet G & Gartler SM 1998 An analysis of meiotic pairing in trisomy 21 oocytes using fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **80** 48–53.
- Cohen PE & Pollard JW 2001 Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* **23** 996–1009.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B & Jessberger R 2000 Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *Journal of Cell Science* **113** 673–682.
- Eijpe M, Offenberg H, Jessberger R, Revenkova E & Heyting C 2003 Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SCM1 $\beta$  and SMC3. *Journal of Cell Biology* **160** 657–670.
- Fawcett DW 1956 The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **2** 403–406.
- García M, Dietrich M, Freixa L, Vink ACG, Ponsa M & Egozcue J 1987 Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Human Genetics* **77** 223–232.
- Harper L, Golubovskaya I & Cande W 2004 A bouquet of chromosomes. *Journal of Cell Science* **117** 4025–4032.
- Hassold T & Hunt P 2001 To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews. Genetics* **2** 280–291.
- Heyting C 1996 Synaptonemal complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **8** 389–396.
- Keegan KS, Holtzman DA, Plug AW, Christenson ER, Brainerd EE, Flaggs G, Bentley NJ, Taylor EM, Meyn MS, Moss SB *et al.* 1996 The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes and Development* **10** 2423–2437.
- Kim S, Kaminker P & Campisi J 1999 TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature Genetics* **23** 405–412.
- Lammers JH, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ & Heyting C 1994 The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Molecular and Cellular Biology* **14** 1137–1146.
- Lenzi ML, Smith J, Snowden T, Kim M, Fishel R, Poulos BK & Cohen PE 2005 Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *American Journal of Human Genetics* **76** 112–127.
- Loidl J 1990 The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* **33** 759–778.
- Luciani JM, Devictor M, Morazzani MR & Stahl A 1976 Meiosis of trisomy 21 in the human pachytene oocyte. *Chromosoma* **57** 155–163.
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeny S, Bonner W & Burgoyne PS 2001 Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genetics* **27** 271–276.
- Martínez-Flores I, Egozcue J, Cabero L & García M 2001 Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*). *Histology and Histopathology* **16** 701–706.
- Martínez-Flores I, Egozcue J & García M 2003 Synaptic process in rat (*Rattus norvegicus*): influence of the methodology on the results. *Microscopy: Research Techniques* **60** 450–457.
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M & Heyting C 1992 A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO Journal* **11** 5091–5100.
- Moens PB, Tarsounas M, Morita T, Habu T, Rottinghaus ST, Freire R, Jackson SP, Barlow C & Wynshaw-Boris A 1999 The association of ATR protein with mouse meiotic chromosome cores. *Chromosoma* **108** 95–102.
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE & Spyropoulos B 2001 The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA–DNA interactions without reciprocal recombination. *Journal of Cell Science* **115** 1611–1622.
- Moses MJ 1968 Synaptonemal complex. *Annual Review of Genetics* **2** 363–412.
- Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RLJ, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ & Heyting C 1998 SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Research* **26** 2572–2579.
- Pelttari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P, Santucci-Darmanin S, Jessberger R, Barbero JL, Heyting C *et al.* 2001 A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Molecular and Cellular Biology* **21** 5667–5677.
- Perera D, Perez-Hidalgo L, Moens PB, Reini K, Lakin N, Syvaaja JE, San-Segundo PA & Freire R 2004 TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role of TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Molecular Biology of the Cell* **15** 1568–1579.
- Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Perez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martínez AC & Barbero JL 2000 STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB Journal* **14** 581–592.
- Pfeifer C, Thomsen PD & Scherthan H 2001 Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenetics and Cell Genetics* **93** 304–314.
- Pfeifer C, Scherthan H & Thomsen PD 2003 Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Developmental Biology* **255** 206–215.
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martínez AC, Rufas JS & Barbero JL 2001 Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nature Cell Biology* **3** 761–766.
- Prieto I, Pezzi N, Buesa JM, Kremer L, Barthelemy I, Carreiro C, Roncal F, Martínez A, Gomez L, Fernandez R *et al.* 2002 STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Reports* **3** 543–550.
- Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martínez A, Martínez-A C, Hultén MA, Barbero JL 2004 Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Research* **12** 197–213.

- Rockmill B & Roeder GS** 1998 Telomere-mediated chromosome pairing during meiosis in budding yeast. *Genes and Development* **12** 2574–2586.
- Rodriguez TA & Burgoyne P** 2000 Evidence that sex chromosome asynapsis, rather than excess Y gene dosage, is responsible for the meiotic impairment of XYY mice. *Cytogenetics and Genome Research* **89** 38–43.
- Roeder GS & Bailis JM** 2000 The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics* **16** 395–403.
- Roig I, Vanrell I, Ortega A, Cabero L, Egozcue J & Garcia M** 2003 The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. *Cytotechnology* **41** 45–49.
- Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M & Scherthan H** 2004 Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* **113** 22–33.
- Scherthan H** 2001 A bouquet makes ends meet. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2** 621–627.
- Scherthan H** 2003 Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics. *Cytogenetics and Genome Research* **103** 235–244.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M & Cremer T** 1996 Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *Journal of Cell Biology* **134** 1109–1125.
- Schmekel K & Daneholt B** 1995 The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends in Cell Biology* **5** 239–242.
- Solari AJ** 1980 Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* **81** 315–337.
- Speed RM** 1984 Meiotic configurations in female trisomy 21 foetuses. *Human Genetics* **66** 176–180.
- Wallace BMN & Hulten MA** 1983 Triple chromosome synapsis in oocytes from a human foetus with trisomy 21. *Annals of Human Genetics* **47** 271–276.
- Weier HU, Kleine HD & Gray JW** 1991 Labeling of the centromeric region on human chromosome 8 by *in situ* hybridization. *Human Genetics* **87** 489–494.

---

Received 11 November 2004

First decision 29 November 2004

Revised manuscript received 14 January 2005

Accepted 24 January 2005



## 4.5.TREBALL 5

### **HUMAN FETAL OVARIAN CULTURE PERMITS MEIOTIC PROGRESSION AND CHROMOSOME-PAIRING PROCESS**

**I. Roig, R. Garcia, P. Robles, R. Cortvrindt, J. Egozcue, J.  
Smitz i M. Garcia.**

**Hum. Reprod. (Submitted).**

**Índex d'impacte (2003)=3.125**

**Human fetal ovarian culture permits meiotic progression and  
chromosome-pairing process**

Roig I.<sup>1</sup>, Garcia R.<sup>1</sup>, Robles P.<sup>1</sup>, Cortvrindt R.<sup>2</sup>, Egozcue J.<sup>1</sup>, Smitz J.<sup>2</sup>, Garcia M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Dept. de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,  
Univ. Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup> Follicle Biology Laboratory,  
Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit Brussel, Brussels,  
Belgium.

Corresponding author:

Montserrat Garcia,  
Dept. de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,  
Univ. Autònoma de Barcelona.  
08193 Bellaterra, Spain.  
Email: montserrat.garcia.caldes@uab.es

Some of the data presented in this manuscript have already been presented before at the ESRHE workshop "Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis. *In vivo* and *in vitro* Approaches", 2002.

**Summary:**

Herein is presented a new culture technique that allows human fetal oocytes to survive for a long period of time *in vitro*, pair homologous chromosomes correctly and progress through the meiotic prophase. Furthermore, this technique promotes oogenesis entrance to meiosis *in vitro*.

**ABSTRACT**

Implication of the female meiotic process in aneuploidy etiology seems to be crucial in humans. The first stages of mammalian female meiosis take place during the fetal time-period, therefore, because of that, only little is known about female meiosis. The goal of this study is to develop a new culture technique that permits human oocytes to progress through the meiotic prophase to have an easier strategy in order to study human female meiosis. Fetal ovaries from four cases were cultured up to 35 days. Results indicate that, although there was an important individual effect of ovarian response to culture conditions, human oocytes survived *in vitro* up to five culture weeks. In three cases, there was a statistically significant meiotic progression after 4 culture weeks (F15, V80 and V84). Homolog synapsis was studied for the first time and results suggested synapsis was completed following the same process described previously for euploid oocytes, as followed by the chromosome-13 pairing process and synaptonemal complex formation. Although a higher proportion of degenerated oocytes was observed as culture-time increased, and results also give evidence of an oogonial entrance to meiotic prophase.

## INTRODUCTION

Aneuploidy is a major cause of spontaneous abortions and severe anomalies among humans, and it is mainly due to errors in female gametogenesis (Hassold and Hunt, 2001). As the first stages of mammalian female meiosis take place during the fetal time-period and since human fetal ovarian tissue is especially difficult to obtain, not many studies are performed on this topic.

Meiosis is a reductional division of the genome that produces haploid gametes in order to ensure species diploidy at fertilization. During meiotic prophase, homologous chromosomes pair and exchange material between them. The meiotic prophase is classically subdivided into different stages. At leptotene, chromosomes start condensation. At late-leptotene, in human oocytes (Roig *et al.*, 2004), all-chromosome telomeres cluster at a limited portion of the nuclear envelope (known as '*bouquet*'; for a review see: Harper *et al.*, 2004) in order to promote homolog encounters. At the zygotene stage, synapsis takes place. During the pachytene stage recombination ends. Finally, at the diplotene stage homologs separate, only remaining joined by the points where recombination has occurred (chiasmata). At this stage, mammalian oocytes block and meiosis will not continue until sexual maturity is achieved.

Efforts have been made to establish the critical conditions *in vitro* that promote oogonia to go through the first meiotic stages, in order to have a new strategy and better material to study the first stages of the meiotic process in females. Reports of fetal ovarian cultures in mouse (Lyra<sup>kou</sup> *et al.*, 2002) and human

(Blandau, 1969; Baker and Neal, 1974; Zhang *et al.*, 1995; Hartshorne, 1996; Hartshorne *et al.*, 1999) have been published. In these studies, meiotic progression *in vitro* has been assessed, and some of these papers also report initiation of meiosis *in vitro* (Baker and Neal, 1974; Hartshorne *et al.*, 1999). In the same way, histological analysis of long-term cultures of frozen/thawed, second-trimester human fetal ovarian pieces have suggested meiotic prophase progression in the female germ cells (unpublished results Cortvrindt R. & Smitz J). However, there is no knowledge regarding how culture conditions affect the homolog pairing-process.

Thus, the aim of our study is to develop a new culture technique which permits human fetal oocytes to progress through the meiotic prophase following the same dynamics known to happen *in vivo*. As the homolog pairing-process of the human oocyte have been characterized in full detail (Roig *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2005 and Roig *et al.*, in press), we choose to monitor the chromosome-13 pairing process, the synaptonemal complex formation and *bouquet* formation in cultured oocytes and compare it to the topological features of *in vivo* developed ones.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Biological material***

Ovaries from four fetuses (Table 1) obtained after legal interruption of the pregnancy according to the Ethical Committee of the Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, were used in this study. Fetus age was deduced from last menstrual period and foot length when available. Three fetuses (F3, V80 and V84) had a euploid karyotype . F15 was found to have trisomy 21 after prenatal diagnosis.

### ***Ovarian culture***

F3 and F15 ovaries were collected in PBS. After removing adjacent tissues and repeated rinsing of fetal ovarian tissues, the tissues were further dissected. In order to try to ensure equal inclusion of cortical and central ovarian regions in each ovary piece, ovaries were cut transversely, obtaining ten equal-sized pieces from each ovary. The pieces were cryopreserved by a programmed, slow-freezing protocol (DMSO) (Newton *et al.*, 1998) and stored in liquid nitrogen (for a maximum of two years). After thawing, the ovarian pieces were first equilibrated overnight in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium (Gibco BRL), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. After washing the ovarian pieces in freshly prepared and pre-warmed medium, the pieces were distributed in tubes (two tubes per culture time) containing 3ml  $\alpha$ -Minimal Essential Medium (Gibco BRL), 2% Human Albumin Serum (Grifols), 5 $\mu$ g/ml

Insulin (Gibco BRL), 5 $\mu$ g/ml Transferrin (Gibco BRL), 5ng/ml Selenium (Gibco BRL) and 100IU/ml Penicillin-100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Gibco BRL). For cases F3 and F15, ovarian cultures lasted 4 and 5 weeks, respectively. Samples were labeled as T0 after the overnight culture and depending on the extraction time (T1, T2, T3, T4 and T5, each label indicating the weeks of culture). All cultured tissues were fixed in methanol:acetic acid.

Two more cases, V80 and V84, were cultured avoiding freezing-thawing of the sample. For this purpose, ovaries were collected in sterile PBS 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL) at the hospital within 2 hours of delivery. Ovarian pieces were cultured following the culture protocol described above. Each week, tissues from two culture tubes were processed for analysis of meiotic progression by applying different techniques (see below). At least one ovarian piece per culture-time was processed immediately to obtain methanol:acetic acid spreads, the rest of the pieces were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Each week, 2.5 ml of culture medium per tube was changed for fresh pre-warmed medium. For V80 and V84 fresh samples were labeled as T0. Cultured samples were labeled as T1, T2, T3 and T4 (indicating the week of fixation).

### ***Oocyte preparations***

In order to analyze meiotic progression of oocyte spreads, 3D-structure preserved preparations and methanol:acetic acid spreads were performed as described elsewhere (Martínez-Flores *et al.*, 2003; Roig *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2005).



***FISH on methanol:acetic acid preparations***

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on methanol:acetic acid preparations was performed as described before (Roig *et al.*, 2005) with slight modifications. Pepsin digestion was applied to preparations from culture times T1, T2, T3 and T4 in order to increase the efficiency of the hybridization. Slides were post-fixed in a formaldehyde solution and denatured in 70% formamide in 2xSSC at 69°C for 4 min. Probe denaturation was performed as described by the manufacturer and the denatured probe was applied after slide dehydration. Oocytes were hybridized with a whole-chromosome 13 probe labeled with Cy3 (Cambio; Cambridge, UK) and a dual locus-specific probe for chromosomes 13q14 (labeled with FITC) and 21q22 (labeled with TRITC) (Appligene Oncor; Heidelberg, Germany). Three post-hybridization washes were performed in 50% formamide in 2xSSC, 2xSSC and 0.4xSSC 0.05% Tween 20 at 45°C. Finally, DNA was counterstained applying an antifade solution (Vector Laboratories; Burlingame, USA ) containing 0.1µg/ml of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma; Munich, Germany).

Oocyte staging was performed according to the morphological criteria previously described (Garcia *et al.*, 1987; Roig *et al.*, 2005).

***Immunostaining of structurally preserved preparations***

Immunofluorescence (IF) against proteins of the synaptonemal complex (SC) (SYCP3, SYCP1, and cohesin REC8) and telomeric proteins (TRF2 and TIN2) was performed as described before (Roig *et al.*, 2004) with one small modification.

Oocytes from cultured ovarian pieces needed an extra permeation treatment with 0.05% formaldehyde in PBS for 30 minutes after fixation of the sample.

Identification of the SC proteins was performed using the following antibodies: a rabbit polyclonal serum against SYCP3 (Lammers *et al.*, 1994), a rabbit polyclonal serum against SYCP1 (Meuwissen *et al.*, 1992), a rabbit polyclonal serum against cohesin REC8 (Eijpe *et al.*, 2003) (all of them kind gifts from Christa Heyting; Wageningen, NL). Chromosomal telomeres were detected using a mouse monoclonal antibody against telomeric protein TIN2 (Imgenex; San Diego, USA) (Kim *et al.*, 1999) and a mouse monoclonal antibody against TRF2 (Abcam; Cambridge, UK). IF staining was performed as described before (Roig *et al.*, 2004). Primary antibodies were diluted in PTBG (PBS, 0.2% BSA, 0.2% Gelatin, 0.05% Tween 20) and incubated overnight at 4°C in a humid chamber. After washing away unattached antibodies with PBTG, detection was performed using some of the following fluorochrome-conjugated secondary antibodies (all from Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, USA, diluted in PTBG): goat anti-rabbit FITC antibody and a goat anti-mouse Cy3 antibody. Secondary antibodies were incubated for an hour at 37°C in a humid chamber. After washing off excess secondary antibodies and fixation of the fluorescent signals with 1% formaldehyde in PBS, DNA was counterstained as mentioned above.

Analysis of degenerated oocytes (SYCP1-positive apoptotic oocytes) was performed following chromatin morphological criteria.

***Microscopy, image analysis and statistics***

Preparations were evaluated using an Olympus BX70 fluorescence microscope (Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany). Images were captured and produced by Smart Capture software. Images were further processed using Adobe Photoshop to match the fluorescence intensity as observed in the microscope.

Evaluation of the significance of the obtained results was performed applying a Chi-square test.

## RESULTS

### ***Presence of oocytes in culture***

Oocytes at meiotic prophase were found at all culture times in all cultured ovarian pieces, except for a single ovarian piece from V80 which was cultured for four weeks and designated to analyze the proportion of oocytes presenting a *bouquet* topology (see below). Taking into account the accurate way ovaries were divided in order to include both cortical and central regions from each ovarian piece, a culture cause cannot be completely excluded. The total number of analyzed oocytes differed in relation to culture time and tissue sample, ranging from 7 to 317, as reflected in Table 2. At most of the culture times, except for the F3 culture, enough oocytes were found in each ovarian piece in order to permit the statistical analysis of results. Due to the heterogeneous distribution of oocytes in the ovary, figures on the number of analyzed oocytes were not considered reliable markers for meiotic progression or degeneration.

### ***Oocyte survival and meiosis progression “in vitro”***

Meiotic prophase progression was measured by analyzing changes in the distribution of the oocytes in the meiotic prophase substages through culture times (Figure 1). Cases F3 and F15 were cultured as a first attempt to analyze meiosis progression *in vitro*. In the F3 culture (Fig. 1A) only few oocytes were obtained from each culture time, therefore it could not be used for analytical

purposes. In the F15 culture (Fig. 1B) the number of oocytes found was sufficient for analysis, ranging from 11 to 67. In this case, a statistically significant meiotic progression ( $\chi^2=9.802$ ;  $p=0.007$ ), as measured by the increase of the pachytene-stage proportion, was observed from T0 to T4. The percentage of pachytene-stage oocytes increased from 20.9% at T0 to 63.6% at T4, suggesting a meiotic progression as the culture progresses. Surprisingly, the percentage of pachytene-stage oocytes decreased and leptotene oocytes increased at T5.

In the V80 culture (Fig. 1C), almost all culture times (see below) maintained the same oocyte substage proportion; thus, there were no significant changes from T0 to T4 through the culture ( $\chi^2=0.571$ ;  $p=0.903$ ). However, there was a statistically significant, dramatic loss of pachytene-stage oocytes accompanied by an increase of leptotene-stage oocytes ( $\chi^2=14.125$ ;  $p=0.003$ ) after the third culture week (T3). This drastic change was restored in just one week. At T4, oocyte distribution was similar to that at T0, showing a statistically significant meiotic progression from T3 to T4 ( $\chi^2=10.271$ ;  $p=0.016$ ).

The V84 culture (Fig. 1D) showed a statistically significant variation of the meiotic prophase proportions throughout the culture time ( $\chi^2=14.497$ ;  $p=0.002$ ). During the culture there was a significant decrease of later stages (pachytene and diplotene; going from 45.2% to 13.3% and from 15.4% to 6.7%; respectively) and an increase of earlier stages, principally the leptotene stage, from 8.7% found in the fresh sample to 40% found after 4 weeks of culture.

These results suggest that not only do oocytes survive *in vitro* conditions, but they are also able to progress through the meiotic prophase in ovarian cultures.

***Dynamics of homolog pairing-process in cultured oocytes.***

During meiotic prophase, chromosomal telomeres arrange themselves in a small portion of the nuclear envelope, known as *bouquet* topology. This process is thought to be crucial in order to help homolog chromosomes to complete synapsis (Scherthan, 2001). In this sense, we analyzed whether a normal *bouquet* topology existed in V80 and V84 cultures to check if homologs paired in cultured oocytes following the same topological organization described previously in fresh oocytes (Roig et al., 2004).

In both cases, and in all culture times analyzed, we commonly found oocytes at the *bouquet* stage showing no noticeable differences to the ones obtained from fresh and frozen samples (data not published; Roig et al., 2004; Roig et al., 2005). The proportion of *bouquet*-stage oocytes was counted for each culture time, giving no statistically significant different figures in V80 (Fig. 2).

In both cultures (V80 T2-T3, and V84 T0-T1) there seems to be an increase of cells that do not present a *bouquet* topology (labeled as “no bouquet” in Fig. 2) when the rate of leptotene oocytes rises (Fig. 2). This suggests either that cultured oocytes fail to start telomeric clustering at the leptotene stage or that early-leptotene oocytes do proportionally increase in culture (early-leptotene

stages have been reported not to have their chromosomal telomeres clustered) (Roig *et al.*, 2004).

In order to address these hypotheses, we investigated the pairing process of homolog chromosome 13 during meiotic prophase *in vitro* and also the synaptonemal complex (SC) formation in V80 and V84 cultured oocytes.

In both cases and at all culture times, chromosome 13 paired following a similar dynamics as in fresh oocytes (Roig *et al.*, in press). At almost all culture times, leptotene-stage oocytes displayed two separate chromosome 13s (Fig. 3A), except at V80 T0 in which 3% of the analyzed oocytes displayed an already-paired bivalent 13. In the V80 culture the proportion of zygotene-stage oocytes with a chromosome-13 bivalent ranged from 66% (n=35, T2) to 78% (n=9, T3). In the V84 culture, the presence of the paired bivalent 13 of zygotene oocytes ranged from 57% (n=30, T0) to 40% (n=5, T4). The proportion of oocytes zygotene-stage with an already-paired bivalent 13 is not significantly different between culture times. All pachytene-stage oocytes analyzed had a paired bivalent 13 (Fig 3C). Similarly, all diplotene oocytes analyzed, displayed a desynapsing bivalent 13 (Fig 3D).

The data obtained for the chromosome-13 pairing process in V80 and V84 cultured oocytes are similar to those obtained from fresh samples (Roig *et al.*, in press), suggesting that ovarian culture does not seem to affect the homolog-chromosome pairing process.

Furthermore, the homolog pairing process was also analyzed following synaptonemal complex formation. This was not found to differ between fresh

sample (T0) and cultured oocytes. Despite finding degenerated oocytes (see below), oocytes with apparently normal SCs, evaluated by synaptonemal complex proteins (SYCP3 and SYCP1) and cohesin REC8 localization, were found at each culture time. This again suggests that ovarian culture does not affect the homolog pairing process.

### ***Oocyte degeneration in culture.***

As previous reports suggested the existence of degenerate oocytes in culture (Hartshorne *et al.*, 1999), specially at the pachytene stage (Baker and Neal, 1974), the percentage of oocytes was analyzed in which the pairing process had started, followed by the presence of SYCP1 and displaying a nuclear DNA degeneration which is characteristic of apoptotic cells (Fig. 2B), these cells were scored as SYCP1-positive degenerate oocytes.

In the V80 culture, there was a low degeneration rate throughout the culture (around 3%, see Fig. 2A), but it statistically significantly increased at T3 to 46% ( $\chi^2=21.662$ ;  $p<0.001$ ). The degeneration rate decreased at the following culture time (T4) to 13 %.

In the V84 culture, the percentage of oocyte degeneration statistically significantly increased progressively from 0% at T0 to 57% at T4 ( $\chi^2=13.416$ ;  $p<0.001$ )(Fig. 2A).

In both cultures, the increase of the degeneration rate coincided in time with a rise in the proportion of oocytes that did not display telomeric clustering (no *bouquet* stage) nor with an augmentation of leptotene-stage oocytes (Fig. 2A).



## DISCUSSION

This paper suggests that meiotic prophase could be maintained oocytes grown in these *in vitro* conditions. Results bring unequivocal evidence for *de novo* initiation of meiosis by culture conditions of human oocytes. Furthermore, a complete analysis of the evolution of homolog-chromosome pairing process, chromosome dynamics (*bouquet* topology) and homolog synapsis is presented for the first time in cultured oocytes. The results suggest that the culture technique described here permits homolog pairing and synapsis progression with nearly similar patterns as those described in fresh oocytes (Roig *et al.*, 2004 and Roig *et al.*, in press).

### ***“In vitro” culture can sustain meiosis***

The techniques used in this study permit unequivocal identification of oocytes, thus finding meiocytes in almost all ovarian pieces. Analysis of the cultured tissue has demonstrated that meiosis can be maintained *in vitro*. After two culture weeks, V80 ovarian samples maintained the same oocyte proportion as the fresh sample (Fig. 1). Throughout all culture times the normal chromosome-13 pairing process was found. The existence of normal telomeric dynamics and the apparently normal SC formation demonstrates that normal development of the homolog pairing process in human oocytes can be maintained in long-term culture. Other studies (Hartshorne *et al.*, 1999) have also reported that oocytes could be maintained for long periods of time *in vitro*,

but an analysis of the homolog pairing process was not described. Surprisingly, and despite the different numbers of oocytes found, F15 and F3 cultures respond to the culture technique similarly to that of V80 and V84 cultures, suggesting that freezing-thawing protocols used in the first cases do not affect the capacity of the oocytes to progress in culture.

In first attempts to stain cultured ovarian tissues it was noted that the original protocols for fresh samples did not perform as expected. Cultured oocytes needed a longer permeation for IF staining and the hypotonic treatment did not reveal 'clean' chromosomes. An enzymatic digestion step was needed in order to remove residual cytoplasm before applying FISH.

Present observations suggest that ovarian culture conditions may alter the cell membrane, making it less reactive to classic protocols. However, these changes did not seem to affect the homolog-chromosome pairing process. Nevertheless, this observation should be kept in mind when discussing results obtained in this study and other published studies in which a defective meiotic recombination is observed in cultured mouse oocytes (Lyra<sup>1</sup> *et al.*, 2002).

Our results emphasize the existence of an important difference between subject effect on response to the same culture technique. The sample developmental stage can also be the reason for a different response in terms of culture progression as different fetal ages were used. Nevertheless, major patterns can be recognized in all cultures. For example: while V80 does not show a variation in percentage of oocytes at different meiotic stages after two

weeks of culture (Fig. 1), the V84 meiotic proportion changed significantly after only one culture week. However, in both cultures, changes lead to an increase of leptotene-stage oocytes and a decrease of later stages (pachytene and diplotene). These changes can also be observed in the F3 and F15 cultures.

The individual particularities, shown during culture, have also been reported in previous studies performed in human ovaries (Hartshorne *et al.*, 1999) and may be attributable to ovary conditions when the sample was collected, time interval between sample collection and establishment of the culture, sample differences or to intrinsic inter-individual differences.

### ***Meiosis starts “ in vitro”***

In the V80 and V84 cultures, an increase of the oocytes with a degenerate DNA has been observed. For V80 it was observed at T3 and for V84 there was a constant increase that led to a maximal degeneration rate at T4. At the same time, a decrease of the pachytene-stage oocytes was found (Figs. 1D and 2A; except for V84 T2 and T3, most probably due to the low number of oocytes found in the ovarian pieces, where analysis of the different meiotic prophase-stages proportion was performed), suggesting that either late-zygotene-stage cells did not enter the pachytene stage or that most pachytene-stage oocytes were eliminated. Concomitantly, the leptotene percentage and *no-bouquet* oocytes increased. All of these data seem to suggest that a massive loss of oocytes is accompanied at the same time by an oogonial entrance into meiotic prophase, coinciding with observations made in previous works using other

technical approaches in which *de novo* meiosis was observed *in vitro* (Blandau, 1969; Hartshorne *et al.*, 1999).

During fetal ovarian development there is a massive loss of oocytes, which coincides with the pachytene stage (Baker, 1963). The high degeneration rate observed in our study could be either due to an ovarian internal “clock” still-working in culture, or to a deficient culture medium. In this sense, Hartshorne *et al.* (1999) also described a high rate of oocyte degeneration, but in their case coinciding with the zygotene stage instead of pachytene-stage oocytes. Furthermore, the pachytene stage is known to have a checkpoint that prevents abnormal meiocytes from progressing through meiosis (Roeder and Bailis, 2000), thus it may be possible that the pachytene stage may play a role in the high loss of pachytene-stage oocytes observed in our cultures. More studies in fresh and cultured oocytes should be performed to better define the cause of this important degeneration rate.

### ***Meiosis progress “in vitro”.***

Results obtained in the F15 culture suggest a clear meiotic progression *in vitro*. The pachytene-stage proportion increased from 21% to 64% in four culture weeks. In the same way, in the V80 culture, meiotic prophase rates changed after T3, leading to a restoration of T0 values in only one culture week, showing a meiotic prophase progression which doubled the pachytene-stage proportion in a culture week. This rapid transition through meiotic stages agrees with observations made in mouse fetal ovaries (Lyra<sup>1</sup> *et al.*, 2002)

and in human fetal ovaries cultured *in vitro* (Hartshorne *et al.*, 1999). However, these results contrast with other studies made in human fetal ovaries in which a longer period of time is needed to obtain a pachytene oocyte *in vitro* (Baker and Neal, 1974). This can be attributable to different developmental stages of the samples used in the different studies.

Meiotic progression observed for F15 is substantially longer than the one observed in the V80 culture. Again, this may be due to the different developmental stages of the sample. As F15 ovaries came from an 18-week-old fetus, the leptotene proportion at T0 is higher than that observed for V80 (48% against 23%, respectively). This may suggest that the higher the proportion of leptotene-stage oocytes when the culture is established, the better response to the culture technique, in terms of meiotic progression, will be achieved.

This meiotic progression observed in the V80 culture seems to mainly originate from oocytes that started meiosis *in vitro*, as there is a massive loss of pachytene oocytes and a high entrance of oogonia into meiosis. Nevertheless, results from the F15 culture suggest that oocytes that started the culture can continue meiosis *in vitro*. At the moment, we have no evidence that meiotic progression observed in our study is derived from surviving oocytes or from *de novo* meiosis, or a combination of both.

***Homolog pairing process is completed in cultured oocytes***

This is the first study in which an analysis of the homolog pairing process is performed in human cultured oocytes. Results show that the pairing process progresses following the same dynamics and topological patterns (*bouquet* topology) described in fresh euploid oocytes (Roig *et al.*, 2004 and Roig *et al.*, in press). These results are in agreement with previous observations which assessed pairing process as an extremely reliable process which ensures formation of a bivalent at pachytene with a low error rate (Roig *et al.*, in press). This hypothesis has recently been confirmed in a study performed in human trisomic 18 oocytes (Roig *et al.*, 2005). Results presented here are another confirmation of pairing-process fidelity, even working in non-optimal conditions as an *in vitro* culture.

In summary, results obtained in this study show that fetal oocytes can survive a long time *in vitro*. Our data provide strong evidence that oogonia can start meiotic prophase in these *in vitro* conditions. Moreover, meiotic prophase progression has been observed with the described culture technique. Cultured oocytes preserved their capacity to perform synapsis with no noticeable differences to the analyzed fresh oocytes. Nevertheless, more studies should be carried out to refine the culture medium in order to increase the meiotic progression rate in culture and to analyze other meiotic processes as recombination.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Ms. Isabelle Hellinckx and Ms. Àngels Niubó for their technical assistance. On the same way, we thank Mr. Miguel Martínez from the statistical lab of the School of Medicine (UAB, Spain) for his assistance with the analysis of the results. We would also like to thank Dr. C. Heyting for kindly providing us with SYCP3, SYCP1 and REC8 antibodies. I.R. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2000-0992), R. G. has a fellowship from the Generalitat de Catalunya (2004FI 00953) and P. R. has a fellowship from a Ministerio de Sanidad grant (FIS 02/0297). This work was supported by a Ministerio de Sanidad grant, FIS 02/0297.

The English of this manuscript has been revised by a native English speaking instructor of English of this University.

## REFERENCES

- Baker, TG (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* 158, 417-433.
- Baker, TG and Neal, P (1974) Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture. *J. Anat.* 117, 591-604.
- Blandau, RJ (1969) Observations on living oogonia and oocytes from human embryonic and fetal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 104, 310-319.
- Eijpe, M, Offenberger, H, Jessberger, R, Revenkova, E and Heyting, C (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SCM1 $\beta$  and SMC3. *J. Cell Biol.* 160, 657-670.
- Garcia, M, Dietrich, M, Freixa, L, Vink, ACG, Ponsa, M and Egozcue, J (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum. Genet.* 77, 223-232.
- Harper, L, Golubovskaya, I and Cande, W (2004) A bouquet of chromosomes. *J. Cell Sci.* 117, 4025-32.
- Hartshorne, GM (1996) Fetal ovarian tissue in vitro. *Ass. Reprod. Rev.* 6, 71-82.
- Hartshorne, GM, Barlow, AL, Child, TJ, Barlow, DH and Hulten, MA (1999) Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture\*. *Hum. Reprod.* 14, 172-182.
- Hassold, T and Hunt, P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2, 280-291.
- Kim, S, Kaminker, P and Campisi, J (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.
- Lammers, JH, Offenberger, HH, van Aalderen, M, Vink, AC, Dietrich, AJ and Heyting, C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1137-46.
- Lyrakou, S, Hulten, MA and Hartshorne, GM (2002) Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 906-911.
- Martínez-Flores, I, Egozcue, J and García, M (2003) Synaptic process in rat (*Rattus norvegicus*): Influence of the methodology on the results. *Microsc. Res. Tech.* 60, 450-457.
- Meuwissen, RL, Offenberger, HH, Dietrich, AJ, Riesewijk, A, van Iersel, M and Heyting, C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J.* 11, 5091-100.
- Newton, H, Fisher, J, Arnold, JR, Pegg, DE, Faddy, MJ and Gosden, RG (1998) Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum. Reprod.* 13, 376-380.
- Roeder, GS and Bailis, JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 16, 395-403.
- Roig, I, Liebe, B, Egozcue, J, Cabero, L, Garcia, M and Scherthan, H (2004) Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in



relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* 113, 22-33.

Roig, I, Robles, P, Garcia, R, Martínez-Flores, I, Egozcue, J, Liebe, B, Scherthan, H and Garcia, M (2005) Chromosome 18 behaviour in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage. *Reproduction* 129, 565-575.

Roig I, Robles P, Garcia R, Martin M, Egozcue J, Cabero L, Barambio S, Garcia Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum. Reprod.* In press

Scherthan, H (2001) A bouquet makes ends meet. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 621-7.

Zhang, J, Liu, J, Xu, KP, Liu, B and DiMattina, M (1995) Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12, 361-368.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Analysis of the meiotic prophase-stage proportion over culture-time per culture: F3 (A), F15 (B), V80 (C) and V84 (D). Per each case there is a table containing the percentage of oocytes at the different meiotic prophase stages presented per culture-time, as well as a graphic representation of these figures.

Figure 2.- Proportion of oocytes that do not present a *bouquet* topology (No *bouquet* %), percentage of SYCP1-positive oocytes presenting a degenerative chromatin morphology (Degenerated %) and leptotene-stage oocyte proportion (Leptotene %) are shown per each culture time from the V80 and V84 cultures (A). Note that No *bouquet*, Degenerated and Leptotene percentages come from analyses performed on different ovarian pieces which were cultured for the same time-period. A significant correlation among the three parameters can be found in both cultures (except for culture V84 at T2 and T3, where the leptotene proportion does not follow the same trend as the others, probably due to the small number of oocytes found when analyzing the leptotene proportion, n=5 and n=7, respectively). SYCP1-positive oocyte (B) with a noticeable degenerated chromatin (blue), note that some SYCP1 fibers (green) are still visible. N.A.: not analyzed.

Figure 3.- Chromosome-13 pairing process in V80 oocytes. Leptotene stage (A) with two independent chromosome 13 (WCP 13 red plus LSI 13 green; LSI 21 red) and two separate chromosome 21 signals. Zygotene-stage oocyte (B) with chromosome-13 pairing and two chromosome-21 aligned signals. Pachytene oocyte (C) with a bivalent 13 and a single chromosome 21 signal. Diplotene oocyte (D) showing the desynapsing bivalents 13 and 21.

**TABLES**

Table 1.-Biological material used.

<i>CASE</i>	<i>G.W.</i>	<i>Diagnosis</i>	<i>Karyotype<sup>a</sup></i>
F3	17	-	46,XX
F15	18	Downs' Syndrome	47,XX +21
V80	22	Polymalformation	46,XX
V84	22	Polymalformation	46,XX

G.W.: gestational weeks; <sup>a</sup>karyotype obtained from prenatal diagnosis.

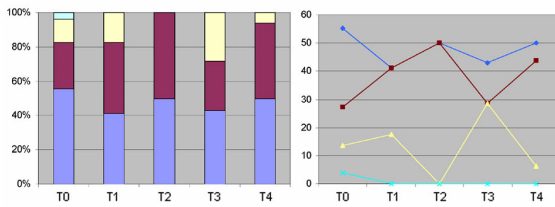
Table 2.- Total number of oocytes analyzed per case and culture time.

<i>CASE</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>TOTAL</i>
F3	132	17	8	7	16	-	180
F15	67	39	25	28	11	27	197
V80	263	317	292	169	172	-	1213
V84	181	83	96	114	38	-	512

Figure 1, Roig et al.

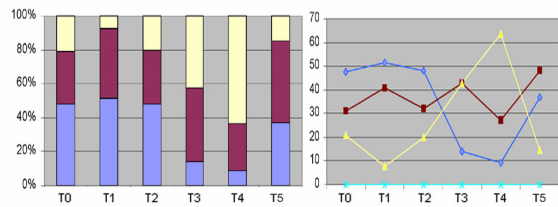
**A**

F3	T0	T1	T2	T3	T4
Leptotene (%)	55.3	41.2	50.0	42.9	50
Zygotene (%)	27.3	41.2	50.0	28.6	43.8
Pachytene (%)	13.6	17.6	0.0	28.6	6.3
Diplotene (%)	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Number of cells analyzed	132	17	8	7	16



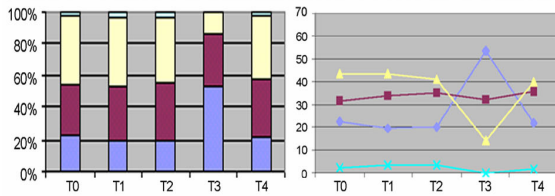
**B**

F15	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Leptotene (%)	47.8	51.3	48.0	14.3	9.1	37.0
Zygotene (%)	31.3	41.0	32.0	42.9	27.3	48.1
Pachytene (%)	20.9	7.7	20.0	42.9	63.6	14.8
Diplotene (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Number of cells analyzed	67	39	25	28	11	27



**C**

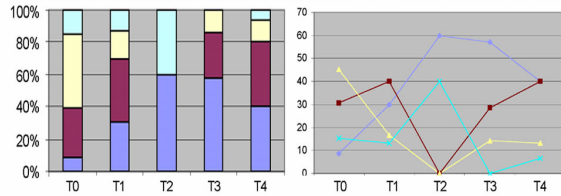
V80	T0	T1	T2	T3	T4
Leptotene (%)	22.7	19.5	20.0	53.6	21.8
Zygotene (%)	31.2	33.6	35.2	31.2	35.4
Pachytene (%)	43.5	43.4	41.0	14.3	40.0
Diplotene (%)	2.6	3.5	3.8	0.0	1.8
Number of cells analyzed	154	113	105	28	55



Leptotene % Zygotene %

**D**

V84	T0	T1	T2	T3	T4
Leptotene (%)	8.7	30.0	60.0	57.1	40.0
Zygotene (%)	30.8	40.0	0.0	28.6	40.0
Pachytene (%)	45.2	16.7	0.0	14.3	13.3
Diplotene (%)	15.4	13.3	40.0	0.0	6.7
Number of cells analyzed	104	30	5	7	15



Pachytene % Diplotene %

Figure 2, Roig et al.

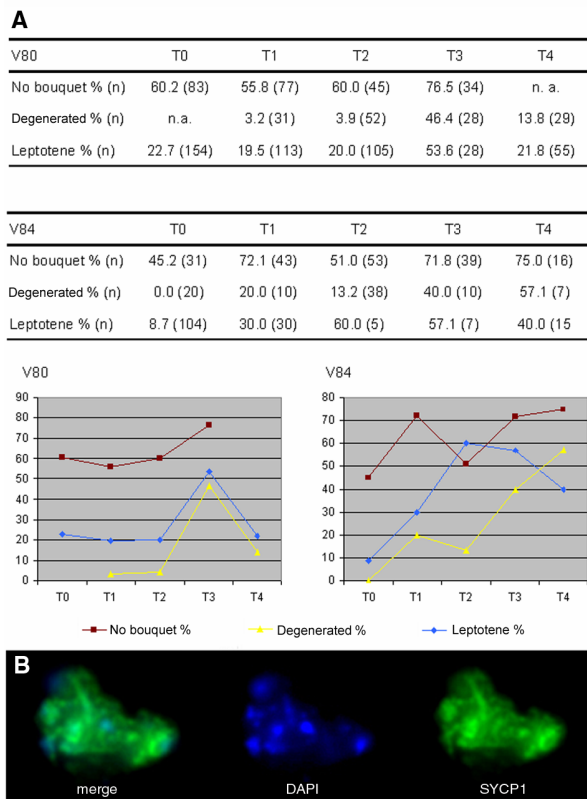
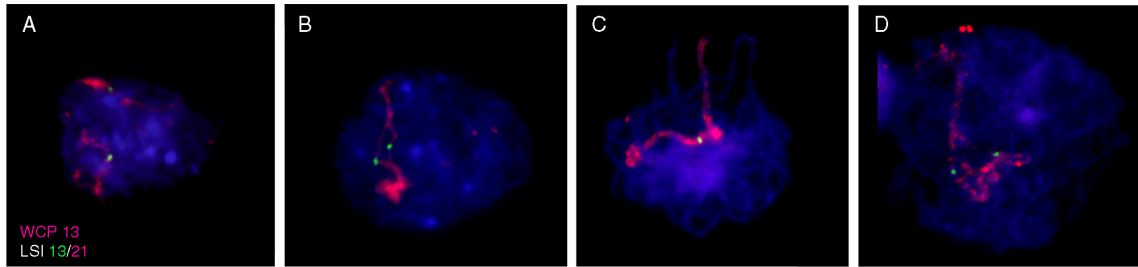


Figure 3, Roig et al.



## Capítol 5

# Discussió



Oòcit a l'estadi de paquitè marcat mitjançant immunofluorescència  
SYCP1 (verd), TIN2 (blanc) i  $\gamma$ H2AX (vermell)



---

## 5.1. VALORACIÓ DE LES TÈCNiques EMPRADES

### 5.1.1. Protocol de cultiu d'estroma ovàric

Com ja s'ha comentat anteriorment, les particularitats de la gametogènesi femenina fan que l'obtenció de mostres d'ovari humà, amb la finalitat d'estudiar els primers estadis de la meiosi, sigui difícil. Aquest fet, sumat a la importància d'estudiar la gametogènesi femenina a causa de la seva implicació en l'origen de les aneuploïdies en humans, ha conduït als investigadors a usar totes les mostres disponibles per analitzar qualsevol dels processos que esdevenen durant la vida fetal de la dona. Actualment, la font més accessible de mostres fetals són les interrupcions legals de l'embaràs (ILEs), o altrament conegudes com avortaments terapèutics. Això implica que la majoria de fetus avortats presenten alguna anomalia anatòmica, fisiològica, genètica o cromosòmica que en el seu moment han permès l'avortament. Tot i això no deixa d'haver-hi fetus fenotípicament normals.

El problema, a l'hora d'estudiar el desenvolupament de la profase meiòtica a femella humana rau a poder saber quan un fetus, sigui quina sigui la raó de l'avortament, es pot considerar control i quan no. És a dir, la dificultat es trobaria a conèixer en quins casos les raons terapèutiques poden tenir conseqüències en els processos meiòtics que s'estan estudiant i, per tant, poden conduir a errors en la seva descripció. En aquest sentit, la posada a punt d'una tècnica de cultiu d'estroma ovàric (treball 1, Roig et al. 2003) que facilita conèixer el cariotip de cada cas, permet solucionar el possible error conduït per l'assumpció que els casos que no presenten anomalies cromosòmiques conegudes són classificats com a controls. Els resultats obtinguts revelen que totes les mostres analitzades que provenien d'avortaments terapèutics, no relacionats amb anomalies cromosòmiques, tenen un cariotip euploide. D'altra banda, l'ús sistemàtic del protocol de cultiu d'estroma ovàric ha permès corroborar, en tots els casos en què es

disposava, el cariotip prenatal obtingut ja fos per mètodes citogenètics o de genètica molecular.

Així doncs, el protocol de cultiu d'estroma ovàric fetal que s'ha desenvolupat permet l'obtenció de cèl·lules a l'estadi de metafase per esbrinar la fórmula cromosòmica que faciliti l'obtenció d'una casuística de fetus euploides amb els quals la caracterització del procés d'aparellament i sinapsi cromosòmica en mostres control resulti, ara sí, possible. A més a més, l'ús d'una tècnica de cultiu que permet saber el cariotip de les cèl·lules de l'estroma ovàric, tot i l'origen diferent de les cèl·lules somàtiques respecte de les germinals, minimitza el possible risc de mosaïcisme que es pot trobar en determinades aneuploïdies, que podrien conduir a errors en l'anàlisi de la profase meiòtica d'aquestes mostres.

### **5.1.2. Tècniques de biologia cel·lular**

Els primers estudis de la profase meiòtica en oòcits I humans, es va realitzar usant tècniques citogenètiques clàssiques sobre extensions d'oòcits fixades en carnoy en què s'observava el patró de condensació dels cromosomes i la dinàmica del seu aparellament (Ohno et al. 1961; Ohno et al. 1962; Baker 1963; Manotaya and Potter 1963; Luciani and Stahl 1971; Luciani et al. 1976; Garcia et al. 1987). També es varen emprar preparacions d'oòcits fixades en paraformaldehid en les quals se'ls aplicava una tinció amb nitrat de plata per observar el desenvolupament dels SCs i l'evolució de la sinapsi cromosòmica mitjançant microscòpia òptica i/o electrònica (Wallace and Hulten 1983; Speed 1984; Speed 1985; Wallace and Hulten 1985; Speed 1986; Speed 1988; Garcia et al. 1989). En tots aquest estudis, el material havia estat processat per tal de tenir preparacions el màxim d'esteses possible, i així poder observar els bivalents, o els SCs, el màxim d'individualitzats possible. Coetàniament, només un grup va realitzar estudis on s'empraven tècniques que preservaven l'estructura nuclear en tres dimensions (Bojko 1983; Bojko 1985).

---

Més recentment, els estudis que s'han fet en oòcits I humans han usat dos grups de tècniques metodològiques que són l'evolució de les anteriorment esmentades. La primera, seguint el testimoni de la citogenètica clàssica, consisteix a marcar cromosomes concrets o regions específiques seves, mitjançant tècniques de citogenètica molecular, hibridació *in situ* fluorescent (FISH), per analitzar l'aparellament de determinats cromosomes durant la profase meiòtica (Cheng and Gartler 1994; Cheng et al. 1995; Cheng et al. 1998; Cheng et al. 1999; Cheng and Naluai-Cecchini 2004). I la segona, en la qual, emprant preparacions d'oòcits fixades amb paraformaldehid sobre les quals s'apliquen tècniques d'immunofluorescència (IF), s'endinsa en l'estudi de la formació i desenvolupament del complex sinapteinemal i de les proteïnes, una a una individualitzades que intervenen en el procés de sinapsi i de recombinació (Barlow and Hultén 1997b; Barlow and Hultén 1998; Barlow et al. 2002; Tease et al. 2002; Prieto et al. 2004; Lenzi et al. 2005). De tots aquests estudis recentment realitzats en oòcits I humans, no n'hi ha hagut cap que centrés l'atenció en la localització i dinàmica cromosòmica en el nucli preservat (en tres dimensions) de manera que, encara que han servit per confirmar les dades aconseguides amb les tècniques clàssiques, no han significat un augment del coneixement que es tenia de l'estructura nuclear i la dinàmica cromosòmica durant la profase meiòtica dels oòcits humans.

Per a la realització d'aquest treball experimental, i amb l'objectiu de caracteritzar amb el màxim detall possible la progressió de l'aparellament i la sinapsi dels cromosomes homòlegs durant la profase meiòtica en oòcits I humans, s'han emprat tècniques de citogenètica molecular i d'immunofluorescència, tant en preparacions d'extensions en dues dimensions com en preparacions en què es preservava el volum nuclear de l'oòcit. Per fer-ho, s'han posat a punt metodologies que havien estat descrites per a altres models animals i que no s'havien emprat mai en oòcits I humans (Scherthan and Cremer 1994; Scherthan et al. 1996; Martínez-Flores et al. 2003; Liebe et al. 2004), així com en alguns casos, s'han desenvolupat noves tècniques d'extensió cel·lular, protocols d'IF i FISH concrets per a les preparacions obtingudes (vegeu protocols 3.2.5,

3.2.7, 3.2.8 i 3.2.10).

Els resultats (Roig et al. in press; Roig et al. 2004; Roig et al. 2005), quant a la qualitat de les preparacions, l'eficiència d'hibridació de la FISH sobre tot tipus de preparacions i la detecció de proteïnes mitjançant IF, són equiparables als treballs anteriorment publicats, en què s'usaven metodologies diferents de les descrites en aquesta tesi. En alguns casos, els resultats obtinguts per primer cop pel nostre laboratori han estat posteriorment corroborats (Judis et al. 2004; Lenzi et al. 2005; Turner et al. 2005).

De fet, l'ús d'una bateria de tècniques tan diversa com la descrita, ha permès realitzar un treball complet en el qual es pot analitzar un mateix procés des de diferents enfocaments, enriquint i diferenciant d'aquesta manera els resultats obtinguts en cada procés analitzat.

Malauradament, en aquest estudi encara ens hem trobat amb les limitacions intrínseques del material de treball, que condicionen la potencialitat de les tècniques metodològiques. D'aquesta manera, el principal problema que s'ha observat, coincidint amb altres autors que treballen en oòcits humans (Cheng and Gartler 1994; Tease et al. 2002), és la frescor de la mostra. Existeixen processos sobre els quals no es pot influir, com pot ser la mort intrauterina del fetus abans de l'expulsió, que condicionen la immediatesa i viabilitat de les mostres que es recullen, i limiten, per tant, l'elaboració d'aquest tipus d'estudis. De fet, la *no contaminació* de cap tipus de l'ovari és bàsica en l'obtenció d'oòcits que permetin les inferències tècniques sense l'aparició d'artefactes que desdibuixin la realitat. Així doncs, com més fresca sigui una mostra, millors resultats s'obtenen, tant usant tècniques de FISH, d'IF o de cultiu cel·lular. A fi de garantir una eficient recollida de les mostres, ha estat molt important l'estreta col·laboració i la gran implicació que hi ha hagut per part del personal clínic dels centres que ens han proporcionat el material biològic. D'aquesta manera, per dur a terme un projecte com aquest, en el qual es pretén estudiar la profase meiòtica en oòcits humans, és absolutament necessària una estreta i acurada coordinació entre l'equip

---

clínic i els membres del grup de recerca, tal com ha estat i és en aquest cas.

### 5.1.3. Tècnica de cultiu d'ovaris fetals

Amb la finalitat d'estudiar l'evolució de la profase meiòtica en oòcits de mamífers, sense requerir mostres *in vivo*, s'han fet alguns estudis en un intent de mantenir i fer progressar els primers estadis de la meiosi en oòcits tant de ratolí com d'humà *in vitro* (Blandau 1969; Baker and Neal 1974; Zhang et al. 1995; Hartshorne 1996; Hartshorne et al. 1999; Lyrakou et al. 2002). Tot i que en alguns casos s'ha obtingut una certa progressió meiòtica *in vitro*, els resultats publicats no han estat suficientment fructífers per permetre l'estandardització d'una tècnica que permetés de fer el seguiment de l'evolució de la meiosi en cultiu. A més a més, el paràmetre emprat per a l'anàlisi de la variació de les mostres cultivades al llarg dels temps de cultiu, en la majoria dels casos, ha estat únicament l'estudi del canvi en la proporció d'oòcits en determinats estadis de la profase meiòtica, mentre que no s'ha analitzat l'efecte de les condicions del medi de cultiu sobre alguns dels processos fonamentals que s'esdevenen durant aquests estadis, com pot ser l'aparellament i la sinapsi dels cromosomes homòlegs.

En aquest sentit, i en el desenvolupament d'un dels objectius d'aquesta tesi, s'ha desenvolupat una tècnica de cultiu d'ovaris fetals que permeti l'evolució dels oòcits *in vitro* de manera similar a com es desenvolupa *in vivo* (treball 5, Roig et al. submitted).

Els resultats obtinguts en els cultius realitzats suggereixen que la meiosi es pot mantenir en les condicions de cultiu usades en aquest treball. Tot i l'alta taxa de degeneració observada al llarg del cultiu, el fet de trobar una eficiència d'aparellament, sinapsi cromosòmica i dinàmica telomèrica semblant a les observades en oòcits en fresc (vegeu l'apartat 5.2) suggereix que els oòcits humans poden ser mantinguts per temps prolongats *in vitro* mantenint aparentment les mateixes funcions que *in vivo*. De tota manera,

els resultats suggereixen que el cultiu pot afectar les característiques físiques dels oòcits, o de determinades estructures seves, ja que els protocols d'IF i FISH s'han hagut de modificar lleugerament a fi d'incrementar la seva eficàcia en oòcits cultivats.

Altrament, els resultats dels cultius d'ovaris que s'han fet, tot i que les quatre mostres cultivades segueixen els mateixos patrons generals, evidencien l'existència d'un marcat efecte de la mostra amb relació a com aquesta reacciona el protocol de cultiu. Aquest fenomen, que ja ha estat observat en altres intents de fer cultius d'ovaris fetals humans (Hartshorne et al. 1999), es pot deure a múltiples factors. L'estat de desenvolupament del fetus en podria ser un, però també, i en el mateix sentit ja explicat anteriorment, les condicions de l'ovari, el temps que transcorre entre la recollida de la mostra i l'establiment del cultiu, és a dir, la frescor de la mostra, torna a ser bàsic i, sobretot, limitant. L'obtenció d'una mostra viable (en el sentit metodològic) i la sistematització i estandarització d'un mètode de cultiu i de processament es fa imprescindible a l'hora de descobrir els factors més importants que intervenen en la reacció de l'ovari a les condicions de cultiu.

Pel que fa als nostres resultats obtinguts en els cultius de cèl·lules germinals, indiquen clarament l'existència d'una progressió de la profase meiòtica, entesa aquesta com una variació de la proporció dels diferents estadis de la profase meiòtica en què tendeixen a augmentar els oòcits en l'estadi de paquitè.

A més a més, l'increment substancial d'oòcits en l'estadi de leptotè que s'observa en determinats temps de cultiu, suggereix l'existència d'una important entrada d'oogònies a la meiosi *in vitro*. Aquest fenomen, que ja s'havia observat en estudis previs (Blandau 1969; Hartshorne et al. 1999), en el nostre cas, s'ha pogut relacionar per primer cop amb un augment d'oòcits en degeneració. Això suggereix que, o bé, les oogònies es diferencien a oòcits i comencen la meiosi com a resposta a una alta mortalitat d'oòcits, o bé que és l'entrada de noves oogònies a la meiosi la que genera un increment de la taxa de degeneració d'oòcits d'estadis més

---

tardans. Altrament, la qüestió és si l'augment d'oòcits que degeneren s'esdevé per deficiències del medi de cultiu o per una activació d'un mecanisme intrínsec a l'ovari humà. Com s'ha comentat a la introducció, a l'ovari fetal es dona un important procés d'atrèsia d'oòcits que fa disminuir dràsticament el nombre d'oòcits durant la vida fetal de l'individu (apartat 1.2.2). Aquest fet suggeriria la possible implicació d'un mecanisme intern de l'ovari en l'augment de la taxa de degeneració d'oòcits en cultiu, però també cal tenir present l'existència dels punts de control de la meiosi, com és el *checkpoint* de paquitè (Roeder and Bailis 2000). Com ja s'ha comentat (apartat 1.3.2.1.4), existeixen mecanismes pels quals les cèl·lules que no han completat correctament la profase meiòtica són aturades a l'estadi de paquitè i eliminades si no corregeixen els errors detectats. Així doncs, no es pot descartar la possible implicació d'aquest procés en l'augment de degeneració d'oòcits en cultiu, tot i la seva suposada ineficàcia en oòcits de mamífers (Hunt and Hassold 2002). Aquesta hipòtesi estaria d'acord amb observacions fetes en cultius d'ovaris fetals de ratolí, on es trobaven oòcits a l'estadi de paquitè sense *foci* de MLH1, i per tant, amb deficiències en el processament dels DSBs (Lyraou et al. 2002).

És important fer ressaltar que l'estudi realitzat no es conforma en haver posat a punt una determinada metodologia de cultiu que permetès l'evolució dels oòcits *in vitro* (objectiu fonamental), sinó que de forma paral·lela i per primer cop, s'ha fet un estudi detallat dels processos d'aparellament i sinapsi cromosòmica dels oòcits cultivats que ens indiquessin el possible efecte que la permanència i progressió de les cèl·lules germinals *in vitro* hagués tingut en un dels processos fonamentals de la meiosi (treball 5, Roig et al. submitted). Aquestes dades suggereixen, doncs, que en oòcits humans cultivats en les condicions descrites per llargs períodes de temps, tant l'aparellament com la sinapsi cromosòmica evolucionen de manera anàloga a l'observada en oòcits no cultivats (vegeu els apartats següents).

## 5.2. EVOLUCIÓ DE LA PROFASE MEIÒTICA DURANT EL DESENVOLUPAMENT FETAL HUMÀ

Existeixen pocs estudis en què s'ha relacionat l'evolució de la profase meiòtica amb el desenvolupament fetal en humans (Baker 1963; Kurilo 1981; Garcia et al. 1987). Segons aquests treballs, la profase meiòtica comença de manera totalment asincrònica en oòcits humans al voltant de les 10-11 setmanes de gestació. Seguidament, s'observa que alguns oòcits arriben a zigotè, i els primers oòcits a l'estadi de paquitè i diplotè es troben pels volts de les 13-14 setmanes de gestació.

Amb aquests antecedents i les limitacions tècniques i legals que condicionen el rang de desenvolupament de les mostres que s'han pogut emprar en aquest treball, l'objectiu no era tant veure quan apareixien cadascun dels estadis de la profase meiòtica, sinó com en variava la proporció al llarg del desenvolupament fetal. Tot i això, en aquest estudi, s'ha pogut observar l'existència d'oòcits a l'estadi de leptotè al voltant de les 15 setmanes de gestació, coincidint en gran mesura amb el que s'havia publicat anteriorment (Kurilo 1981; Garcia et al. 1987). Igualment, en aquest període estudiat s'observa com el percentatge d'oòcits a l'estadi de leptotè tendeix a disminuir, però sense extingir-se. De manera que es pot concloure, que després de les 22 setmanes de gestació encara es deuen poder observar oòcits que tot just comencen la profase meiòtica i, per tant molt possiblement encara quedin oogònies a l'ovari, tal com suggereixen altres autors (Baker 1963; Speed 1985). La progressió de la proporció d'oòcits a l'estadi de zigotè, per contra, no mostra una relació estadísticament significativa amb l'estat de desenvolupament fetal, tot i que es pot observar una tendència a assolir un màxim al voltant de les 20-21 setmanes de gestació. En canvi, la proporció d'oòcits a l'estadi de paquitè i diplotè s'incrementa significativament amb el desenvolupament fetal.

Les petites diferències existents respecte de les dades d'alguns autors (Baker 1963; Kurilo 1981) es poden explicar tenint en compte que la majoria de mostres provenen d'ILEs i, per tant, aquestes poden tenir algun retard de desenvolupament a causa de la patologia que permet



l'avortament. Això queda demostrat pel fet que la progressió meiòtica presenta una millor relació estadística amb la mesura plantar que amb l'edat de gestació. Tot i això, i com en tots els paràmetres biològics, no s'han de subestimar les diferències interindividuais existents dins de cada una de les mostres que poden influir en la variació de la proporció dels estadis meiòtics.

## **5.3. EVOLUCIÓ DE L'APARELLAMENT I DE LA SINAPSI DELS CROMOSOMES HOMÒLEGS EN OÒCITS HUMANS**

### **5.3.1. Aparellament dels cromosomes homòlegs en la profase meiòtica d'oòcits humans euploides**

#### **5.3.1.1. Dinàmica cromosòmica**

Els primers estudis de l'aparellament dels cromosomes homòlegs en oòcits humans es van fer emprant tècniques de citogenètica clàssica (Luciani and Stahl 1971; Luciani et al. 1976), en els quals s'intentava classificar els cromosomes gràcies al patró de bandes, anomenats cromòmers, que s'obtenia de tenyir les preparacions d'oòcits fixades en carnoy amb determinats colorants. Tot i que es va trobar una relació entre el patró de bandes que s'obtenia en preparacions meiòtiques i les observades en cromosomes mitòtics, la necessitat de tenir molt bones extensions per identificar els bivalents, així com de disposar de personal altament entrenat i especialitzat per identificar els determinats parells de cromosomes van fer que aquesta línia de treball per a l'estudi de la profase meiòtica quedés en desús.

Amb l'arribada de la citogenètica molecular, l'estudi de l'aparellament dels cromosomes homòlegs durant la profase meiòtica va esdevenir menys subjectiu. En oòcits humans, gràcies a aquesta tècnica, s'ha pogut estudiar l'aparellament dels cromosomes homòlegs X (Cheng and Gartler 1994), 18 (Cheng et al. 1995) i 21 (Cheng et al. 1998), així com l'aparellament de genomes reorganitzats (Cheng et al. 1999) i estudiar l'existència d'associacions entre determinats cromosomes involucrats en translocacions robertsonianes (Cheng and Naluai-Cecchini 2004).

En aquest treball s'ha estudiat l'aparellament dels cromosomes 13 i 18. Es tracta dels cromosomes implicats en la tercera i la segona aneuploidia més freqüent en nadons humans, respectivament (vegeu la

---

introducció). I en el cas del cromosoma 18 els resultats es podien comparar amb els resultats obtinguts per Cheng et al. (1995). Els nostres resultats demostren que l'aparellament dels cromosomes homòlegs 13 i 18 comença durant l'estadi de leptotè, la qual cosa confirma les primeres observacions fetes per Cheng et al. (1995) per al cromosoma 18. Tot i això, els valors observats per aquest autors en aquest estudi són sensiblement superiors als trobats en aquest estudi (treball 2, Roig et al. in press), molt possiblement degut a efectes interindividuals, tot i que no es pot excloure que existeixin diferents criteris de classificació dels oòcits. A l'estadi de leptotè el cromosoma 13 es presenta menys cops aparellat que el cromosoma 18. Aquest fenomen es pot deure a la diferent longitud dels cromosomes analitzats, que fa que els cromosomes més curts es puguin aparellar més ràpidament que els més llargs.

Durant l'estadi de zigotè es dona l'aparellament dels homòlegs 13 i 18; així doncs, es poden trobar en alguns oòcits els dos homòlegs desapparellats, iniciant l'aparellament, completant l'aparellament, i també formant un bivalent, a l'espera que la resta d'homòlegs completin la sinapsi per avançar a l'estadi de paquitè. En la majoria dels oòcits a l'estadi de zigotè en què s'ha analitzat l'aparellament dels homòlegs 13 s'observen o bé dos univalents separats o bé un bivalent ja format, de manera que es pot concloure que l'aparellament del cromosoma 13 es dona ràpidament, la qual cosa fa que sigui difícil observar estructures intermediàries d'aparellament.

A l'estadi de paquitè els cromosomes estan completament aparellats al llarg de tota la seva longitud. Aquest procés s'ha vist que és altament eficient (vegeu l'apartat 5.3.1.3) cosa que corrobora les investigacions prèviament publicades. Seguidament, a l'estadi de diplotè els homòlegs se separen i resten units pels quismes, que són els punts on ha existit recombinació (Marcon and Moens 2003).

### 5.3.1.2. Dinàmica de centròmers i telòmers

Durant l'inici de la profase meiòtica es dona un moviment generalitzat dels cromosomes que pot ser observable fent un seguiment dels centròmers i els telòmers (Scherthan 2001). Bojko et al. (1983) van descriure per primer cop en oòcits humans que l'aparellament dels cromosomes homòlegs era mitjançat per la conformació de *bouquet*, però a part d'això, no es coneixia quina era la dinàmica dels centròmers i dels telòmers durant la profase meiòtica d'oòcits humans.

Els resultats obtinguts (treball 3, Roig et al. 2004) revelen que en els oòcits humans, en general, es donen els mateixos fenòmens descrits anteriorment en els espermatòcits humans (Scherthan et al. 1996). Així doncs, el primer fenomen detectable és l'organització dels centròmers a la perifèria del nucli durant l'estadi de preleptotè. Seguidament, a l'estadi de leptotè, els telòmers se situen a l'embolcall nuclear i, paulatinament, a la transició leptotè/zigotè es van agrupant en una porció concreta de l'embolcall nuclear adquirint així la conformació de *bouquet*. A l'estadi de zigotè els telòmers estan tots agrupats en una petita porció de l'embolcall, això es coneix com *bouquet* comprimit. Aquesta polarització es manté fins que als inicis del paquitè, després, la polarització es va perdent. A l'estadi de diplotè, els telòmers estan a l'interior del nucli i en algunes cèl·lules germinals s'han observat els centròmers alineats.

Clàssicament s'ha entès la topologia de *bouquet* com una organització nuclear que facilitava l'encontre dels cromosomes homòlegs. Així doncs, el fet d'haver observat que l'inici del *bouquet* comença a l'estadi de leptotè, permet entendre que en l'estudi de la dinàmica dels cromosomes 13 i 18, en determinats oòcits es trobin els cromosomes homòlegs aparellats abans de començar l'estadi de zigotè ((Cheng et al. 1995), vegeu el punt 5.1.3.1).

### 5.3.1.3. Eficiència d'aparellament dels cromosomes homòlegs

Com s'ha dit anteriorment, normalment, a l'estadi de paquitè els homòlegs estan aparellats. Aquest procés, però, no és infal·lible, tot i que treballs realitzats en oòcits humans (Cheng and Gartler 1994; Cheng et al. 1995; Cheng et al. 1998; Cheng et al. 1999), han revelat que l'aparellament dels homòlegs és bastant eficient en tots els casos estudiats, la qual cosa contrasta amb les dades obtingudes mitjançant estudis del complex sinapteinemal (SC) (Speed 1985) on s'observaven anomalies d'aparellament en un 25% dels casos.

Els resultats obtinguts en aquest estudi, revelen que l'eficiència d'aparellament observada per als cromosomes 13 i 18 no és estadísticament diferent. La presència d'oòcits amb dos cromosomes 13 o 18 desaparellats a l'estadi de paquitè té una mitjana d'un 0,13% dels casos. Aquestes dades són semblants a les trobades per als cromosomes X i 21 (Cheng and Gartler 1994; Cheng et al. 1998), però difereixen de l'eficiència d'aparellament descrita pel cromosoma 18 (Cheng et al. 1995). Aquestes diferències es poden deure al diferent nombre d'oòcits estudiats en tots dos treballs (en aquests treball s'han estudiat 2.352 oòcits a l'estadi de paquitè, mentre que Cheng et al. en van estudiar 755).

Com s'ha comentat anteriorment, a l'estadi de diplotè els homòlegs se separen i resten units pels quiasmes. Sorprenentment, els resultats obtinguts en aquest estudi demostren que la freqüència d'error és significativament superior a l'estadi de diplotè que a l'estadi de paquitè (un 1,3% contra un 0,13%, respectivament). Els oòcits que tenen dos cromosomes desaparellats a l'estadi de diplotè poden provenir d'oòcits que no han completat l'aparellament dels homòlegs a l'estadi de paquitè; com s'ha dit anteriorment, aquest fenomen passa en un 0,13% dels casos. La resta de casos provenien de bivalents que a l'estadi de paquitè no han recombinat i que, per tant, quan els homòlegs se separen a l'estadi de diplotè no queden units per cap punt. Aquesta no és la primera observació directa d'errors en el procés de recombinació en oòcits humans, l'absència de recombinació en els bivalents 18 i 21 ha estat descrita anteriorment

(Tease et al. 2002). Aquestes observacions demostren que errors en la recombinació entre els homòlegs en la profase meiòtica poden originar univalents produïts per una prematura disjunció dels homòlegs a l'estadi de diplotè, que quan arribin a la metafase I segregarien independentment i podrien originar oòcits desequilibrats.

Així doncs, els resultats obtinguts en aquest treball aporten més dades per entendre que l'absència de recombinació és un fenomen clau en la correcta dinàmica cromosòmica durant la profase meiòtica i impliquen una major importància de la prematura separació dels homòlegs a l'estadi de diplotè, respecte a l'aparellament dels cromosomes homòlegs durant l'estadi de zigotè i paquitè, en l'origen de les aneuploidies en humans. A més a més, la taxa d'error observada a l'estadi de diplotè és semblant a la freqüència d'embarassos aneuploides observats en dones de menys de 25 anys (Hassold and Hunt 2001). Aquesta observació aportaria més indicis a favor de la no existència d'un *checkpoint* de metafase en la meiosi femenina (Hunt and Hassold 2002), ja que gran part dels oòcits amb anomalies d'aparellament o disjuncions prematures dels homòlegs podrien continuar la meiosi i l'oogènesi fins a esdevenir un oòcit II fecundable. Estudis fets en oòcits II (Pujol et al. 2003) troben amb una alta freqüència oòcits amb anomalies numèriques suposadament originades durant la meiosi I. Cal tenir en compte, però, que l'origen de la mostra analitzada pot condicionar els resultats observats.

Tot i que les diferències no són estadísticament significatives, els resultats suggereixen una major tendència per part del bivalent 18 a patir disjuncions prematures dels homòlegs a l'estadi de diplotè. Aquest fet es pot explicar ja que els cromosomes acrocèntrics grans, com és el cromosoma 13, normalment tenen dos punts de recombinació al seu braç llarg, a més de tenir una major freqüència de recombinació que cromosomes de mida semblant (Lynn et al. 2004). Així doncs, les dades obtingudes en aquest estudi suggereixen que els problemes d'aparellament afecten de manera semblant a tots els cromosomes, mentre que sembla que alguns bivalents són més susceptibles que altres a presentar errors de

---

recombinació, tal com ha estat proposat per alguns autors (Lynn et al. 2004).

Sorprenentment, es va trobar un oòcit procedent d'un fetus euploide que presentava tres cromosomes 18 a l'estadi de leptotè. Aquest fet havia estat observat anteriorment per al cromosoma X (Cheng and Gartler 1994). La presència d'un cromosoma 18 de més en un oòcit a l'estadi de leptotè pot ser originada per una no-disjunció d'alguna divisió premeiòtica. El fet de no trobar cap oòcit amb tres cromosomes 13 fa pensar amb una major susceptibilitat del cromosoma 18 a patir no-disjuncions mitòtiques, tot i que aquest fenomen es podria deure a la menor pressió selectiva que podrien patir les cèl·lules trisòmiques 18, comparada amb les trisòmiques 13, com queda reflectit en la simptomatologia menys severa de la síndrome d'Edwards en comparació amb la síndrome de Patau (vegeu la introducció).

### **5.3.2. Evolució de la sinapsi cromosòmica**

Els resultats obtinguts en les IFs fetes per detectar SYCPs en oòcits humans (treball 3, Roig et al. 2004), revelen que SYCP3, a més de localitzar-se en els AEs del SC, fa agregats proteics que es localitzen en els nuclèols i que estan presents durant tota la profase meiòtica, com ja s'havia observat anteriorment en oòcits de vedells (Pfeifer et al. 2003). Un estudi recent realitzat en oòcits humans (Prieto et al. 2004), descriu la presència d'aquests agregats només fins a l'estadi de zigotè contrastant amb les dades obtingudes en aquest treball. Aquesta diferència es pot deure a les tècniques emprades, ja que l'estudi realitzat per Prieto et al. (2004) es fa en extensions d'oòcits, mentre que aquest treball està fet en preparacions en les quals es preserva l'estructura del nucli en tres dimensions, la qual cosa impedeix que cap estructura de l'interior del nucli es perdi.

L'ús de tècniques que preserven la integritat nuclear en tres dimensions, a més a més, ha permès observar que l'inici de la sinapsi

cromosòmica es dona durant l'estadi de *bouquet* (treball 3, Roig et al. 2004). Aquesta observació està d'acord amb estudis previs en espermatòcits i oòcits de vedell (Pfeifer et al. 2001; Pfeifer et al. 2003) i en espermatòcits de ratolí i humà (Scherthan et al. 1996). Recentment, però, un estudi fet en oòcits de ratolí, descriu que l'inici de la sinapsi es dona en cèl·lules que no presenten cap polarització nuclear (Tankimanova et al. 2004). Aquests autors proposen que el *bouquet* pot afavorir l'aparellament dels homòlegs, però que la sinapsi cromosòmica està promoguda per altres factors. Per contra, els resultats obtinguts en oòcits humans i de vedell (Pfeifer et al. 2003; Roig et al. 2004), suggereixen que la conformació de bouquet ajuda al prealineament dels homòlegs i a l'inici de la sinapsi intersticial en les femelles.

### **5.3.3. Diferències observades en el desenvolupament de la profase meiótica en espermatòcits i oòcits humans**

#### **5.3.3.1. Dinàmica centromèrica i telomèrica**

De la mateixa manera que s'ha descrit en vedells (Pfeifer et al. 2001; Pfeifer et al. 2003) i ratolins (Tankimanova et al. 2004), la durada i la freqüència de *bouquet* observat en oòcits humans és marcadament superior al descrit en espermatòcits humans (Scherthan et al. 1996). Aquest augment de la topologia de *bouquet*, així com de la seva durada, podria ser una conseqüència del menor grau de condensació dels cromosomes en oòcits que en espermatòcits (Barlow and Hultén 1998; Martínez-Flores et al. 2003). És a dir, podríem relacionar un increment de la durada del *bouquet* amb una reducció de la condensació cromosòmica. Alhora, però, ratolins *knockout* per intermediaris de reparació del DNA presenten allargaments de l'estadi de *bouquet* (Scherthan 2003), cosa que suggereix que la conformació de *bouquet* també pot estar relacionada amb la reparació dels DSBs. Així doncs, el fet de trobar un marcat increment de la durada de l'estadi de *bouquet* en oòcits humans podria ser degut a un



---

deficient, o si més no diferent, procés de reparació dels DSBs (vegeu l'apartat 5.3.3.3).

### **5.3.3.2. Sinapsi cromosòmica i organització de les proteïnes del complex sinaptnemal**

Una altra diferència observada entre tots dos sexes, tal com s'ha descrit en estudis fets en oòcits de ratolí (Tankimanova et al. 2004), de vedell (Pfeifer et al. 2003), de rata (Martínez-Flores et al. 2003) i humans (Bojko 1983), és que en les dones l'inici de la sinapsi és, a diferència dels mascles, intersticial i terminal. Els resultats obtinguts en aquest treball (treballs 3 i 4, Roig et al. 2004; Roig et al. 2005) corroboren els estudis anteriorment publicats.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la presència d'agregats de SYCP3 fins a l'estadi de paquitè en oòcits humans és un fenomen que s'ha descrit anteriorment en oòcits de rata (Dietrich et al. 1992) i vedell (Prieto et al. 2004). En mascles de ratolí, vedell i humà, però, s'ha vist que els agregats de SYCP3 desapareixen durant l'estadi de zigotè (Scherthan et al. 1996; Pfeifer et al. 2001). Alhora, igual com havien observat altres autors (Barlow and Hultén 1997a; Pfeifer et al. 2003), en aquest treball (treball 3, Roig et al. 2004) s'ha observat que el marcatge dels AEs per SYCP3 en oòcits humans és menys intens que en preparacions semblants d'espermatòcits. Totes aquestes dades fan pensar que possiblement els AEs dels SCs d'oòcits humans tinguin menys SYCP3 que els dels espermatòcits. Aquesta hipòtesi podria explicar el perquè de la diferència de longitud entre els cromosomes meiótics en oòcits i espermatòcits, ja que s'ha observat que SYCP3 intervé, directament o indirectament, en la condensació cromosòmica durant la profase meiótica (Yuan et al. 2002; Kolas et al. 2004; Liebe et al. 2004). A més a més, ja que també es creu que els AEs poden estar involucrats en el processament dels DSBs seleccionant els punts de recombinació i conversió gènica (Blat et al. 2002;

Tsubouchi and Roeder 2003), que els oòcits tinguessin uns AEs amb menor quantitat de SYCP3 que els espermatòcits, podria implicar un diferent comportament del SC a l'hora de regular el processament dels DSBs, i d'aquesta manera s'explicaria un augment del nombre de punts de recombinació i, alhora, possiblement un allargament de l'estadi de bouquet en els oòcits comparat amb els espermatòcits humans (vegeu l'apartat anterior).

### 5.3.3.3. Processament dels DSBs

Els resultats obtinguts (treball 3, Roig et al. 2004), demostren una marcada diferència entre mascles i femelles a l'hora de processar els DSBs. El fet que en els oòcits el 89% dels *foci* de  $\gamma$ H2AX colocalitzin amb RPA i, en canvi, en espermatòcits, aquest fet es doni només en un 18% dels casos, sumat al fet que tant en oòcits com en espermatòcits, la majoria dels *foci* de  $\gamma$ H2AX no colocalitzen amb MLH1, suggereix que els primers estadis de reparació dels DSBs es donen més lentament en oòcits que en espermatòcits. Aquesta no colocalització de  $\gamma$ H2AX i MLH1 ha estat corroborada per un estudi recent en el qual es postula que l'acumulació de MLH3-MLH1 en els DSBs pot provocar una defosforilació de la histona H2AX (Lenzi et al. 2005).

Aquests autors (Lenzi et al. 2005), però, coincideixen en l'altra hipòtesi suggerida en el nostre treball, on es postula que no es pot descartar que la major presència de  $\gamma$ H2AX en oòcits es degui al fet que el procés de defosforilació de la  $\gamma$ H2AX en oòcits es doni més lentament que en espermatòcits.

Lenzi et al. (2005) també observen que existeix una gran variabilitat en els processos en què intervenen les proteïnes del sistema MMR, generant d'aquesta manera una població molt heterogènia d'oòcits en humans, que, com s'ha demostrat en els nostres estudis i que no sembla ser tan accentuada en els espermatòcits humans (treball 3, Roig et al. 2004). Aquest fet indica que existeix una diferència significativa en la progressió

meiòtica en els oòcits respecte als espermatòcits que es podria correlacionar amb l'alta incidència d'aneuploidies amb un origen matern (Hassold and Hunt 2001).

## **5.4. EFECTES DE LA PRESENCIA D'UN CROMOSOMA DE MÉS EN LA PROFASE MEIÒTICA D'OÒCITS HUMANS**

### **5.4.1. Aparellament i sinapsi en oòcits aneuploides**

L'anàlisi, per primer cop, des de diferents punts de vista, del procés d'aparellament i sinapsi cromosòmica que es dona en oòcits aneuploides s'ha dut a terme mitjançant l'estudi de la dinàmica de centròmers i telòmers, de l'eix de cohesines i del desenvolupament de la sinapsi.

Tant l'organització de l'eix de cohesines com la dinàmica de centròmers i telòmers, així com l'evolució del SC (treball 4, Roig et al. 2005) segueixen els mateixos patrons descrits per als oòcits euploides (treball 3, Roig et al. 2004), la qual cosa suggereix que les aneuploidies no afecten, de manera clarament visible, l'aparellament dels cromosomes homòlegs ni la formació del SC, tal com havien proposat estudis previs (Luciani et al. 1976; Wallace and Hulten 1983; Speed 1984; Cheng et al. 1995; Cheng et al. 1998; Barlow et al. 2002).

Alguns estudis realitzats anteriorment en oòcits amb trisomia 21 suggereixen que el cromosoma extra podria alterar l'aparellament dels altres homòlegs (Cheng et al. 1998). A fi de comprovar-ho, s'ha analitzat com evoluciona l'aparellament del cromosoma 13 en oòcits trisòmics 18 i euploides d'edats de gestació semblants (treball 4, Roig et al. 2005). Els resultats obtinguts revelen que no existeixen diferències significatives entre ambdós casos. A més a més, la normal aparició de SYCP1 en oòcits trisòmics 18 també indica que l'aparellament dels homòlegs no implicats en la trisomia, sembla que no presenta diferències amb l'observat en oòcits euploides (treball 3, Roig et al. 2004) Així doncs, els nostres resultats suggereixen que la presència d'un cromosoma extra no influeix en l'eficiència d'aparellament ni de la sinapsi cromosòmica de la resta de parells de cromosomes homòlegs. Coincidint amb les observacions fetes per altres autors (Speed 1984; Rodriguez and Burgoyne 2001), Cheng et al. (1998) suggerien en el seu treball que la interferència causada pel tercer

---

cromosoma 21 es reduïa sensiblement amb la formació d'un trivalent. Així doncs, l'alta eficiència observada en oòcits 47,XX,+18 a l'hora de formar el trivalent 18 (vegeu punt 5.4.2) podria explicar les diferències entre tots dos treballs. Alhora, cal tenir en compte que els cromosomes 13 i 21 es troben freqüentment associats durant la profase meiótica en oòcits euploides i aneuploides (Roig I. i Garcia M., dades no publicades), i aquesta relació podria jugar un paper important en l'efecte intercromosòmic descrit per Cheng et al. (1998) en oòcits 47,XX,+21.

### **5.4.2. Aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs implicats en la trisomia**

Pel que fa al procés de formació del trivalent, els resultats obtinguts són semblants als descrits anteriorment en oòcits trisòmics 21 (Wallace and Hulten 1983; Speed 1984; Barlow et al. 2002) i en rata mascle amb una trisomia (Martínez-Flores et al. 2001). Tot i això, en preparacions en què s'ha analitzat l'aparició de SYCP1 i REC8, no s'ha observat un engruiximent del segment asinapsat del trivalent, la qual cosa contrasta amb els resultats anteriorment publicats en què s'analitzava el SC mitjançant tincions amb nitrat de plata (Wallace and Hulten 1983; Speed 1984; Martínez-Flores et al. 2001). Aquestes dades indiquen que l'engruiximent de l'AE asinapsat no es deu a un excés de REC8 ni SYCP1, d'altra banda, altres estudis han pogut concloure que tampoc no es deu a un excés de SYCP3 (Barlow et al. 2002).

L'única alteració de la profase meiótica observada en oòcits trisòmics 18 en relació amb els oòcits euploides (treball 4, Roig et al. 2005) ha estat l'augment de la durada de l'estadi de *bouquet*. Aquest fenomen ja havia estat observat entre espècies que tenen mides de genoma semblant però diferent nombre de cromosomes (Pfeifer et al. 2001). L'augment de la durada de l'estadi de *bouquet* es pot deure a la gran eficiència d'aparellament i sinapsi que s'ha observat per als cromosomes 18, que conduiria a una elevada freqüència a la formació d'un trivalent, tenint com a

pas previ la formació d'un bivalent a l'estadi de leptotè o zigotè. La necessitat de formar un trivalent podria ser un requisit perquè l'òocit pogués passar el *checkpoint* de paquitè (Roeder and Bailis 2000). Així doncs, l'existència d'un estadi de *bouquet* prolongat pot venir originat per l'*obligatorietat* de formar un trivalent. Si aquest fos el cas, fent l'anàlisi dels òocits a l'estadi de *bouquet* s'haurien d'observar, amb relativa freqüència, òocits que aparentment haguessin completat l'aparellament, però encara mantinguessin la polaritat nuclear. Estudis fets en fetus trisòmics 21 han confirmat aquesta hipòtesi i han suggerit que, en òocits aneuploides l'estadi de *bouquet* està prolongat per la presència d'un cromosoma de més (P. Robles i M. Garcia, dades no publicades). Tot i això, no s'ha d'excloure la possibilitat que l'endarreriment de desenvolupament que comporta la síndrome d'Edwards pugui intervenir en l'augment de la topologia de *bouquet*, tot i que els resultats obtinguts en òocits 47,XX,+21, anteriorment esmentats, sembla que rebutgen aquesta hipòtesi.

### 5.4.3. Relació d'ATR amb els cromosomes que aparellen tard

A fi d'aclarir la possible existència d'un *checkpoint* d'aparellament/sinapsi a l'estadi de paquitè en òocits humans, s'ha estudiat l'aparició d'ATR en òocits 47,XX,+18 (treball 4, Roig et al. 2005), ja que aquesta proteïna ha estat proposada com un element clau en el control de la sinapsi cromosòmica (Keegan et al. 1996; Moens et al. 1999; Baart et al. 2000). Atès que en el moment de fer el treball no es coneixia la localització d'ATR en espermatòcits ni òocits humans, es va analitzar on apareixia ATR en aquestes cèl·lules. Els resultats obtinguts (treball 4, Roig et al. 2005) són diferents dels descrits en ratolí. En espermatòcits i òocits, euploides i aneuploides, humans, a l'estadi de zigotè tardà, ATR tendeix a aparèixer tant a les regions sinapsades com asinapsades dels bivalents. Aquestes dades sembla que van en contra de la hipòtesi proposada per alguns autors (Keegan et al. 1996; Moens et al. 1999; Baart et al. 2000) en què es proposa que ATR està involucrada en el *checkpoint* de paquitè controlant l'evolució de la sinapsi cromosòmica. De totes maneres, un estudi recent

---

(Perera et al. 2004); en canvi, proposa que ATR pot intervenir en el *checkpoint* de paquitè, però controlant l'evolució del procés de recombinació. Aquesta acció sembla que s'adiu més amb la possible funció d'aquesta proteïna, ja que és un membre de la família de les de proteïnes semblants a la fosfatidilinositol-3-quinasa (vegeu el punt 1.3.2.1.2) i, suposadament, aquestes intervenen en la detecció de lesions del DNA (Fernandez-Capetillo et al. 2004). Així doncs, les dades obtingudes (treball 4, Roig et al. 2005), sumades a observacions recents de colocalització de *foci* d'ATR amb *foci* de  $\gamma$ H2AX en oòcits humans a l'estadi de paquitè (R. Garcia i M. Garcia, dades no publicades) suggereixen que la funció d'ATR podria estar més relacionada amb el processament dels DSBs, i, per tant, en el procés de recombinació, que amb la sinapsi cromosòmica. Tot i això, un estudi realitzat en ratolí ha relacionat l'aparició d'ATR en cromosomes asinapsats com a mediador d'un procés d'inactivació transcripcional (Turner et al. 2005) semblant al que sembla que es dona en la vesícula sexual. Actualment s'estan duent a terme estudis detallats en oòcits humans sobre l'aparició d'ATR i l'estat transcripcional del fragment del bivalent pròxim a aquests *foci* per aportar més dades que aclareixin l'acció d'aquesta proteïna durant la profase meiòtica. Altrament, també cal tenir en compte que segons semblen indicar els estudis comparatius entre ratolí i humà (Roig et al. 2004; Tankimanova et al. 2004; Lenzi et al. 2005; Roig et al. 2005), l'evolució de la sinapsi i recombinació meiòtica en aquestes dues espècies podria diferir lleugerament, la qual cosa explicaria la gran diferència observada pel que fa a la producció de gàmetes aneuploides entre ambdues espècies.

## 5.5. RELACIÓ ENTRE LA SINAPSI CROMOSÒMICA I EL PROCÉS DE RECOMBINACIÓ EN HUMANS

Tant en llevats com en ratolins, l'inici del procés de recombinació comença abans d'iniciar-se el procés d'aparellament i de sinapsi cromosòmica (Mahadevaiah et al. 2001; Smith et al. 2001). Els resultats obtinguts en aquest treball (treball 3, Roig et al. 2004), mitjançant el seguiment de la forma fosforilada de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), com a marcador dels DSBs (Rogakou et al. 1998), ha permès detectar que, tant en espermatòcits com en oòcits humans, l'inici de la recombinació és anterior al procés de sinapsi cromosòmica. La dinàmica d'aparició de la  $\gamma$ H2AX en espermatòcits humans és semblant al patró descrit en ratolins, és a dir,  $\gamma$ H2AX apareix a l'estadi de leptotè marcant tot el nucli i, a mesura que la sinapsi avança,  $\gamma$ H2AX desapareix. A l'estadi de paquitè en la majoria d'espermatòcits humans,  $\gamma$ H2AX queda restringida a la vesícula sexual. Finalment, a l'estadi de diplotè, el senyal de  $\gamma$ H2AX continua localitzat únicament a la vesícula sexual.

En oòcits humans, la dinàmica d'aparició de la  $\gamma$ H2AX és semblant a la descrita en espermatòcits, amb la variació que en oòcits no existeix vesícula sexual. Així doncs  $\gamma$ H2AX apareix a l'estadi de leptotè i, a mesura que la sinapsi cromosòmica progressa durant l'estadi de zigotè,  $\gamma$ H2AX va desapareixent. La diferència observada més important, en comparació amb els espermatòcits, és que en la majoria dels oòcits a l'estadi de paquitè es troben múltiples *foci* de  $\gamma$ H2AX sobre tots els SCs. Aquest fet no havia estat descrit en l'estudi fet anteriorment ni en espermatòcits ni oòcits de ratolí (Mahadevaiah et al. 2001) i, per tant, suposa una important particularitat dels humans. Aquest tipus de cèl·lules també es troben en espermatòcits humans però amb una freqüència molt inferior (vegeu l'apartat 5.3.3.3). Oòcits a l'estadi de diplotè també presenten, en una alta freqüència, *foci* de  $\gamma$ H2AX en els seus SCs. Aquests *foci* de  $\gamma$ H2AX trobats a l'estadi de paquitè correspondrien a DSBs que estan sent processats, ja que en oòcits (vegeu l'apartat 5.3.3.3), la majoria d'aquests *foci* colocalitzen amb RPA.



---

La mitjana del nombre de *foci* de  $\gamma$ H2AX trobats per oòcit a l'estadi de paquitè coincideix amb la mitjana de punts de recombinació observada en oòcits humans (Tease et al. 2002). Tot i això, el rang de *foci* de  $\gamma$ H2AX és superior al dels punts de recombinació observats en altres estudis (Tease et al. 2002). A més a més, la presència de 4 o més *foci* de  $\gamma$ H2AX en un únic SC de mida petita, alguns d'ells pròxims, implicaria que hi ha més DSBs que punts de recombinació. Aquestes observacions estarien d'acord amb altres observacions fetes prèviament en ratolí en què es proposava que hi havia més DSBs que punts de recombinació (Ashley et al. 1995; Tarsounas et al. 1999).

Recentment, s'han publicat estudis que corroboren les dades obtingudes en aquest treball tant en espermatòcits humans (Judis et al. 2004) com en oòcits humans (Lenzi et al. 2005). Lenzi et al. (2005), que analitzen la progressió de la recombinació, obtenen els mateixos resultats que els descrits en el nostre estudi, i d'aquesta manera corroboren la diferent dinàmica de desaparició de la forma fosforilada de la histona H2AX en humans i ratolins. Aquest treball també troba que, a l'estadi de paquitè, la majoria de *foci* de  $\gamma$ H2AX no colocalitzen amb MLH1. Lenzi et al. (2005) coincideixen en la nostra interpretació que aquests *foci* de  $\gamma$ H2AX presents a paquitè poden ser DSBs produïts per SPO11 que encara s'estan reparant, com demostra l'alta colocalització a l'estadi de paquitè amb RPA (treball 3, Roig et al. 2004), i que encara no han adquirit MLH1. A més a més, aquests autors postulen altres hipòtesis com podria ser que aquests *foci* de  $\gamma$ H2AX corresponguin a possibles DSBs que no estan involucrats en processos de recombinació ni conversió gènica.

Alternativament, Lenzi et al. (2005) també proposen que en oòcits humans es podrien donar diferents rondes de DSBs que generarien la localització en un mateix oòcit de diferents intermediaris de reparació en un determinat estadi de la profase meiòtica. Durant l'anàlisi de l'evolució de la profase meiòtica en oòcits aneuploides (treball 4, Roig et al. 2005), s'ha dut a terme l'estudi de la localització d'ATR en oòcits i espermatòcits humans, ja que aquesta proteïna ha estat descrita com a reguladora de

l'evolució de l'aparellament i sinapsi dels homòlegs (Keegan et al. 1996; Moens et al. 1999; Baart et al. 2000). Els resultats obtinguts han revelat que la presència de *foci* d'ATR sobre els SCs sinapsats en oòcits i espermatòcits humans a l'estadi de paquitè (treball 4, Roig et al. 2005), a més a més, la seva colocalització amb els foci de  $\gamma$ H2AX (R. Garcia i M. Garcia, dades no publicades) són dades que podrien estar a favor de l'existència de diferents rondes de DSBs al llarg de la profase meiòtica d'oòcits humans.

## Capítol 6

# Conclusions



Oòcit a l'estadi de diplotè hibridat amb WCP 13

Els resultats obtinguts en aquest treball d'investigació han permès concloure el següent:

1. El protocol de cultiu de cèl·lules somàtiques d'estroma ovàric fetal humà desenvolupat permet obtenir el cariotip de cada mostra i així classificar correctament cadascun dels casos que s'empren en l'estudi de la profase meiòtica en oòcits humans.
2. Les tècniques usades en aquest estudi han permès caracteritzar el procés d'aparellament i sinapsi dels cromosomes homòlegs en la profase meiòtica d'oòcits humans.
3. La tècnica de cultiu d'ovaris fetals humans desenvolupada en aquest treball permet que els oòcits sobrevisquin per períodes llargs, que la meiosi progressi i que els cromosomes homòlegs s'aparellin i completin la sinapsi correctament *in vitro*. A més a més, aquesta tècnica promou l'entrada d'oogònies a la meiosi *in vitro*.
4. L'anàlisi feta en ovaris procedents de 15 fetus euploides ha permès establir una relació entre l'evolució de la profase meiòtica i l'estadi de desenvolupament fetal entre les 15 i 22 setmanes de gestació. En aquest període de temps, el percentatge d'oòcits a l'estadi de leptotè tendeix a decreixer. No s'observa una relació estadísticament significativa en l'evolució del percentatge d'oòcits a l'estadi de zigotè, mentre que el percentatge de cèl·lules en estadis de paquitè i diplotè augmenten significativament amb el desenvolupament fetal.

5. En oòcits humans, igual que passa en els espermatòcits, durant la profase meiòtica es donen una sèrie de reorganitzacions nuclears originades per moviments dels centròmers i dels telòmers dels cromosomes, com és l'adquisició de la conformació de *bouquet*, que condueixen a l'inici de l'aparellament i de la sinapsi cromosòmica en la transició de l'estadi de leptotè a zigotè.
  
6. D'igual manera que es dona en el vedell, en oòcits humans l'estadi de *bouquet* està molt prolongat en comparació amb els espermatòcits, ja que s'inicia en ambdós sexes durant la transició entre l'estadi de leptotè i zigotè, i finalitza en espermatòcits poc després, mentre que en oòcits es troba fins a estadis de paquitè primerenc.
  
7. La sinapsi cromosòmica en oòcits humans s'inicia durant la transició de leptotè a zigotè, amb l'adquisició de la conformació de *bouquet*, per regions subtelomèriques, però, com passa en oòcits de rata, ratolí i de vedell, la sinapsi també s'inicia en regions intersticials dels cromosomes homòlegs.
  
8. L'eficiència d'aparellament dels cromosomes homòlegs observada en oòcits humans (tant en oòcits euploides frescos, com en oòcits euploides cultivats i així com en oòcits aneuploides) durant la profase meiòtica és molt alta, de l'ordre d'un 99,9% en oòcits euploides frescos, suggerint que l'aparellament cromosòmic no tindria un paper important en l'origen de l'alta taxa d'oòcits II fecundables desequilibrats que s'observa en humans. D'altra banda, l'elevat nombre d'oòcits a l'estadi de diplotè que presenten una disjunció prematura dels cromosomes homòlegs fa pensar que, com han proposat altres autors, errors en el procés de recombinació entre els

cromosomes homòlegs podrien estar involucrats en la producció de gàmetes aneuploides en humans.

9. La presència d'un cromosoma de més en oòcits humans trisòmics 18 no comporta un efecte visible sobre l'aparellament i la sinapsi dels cromosomes homòlegs, assolint-se eficiències d'aparellament i sinapsi cromosòmica semblants a les observades en oòcits euploides. Tot i això, s'observa un augment significatiu del percentatge d'oòcits a l'estadi de *bouquet*.
10. L'aparellament i sinapsi dels tres cromosomes 18 en oòcits trisòmics 18 humans és molt eficient ja que s'assoleix amb una elevada freqüència la formació d'un trivalent a l'estadi de paquitè. Tot i que, per aconseguir-ho, es requereix que la cèl·lula mantingui l'estadi de *bouquet* més temps a fi de permetre l'encontre dels tres cromosomes homòlegs per formar en primer lloc un bivalent i, seguidament, el trivalent.
11. En oòcits humans, al llarg de tota la profase meiòtica s'observen agregats de SYCP3 en els nuclèols, la qual cosa contrasta amb les observacions fetes anteriorment en espermatòcits. Aquests acúmuls de SYCP3, junt amb el marcatge de SYCP3 més lleuger observat en els SCs dels oòcits que en els dels espermatòcits, suggereix que pot existir una deficient incorporació de SYCP3 en els SCs dels oòcits humans, i determina d'aquesta manera la condensació cromosòmica diferent durant la profase meiòtica i els processos de recombinació en oòcits humans.
12. Tal com s'ha descrit en llevats i en ratolins, en humans l'inici de la recombinació comença abans que s'aparellin els cromosomes

homòlegs. Per contra, el processament dels DSBs al llarg de la profase meiótica sembla que és diferent en ratolins i humans, quedant encara molts DSBs en reparació en espermatòcits i oòcits humans a l'estadi de paquitè. De la mateixa manera, la reparació dels DSBs sembla que és bastant més lenta en els oòcits que en els espermatòcits humans.

13. En humans, ATR presenta un patró d'aparició diferent al descrit anteriorment en ratolí, no marcant diferencialment els cromosomes homòlegs que aparellen tard.
  
14. La diferent dinàmica d'aparició d'ATR, juntament amb les diferències observades en el processament dels DSBs en ratolins i humans, suggereixen que existeixen diferències en l'evolució de la profase meiótica entre aquestes espècies que podrien promoure la recerca d'un altre model animal més idoni per a l'estudi de la meiosi en mamífers.

## Capítol 7

# Bibliografia



Oòcit a l'estadi de diplotè hibridat amb sonda Pan-centromèrica (vermell) i Pan-telomèrica (verd)



---

**A**

---

- Ashley T, Plug A (1998) Caught in the act: deducing meiotic function from protein immunolocalization. *Curr. Top. Dev. Biol.* 37:201-39
- Ashley T, Plug AW, Xu J, Solari AJ, Reddy G, Golub EI, Ward DC (1995) Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* 104:19-28

---

**B**

---

- Baarends WM, Grootegoed JA (2003) Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. *Cytogenet Genome Res* 103:225-34
- Baart EB, de Rooij DG, Keegan KS, de Boer P (2000) Distribution of Atr protein in primary spermatocytes of a mouse chromosomal mutant: a comparison of preparation techniques. *Chromosoma* 109:139-142
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat. Genet.* 13:336-42.
- Baker TG (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* 158:417-433
- Baker TG, Neal P (1974) Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture. *J. Anat.* 117:591-604
- Barlow AL, Hultén MA (1997a) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I oocytes from normal human females. *Zygote* 6:27-38
- Barlow AL, Hultén MA (1997b) Sequential immunocytogenetics, molecular cytogenetics and transmission electron microscopy of microspread meiosis I oocytes from a human fetal carrier of an unbalanced translocation. *Chromosoma* 106:293-303
- Barlow AL, Hultén MA (1998) Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur. J. Hum. Genet.* 6:350-358
- Barlow AL, Tease C, Hultén MA (2002) Meiotic chromosome pairing in fetal oocytes of trisomy 21 human females. *Cytogenet. Genome Res.* 96:45-51

- Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86:159-71
- Bergerat A, de Massy B, Gabelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386:414-7
- Blandau RJ (1969) Observations on living oogonia and oocytes from human embryonic and fetal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 104:310-319
- Blat Y, Protacio RU, Hunter N, Kleckner N (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasmata formation. *Cell* 111:791-802
- Bojko M (1983) Human Meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlsberg Res. Commun.* 48:457-483
- Bojko M (1985) Human meiosis IX. Crossing over and chiasmata formation in oocytes. *Carlsberg Res. Commun.* 50:43-72
- Borner GV, Kleckner N, Hunter N (2004) Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 117:29-45
- Boue A, Boue J, Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 14:1-57
- Burke DJ (2000) Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 10:26-31

## C

---

- Champion MD, Hawley RS (2002) Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis. *Nat Cell Biol* 4 Suppl:s50-6
- Cheng EY, Chen YJ, Bonnet G, Gartler SM (1998) An analysis of meiotic pairing in trisomy 21 oocytes using fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 80:48-53
- Cheng EY, Chen YJ, Distèche CM, Gartler SM (1999) Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum. Genet.* 105:191-196

- 
- Cheng EY, Chen YJ, Gartler SM (1995) Chromosome painting analysis of early oogenesis in human trisomy 18. *Cytogenet. Cell Genet.* 70:205-210
- Cheng EY, Gartler SM (1994) A fluorescent in situ hybridization analysis of X chromosome pairing in early human female meiosis. *Hum. Genet.* 94:389-394
- Cheng EY, Naluai-Cecchini T (2004) FISHing for acrocentric associations between chromosomes 14 and 21 in human oogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190:1781-1785
- Cohen PE, Pollard JW (2001) Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* 23:996-1009
- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Kozieradzki I, Landers R, Mo R, Hui C, Nieves E, Cohen PE, Osborne LR, Wada T, Kunieda T, Moens P, Penninger JM (2003) Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 300:1291-1295
- Cusidó L, Pujol R, Egozcue J, Garcia M (1995) Cyclophosphamide-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase of female *Rattus norvegicus*. *Mutat. Res.* 329:131-141

## D

---

- Dietrich AJ, Kok E, Offenberg HH, Heyting C, de Boer P, Vink AC (1992) The sequential appearance of components of the synaptonemal complex during meiosis of the female rat. *Genome* 35:492-497

## E

---

- Eichenlaub-Ritter U (1996) Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: a story of past and present. *Environ Mol Mutagen* 28:211-36
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R (2000) Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* 113:673-682

Eijpe M, Offenberg H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SCM1 $\beta$  and SMC3. *J. Cell Biol.* 160:657-670

## F

---

Fawcett DW (1956) The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2:403-06.

Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A (2003) Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 2:426-7

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3:959-67

Ferro J, Martinez MC, Lara C, Pellicer A, Remohi J, Serra V (2003) Improved accuracy of hysteroembryoscopic biopsies for karyotyping early missed abortions. *Fertil Steril* 80:1260-4

Froenicke L, Anderson LK, Wienberg J, Ashley T (2002) Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1353-68.

## G

---

Garcia M, Dietrich M, Freixa L, Vink ACG, Ponsa M, Egozcue J (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light microscopy. *Hum. Genet.* 77:223-232

Garcia M, Dietrich M, Pujol R, Egozcue J (1989) Nucleolar structures in chromosome and SC preparations from human oocytes at 1st meiotic prophase. *Hum. Genet.* 82:147-153

Greenfeld C, Flaws JA (2004) Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bioessays* 26:829-32

---

## H

---

- Hartshorne GM (1996) Fetal ovarian tissue in vitro. *Ass. Reprod. Rev.* 6:71-82
- Hartshorne GM, Barlow AL, Child TJ, Barlow DH, Hulten MA (1999) Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture\*. *Hum. Reprod.* 14:172-182
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2:280-291
- Hunt P, LeMaire R, Embury K, Mroz K, Sheean L (1995) Analysis of chromosome behaviour in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during mammalian female meiosis. *Hum. Mol. Gen.* 4:2007-2012
- Hunt PA, Hassold T (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181-2183
- Hunter N, Kleckner N (2001) The single end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand-break to double-holiday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106:59-70

---

## J

---

- Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D, Skuse D (1997) Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann. Hum. Genet.* 61:471-483
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428:145-50
- Judis L, Chan ER, Schwartz S, Seftel A, Hassold T (2004) Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. *Fertil Steril* 81:205-9

## K

---

- Keegan KS, Holtzman DA, Plug AW, Christenson ER, Brainerd EE, Flaggs G, Bentley NJ, Taylor EM, Meyn MS, Moss SB, Carr AM, Ashley T, Hoekstra MF (1996) The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev.* 10:2423-37
- Keeney S, Baudat F, Angeles M, Zhou ZH, Copeland NG, Jenkins NA, Manova K, Jasin M (1999) A mouse homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* meiotic recombination DNA transesterase Spo11p. *Genomics* 61:170-82
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88:375-84
- Kleckner N, Storlazzi A, Zickler D (2003) Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends Genet.* 19:623-628
- Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D (2000) Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *Am J Hum Genet* 67:395-404
- Kolas NK, Cohen PE (2004) Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination. *Cytogenet Genome Res* 107:216-31
- Kolas NK, Yuan L, Hoog C, Heng HH, Marcon E, Moens PB (2004) Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment. *Cytogenet Genome Res* 105:182-8
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* 38:233-71
- Kurilo LF (1981) Oogenesis in antenatal development in man. *Hum. Genet.* 57:86-92

---

**L**

---

- Lamb N, Freeman S, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL (1996) Susceptible chiasmate configuration of chromosomes 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat. Genet.* 14:400-405
- Lammers JH, Offenbergh HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* 14:1137-46.
- LeMaire-Adkins R, Radke K, Hunt P (1997) Lack of checkpoint control at the metaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J. Cell Biol.* 139:1611-1619
- Lenzi ML, Smith J, Snowden T, Kim M, Fishel R, Poulos BK, Cohen PE (2005) Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *Am J Hum Genet* 76:112-27
- Liebe B, Alsheimer M, Hoog C, Benavente R, Scherthan H (2004) Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing and bouquet stag duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol. Biol. Cell* 15:827-837
- Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman JW, Green ED, Schwartzberg P, Collins FS, Cohen PE (2002) Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* 31:385-90
- Luciani JM, Devictor M, Morazzani MR, Stahl A (1976) Meiosis of trisomy 21 in the human pachytene oocyte. *Chromosoma* 57:155-163
- Luciani JM, Stahl A (1971) Etude des stades de debut de la meiose chez l'ovocyte foetal humain. *Bull. Assoc. Anat.* 15:445-458
- Lynn A, Ashley T, Hassold T (2004) Variation in human meiotic recombination. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5:317-349
- Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA, Hassold TJ (2002) Covariation of Synaptonemal Complex Length and Mammalian Meiotic Exchange Rates. *Science* 296:2222-2225

Lyrakou S, Hulten MA, Hartshorne GM (2002) Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 8:906-911

## M

---

Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeny S, Bonner W, Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27:271-276

Mäkinen M, Hillukkala T, Tuusa J, Reini K, Vaara M, Huang D, Pospiech H, Majuri I, Westerling T, Makela TP, Syvaöja JE (2001) BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J. Biol. Chem.* 276:30399-30406

Manotaya T, Potter EL (1963) Oocytes in prophase of meiosis from squash preparations of human fetal ovaries. *Fertil. Steril.* 14:378-392

Marcon E, Moens P (2003) MLH1p and MLH3p localize to precociously induced chiasmata of okadaic-acid-treated mouse spermatocytes. *Genetics* 165:2283-2287

Martínez-Flores I (1997) Estudio de la primera profase meiótica de la rata (*Rattus norvegicus*). Efectos de las radiaciones ionizantes en ovocitos inmaduros de ratas irradiadas en diferentes edades de desarrollo. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Medicina

Martínez-Flores I, Egozcue J, Cabero L, Garcia M (2001) Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*). *Histol. Histopathol.* 16:701-706

Martínez-Flores I, Egozcue J, García M (2003) Synaptic process in rat (*Rattus norvegicus*): Influence of the methodology on the results. *Microsc. Res. Tech.* 60:450-457

Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J.* 11:5091-100.

Moens PB, Chen DJ, Shen Z, Kolas N, Tarsounas M, Heng HH, Spyropoulos B (1997) Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* 106:207-15

Moens PB, Freire R, Tarsounas M, Spyropoulos B, Jackson SP (2000)



---

Expression and nuclear localization of BLM, a chromosome stability protein mutated in Bloom's syndrome, suggest a role in recombination during meiotic prophase. *J. Cell Sci.* 113:663-72

Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B (2001) The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115:1611-1622

Moens PB, Tarsounas M, Morita T, Habu T, Rottinghaus ST, Freire R, Jackson SP, Barlow C, Wynshaw-Boris A (1999) The association of ATR protein with mouse meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 108:95-102

Morton NE, Jacobs PA, Hassold T, Wu D (1988) Maternal age in trisomy. *Ann Hum Genet* 52 ( Pt 3):227-35

Moses MJ (1956) Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2:215-218

## N

---

Nasmyth K (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297:559-65

Nicolaidis P, Petersen MB (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum. Reprod.* 13:311-319

## O

---

Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RLJ, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJJ, Heyting C (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res.* 26:2572-2579

Ohno S, Klinger HB, Atkin NB (1962) Human oogenesis. *Cytogenetics* 1:42-52

Ohno S, Makino S, Kaplan WD, Kinogita R (1961) Female germ cells of man. *Exp. Cell Res.* 24:106-110

## P

---

Page SL, Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785-789

Page SL, Hawley RS (2004) The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:525-58

Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP (1960) Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1:790-3

Perera D, Perez-Hidalgo L, Moens PB, Reini K, Lakin N, Syvaaja JE, San-Segundo PA, Freire R (2004) TopBP1 and ATR Colocalization at Meiotic Chromosomes: Role of TopBP1/Cut5 in the Meiotic Recombination Checkpoint. *Mol. Biol. Cell* 15:1568-1579

Pezzi N, Prieto I, Kremer L, Perez Jurado LA, Valero C, Del Mazo J, Martinez AC, Barbero JL (2000) STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams- Beuren syndrome deletion. *Faseb J.* 14:581-92.

Pfeifer C, Scherthan H, Thomsen PD (2003) Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev. Biol.* 255:206-15

Pfeifer C, Thomsen PD, Scherthan H (2001) Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet. Cell Genet.* 93:304-14

Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK (2003) Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod* 18:1724-32

Plug AW, Peters AH, Xu Y, Keegan KS, Hoekstra MF, Baltimore D, de Boer P, Ashley T (1997) ATM and RPA in meiotic chromosome synapsis and recombination. *Nat. Genet.* 17:457-61.

Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martinez AC, Rufas JS, Barbero JL (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid

arms in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* 3:761-6.

- Prieto I, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martínez A, Martínez-A C, Hultén MA, Barbero JL (2004) Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res.* 12:197-213
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J, Navarro J (2003) Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 11:325-36
- Pujol R, Garcia M, Freixa L, Egozcue J (1988) Sequential study of the synaptonemal complex in rat (*Rattus norvegicus*) oocytes by light and electron microscopy. *Genetica* 77:179-187

## R

---

- Rasmussen SW, Holm PB (1978) Human meiosis II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlberg Res. Commun.* 43:275-327
- Ribas I (2002) Anomalies cromosòmiques en avortaments espontanis de primer trimestre., Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra
- Rodriguez TA, Burgoyne PS (2001) Spermatogenic failure in male mice with four sex chromosomes. *Chromosoma* 110:124-129
- Roeder GS, Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 16:395-403
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner W (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146:905-915
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner W (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273:5858-5868
- Roig I, Garcia R, Robles P, Cortvrindt R, Egozcue J, Smitz J, Garcia M Human fetal oocytes survive *in vitro* culture. Submitted
- Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M, Scherthan H (2004) Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes.

Chromosoma 113:22-33.

Roig I, Robles P, Garcia R, Martin M, Egozcue J, Cabero L, Barambio S, Garcia M Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. Hum. Reprod. In press

Roig I, Robles P, Garcia R, Martínez-Flores I, Egozcue J, Liebe B, Scherthan H, Garcia M (2005) Chromosome 18 behaviour in human trisomic oocytes. Presence of an extra chromosome extends bouquet stage. Reproduction 129:565-575

Roig I, Vanrell I, Ortega A, Cabero L, Egozcue J, Garcia M (2003) The use of foetal ovarian stromal cell culture for cytogenetic diagnosis. Cytotechnology 41:45-49

Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. Mol Cell 6:975-87

Ross LO, Maxfield R, Dawson D (1996) Exchanges are not equally able to enhance meiotic chromosome segregation in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A 93:4979-83

## S

---

Scherthan H (2001) A bouquet makes ends meet. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:621-7.

Scherthan H (2003) Knockout mice provide novel insights into meiotic chromosome and telomere dynamics. Cytogenet Genome Res 103:235-44

Scherthan H, Cremer T (1994) Methodology of non isotopic in situ hybridization in embedded tissue sections. Methods Mol. Genet. 5:223-238

Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H, Jauch A (1998) Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. J. Cell Sci. 111:2337-51.

Scherthan H, Jerratsch M, Dhar S, Wang YA, Goff SP, Pandita TK (2000a) Meiotic telomere distribution and Sertoli cell nuclear architecture are altered in Atm- and Atm-p53-deficient mice. Mol. Cell. Biol. 20:7773-83.

- 
- Scherthan H, Jerratsch M, Li B, Smith S, Hulten M, Lock T, de Lange T (2000b) Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol. Biol. Cell.* 11:4189-203.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T (1996) Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* 134:1109-25.
- Smith KN, Penkner A, Ohta K, Klein F, Nicolas A (2001) B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis. *Curr Biol* 11:88-97
- Speed RM (1984) Meiotic configurations in female trisomy 21 fetuses. *Hum. Genet.* 66:176-180
- Speed RM (1985) The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 69:69-75
- Speed RM (1986) Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: The possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma* 94:115-124
- Speed RM (1988) The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes. *Hum. Genet.* 78:260-266
- Spradling AC (2004) Stem cells: more like a man. *Nature* 428:133-4
- Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M, Bozorgi N, White M, Caffarelli M, Verlinsky Y (1992) Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype. *J Assist Reprod Genet* 9:458-61
- Svetlanov A, Cohen PE (2004) Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp Cell Res* 296:71-9

## T

---

- Tanaka T, Fuchs J, Loidl J, Nasmyth K (2000) Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol* 2:492-9
- Tankimanova M, Hulten MA, Tease C (2004) The initiation of homologous

- chromosome synapsis in mouse fetal oocytes is not directly driven by centromere and telomere clustering in the bouquet. *Cytogenet Genome Res* 105:172-81
- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* 147:207-20
- Tease C, Hartshorne GM, Hultén MA (2002) Patterns of meiotic recombination in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 70:1469-1479
- Telenius H, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BA (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4:257-263
- Telfer EE (2004) Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice? *Reprod Biol Endocrinol* 2:24
- Terasawa M, Shinohara A, Hotta Y, Ogawa H, Ogawa T (1995) Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of the lily at various meiotic stages. *Genes Dev* 9:925-34
- Tomonaga T, Nagao K, Kawasaki Y, Furuya K, Murakami A, Morishita J, Yuasa T, Sutani T, Kearsey SE, Uhlmann F, Nasmyth K, Yanagida M (2000) Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* 14:2757-70
- Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K (1999) Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* 13:320-33
- Tsubouchi H, Roeder GS (2003) The importance of genetic recombination for fidelity of chromosome pairing in meiosis. *Dev. Cell* 5:915-925
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, Burgoyne PS (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37:41-7

## U

---

- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K (2000) Cleavage

---

of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103:375-86

## V

---

Vidal F, Blanco J, Egozcue J (2001) Chromosomal abnormalities in sperm. *Mol Cell Endocrinol* 183 Suppl 1:S51-4

Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P (1998) The meiotic competence of *in-vitro* matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum. Reprod.* 13:154-160.

## W

---

Wallace BMN, Hulten MA (1983) Triple chromosome synapsis in oocytes from a human foetus with trisomy 21. *Ann. Hum. Genet.* 47:271-276

Wallace BMN, Hulten MA (1985) Meiotic chromosome pairing in the normal human female. *Ann. Hum. Genet.* 49:215-226

## Y

---

Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Höög C (2002) Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296:1115-1118

Yuan L, Liu JG, Zaho J, Brundell E, Daneholt B, Höög C (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell* 5:73-83

## Z

---

Zhang J, Liu J, Xu KP, Liu B, DiMattina M (1995) Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12:361-368

Zickler D, Kleckner N (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Ann. Rev. Genet.* 32

Zuckerman S (1951) The number of oocytes in the mature ovary. *Recent. Prog. Horm. Res.* 6:63-109



Ja tenia ganes d'escriure aquesta part de la tesi... Són moltes hores les que han passat fins avui, així que, de ben segur que el temps es farà notar i pot ser que em descuidi d'algú. Per tant, i abans de res, moltes gràcies a tothom i que ningú no se m'enfadi si se m'oblida algun nom...

Primer de tot, m'agradaria agrair la labor feta pels meus directors. A la Montse per haver-me donat una oportunitat, per deixar-me créixer com a investigador, però sobretot, per acollir-me al lab i fer-m'hi sentir com a casa amb totes les seves històries, celebracions i *batalletes*. A l'Egozcue, per tenir sempre la firma a punt i el consell precís.

La resta de professors de la Unitat de Biologia de la Facultat de Medicina, la Quima, en Jordi, la Cristina, la Carme i la Rosa, també han col·laborat molt en fer-me sentir a gust al lab, amb les petites converses de passadís, les celebracions, les calçotades, etc. A l'Ana, per, entre d'altres coses, ensenyar-me mil i un cops com funciona el fax, després de 6 anys crec que ja ho he après!! A l'Àngels, per ajudar-me amb els cultius i posar-me a ratlla amb les normes del laboratori.

Als companys veterans del grup, l'Iván i l'Alícia, els hi estic agrait per haver tingut prou paciència per respondre a cadascuna de les preguntes que els feia. I als més nous, la Ivette i sobretot en Pedro i la Raquel, per ajudar-me quan necessitava algunes mans extra i per suportar-me estoicament, sobretot aquests últims mesos...

Als companys que vaig trobar en arribar, la Mercè D., la M<sup>a</sup> Àngels, la Laura T., en Sergio, la Maria, la Imma, l'Esther, la Rosana, la Bea i en Jorge, per estar sempre a punt per donar un consell, o respondre un dubte, però més que res per compartir tants bons moments de feina i diversió, amics invisibles, dinars, sopars, *mirades seductores*, partits de badminton al despatx,...

Als que vam començar aquest camí junts, la Cristina G., la Montse C., l'Aïda, la Cristina H., la Núria C., la Núria A., per passar plegats per les mateixes vicissituds (sol·licituds de beques, classes pràctiques, problemes experimentals, sortides a l'estranger,...) i fer-ho amb alegria, ja sabeu, *mal de muchos consuelo de tontos*... I també cal recordar algun que altre viatge per Itàlia i Anglaterra!!! Per cert, com ja saben algunes (Aïda i *Cristines*), ànims que hi ha llum al fons de túnel!!!!

En especial, al Jordi, per compartir tants bons moments fent cafè, al despatx, i a molts altres llocs on hem estat, i per ser un estímul constant per a continuar progressant. I al Pere, per oferir-se constantment a ajudar-me amb les pràctiques de farmàcia i per explicar anècdotes vàries i aportar una altra visió de les coses tot xarrupant el bombó.

I pels que han vingut després al lab, la Mònica, en Javi, l'Anna, la Yolanda, la Meri, l'Ari, l'Elsa, la Gemma i l'Albert, per les corredisses pel passadís (eh Javi?), per la gresca, la il·lusió i les ganes de tirar endavant típiques de qui comença.

A la Unitat de Biologia de la Facultat de Ciències, voldria agrair a la Montse Ponsà per introduir-me al món de la citogenètica, quan encara no sabia ben bé què volia fer. A la Fanny, per ajudar-me sempre que ha calgut. Però sobretot, a l'Aurora i a la Paqui, per parlar de mi a la seva *jefa*, ara ja fa sis anys, i d'aquesta manera ajudar-me a començar aquest camí. I al laboratori de Citogenètica de l'IBB, a la Marta, la Laura i la Laia, per deixar-me un raconet sempre que ha calgut.

A l'Hospital de la Vall d'Hebron voldria agrair al Dr. Lluís Cabero per creure en el projecte i organitzar el sistema de donació de mostres. A l'equip dels ILEs, la Merche, la Mònica i la Imma, per haver estat sempre tant atentes amb mi i haver-me facilitat moltíssim la meva feina.

Fora de Catalunya voldria agrair a la gent del laboratori del Dr. Johan Smitz i a la Dra. Rita Cortvrindt de la AZ-VUB de Brussel·les, la Leen, la Kelly, l'Iris, en Tom, la Dani, la Sandy, en Daniel, en Jean Claire, l'Ingrid, la Katty i la Lotte, per ensenyar-me a ser crític científicament parlant, fer-me sentir com un més del laboratori i descobrir-me Flandes i la cervesa belga.

En el Max Planck Institute for Molecular Genetics de Berlin, al Dr. Harry Scherthan, per ser-hi sempre que ha calgut, tot i la marcada influència de la lluna... A en Bodo, l'Ede, en Nils, la Barbara i la Bea, per acollir-me tant bé durant les dos estades que vaig fer, tant al laboratori com a fora d'ell i passejar-me per Berlin amb qualsevol excusa.

A la Facultat de Medicina de la Universitat de Yale dels EUA, a la Dra. Terry Ashley per donar-me temps per treballar amb els oòcits tot i les dificultats de la mostra. A l'Adelle per facilitar-me la feina i donar-me la benvinguda als USA. I a l'Anne pel bon rotllo que generava al lab i per ensenyar-me New York.

Aquesta tesi no hauria estat possible, sense el recolzament de la meva família, al Tatí i la Jane, i en Romanet i l'Yle, que tot i les pors que comporta que algú s'embranchi en una bogeria com aquesta, han estat al meu costat en tot moment, inclús quan era a Bèlgica, Alemanya i els Estats Units...quin esforç!!! ;-)

A la Mireia, per ser-hi en tot moment. Per intentar llegir-se tots i cadascun del articles, per aprendre's el títol del projecte de tesi tot i que sonés a xino. Per aguantar-me, especialment durant aquests darrers mesos. Per animar-me i fer-me riure, especialment quan era lluny i les coses no sortien. Però sobretot, per ser-hi i recolzar-me sempre tot i els dubtes i les pors.

Barcelona, Abril de 2005.