



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE TRIP13 EN LA PROFASE MEIÓTICA DE MAMÍFEROS

Memoria presentada por
Andros Maldonado Linares

Para optar al título de
Doctor en Biología Celular

Tesis dirigida por
Dr. Ignasi Roig Navarro

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Institut de Biomedicina i Biotecnologia (IBB)
Universitat Autònoma de Barcelona

Director

Dr. Ignasi Roig Navarro

Doctorando

Andros Maldonado Linares

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2023

Este trabajo ha sido llevado a cabo con la financiación de:

Proyectos de I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España:

- BFU2016-80370-P
- PID2019-107082RB-I00
- Excellence network MeioNet (BFU2015-71786-REDT).

European Proteomics Infrastructure Consortium

- EPIX-XS-0000061

“La vida es muy simple, pero insistimos en hacerla complicada”

Confucio

“El Caos es una escalera. Muchos intentan subirla y fracasan y nunca podrán hacerlo de nuevo. La caída los destroza. Pero otros, si se les deja subir, se aferrarán a los dioses o a ilusiones. Solo la escalera es real. El ascenso es todo lo que queda”

Petyr Baelish

ÍNDICE

RESUMEN

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 GAMETOGÉNESIS DE MAMÍFEROS	12
1.1.1 Espermatogénesis	13
1.1.2 Ovogénesis	16
1.2 MEIOSIS	18
1.2.1 Recombinación meiótica	19
1.2.2 Sinapsis de los cromosomas homólogos	22
1.2.3 Desinapsis de los cromosomas homólogos	25
1.3 LAS FUNCIONES DE PCH2/TRIP13	27
1.3.1 Proteínas con dominio HORMA	27
1.3.2 Regulación del SAC	28
1.3.3 Regulación del complejo Shieldin	28
1.3.4 Regulación de las proteínas HORMAD1/2 en meiosis	29
1.3.5 Funciones de Pch2 en la meiosis de levadura	30
1.3.6 Funciones de TRIP13 en la meiosis de mamíferos	32
1.4 ELECCIÓN DE LA RUTA DE REPARACIÓN DE LOS DSBs EN CÉLULAS SOMÁTICAS	33
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	40
3.1.1 Animales y alelos usados	40
3.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	41
3.2.1 Extracción de ADN genómico	41
3.2.2 Genotipado	41
3.2.3 Clonación de genes	45
3.2.4 Extracción de proteínas de testículo de ratón	52
3.2.5 Inmunoprecipitación con crosslink	54
3.2.6 Western Blot	55
3.3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	59
3.3.1 Fijación, inclusión y seccionado	59
3.3.2 Protocolo de desparafinado y rehidratación	60
3.3.3 Tinción con PAS-Hematoxilina	61

3.3.4	Test de TUNEL.....	61
3.3.5	Inmunofluorescencia sobre secciones histológicas.....	62
3.4	TÉCNICAS CITOLÓGICAS.....	65
3.4.1	Extensiones de espermatoцитos en fresco.....	65
3.4.2	Extensiones de espermatoцитos a partir de muestras congeladas	66
3.4.3	Preparaciones de espermatoцитos en <i>squash</i>	66
3.4.4	Tratamiento con DNAsa I.....	67
3.4.5	Cultivo de células de testículo con el inhibidor de TRIP13 DCZ0415	68
3.5	MICROSCOPIA, PROCESAMIENTO DE DATOS Y ESTADÍSTICA.....	69
4.	RESULTADOS.....	71
4.1	LOCALIZACIÓN DE TRIP13 DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS	72
4.2	NUEVOS MODELOS MURINOS PARA ESTUDIAR LAS FUNCIONES DE TRIP13 EN LA PROFASE MEIÓTICA	74
4.2.1	Caracterización fenotípica del mutante <i>Trip13</i> ^{-/-}	74
4.2.2	Caracterización fenotípica del mutante <i>Trip13</i> ^{ATPasaDead}	91
4.2.3	Tratamiento <i>in vivo</i> con el inhibidor DCZ0415.....	103
4.2.4	Cultivo <i>in vitro</i> de células de testículo y tratamiento con DCZ0415.....	111
4.2.5	Caracterización fenotípica del mutante <i>Hormad1</i> ^{3HA/3HA}	114
4.3	FUNCIÓN DE TRIP13 EN LA ELECCIÓN DE LA VÍA DE REPARACIÓN DE LOS DSBs.....	121
4.3.1	Los mutantes de <i>Trip13</i> presentan menos DSBs no reparados	121
4.3.2	Los mutantes de <i>Trip13</i> presentan más marcadores de NHEJ	129
4.3.3	Los espermatoцитos <i>Trip13</i> ^{-/-} presentan acúmulos de 53BP1.....	137
4.3.4	Se acumula más Ku70 en ausencia de <i>Trip13</i>	138
4.4	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA DE TRIP13 DURANTE LA MEIOSIS.....	143
4.4.1	No hay más formación de DSBs en los telómeros en ausencia de TRIP13	143
4.4.2	Los mutantes de <i>Trip13</i> presentan más fusiones entre cromosomas	145
4.4.3	Las fusiones involucran uniones de ADN.....	147
4.4.4	Las fusiones de cromosomas son dependientes de 53BP1.....	149
4.4.5	Los mutantes de <i>Trip13</i> presentan más fusiones en ausencia de DSB.....	151
4.5	FUNCIÓN DE TRIP13 EN LA SINAPSIS DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS.....	153
4.5.1	Los mutantes de <i>Trip13</i> presentan defectos en la sinapsis.....	154
4.5.2	Estudio de los interactores de TRIP13 en testículo.....	156
4.5.3	HSPA2 se encuentra desregulada en los mutantes de <i>Trip13</i>	159
4.5.4	PLK1 se encuentra desregulada en los mutantes de <i>Trip13</i>	165
4.5.5	La función de TRIP13 en la sinapsis es independiente de su función en la recombinación.....	169
4.5.6	La función ATPasa de TRIP13 es necesaria para evitar la desinapsis prematura 175	
4.5.7	La función ATPasa de TRIP13 previene la acumulación precoz de HSPA2 y PLK1 177	
4.5.8	La persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados impide completar la sinapsis.....	180

5. DISCUSIÓN.....	184
5.1 NUEVOS MODELOS PARA ESTUDIAR LA FUNCIÓN DE TRIP13 EN LA MEIOSIS.....	185
5.2 LOS MUTANTES DE <i>TRIP13</i> NO PUEDEN COMPLETAR LA RECOMBINACIÓN MEIÓTICA	189
5.3 FUNCIÓN DE TRIP13 EN LA ELECCIÓN DE LA VÍA DE REPARACIÓN DE LOS DSBs.....	192
5.4 FUNCIÓN DE TRIP13 EN LOS TELÓMEROS	196
5.5 FUNCIÓN DE TRIP13 EN LA SINAPSIS DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS.....	199
5.6 TRIP13 EVITA LA DESINAPSIS PREMATURA DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS.....	202
6. CONCLUSIONES.....	207
7. REFERENCIAS.....	210

RESUMEN

Al inicio de la profase meiótica, la proteína SPO11 produce roturas de doble cadena (DSBs), y su reparación por recombinación homóloga (HR) promueve que los cromosomas homólogos se apareen y sinapsen. La reparación de los DSBs mediante HR o por unión de extremos no homólogos (NHEJ) en meiosis precisa de una regulación muy estricta. Las proteínas del complejo sinaptonémico (SC) son reclutadas a los ejes cromosómicos, lo cual es fundamental para que se pueda completar la recombinación meiótica. TRIP13, también conocida como Pch2 en especies de no vertebrados, es una proteína que pertenece a la familia de las AAA+ ATPasas. Algunas de las funciones de TRIP13 se explican por su capacidad de cambiar la conformación de proteínas que poseen el dominio HORMA, como MAD2, HORMAD1 y REV7. Hemos localizado TRIP13 en los en las porciones sinapsadas del SC y en los telómeros, una localización que no había sido descrita en ningún otro organismo modelo. Para aprender más acerca de las funciones de TRIP13 en la reparación de los DSBs y en la sinapsis de los cromosomas homólogos, hemos usado los mutantes *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}*, hemos generado los modelos murinos *Trip13^{-/-}* y *Trip13^{ATPasaDead}* y también hemos realizado un tratamiento farmacológico usando un inhibidor de TRIP13. También se inmunoprecipitó TRIP13 y sus proteínas interactoras a partir de extractos proteicos de testículo y se identificaron mediante espectrometría de masas. Los resultados de la espectrometría de masas revelaron que la chaperona HSPA2, un factor que controla la desinapsis, es un interactor de TRIP13. HSPA2 y PLK1, otra proteína que promueve la desinapsis, se encuentran desreguladas en los mutantes de *Trip13*. Los espermatocitos de mutantes de *Trip13* presentan defectos en la sinapsis y acumulan DSBs sin reparar. En este trabajo proponemos que TRIP13 evita la desinapsis prematura del SC durante la profase meiótica regulando la presencia de factores desinápticos. Por otro lado, en células somáticas, TRIP13 regula la elección de la vía de reparación de los DSBs desensamblando el complejo Shieldin, en el cual se encuentra REV7. Este complejo protege a los DSBs de la resección, inhibiendo su reparación por HR y promoviéndola por NHEJ. En espermatocitos hemos observado como en ausencia de TRIP13, los marcadores de HR se encuentran reducidos y los marcadores de NHEJ se encuentran aumentados. Además, los espermatocitos deficientes de *Trip13* presentan más cromosomas unidos por los telómeros, un efecto dependiente de 53BP1.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

%: Porcentaje	Ddx4: DEAD-Box Helicase 4
µg: microgramo	dHJ: uniones dobles de Holliday (double Holliday Junctions)
µl: microlitro	Dmc1: Disrupted Meiotic cDNA1
µm: micrómetro	DMSO: Dimetilsulfóxido
µM: micromolar	dpc: días post-coito
53BP1: p53-binding protein 1	dpp: días post-parto
AAA+: Atpases Associated with diverse cellular Activities	DSBs: roturas de doble hebra (Double Strand Breaks)
Ab: anticuerpo (Antibody)	dsDNA: DNA de doble hebra (double-stranded DNA)
ADN: ácido desoxirribonucleico	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ADP: Adenosín bifosfato	EX01: Exonucleasa 1
AEs: elementos axiales (Axial Elements)	ESCs: Células madre embrionárias
APC/C: Anaphase-promoting Complex/Cyclosome	FBS: SÉRUM bovino fetal
ARN: ácido ribonucleico	FITC: isotiocianato de fluoresceína
ASY3: Meiosis-specific protein 3	FSH: hormona estimulante de folículos (Follicle Stimulating Hormone)
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated	g: fuerza G
ATP: Adenosín trifosfato	GFP: Green Fluorescent Protein
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-related	γH2AX -H2AX fosforilada
bp: pares de bases (base pair)	GVBD: Germinal Vesicle Breakdown
Cdc20: Cell Division Cycle 20	h: Hora
CDK1: Cyclin Dependent Kinase 1	H1T: Histona H1T
CE: elemento central (Central Element)	HOP1: Homolog Pairing 1
CHAMP1: Chromosome Alignment Maintaining Phosphoprotein 1	HORMA: HOP1, REV7, MAD2
CHK1: Checkpoint kinase 1	HORMAD1: HORMA Domain Containing 1
CHK2: Checkpoint kinase 2	HR: Recombinación homóloga
CM: <i>Closure motif</i>	HSPA2: Heat Shock Protein Family A Member 2
CO: crossover	HTP-3: Horma domain containing protein 3
co-IP: co-inmunoprecipitación	IF: Inmunofluorescencia
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	IH: interhomolog
Dazl; Deleted in Azoospermia Like	IHO1: Interactor of HORMAD1

KASH5: KASH Domain Containing 5
kDa: kiloDalton
KO: mutante nulo (knockout)
LEs: elementos laterales (Lateral Elements)
LH: hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)
MAD2: Mitotic Arrest Deficient 2
MAD2L2: Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2, (También REV7)
mM: milimolar
Mod: Moderado
MSCI: Inactivación de los cromosomas sexuales meióticos (Meiotic Sex Chromosome Inactivation)
NaCl: Cloruro sódico
NCO: non-crossover
NHEJ: reparación de extremos no homólogos (Non-Homologous End Joining)
°C: grados Celsius
ON: Toda la noche
PAR: región pseudoautosómica (PseudoAutosomal Region)
PAS: tinción Periodic Acid-Schiff
Pch2: Pachytene checkpoint Protein 2
PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
PGCs: células germinales primordiales (Primordial Germ Cells)
pH: potencial hidrógeno
PLK1: Polo-like Kinase 1
PTBG: PBS-Tween-BSA-Gelatin
RNF212: Ring Finger Protein 212
RNs: nódulos de recombinación (Recombination Nodules)

RPA: Replication Protein A
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Temperatura ambiente
s: segundo
SAC: Spindle Assembly Checkpoint
SC: complejo sinaptonémico (Synaptonemal Complex)
SDS: Dodecilsulfato sódico
SDSA: Synthesis-dependent strand annealing
Sev: Severo
sHJ: uniones simples de Holliday (single Holliday Junctions)
SPATA12: Spermatogenesis Associated 12
Sry: Sex-determining region Y
SSCs: células madre espermatogoniales (Spermatogonial Stem Cells)
ssDNA: DNA de hebra simple (single-stranded DNA)
SUN1: Sad1 And UNC84 Domain Containing 1
SYCP3: Synaptonemal Complex Protein 3
TEX12: Testis Expressed 12
TF: filamentos transversales (Transverse Filaments)
TRIP13: Thyroid Hormone Receptor Interactor Protein 13
TUNEL: TdT mediated dUTP Nick End Labelling, marcaje de apoptosis
WB: Western Blot
WT: silvestre (Wild-Type)
Zip1: Synaptonemal Complex Protein ZIP1

1. Introducción



1.1 Gametogénesis de mamíferos

La gametogénesis es el proceso biológico mediante el cual se obtienen los gametos a partir de las células germinales. Los gametos, en la hembra los ovocitos, y en el macho los espermatozoides, son células muy especializadas que sufren una reducción en su ploidía. De esta manera, cuando se produzca la fecundación, se formará un cigoto diploide encargado de generar el nuevo individuo con la información genética de ambos progenitores. En mamíferos, la meiosis presenta dimorfismo sexual (Morelli & Cohen, 2005). En las hembras de ratón se inicia durante el desarrollo fetal de una manera sincrónica. En el momento del nacimiento, las ovocitos se detienen al final de la profase meiótica, conocido como estadio dictioteno, hasta el final de la edad reproductiva (Martínez-Marchal et al., 2020). En los machos en cambio, la entrada en meiosis es un proceso más tardío, ya que no es hasta la pubertad cuando las espermatogonias se diferenciarán a espermatoцитos para producir los gametos masculinos, proceso que se llevará a cabo a partir de este momento y durante la mayor parte de la vida del adulto. **(Figura 1-1).**

La gametogénesis tiene sus inicios durante el desarrollo embrionario cuando aparecen las células germinales primordiales (PGCs), las células precursoras de los gametos (Ginsburg et al., 1990; McLaren, 2003). En el embrión de ratón sobre el día 7 embrionario, un grupo de células del ectodermo extraembrionario se diferencian en las PGC gracias a señales paracrinas específicas (de Felici et al., 2005; Richardson & Lehmann, 2010). Desde el epiblasto, lugar donde se produjo la especificación, proliferan, migran y colonizan las crestas genitales alrededor del día 11 embrionario (Bendel-Stenzel et al., 1998; Molyneaux et al., 2001; Ohinata et al., 2006). Es durante este periodo de transición cuando las células inician la reprogramación epigenética, produciendo una desmetilación por todo el genoma para luego poder transcribir genes específicos de células germinales **(Figura 1-1)** (Ohinata et al., 2006; Seki et al., 2007). Si en las células germinales se expresa el gen *Sry*, se diferenciarán para formar los testículos, y en su ausencia se formarán los ovarios (Feng et al., 2014; McLaren & Southee, 1997).

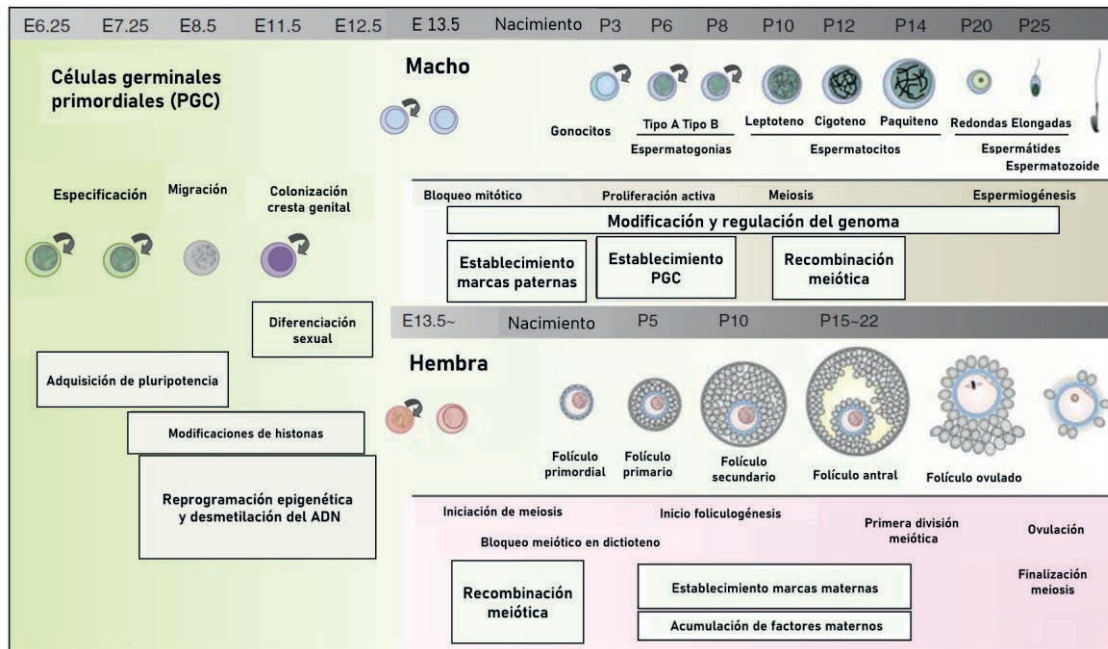


Figura 1-1. La gametogénesis de mamíferos presenta dimorfismo sexual. Diagrama representativo de la diferenciación de las células germinales en machos y en hembras. La gametogénesis se inicia en ambos sexos durante el periodo fetal con la especificación de las PGCs, su proliferación y posterior migración para colonizar las crestas genitales. En ese momento se produce la diferenciación sexual. En machos (sección de arriba), las PGCs dejan de dividirse hasta que se reanuda la mitosis después del nacimiento. Los gonocitos entran en meiosis diferenciándose en espermatocitos y estos en espermátidas, las cuales mediante la espermiogénesis se transformarán en espermatozoides. Este proceso dura toda la vida del individuo. Al contrario, en las hembras (sección de abajo), todos los ovocitos inician la meiosis a la vez durante el periodo fetal y quedan bloqueados en dictioteno. A partir del nacimiento, se produce una muerte masiva de ovocitos, y los ovocitos restantes pasan a ser folículos primordiales. A partir de la pubertad, prosigue la foliculogénesis hasta que el ovocito extruye el primer corpúsculo polar, es ovulado y quedará bloqueado en metafase II hasta la fecundación. Diagrama adaptado de Mitinori Saitou, Masashi Yamaji 2012.

1.1.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso especializado mediante el cual se forman los gametos masculinos, los espermatozoides (Nishimura & L'Hernault, 2017; Phillips et al., 2010). En los embriones XY, entre el día 10 y 12 embrionario, se empieza a expresar el gen *Sry* que llevará a las gónadas a diferenciarse en testículos y a la diferenciación de las células de Sertoli (Sekido, 2010). Durante la migración hacia las crestas genitales, las PGCs proliferan. Una vez las han colonizado, las PGCs se diferencian a gonocitos (o proespermatogonias) que quedarán en estado quiescente hasta la pubertad (Hamer & de Rooij, 2018; McLaren, 2003; Western et al., 2008). Los gonocitos y las células de Sertoli forman los cordones seminíferos, precursores de los túbulos seminíferos (Cool & Capel, 2009; Phillips

et al., 2010). La espermatogénesis se reestablece una vez empieza la pubertad, a los 5 días dpp (días postparto) en ratón, y durará la mayor parte de la vida reproductiva del macho. En el momento que se restablece la espermatogénesis, los gonocitos adquieren la capacidad de migrar desde el centro del túbulo primitivo hacia la base, y es en esa región donde se diferenciarán a espermatogonias, iniciando así la primera oleada de la espermatogénesis (McLean et al., 2003; Reece, 1996).

Las espermatogonias son células con capacidad de autoperpetuarse (de Rooij & Grootegoed, 1998). Hay distintas poblaciones de espermatogonias a las que históricamente se las clasificó en función de si poseían o no heterocromatina en el núcleo (Griswold, 2016, Reece, 1996). Las espermatogonias A son las células más indiferenciadas (Niederberger et al., 2018). Se dividen por mitosis con citocinesis incompleta, a través de las cuales se forma una cadena de células conectadas entre ellas, en la que algunas células progresarán en la diferenciación hacia espermatogonia intermedia y finalmente a espermatogonias B (Fayomi & Orwig, 2018). En las espermatogonias B se produce la replicación del ADN, son las se diferencian a espermatocitos y las células que inician la meiosis, proceso que ocurre alrededor del día 6 dpp (de Rooij & Grootegoed, 1998, Muñoz-Velasco et al., 2013). Los espermatocitos sufren dos rondas de segregación cromosómica para reducir su ploidía, y así generan las espermatidas, ya células haploides. Estas células llevan a cabo cambios estructurales y funcionales, conocidos como la espermiogénesis, que dará lugar a los espermatozoides (**Figura 1-2**). Los cambios que se producen incluyen la condensación del núcleo, la elongación del cuerpo de la célula, además de la formación del acrosoma y el flagelo (Hess & de Franca, 2008; Neto et al., 2016). También ocurre la compactación de la cromatina, gracias a la sustitución de las histonas por las protaminas (S. L. Hao et al., 2019). Los últimos pasos de la maduración de los espermatozoides se producen cuando éstos ya se han liberado de los túbulos seminíferos y se almacenan en el epidídimo. En ratón, el proceso dura alrededor de 35 días. La fase mitótica de las espermatogonias dura unos 10 días, la fase meiótica engloba 11 días y la espermiogénesis se lleva a cabo en 14 días. Cada 8 días, se inicia un nuevo proceso de espermatogénesis, y de esta manera se acaban solapando distintas oleadas en un mismo túbulo seminífero (Clermont & Trott, 1969; Eddy, 2002).

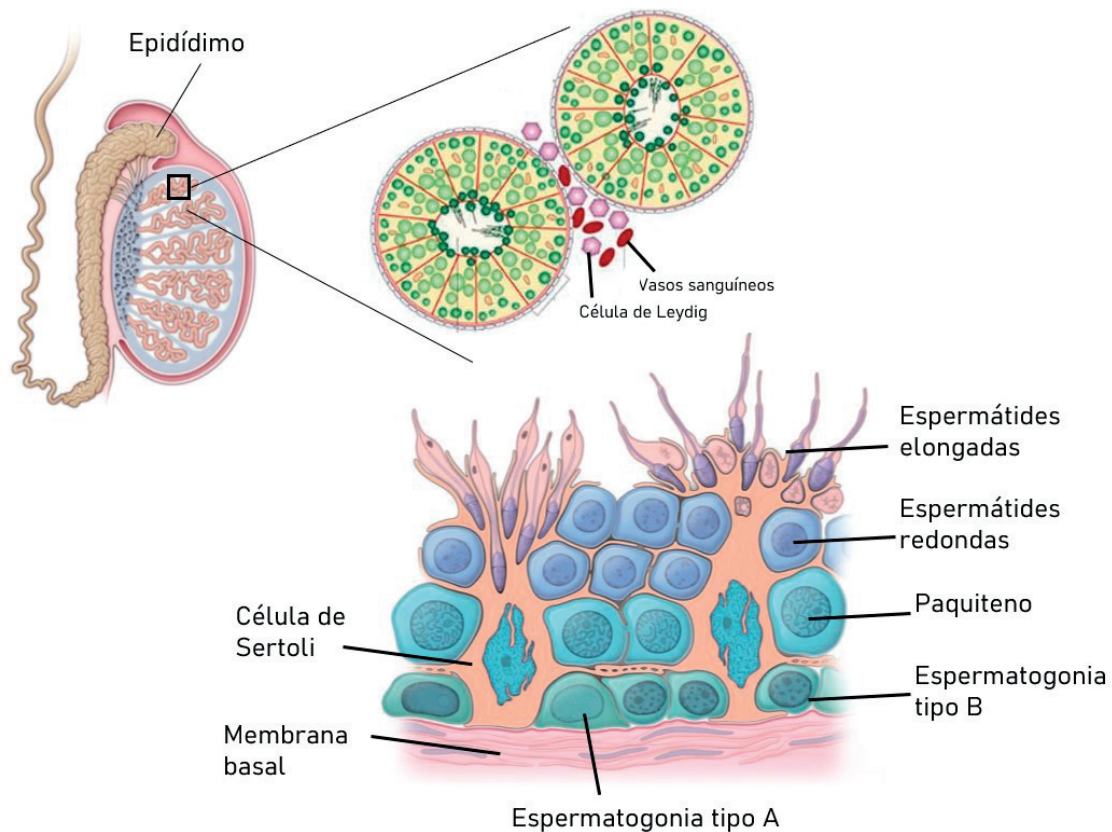


Figura 1-2. Organización de los túbulos seminíferos en los testículos. Esquema que muestra la organización de los túbulos seminíferos en el testículo. En estas estructuras se hallan las células del epitelio germinal incluidas las células de Sertoli. El epitelio está apoyado en la membrana basal. Las espermatogonias están en el compartimento basal. Los espermatocitos tardíos y las espermátidas se encuentran en el compartimento adluminal. Una vez se completa la meiosis, las espermátidas llevan a cabo la espermiogénesis para transformarse en espermatozoides que madurarán en el epidídimo. Imagen modificada de Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013) y Cooke and Saunders (2002).

La espermatogénesis se realiza en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos en condiciones normales de manera continuada e ininterrumpida desde la pubertad y durante toda la vida del individuo (Griswold, 2016; Nishimura & L'Hernault, 2017; Walker, 2011). En él, residen los distintos tipos celulares involucrados en generar los espermatozoides (**Figura 1-2**) (Romrell et al., 1976). Dependiendo de los tipos de células germinales y el grado de diferenciación en que se encuentran en cada porción del túbulo seminífero, se pueden clasificar hasta XII estadios distintos (Ahmed & de Rooij, 2009; Hess & de Franca, 2008). Además de las células germinales, en el epitelio germinal también se encuentran las células de Sertoli, las cuales forman el nicho en el que yace el epitelio (Hale, 1996). También son necesarias para controlar el metabolismo de las células germinales para permitir su correcto funcionamiento (Griswold, 1998). Las células de Sertoli forman la barrera hematotesticular gracias a las uniones estrechas que se

encuentran entre ellas (Mruk & Cheng, 2015). Esta barrera separa el epitelio germinal en dos compartimentos: la zona basal y la zona adluminal. La zona basal es el área definida entre la lámina basal del túbulo y las uniones estrechas de las células de Sertoli. Estas rodean completamente con sus prolongaciones citoplasmáticas a las espermatogonias. La zona adluminal es la región donde los espermatoцитos y espermátidas progresan hacia la luz del túbulo. La función de la barrera hematotesticular es la de aislar el compartimento adluminal del espacio intersticial, localizado entre los distintos túbulos seminíferos. En él, se encuentran las células del sistema inmune, vasos sanguíneos y las células de Leydig. Estas últimas son las productoras de testosterona, hormona que regula muchas funciones en la espermatogénesis, necesaria para que las células de Sertoli mantengan la homeostasis del epitelio germinal (**Figura 1-2**) (Oatley & Brinster, 2012; Zhou et al., 2019).

1.1.2 Ovogénesis

La ovogénesis en mamíferos se inicia durante el desarrollo embrionario (**Figura 1-1**). En los embriones XX de ratón, la ovogénesis comienza en el día 10,5 embrionario cuando las PGCs proliferan y se diferencian a ovogonias en las crestas genitales (Molyneaux et al., 2001). Después de la diferenciación, las ovogonias se dividen por mitosis con citocinesis incompleta hasta el día 13,5 embrionario formando lo que se conoce como quistes o nidos, estructura conservada en distintas especies (O'Connell & Pepling, 2021; X. Wang & Pepling, 2021). Las ovogonias se mantienen conectadas mediante puentes intercelulares, estructuras que propician una comunicación celular que permite el transporte de vesículas y mitocondrias entre las distintas células (Pepling & Spradling, 1998). Las ovogonias que se encuentran en los nidos expresan genes relacionados con la meiosis, tales como *Sycp3*, *Ddx4* o *Dazl*, que permitirá su diferenciación a ovocitos (di Carlo et al., 2000; Maatouk et al., 2006, McClellan et al., 2003). Los ovocitos progresan por la profase meiótica hasta quedar bloqueados en dictioteno, un estado prolongado de diploteno, alrededor del día 19 embrionario (Martínez-Marchal et al., 2020). En este momento, una gran parte de estos ovocitos morirán por atresia, lo que causará la fragmentación de los nidos (Martínez-Marchal et al., 2020). Este proceso está regulado por distintos mecanismos de control celular, que terminarán seleccionando a los ovocitos más viables.

Una vez que los ovocitos se individualizan, comienza la foliculogénesis. Las células del estroma del ovario rodean a los ovocitos en una monocapa de células planas y forman los folículos primordiales (O'Connell & Pepling, 2021). En ratón, justo después del nacimiento, se produce la formación de los folículos primordiales, y posteriormente se empezarán a reclutar los folículos para su maduración a partir de la pubertad. Estos folículos primordiales representan toda la población de ovocitos disponibles durante la vida reproductiva de la hembra (Pepling, 2012). Las células somáticas, también conocidas como células de la pregranulosa, nutren al ovocito y le proporcionan distintos factores importantes para su desarrollo. Los folículos primordiales se mantendrán en estado quiescente hasta que sean reclutados. Esta activación promueve su crecimiento. Las células de la pregranulosa que los rodean pasan de ser una monocapa de células planas a ser una capa formada por células cúbicas de células de la granulosa (Hsueh et al., 2015; Pedersen & Peters, 1968). De esta manera, los folículos primordiales pasan a ser folículos primarios, en los que las células de la granulosa se dividen mitóticamente y forman múltiples capas que rodean al ovocito. El folículo primario madura hacia folículo secundario. En este momento se forma la teca, una capa de células externa a la lámina basal que rodea al folículo en crecimiento (Tajima et al., 2006). Además, durante esta maduración, el ovocito acumula más mitocondrias y ribosomas unido a un incremento de la síntesis de proteínas (Ntostis et al., 2021). Hasta este momento, el desarrollo de los folículos era independiente del efecto de gonadotropinas. Pero al principio del estadio pre-antral, los folículos secundarios expresan receptores para FSH y LH, que les permite responder a gonadotropinas (F. Sánchez & Smitz, 2012). El folículo secundario empieza a formar el antro, una cavidad llena de líquido folicular producido por las células foliculares (Turathum et al., 2021). Las células foliculares se agrupan en dos poblaciones, las células del *cummulus*, que rodean al ovocito, y las células de la granulosa murales, que forman la pared folicular (Sánchez & Smitz, 2012; Uyar et al., 2013). A partir de este momento, el folículo pasa a ser un folículo antral y su desarrollo es dependiente de FSH y LH. La FSH estimula a las células de la granulosa para segregar estrógenos. La LH estimula a las células de la teca para producir progesterona y testosterona (Oduwole et al., 2021; Palermo, 2007). La LH además es importante para inducir la maduración final de los folículos y producir la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), que produce la rotura y disolución de la envoltura

nuclear y la condensación de los cromosomas (R. Li & Albertini, 2013; Trounson et al., 1998). La rotura de la pared folicular y la liberación del ovocito junto a las células del *cummulus* propician la ovulación. Una vez el ovocito ha sido ovulado, el ovocito prosigue la meiosis hasta progresar hasta la metafase II. Para completar la meiosis II necesitará la fecundación para producir la extrusión del segundo corpúsculo polar (R. Li & Albertini, 2013).

1.2 Meiosis

La meiosis es una división celular especializada que genera gametos haploides provenientes de una célula diploide. Este proceso consiste primero en una sola ronda de replicación del ADN seguido de dos divisiones consecutivas (Kleckner, 1996). Los cromosomas homólogos se separan durante la primera división meiótica y de esta manera se generan las células haploides. Posteriormente, en la segunda división meiótica, son las cromátides hermanas las que se separarán, en una división análoga a lo que ocurre en la mitosis. Después de la fecundación la diploidía se vuelve a recuperar una vez se unen los dos gametos sexuales (**Figura 1-3**). La meiosis comienza con la profase meiótica, un proceso muy bien controlado debido a su alta complejidad. Es la etapa de mayor duración del ciclo, y en ella se producen eventos tales como la formación de roturas de doble cadena (DSBs de Double Strand Breaks) (Keeney et al., 1997), un daño programado que se deberá reparar mediante recombinación homóloga (HR). Esto llevará al apareamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos para formar los bivalentes. La recombinación homóloga tiene como resultado la formación de crossovers (COs), un intercambio de material genético entre los cromosomas homólogos (Cole et al., 2012). Los COs también forman una conexión física entre los cromosomas homólogos, llamada quiasma, la cual permitirá una posterior segregación en la primera división meiótica (Bascom-Slack et al., 1997). La profase meiótica se puede dividir a su vez en cuatro subestadios en los que van ocurriendo los eventos mencionados. Estos estadios son, en orden de aparición, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno y se pueden distinguir entre ellos por la aparición del complejo sinaptonémico (SC). El SC es una estructura proteica en forma de cremallera, exclusiva de la meiosis, que une a los cromosomas homólogos y

permite que ocurra la recombinación entre ellos (Cahoon & Hawley, 2016; Fraune et al., 2012; Morelli & Cohen, 2005).

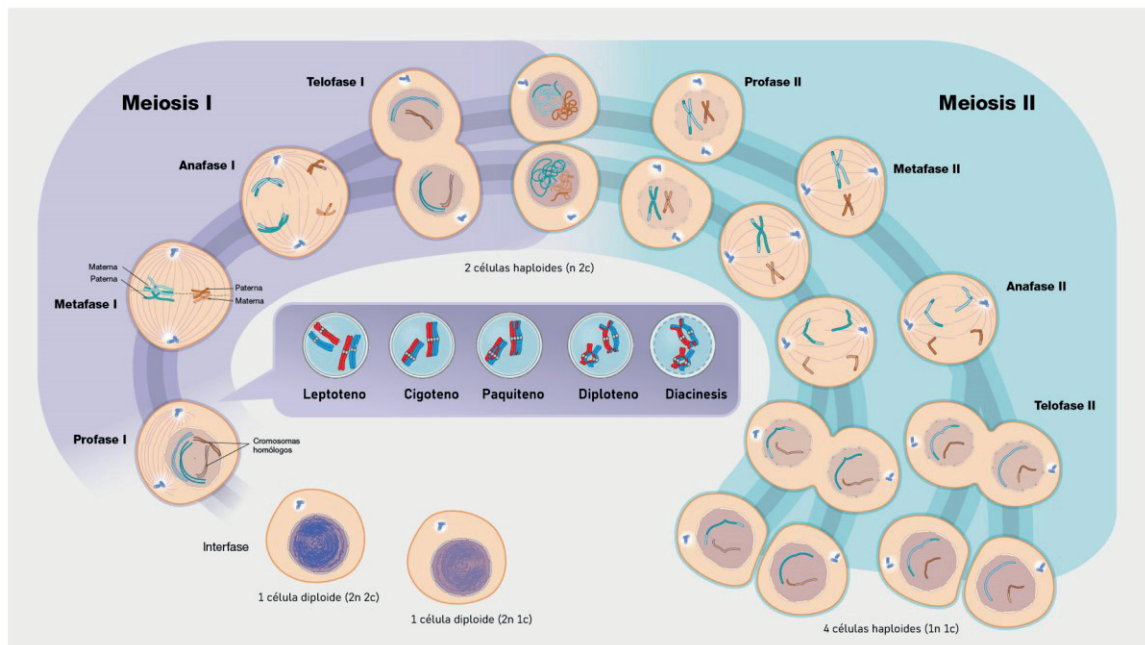


Figura 1-3. Progresión de la meiosis en mamíferos. La primera división meiótica comienza con la profase meiótica, que se divide en cuatro subestadios: leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. En leptoteno, la proteína SPO11 produce los DSBs y se inicia la recombinación homóloga. Con la reparación de los DSBs, los cromosomas homólogos aparean y sinapsan en cigoteno. En paquiteno, la sinapsis se ha completado y los cromosomas homólogos forman los COs. En diploteno, los cromosomas homólogos desinapsan para producir la segregación de los cromosomas homólogos en la metafase I y anafase I. La segunda división meiótica segrega las cromátidas hermanas para producir los gametos haploides. Imagen modificada de National Human Genome Research Institute.

1.2.1 Recombinación meiótica

La recombinación meiótica es un tipo de recombinación homóloga (HR) que utiliza el cromosoma homólogo como molde y promueve la creación de los COs. A nivel molecular, la recombinación meiótica comienza con la inducción de DSBs a lo largo de todo el genoma por la transesterasa SPO11, una ADN topoisomerasa II muy conservada evolutivamente (sus ortólogos se encuentran en levadura, invertebrados, plantas y mamíferos) y es responsable de catalizar los DSBs programados al inicio de la meiosis (Keeney et al., 1997). En mamíferos, SPO11 actúa con otras proteínas accesorias como TOPOVIBL, REC114, IHO1, ANKRD31, MEI1 o MEI4. (Keeney et al., 1997; Lam & Keeney, 2015; Papanikos et al., 2019; Stanzione et al., 2016, Kumar et al., 2018). En leptoteno, cuando se han producido los DSBs, ATM es reclutada al lugar del daño y fosforila la histona H2AX en la serina

139 (γ H2AX), lo cual activa la cascada de reparación de los DSBs (Royo et al., 2013). SPO11 está covalentemente unida al extremo 5' de cada fragmento de ADN roto. Para poder reparar el daño, SPO11 es liberado mediante un corte endonucleolítico mediado por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) y posteriormente los extremos son reseccionados. La resección de los DSBs se hace del extremo 3' al 5' gracias a la actividad exonucleasa del MRE11 y del extremo 5' al 3' se da por la acción de la exonucleasa EXO1 (Lam & Keeney, 2015). Este proceso acaba generando extremos de cadena simple (ssADN). Después de que se haya producido la resección de los DSBs, el complejo proteico RPA se une a los extremos 3' de ssADN con los que tiene mucha afinidad, protegiéndolos de ser degradados gracias al complejo que forma con MEI0B y SPATA22 (Guo et al., 2021; Ribeiro et al., 2021; Souquet et al., 2013). RPA es desplazado rápidamente por las recombinasas RAD51 y DMC1 (específica de meiosis), formando los nódulos de recombinación (Hinch et al., 2020). Este intercambio de RPA por RAD51 y DMC1 está regulado por múltiples proteínas, tales como ATR, BRCA2, el complejo Shu SWS1-SWSAP1, PALB2 y TRIP13 (Abreu et al., 2018; Pacheco et al., 2018; Roig et al., 2010; Zhao et al., 2017). ATR promueve la carga de ambas proteínas, a través de CHK1, en respuesta al reconocimiento del ssADN con RPA (Pacheco et al., 2018; Widger et al., 2018). BRCA2 reemplaza RPA por RAD51 mediando la unión directa de RAD51 a los ssADN (Liu et al., 2010; H. Sánchez et al., 2017). TRIP13 también es necesaria para promover la carga de RAD51 (Roig et al., 2010).

La búsqueda de homología y la invasión del cromosoma homólogo empieza en cigoteno, cuando una de las ssADN recubierta con RAD51 y DMC1 se inserta en la hebra molde del cromosoma homólogo formando el *D-loop* (**Figura 1-4**). Se produce la elongación por síntesis del extremo 3' usando la hebra del cromosoma homólogo como molde. Se ha formado la unión de Holliday (HJ). Si el otro extremo reseccionado se incorpora, el *D-loop* se estabiliza y se forma una doble unión de Holliday (dHJ), que se resolverá formando un CO. Sin embargo, si el extremo reseccionado es desplazado, el *D-loop* no se estabiliza y los DSBs se reparan mediante el anillamiento de hebra dependiente de síntesis (SDSA), resolviéndose como un *non-crossover* (NCO). El CO consiste en un intercambio recíproco de material genético (Zickler & Kleckner, 2015), y el NCO involucra solo una transferencia de material genético unidireccional, conocido como conversión

génica (**Figura 1-4**). En ratón, solo el 10% de las roturas se acabarán reparando vía CO (Cole et al., 2012). En paquiteno la mayor parte de las roturas han sido reparadas y al menos se habrá formado un CO por bivalente, para asegurar una correcta segregación de los cromosomas en la metafase I (Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

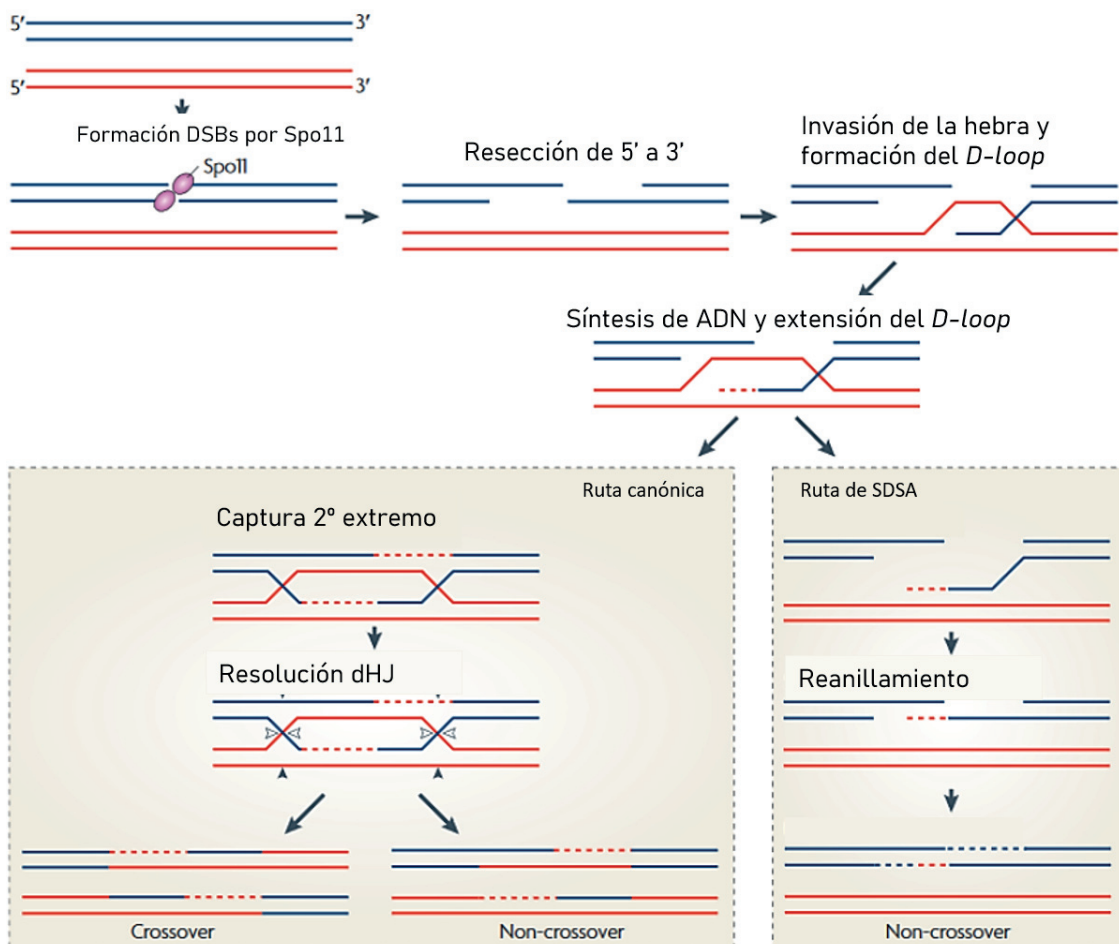


Figura 1-4. Ruta de la recombinación meiótica. Una vez se han producido los DSBs por la proteína SP011, esta se mantiene covalentemente unida al extremo 5' hasta que el complejo MRN resecciona el daño. La resección genera extremos de cadena simple que serán recubiertos por RPA. Posteriormente RPA es reemplazada por RAD51 y DMC1 para promover la búsqueda de la hebra homóloga y la invasión hacia el cromosoma homólogo, formando el *D-loop*. Una vez se ha formado el *D-loop* y se ha extendido por síntesis de ADN, se puede revolver por dos rutas distintas. La captura del segundo extremo forma el dHJ, que puede resolverse produciendo un CO. La otra vía es la SDSA, que desplaza la hebra, reanillando y resolviendo en forma de NCO. Imagen adaptada de Sasaki et al (2010).

Se ha sugerido que se deben realizar entre 200 y 400 DSBs por todo el genoma, basado en los foci de RAD51 y DMC1 que se encuentran en leptoteno (Baudat & de Massy, 2007). Esta producción controlada de DSBs es necesaria, ya que una reducción en su número llevará a problemas de sinapsis (Kauppi et al., 2013). ATM juega un papel esencial regulando la producción de los DSBs, ya que actúa como *feedback* negativo (Barchi et al., 2008; Cooper et al., 2014, Lange et al., 2011). En ratón, los mutantes de ATM presentan un incremento significativo en el número de DSBs (Pacheco et al., 2015). En levadura Tel1^{ATM} actúa inhibiendo la formación de más roturas en lugares donde ya se han producido, y evita también que los DSBs se acumulen en las mismas regiones del genoma (Garcia et al., 2015).

1.2.2 Sinapsis de los cromosomas homólogos

La sinapsis permite que los cromosomas homólogos puedan mantenerse unidos para permitir la recombinación homóloga. En mamíferos la recombinación y la sinapsis son dos procesos íntimamente ligados, una dependencia mutua en la que, si ocurre algún fallo en alguno de los dos procesos, el otro también se verá afectado (MacQueen & Hochwagen, 2011). La unión física entre los cromosomas se establece gracias a la presencia del complejo sinaptonémico (SC), una estructura proteica que mantiene los cromosomas unidos durante toda la profase meiótica. También actúa como andamiaje y sitio de anclaje de distintas proteínas relacionadas con la recombinación (Zickler & Kleckner, 2015). La arquitectura del SC está evolutivamente conservada (Grishaeva & Bogdanov, 2014).

Aunque los DSBs no son imprescindibles para ensamblar el SC, sí son necesarios para que el SC se forme entre los cromosomas homólogos. En ratón esto precisa de la formación de los DSBs y la reparación de estos por recombinación meiótica. (Baudat et al., 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Una reducción en el número de DSBs se traduce en mayor dificultad para que los cromosomas homólogos se encuentren, retrasando la sinapsis e incluso produciendo sinapsis entre cromosomas no homólogos, como ocurre en los mutantes de SPO11 (Kauppi et al., 2013, Baudat et al., 2000). Además de la existencia de un proceso DSBs-dependiente para promover el apareamiento de los cromosomas, hay un mecanismo DSBs-independiente que ocurre ya en la etapa de interfase de las células. Este mecanismo promueve que los cromosomas homólogos ya estén cerca

en las espermatogonias y espermatocitos en pre-leptoteno con lo que la búsqueda del homólogo durante la profase meiótica parece estar preestablecida desde estadios previos (Boateng et al., 2013; Solé et al., 2022). En la transición entre leptoteno y cigoteno, los telómeros de los cromosomas se agrupan en una región delimitada en la envoltura nuclear formando el *bouquet* para facilitar el apareamiento de los cromosomas y pueda producirse la sinapsis entre los homólogos (Lee et al., 2015; Scherthan, 2007). Los telómeros producen un movimiento rápido de los cromosomas mediado por las proteínas SUN1 y KASH5, que unidas al citoesqueleto, transmiten las fuerzas generadas a la envoltura nuclear (Bass, 2003; H. Hao & Starr, 2019).

El SC tiene una estructura tripartita compuesta por dos elementos laterales paralelos (AE) y un elemento central (CE), unidos a su vez por filamentos transversales (TE). En mamíferos se han identificado hasta 8 proteínas distintas que forman el SC. Los elementos laterales recorren toda la longitud del cromosoma y están formados por las proteínas SYCP2 y SYCP3 (Offenberg et al. 1998). Los filamentos transversales son de SYCP1 (Meuwissen et al. 1992). SYCP1 y SYCP3 pueden autoensamblar, formando el SC en ausencia de otros componentes de este (Fraune et al., 2012). Entre los dos cromosomas homólogos se sitúan los elementos centrales, formados por SYCE1, SYCE2 y SYCE3, TEX12 y SIX6OS1 (Costa et al. 2005; Hamer et al. 2006; Schramm et al. 2011; Gómez-H et al. 2016). Gracias a la disposición de las proteínas que conforman el SC se puede clasificar los distintos estadios de la profase meiótica. Al inicio de la profase meiótica, en leptoteno, la cromatina empieza a condensar en forma de *loops* y estos se ensamblan en los ejes cromosómicos. Los ejes formados por SYCP2 y SYCP3 mantendrán las cromátidas hermanas unidas gracias a la participación de las cohesinas. Los complejos de cohesinas son estructuras proteicas en forma de anillo que unen las cromátidas hermanas. Las cohesinas son esenciales para el ensamblaje de los elementos laterales, la compactación de la cromatina, la formación y reparación de los DSBs y para que se produzca la recombinación meiótica (Fujiwara et al., 2020; Ishiguro, 2019; Kouznetsova et al., 2005; Page et al., 2006). Para iniciar la formación del SC, el extremo C-terminal de SYCP1 se asocia con los elementos laterales formando la estructura en forma de cremallera (Schücker et al., 2015). SYCE2, SYCE3 y TEX12 se unen a SYCP1, polimerizando y

creando el elemento central del SC (Bolcun-Filas et al., 2007; Costa & Cooke, 2007; Schramm et al., 2011). Gracias a la estabilización que se da entre las distintas proteínas que conforman el SC, la sinapsis se propaga por todo el eje cromosómico mediante la carga de SYCE2 y TEX12 (**Figura 1-5**) (Davies et al., 2012; Duncce et al., 2021).

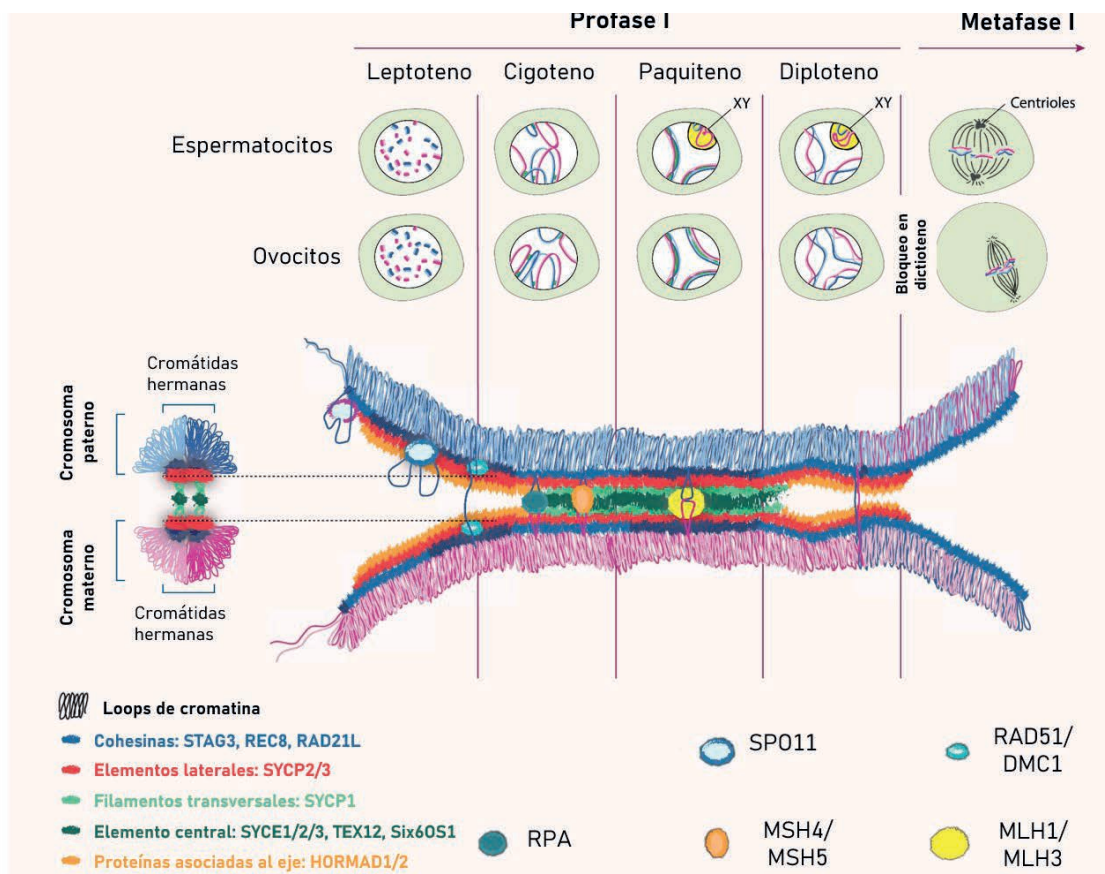


Figura 1-5. Estructura del complejo sinaptonémico durante la profase meiótica. Esquema que ilustra la dinámica de los cromosomas durante la primera profase meiótica y el dimorfismo sexual presente en el proceso (arriba) y la coordinación espaciotemporal de los ejes cromosómicos y el ensamblaje del SC (abajo). Durante leptoteno, cada cromosoma consiste en dos cromátidas hermanas conectadas gracias a las cohesinas. Se inicia la recombinación cuando SP011 produce los DSBs a la vez que los AE van depositando y elongando. En cigoteno, la sinapsis se inicia y se extiende por todo el AE. La sinapsis se facilita gracias a las proteínas RAD51 y DMC1 que se estructuran en los nódulos de recombinación. Además, en cigoteno se ensamblan los elementos de TE (SYCP1) y los elementos CE (SYCE1/2/3, TEX12, Six60S1) La deposición de los elementos TE y CE coincide con la depleción de las proteínas HORMAD. En paquiteno los cromosomas homólogos se mantienen completamente sinapsados a excepción de los cromosomas sexuales. En paquiteno también aparecen MLH1/MLH3 como marcadores de recombinación. En diploteno los cromosomas desinapsan, se mantienen unidos gracias a los quiasmas (COs) y HORMAD vuelve a cargar a los ejes desinapsados. Imagen adaptada de Bolcun-Filas and Handel (2018).

Otras proteínas que forman parte de los elementos laterales son las proteínas HORMAD1 y HORMAD2 (Wojtasz et al., 2009). Estas pertenecen a la familia de proteínas con dominio HORMA (Hop1, Rev7, Mad2) (Rosenberg & Corbett, 2015). Estas proteínas se cargan en los ejes cromosómicos en leptoteno. TRIP13 retira HORMAD1/2 de las regiones sinapsadas del SC a medida que los homólogos sinapsan. Por tanto, solo se localizan en las regiones asinapsadas (Roig et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). En macho se puede ver HORMAD1/2 en las regiones asinapsadas del par XY. Luego, en diploteno, estas proteínas vuelven a cargarse al eje cromosómico, una vez el SC se ha desensamblado. Esta carga tardía es dependiente de RNF212 (Fukuda et al., 2010; Qiao et al., 2018; Wojtasz et al., 2009). Las funciones de las proteínas HORMAD incluyen la participación en la formación del SC, la segregación cromosómica, participan en el *checkpoint* de sinapsis y promueven el IH-bias (Carofiglio et al., 2018; Daniel et al., 2011; Kogo et al., 2012; Wojtasz et al., 2012).

1.2.3 Desinapsis de los cromosomas homólogos

Finalmente, el desensamblaje del SC tiene que estar muy coordinado con la compleción de la recombinación. Después de que los COs se hayan formado, el SC se desensambla en diploteno para permitir la segregación cromosómica en anafase I. Fallos en la regulación de la desinapsis llevan a que la célula se bloquee en la transición a metafase, generando inestabilidad (Sun & Handel, 2008). El control es llevado a cabo sobre todo por quinasas reguladoras del ciclo celular. En ratón, la quinasa PLK1 y el complejo CDK1/Ciclina B, regulado por la chaperona HSPA2, controlan la desinapsis de los cromosomas homólogos (**Figura 1-6**).

PLK1 (Polo-like kinase 1) es una quinasa que en mitosis se asocia con los centrosomas, se encuentra enriquecida en los cinetocoros en prometafase y metafase, y se recluta al huso mitótico en anafase (Singh et al., 2021). También se encuentra en los ejes cromosómicos cuando los cromosomas empiezan a condensarse al final de la profase mitótica (Abe et al., 2011). En meiosis, PLK1 localiza en el SC en paquiteno y diploteno. PLK1 tiene como función desensamblar los elementos centrales del SC, posiblemente fosforilando SYCP1 y TEX12 (Jordan et al., 2012). Además, PLK1 media (directa o indirectamente) la fosforilación de la proteína de los elementos centrales SYCE1, de los elementos laterales SYCP2 y de

las proteínas HORMAD, eventos necesarios para desensamblar los elementos centrales del SC (Jordan et al., 2012).

La formación del complejo CDK1-Ciclina B también se requiere para desensamblar el SC, y su formación está regulada por HSPA2 (Dix et al., 1997). HSPA2 es una chaperona, proteína que favorece el plegamiento y ensamblaje de otras proteínas. HSPA2 se localiza en el SC, cuya función sería reclutar CDK1 para fosforilar los componentes del SC. SYCP1 tiene un dominio carboxi-terminal, potencial diana para la fosforilación de CDK1 (Zhu et al., 1997). Los mutantes de *Hspa2* son estériles y presentan apoptosis en los espermatoцитos en paquiteno tardío. La actividad quinasa de CDK1 no está presente en los testículos de los ratones mutantes de *Hspa2*, lo cual sugiere que el fallo en la desinapsis de los mutantes podría deberse a la pérdida de habilidad de CDK1 de fosforilar SYCP1. HSPA2 está regulada transcripcionalmente en paquiteno por *EIF4G3* y la mutación en este gen produce un fallo en la transcripción de *Hspa2*. Los mutantes de *Eif4g3*, igual que en los mutantes de *Hspa2*, no presentan actividad de CDK1, y también muestran defectos en la desinapsis (Sun et al., 2010).

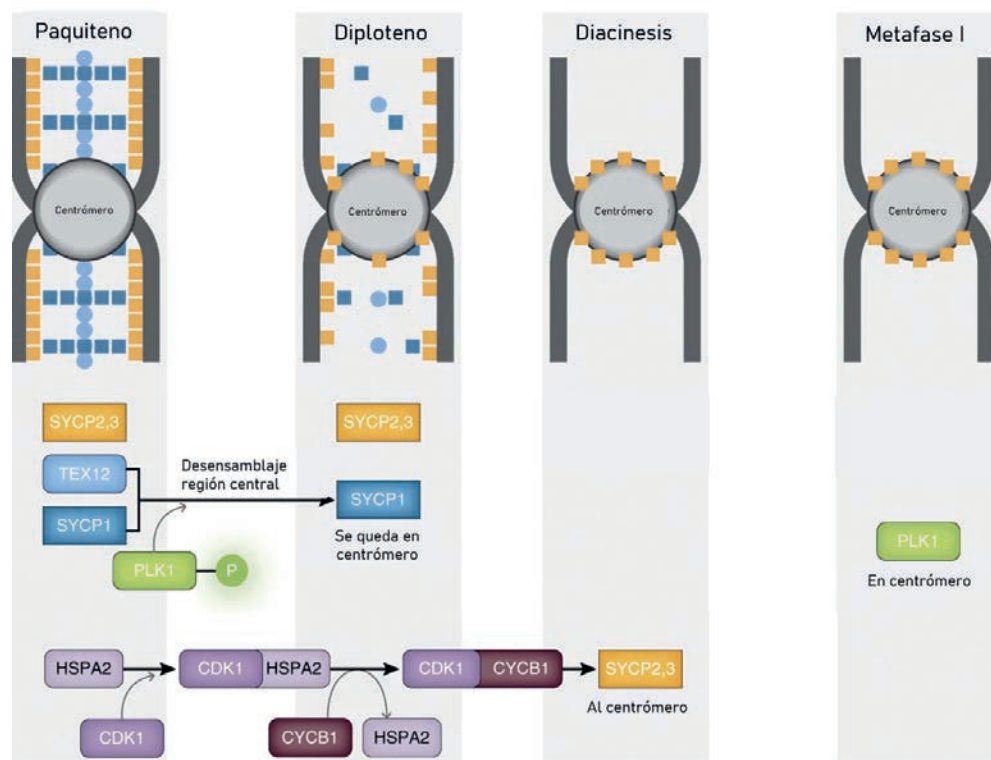


Figura 1-6. Desinapsis del complejo sinaptonémico en mamíferos. El desensamblaje del SC depende de PLK1 y del complejo CDK1-Ciclina B. PLK1 fosforila SYCP1 y TEX12 promoviendo su desensamblaje de la región central. HSPA2 regula la formación del complejo CDK1-Ciclina B necesario para desensamblar los distintos componentes del SC. Imagen adaptada de Cahoon and Hawley (2016)

1.3 Las funciones de Pch2/TRIP13

Pch2 (pachytene checkpoint 2 gene) es una proteína muy conservada evolutivamente que fue descubierta inicialmente en *S. cerevisiae* (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). Se encuentra además en otros organismos tales como *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans* y en mamíferos, donde se conoce como TRIP13. Pch2 pertenece a la familia de las AAA+ ATPasas, un grupo de hidrolasas que defosforilan ATP para aprovechar la energía liberada, y cambiar la conformación de sus proteínas diana (Puchades et al., 2020). Estas proteínas participan en múltiples procesos celulares incluyendo la degradación de proteínas, la regulación de la transcripción, la replicación del ADN y el plegamiento de proteínas (Snider et al., 2008). Por el momento, los sustratos de Pch2/TRIP13 que se conocen son estas proteínas con dominio HORMA y gracias a la interacción entre las proteínas se pueden explicar la mayor parte de las funciones de Pch2/TRIP13 durante la mitosis y la meiosis en los distintos organismos modelo, como participar en el *checkpoint*, controlar la actividad local de los DSBs, la formación de los COs y la regulación del eje cromosómico (Bhalla & Dernburg, 2005; Joyce & McKim, 2009; X. Li & Schimenti, 2007; Miao et al., 2013; Roig et al., 2010; Vader et al., 2011).

1.3.1 Proteínas con dominio HORMA

El rol de Pch2 es actuar sobre proteínas que tienen dominio HORMA (Hop1, Rev7 y Mad2) (Alfieri et al., 2018; Chen et al., 2014; Vader, 2015; Ye et al., 2017). Dentro de este grupo inicial de proteínas descubierto en levadura, más recientemente se han identificado y añadido a p31^{comet} (M. Yang et al., 2007) y Atg13/Atg101 (Suzuki et al., 2015) como miembros de la familia de proteínas con dominio HORMA. Estas proteínas, a pesar de tener funciones celulares muy distintas entre ellas, comparten rasgos característicos. Este dominio puede adoptar distintos estados topológicos (Rosenberg & Corbett, 2015). En lo que es considerado el estado activo de las proteínas que contienen dominio HORMA, el extremo C-terminal del dominio HORMA presenta la región *safety belt* que interactúa con el *closure motif* (CM) que presentan otras proteínas (Rosenberg & Corbett, 2015). Cuando se unen, se genera una interacción entre las proteínas HORMA y las proteínas que contienen el CM. El estado conformacional de las proteínas con dominio HORMA puede transicionar de “cerrado” a “abierto”, lo cual liberará la proteína que contiene el dominio CM

rompiendo la unión existente entre ambas proteínas. La actividad ATPasa de Pch2/TRIP13 promueve la disolución del complejo HORMA/proteína con CM, pasando del estado “cerrado” a “abierto”, y de esta manera la cascada de señalización que dependen de las proteínas HORMA se ve afectada (Rosenberg & Corbett, 2015).

1.3.2 Regulación del SAC

Pch2/TRIP13 se expresa en células somáticas y colocaliza con otros factores reguladores de la mitosis (Tipton et al., 2012). Durante la mitosis, Pch2/TRIP13 se localiza en los cinetocoros y allí interacciona con p31COMET para producir el silenciamiento del SAC (de *Spindle Assembly Checkpoint*). p31COMET permite a su vez la interacción de Pch2/TRIP13 con otras proteínas HORMA, como REV7 o MAD2 (**Figura 1-7**) (Alfieri et al., 2018; Clairmont et al., 2020; Nelson et al., 2015; Sarangi, Clairmont, & D’Andrea, 2020). El SAC es el mecanismo que detecta la correcta formación del huso mitótico y que todos los cromosomas están asociados a dicho huso de manera bipolar (Eytan et al., 2014; K. Wang et al., 2014). Estructuralmente p31COMET es muy similar a MAD2 (London & Biggins, 2014). Cuando hay cromosomas no alineados, MAD2 se convierte de la forma “abierto” e inactiva (O-MAD2) a la forma “cerrada” y activa (C-MAD2). C-MAD2 se une al CM de Cdc20 inhibiendo la formación del complejo APC/C, bloqueando así la transición entre metafase y anafase. Cuando los cromosomas se han orientado correctamente, p31COMET forma un complejo con C-MAD2, liberando Cdc20 y permitiendo la formación del complejo APC/C (M. Yang et al., 2007). Pch2/TRIP13 es la proteína que proporciona la energía para cambiar la conformación de MAD2 de “cerrado” a “abierto” (Eytan et al., 2014; K. Wang et al., 2014).

1.3.3 Regulación del complejo Shieldin

REV7 también es una proteína con dominio HORMA. Junto a SHLD1, SHLD2 y SHLD3 forma parte del complejo Shieldin, un factor regulador en la elección de la ruta de reparación de los DSBs. Shieldin inhibe la resección de los DSBs favoreciendo la reparación por NHEJ en lugar de HR. REV7 une SHLD2 y SHLD3 en el complejo (Gupta et al., 2018; Noordermeer et al., 2018; C. Yang et al., 2022). REV7 también adopta la forma “cerrada” (C-REV7) como activa y la “abierto” (O-REV7) como inactiva. C-REV7 interacciona con SHLD3 de manera parecida como

MAD2 interacciona con Cdc20 mediante el dominio *safety belt*. TRIP13 puede disociar C-REV7-SHLD3, desensamblando el complejo Shieldin (Clairmont et al., 2020; Sarangi, Clairmont, & D'Andrea, 2020). TRIP13 y su cofactor p31COMET producen el cambio conformacional de REV7 liberando a sus proteínas interactoras (**Figura 1-7**) (Sarangi, Clairmont, Galli, et al., 2020). De esta manera, se permitiría que el complejo Shieldin junto a REV7 pudiera desplazarse entre distintos complejos proteicos, y ser deplecionado de los lugares con DSBs una vez la reparación se haya completado. En estudios *in vitro*, TRIP13 potencia la resección de los DSBs de manera dependiente de REV7 (de Krijger et al., 2021). La localización de Shieldin en los DSBs se ha visto que depende de ATM (Boersma et al., 2015; Gupta et al., 2018), ya que inhibidores de ATM reducen drásticamente la presencia de SHLD2 y SHLD3 en los DSBs (de Krijger et al., 2021). En células con depleción de *Trip13* en cambio, hay mayor acumulación de SHLD2 y SHLD3 en los DSBs, indicando que TRIP13 afecta al reclutamiento y la estabilidad de Shieldin en los DSBs (de Krijger et al., 2021). Recientemente se ha descrito que REV7 interacciona con CHAMP1 la cual promueve la resección de los DSBs y la HR de manera independiente de TRIP13 (F. Li et al., 2022). Mientras que TRIP13 junto a p31COMET abren la conformación de REV7 liberándola del complejo con SHLD3, CHAMP1 se une directamente a REV7 y compite con la unión con SHLD3 (F. Li et al., 2022).

1.3.4 Regulación de las proteínas HORMAD1/2 en meiosis

Las proteínas HORMAD1/2 son proteínas con dominio HORMA altamente conservadas (**Figura 1-7**). En levadura se conoce como Hop1, en mamíferos y plantas HORMAD1 y HORMAD2, y en gusano hay hasta cuatro proteínas HORMAD (HIM-3, HTP1/2/3) (Caryl et al., 2000; Sato-Carlton et al., 2020; Wojtasz et al., 2009). Estas proteínas contienen un CM en su extremo C-terminal (Kim et al., 2014). Trabajos en *C. elegans* sugieren que hay una interacción directa entre HTP-3 y el complejo de cohesinas para el reclutamiento inicial a los ejes cromosómicos (Di Giacomo et al., 2005). En *S. cerevisiae* Hop1 requiere Red1 y REC8 para localizarse en los cromosomas (Panizza et al., 2011; Smith & Roeder, 1997; X. Sun et al., 2015). En plantas y mamíferos hay ortólogos de Red1 (ASY3/4 y SYCP2, respectivamente) que podrían hacer la misma función (Ferdous et al., 2012; Lai et al., 2011). En mamífero también se requiere el complejo de cohesinas para la carga inicial de

HORMAD1 a la cromatina (Fujiwara et al., 2020). Pch2/TRIP13 tienen la función de retirar las proteínas HORMAD de los ejes sinapsados (Roig et al., 2010; San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). En levadura, Hop1 interacciona directamente con Pch2 (C. Chen et al., 2014). En ratón, se comprobó que se requiere el extremo N-terminal para la interacción entre TRIP13 y HORMAD1 (Ye et al., 2017). Se utilizaron dos versiones truncadas del extremo N-terminal de HORMAD1 (Δ N5-HORMAD1-eGFP y Δ N20-HORMAD1-eGFP) y también 3xFLAG-HORMAD1. Se comparó con el constructo HORMAD1-eGFP para ver si había un defecto en la retirada de las proteínas de los cromosomas (Ye et al., 2017). Mientras que el constructo HORMAD1-eGFP se localizaba en los cromosomas de los espermatocitos en estadios tempranos, luego se retiraba cuando se producía la sinapsis. Las versiones truncadas de HORMAD1 no afectaron a la carga inicial de la proteína a los ejes, pero sí que causaron un defecto progresivo en la retirada de los ejes sinapsados (Ye et al., 2017).

1.3.5 Funciones de Pch2 en la meiosis de levadura

Pch2 (Pachytene checkpoint 2) se identificó en levadura como una proteína específica de meiosis, teniendo su pico máximo de expresión en paquiteno (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). Pch2 funciona como una proteína de *checkpoint* de paquiteno ya que es necesario para activar el bloqueo de la progresión de la profase en mutantes de *Zip1*, principal componente del elemento central de levadura (Sym et al., 1993). Mientras el mutante *Zip1* presenta un bloqueo meiótico, el doble mutante *pch2 zip1* en cambio tiene un nivel de esporulación comparable al wild-type. La función de Pch2 en este *checkpoint* es promover la fosforilación de Hop1-T318 dependiente de Mec1/Tel1, indispensable para la activación del *checkpoint* (Herruzo et al., 2016). También alivia el bloqueo en el mutante de *Zip2* y solo parcialmente el bloqueo del mutante *Dmc1*, por lo que se dedujo que Pch2 es necesaria para implementar el *checkpoint* de paquiteno en respuesta a problemas en la sinapsis (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). Esta función está conservada en *C. elegans*, la cual es necesaria para eliminar los ovocitos con sinapsis defectuosa (Bhalla & Dernburg, 2005).

En levaduras, la mayor parte de Pch2 se encuentra localizada en el nucleolo, y una pequeña parte formando foci colocalizando con *Zip1* en los cromosomas

sinapsados (Joshi et al., 2009; San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). La localización de Pch2 en el rADN del nucleolo, promovida por la interacción con Orc1, es necesaria para retirar Hop1 del rADN y así prevenir la recombinación meiótica en estas regiones (Vader et al., 2011). La localización de Pch2 en el nucleolo también es dependiente de Sir2, una proteína nucleolar necesaria para inhibir la recombinación en el rADN durante la mitosis y la meiosis (Fritze et al., 1997; San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). La producción de DSBs propicia la activación del *checkpoint* de recombinación que depende de Tel1^{ATM} y Mec1^{ATR} (Subramanian & Hochwagen, 2014). Pch2 vía Tel1^{ATM} promueve la fosforilación de Hop1 y su reclutamiento a los DSBs, promoviendo así el *interhomolog bias* y su función en el *checkpoint* (Ho & Burgess, 2011).

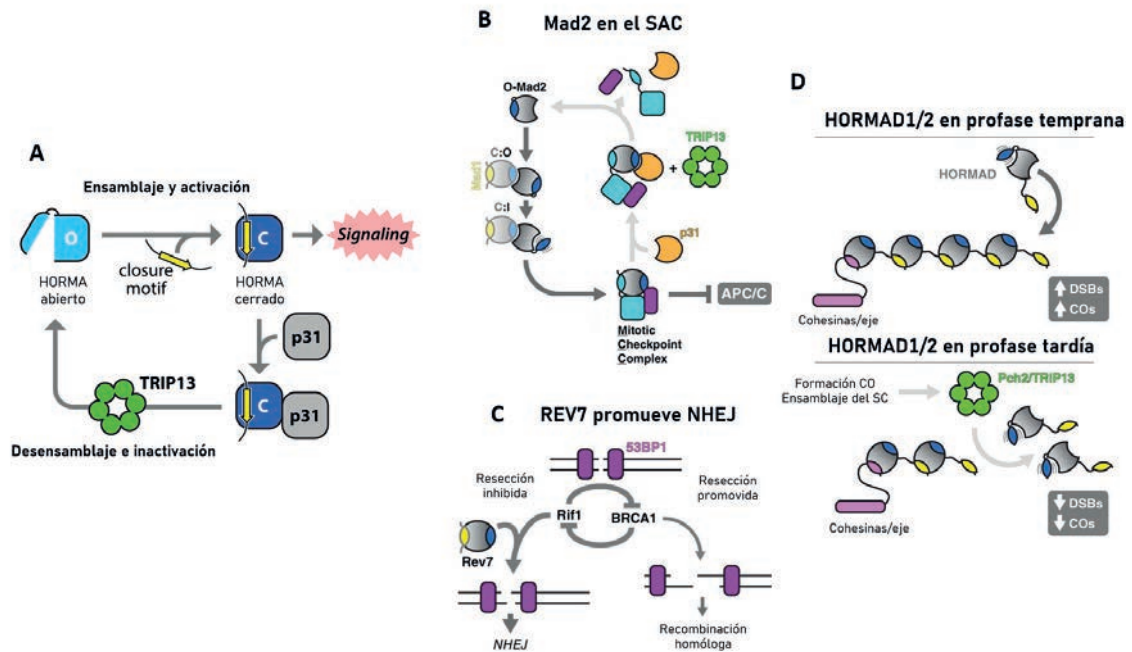


Figura 1-7. Funciones de las proteínas con dominio HORMA y su relación con Pch2/TRIP13.

A) Dibujo esquemático ilustrando como los cambios conformacionales del dominio *safety belt* permiten la unión de proteínas interactoras con dominio CM. En el estado "abierto", el *safety belt* ocupa el lugar de interacción de las proteínas interactoras. Mediante la energía que le proporciona Pch2/TRIP13 se cambia el estado de conformación de "abierto" a "cerrado" permitiendo la interacción con las proteínas que contienen el dominio CM. B) Mecanismo de activación del SAC en mamífero con la intervención de MAD2, p31comet, CDC20 junto a Pch2/TRIP13. C) REV7 promueve la NHEJ durante la reparación de los DSBs. Después de la asociación de 53BP1 con los DSBs, RIF1 y BRCA1 tienen un rol antagonista inhibiendo o promoviendo la resección del daño, respectivamente. REV7 promueve la reparación por NHEJ. D) Modelo de ensamblaje y desensamblaje de las proteínas HORMADs a los ejes cromosómicos durante la profase meiótica. Imagen adaptada de Rosenberg & Corbett, 2015.

1.3.6 Funciones de TRIP13 en la meiosis de mamíferos

En mamíferos, TRIP13 (Thyroid hormone receptor interacting protein 13) se expresa en todos los tejidos, pero su expresión es mayor en los testículos (Roig et al., 2010). TRIP13 es necesaria para completar la gametogénesis en machos y hembras (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Para el estudio de la función de TRIP13 en ratón, se usaron dos mutantes hipomórficos. Los dos mutantes de *Trip13* fueron generados a partir de líneas ESCs que contenían alelos mutados por la inserción de un *gene-trap* en el segundo (*Trip13^{CH0621}*) o tercer intrón (*Trip13^{RRB047}*) de la secuencia del gen (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Estas mutaciones permiten estudiar el defecto de TRIP13 con distinta penetrancia. Mientras que el *Trip13^{RRB047}* (o *Trip13^{mod}*) presenta menos expresión del gen que el alelo salvaje, el *Trip13^{CH0621}* (o *Trip13^{sev}*) consigue reducir casi por completo la expresión del gen (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Ambas mutaciones en homocigosis confieren esterilidad y los machos presentan testículos de menor tamaño. Los espermatoцитos del mutante *Trip13^{mod/mod}* no pueden completar la recombinación, presentan una reducción en la formación de CO e interferencia alterada (Roig et al., 2010). La mayoría de los espermatoцитos del mutante moderado consiguen completar la sinapsis a pesar de presentar acumulación de DSBs sin reparar. Hay una población de espermatoцитos, llamados *escapers*, los cuales posiblemente expresan más TRIP13, y consiguen progresar hasta el estadio de espermátidas redondas (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Debido a la acumulación de DSBs sin reparar, se activa el *checkpoint* de recombinación y los espermatoцитos mutantes de *Trip13* mueren antes de incorporar H1T (en paquiteno temprano) (Pacheco et al., 2015; Marcet-Ortega et al., 2017).

Los espermatoцитos del mutante severo (*Trip13^{sev/sev}*) no son capaces de sinapsar completamente los cromosomas homólogos y no progresan más allá de un estadio entre cigoteno y paquiteno temprano (Roig et al., 2010). En paquiteno, las regiones asinapsadas de los cromosomas X e Y son transcripcionalmente reprimidas gracias a la formación de la vesícula sexual (Burgoyne et al., 2009). TRIP13 también es necesaria para la formación de una vesícula sexual funcional (Pacheco et al., 2015; Marcet-Ortega et al., 2017). En los espermatoцитos en paquiteno de los mutantes moderados hay una carga deficiente de ATR en la cromatina de los cromosomas

sexuales. Este defecto produce una fosforilación ineficiente de H2AX y una menor incorporación de SUMO-1 a la cromatina de la vesícula sexual, resultando en un silenciamiento de los cromosomas sexuales (MSCI de las siglas en inglés) deficiente, lo que termina produciendo la muerte celular (Burgoyne et al., 2009). Ambos mutantes de *Trip13* presentan HORMAD1 y HORMAD2 en los ejes sinapsados de los espermatoцитos en paquiteno (Roig et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). En los cromosomas sexuales de los espermatoцитos WT, HORMAD1 y HORMAD2 se acumulan en las regiones asinapsadas para propiciar su silenciamiento. En los mutantes de *Trip13*, la localización permanente de HORMAD1/2 en los bivalentes de los autosomas puede limitar la señalización de las regiones asinapsadas de los cromosomas sexuales, impidiendo su silenciamiento (Pacheco et al., 2015; Roig et al., 2010).

En hembras, la ovogénesis también se encuentra afectada en ambas mutantes de *Trip13*. De nuevo, el fenotipo de los ratones severos es más marcado que el de los moderados. Mientras que las hembras mutantes de *Trip13^{mod/mod}* a los 21 dpp presentan algunos folículos, las hembras mutantes *Trip13^{sev/sev}* no presentan folículos en absoluto. Estos resultados indican que TRIP13 es necesaria para completar la recombinación en ovocitos (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010).

1.4 Elección de la ruta de reparación de los DSBs en células somáticas

Las células eucariotas tienen dos maneras principales de reparar los DSBs: mediante recombinación homóloga (HR) o mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ de non-homologous end joining). (Chang et al., 2017; Le Guen et al., 2015). La decisión de qué ruta escoger es vital para mantener la estabilidad genómica y está controlado durante las distintas fases del ciclo celular (McMullen et al., 2020). La NHEJ es una vía activa durante todo el ciclo celular, mientras que la HR se restringe a las fases S y G2, ya que se utiliza la cromátida hermana como molde para la reparación (**Figura 1-8**). Una característica que define qué ruta se va a escoger para reparar la rotura es la resección de ese daño. La recombinación homóloga depende de que haya habido una resección de los DSBs, mientras que la NHEJ se beneficia de que haya menos resección (Heyer et al., 2010; Symington &

Gautier, 2011). En la ruta de NHEJ canónica, una vez se han producido los DSBs los extremos son reconocidos por el complejo Ku70/Ku80, lo que recluta a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs).

Finalmente se promueve la ligación directa de los extremos de las roturas mediante XRCC4, LIG4 y XLF (Le Guen et al., 2015). Es una vía de reparación que puede inducir a errores tales como inserciones, deleciones, sustituciones y otras reparaciones anómalas (Chang et al., 2017).

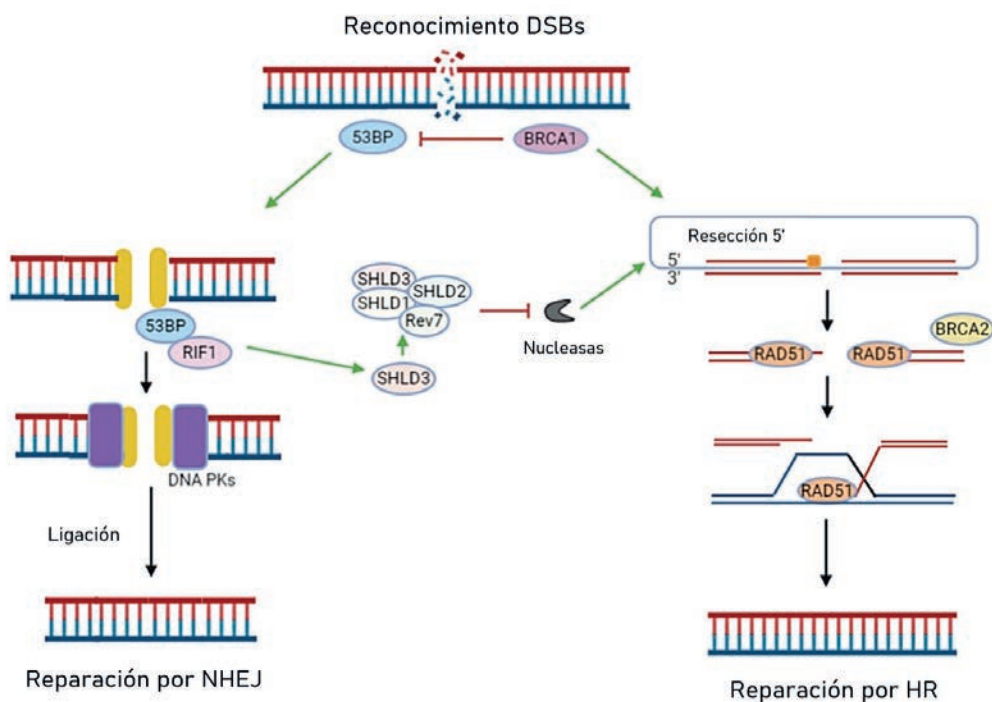


Figura 1-8. La reparación de los DSBs puede hacerse mediante NHEJ o HR. En ausencia de la función de BRCA1, los DSBs pueden ser reparados mediante NHEJ. 53BP1 normalmente promueve la reparación de los DSBs mediante NHEJ, formando un complejo con RIF1 que protege a los extremos de los DSBs de ser resecionados por las endonucleasas. Si se inhibe 53BP1, no se recluta el complejo Shieldin a los DSBs, permitiendo la resección del extremo 5' y la reparación mediante HR. Imagen modificada de McMullen et al., 2020.

53BP1 es una proteína que protege los DSBs de ser resecionados, favoreciendo así su reparación por NHEJ (Panier & Boulton, 2014). 53BP1 coopera con RIF1 para bloquear la resección de los DSBs en G1. 53BP1 se acumula en los DSBs durante las fases G1, fase S y fase G2, pero cuando la célula entra en fase S, BRCA1 retira a 53BP1 de los DSBs para promover su reparación mediante HR, por lo que existe una relación antagónica entre ambas proteínas (Bunting et al., 2010; Chapman

et al., 2012). También hay evidencias que BRCA1 antagoniza la acumulación de RIF1 en los DSBs (Chapman et al., 2013). En mutantes de BRCA1, 53BP1 no es retirada de los DSBs y por lo tanto se protegen de ser reseccionados, y en ausencia de la resección, al persistir el daño, se repara mediante NHEJ (Bunting et al., 2010). En células somáticas, TRIP13 promueve la reparación de los DSBs por HR mediante la disociación del complejo Shieldin inactivando REV7. El complejo Shieldin es un complejo formado por las proteínas SHLD1, SHLD2 y SHLD3, además de por REV7/MAD2L2 (Noordermeer et al., 2018; C. Yang et al., 2022). En el complejo Shieldin, REV7 interactúa con SHLD3, que a su vez interacciona con RIF1. REV7 también está unido SHLD2. La porción del complejo que se une al ssADN es el extremo C-terminal de SHLD2, que presenta 3 dominios *Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding (OB) Fold*. Estos dominios OB tienen gran afinidad por los ssADN (Gao et al., 2018).

Hay dos hipótesis para explicar la actuación del complejo Shieldin en los fragmentos de ssADN. La primera predice que la función de Shieldin es promover la síntesis de ADN mediada por la ADN polimerasa α (Pol α) en los extremos reseccionados (Mirman et al., 2018). Durante la replicación de los telómeros, los extremos de éstos son reseccionados por EXO1, que genera unos extremos 3' muy largos. El complejo CST interacciona con la Pol α para sintetizar ADN en esos extremos (Mirman et al., 2018). Se ha comprobado que el complejo CST también es reclutado a los DSBs por medio de 53BP1 y Shieldin (Barazas et al., 2018). CST-Pol α estaría involucrado en la supresión de la HR mediante la vía de 53BP1-Shieldin. Cuando se producen los DSBs, el complejo MRN procesa las roturas. Se produce la fosforilación de H2AX por ATM, seguido del reclutamiento de MDC1, y la activación de RNF8-RNF168, que ubiquitinizan la cromatina alrededor de la rotura. Esto recluta a 53BP1. 53BP1 recluta su vez a RIF1, que atrae el complejo Shieldin a los DSBs (**Figura 1-9**) (Gupta et al., 2018). Los dominios OB de SHLD2 se unen a los fragmentos de cadena simple para inhibir la resección de EXO1 y de esta manera los extremos no siguen siendo reseccionados. Shieldin recluta al complejo CST-Pol α , que sintetiza nuevo ADN que será reparado finalmente mediante NHEJ con la acción de la Ligasa IV y XRCC4.

La segunda hipótesis incluye el bloqueo de la acción de las nucleasas que producen la resección. Después de que el complejo MRN haya procesado los DSBs y se han

generado los primeros fragmentos de cadena simple más cortos, en ese momento se podría proceder a una competición con RPA o un bloqueo de las nucleasas EXO1 y DNA2/BLM (C. Yang et al., 2022) y así poder ser reparado mediante NHEJ.

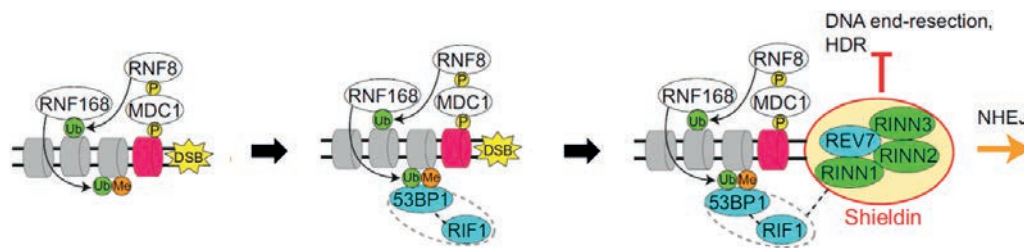


Figura 1-9. Mecanismo de acción de 53BP1-RIF1-Shieldin en la reparación de los DSBs. Esquema que representa el reclutamiento de 53BP1 y RIF1 a los DSBs mediado por RN8-RNF168. El complejo Shieldin reclutado por RIF1 a los DSBs inhibe la resección y promueve la reparación por NHEJ. Imagen modificada de Gupta et al 2018.

2. Objetivos

TRIP13, también conocida como Pch2 en especies de no vertebrados, es una AAA+ ATPasa que cumple distintas funciones durante la profase meiótica: promover la recombinación meiótica, controlar la composición del eje cromosómico o mediar en la sinapsis de los cromosomas homólogos. Sin embargo, poco se sabe acerca de la localización de TRIP13 durante la profase meiótica y las proteínas con las que interactúa TRIP13 para llevar a cabo sus funciones. En este estudio hemos analizado en más detalle algunas de las funciones de TRIP13 como son la reparación de los DSBs, el rol de TRIP13 en los telómeros y su implicación en la sinapsis de los cromosomas homólogos. Para ello, se han creado los mutantes murinos *Trip13*^{-/-} y *Trip13*^{ATPasaDead} y también se ha puesto a punto un tratamiento farmacológico *in vivo* e *in vitro* para inhibir la función de TRIP13 y evaluar los efectos de la inhibición durante la profase meiótica.

Los objetivos concretos que se plantearon en este trabajo fueron los siguientes:

1. Analizar el rol de TRIP13 en la elección de la vía de reparación de los DSBs

- Se examinará como se lleva a cabo la reparación de los DSBs en los distintos mutantes de *Trip13*.
- Se analizará la presencia de factores de HR y NHEJ en espermatoцитos.

2. Estudiar la función de TRIP13 en los telómeros

- Se analizará si TRIP13 protege a los telómeros de la formación de DSBs.
- Se estudiará en detalle la presencia de marcadores de HR y NHEJ en los telómeros.

3. Examinar la implicación de TRIP13 en la sinapsis de los cromosomas homólogos

- Se detallarán los defectos de sinapsis presentes en los distintos mutantes de *Trip13*.
- Se estudiarán las funciones de las proteínas interactoras de TRIP13 y su implicación en la sinapsis.

3. Materiales y métodos



3.1 Material biológico

3.1.1 Animales y alelos usados

Los modelos murinos que fueron usados en el trabajo son *Chk2^{-/-}*, *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}*, *Dmc1^{-/-}* y *Spo11^{-/-}* fueron generados y descritos anteriormente (Baudat et al., 2000; Hirao et al., 2002; Pittman et al., 1998; Roig et al., 2010). El modelo murino *Trip13^{-/-}* se obtuvo en colaboración con el laboratorio de Dr. Marcos Malumbres (CNIO) y se fundó la nueva colonia en el estabulario de la UAB. Las líneas murinas han sido mantenidas en un *background* genético mixto C57BL/6-129/Sv.

Para la obtención de ratones de los alelos *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{-/-}*, *Dmc1^{-/-}*, *Dmc1^{-/-}* *Trip13^{m/m}*, *Dmc1^{-/-}* *Chk2^{-/-}*, *Dmc1^{-/-}* *Chk2^{-/-}* *Trip13^{m/m}*, *Spo11^{-/-}* y *Spo11^{-/-}* *Trip13^{m/m}* se cruzaron ratones heterocigotos para los alelos debido a la esterilidad de los animales con el alelo mutante en homocigosis.

Se generó el mutante murino *Trip13^{ATPasaDead}* mediante la técnica CRISPR/Cas9 en colaboración con el laboratorio del Dr. Alberto Pendás (CIC-CSIC, Salamanca) pero no se pudo fundar la colonia debido a la esterilidad de los animales fundadores, de los que se obtuvo material biológico para analizar. Como animales controles en los análisis del mutante *Trip13^{ATPasaDead}* se usaron ratones B6.CBA.

Se hizo un tratamiento con el inhibidor de TRIP13 DCZ0415 (MedChemExpress) (Wang et al., 2020). El fármaco fue disuelto en 10% DMSO/40% PEG300/ 5% Tween-80/solución salina 45% y administrado vía intraperitoneal a tres ratones adultos WT de la colonia *Trip13^{-/-}* con una dosis diaria de 25 mg/kg y tres adultos con dosis de 50 mg/kg durante 7 días. A tres ratones adultos se les administró el mismo volumen de vehículo sin el fármaco (grupo control). Los 9 animales fueron sacrificados el último día del tratamiento.

Las muestras biológicas de los mutantes *53bp1^{-/-}* y *Hormad1^{3HA/3HA}* y sus controles se obtuvieron mediante colaboración con el laboratorio de la Dra. Maria Jasin (MSKCC, EE.UU) y del Dr. Attila Toth (TU Dresden) respectivamente.

En el texto se referirá a individuos *Trip13^{+/+}*, *Hormad1^{+/+}* y los animales usados como control de los distintos experimentos como WT para ser comparados con sus alelos mutantes. Todos los experimentos realizados se han hecho con al menos dos ratones (a menos que se mencione lo contrario en el texto) y se ha comparado con animales control de la misma camada, o de la misma edad (de 2 a 4 meses).

Todos los ratones utilizados para realizar experimentos y que estaban estabulados en nuestras instalaciones fueron sacrificados usando CO₂ o decapitación como métodos de eutanasia aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autònoma de Barcelona y el Govern de Catalunya.

3.2 Técnicas de biología molecular

3.2.1 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se utilizó para genotipar de los animales obtenidos. Se utilizó un fragmento de la cola del animal estabulado para extraer el ADN.

Protocolo:

- Colocar un fragmento de la cola del animal de 0,5 cm en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Añadir 490 µl de tampón de lisis (0,1 M Tris-HCl pH= 8.5-9, 0,2 M NaCl, 0,2% SDS y 5 mM EDTA) y 0,4 µg/µl de Proteinasa K (20 mg/ml stock, Roche Diagnostics).
- Incubar a 56°C ON.
- Centrifugar el tubo durante 15 minutos a 13200 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo con 500 µl de isopropanol. Agitar hasta que el ADN haya precipitado.
- Centrifugar los tubos 3 minutos a 13200 rpm y descartar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de etanol 70° a -20°C al pellet y agitar para lavarlo.
- Centrifugar los tubos 3 minutos a 13200 rpm y descartar el sobrenadante. Dejar secar los tubos a temperatura ambiente.
- Disolver el pellet en 100 µl de agua Milli-Q y poner los tubos a incubar 10 minutos a 60°C.
- Almacenar el ADN extraído a -20°C hasta su uso.

3.2.2 Genotipado

Para genotipar los ratones, se utilizó el ADN extraído y se amplificó mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Los *primers* y las reacciones de amplificación usadas se diseñaron previamente para cada gen con el fin de

distinguir los alelos salvajes y mutantes basado en los productos amplificados (ver Tablas 3-1 a 3-5).

Tabla 3-1. Primers usados en el genotipado del gen *Spo11*

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Producto amplificado</i>
SP16R	5' - TGTTAAAAACATAGGTTTGTAAAGTT - 3'	+/-	
Forward SP1F	5' - CTACCTAGATTCTGGTCTAAGC - 3'	+	1024
PRSF2	5' - CTGAGCCCAGAAAGCGAAGGAA - 3'	-	600

Tabla 3-2. Primers usados en el genotipado del gen de *Dmc1*

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Producto amplificado</i>
Dmc1WTF	5' - AAAGGGACTGCTGAGGCAT - 3'	+/-	
Dmc1WTR	5' - CCGGCCAGATTACATTTCTT - 3'	+	233
Dmc1Mut	5' - GCCAGAGGCCACTTGTGTAG - 3'	-	147

Tabla 3-3. Primers usados en el genotipado del gen de *Trip13 moderado*

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Producto amplificado</i>
RRB047 R	5' - ACCCACCTTTGACCATTTAGTTT - 3'	+/mod	
RRB047 WTF	5' - GGGAGGGAGGCCTGGCAGAG - 3'	+	387
RRB047 MUTF	5' - CCACGCTCACCGGCTCCAGA - 3'	mod	855

Tabla 3-4. Primers usados en el genotipado del gen de *Chk2*

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Producto amplificado</i>
WT1F	5' - GTGTGCGCCACCACTATCCTG - 3'	+/-	
WT2R	5' - CCCTTGGCCATGTTTCATCTG - 3'	+	450
NeoMutR	5' - TCCTCGTGCTTTACGGTATC - 3'	-	625

Tabla 3-5. Primers usados en el genotipado del gen de *Trip13*^{-/-}

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Producto amplificado</i>
Trip13 Fw 13bp	5' – GGCTGCTCAACCGGCATAA – 3'	+	360
Trip13 Rv 13bp	5' – AAAGGGACTGCTGAGGCAT – 3'	-	347

Protocolo con Canvax mix Horse-Power Taq DNA Polimerasa recombinant:

- Añadir 1 µl de ADN genómico o 1 µl de agua Milli-Q para el control negativo en un tubo de PCR de 200 µl.
- Preparar la mastermix de PCR (Canvax) (**Tabla 3-6**).

Tabla 3-6. Componentes de reacción de la Master Mix de PCR (Canvax)

PCR Mix	Volumen (para 20 µl de reacción)
Tampón 10X PCR	2 µl
25 mM MgCl ₂	1,36 µl
dNTPs 8 mM	2 µl
<i>Primers</i> 10 µM	1 µl
Horse-Power-Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,4 µl
Agua milli-Q	Añadir hasta los 20 µl

Protocolo con NZYtaq II 2× Green Master Mix:

- Añadir 1 µl de ADN genómico o 1 µl de agua Milli-Q para el control negativo en un tubo de PCR de 200 µl.
- Preparar la PCR mix con los reactivos (**Tabla 3-7**).

Tabla 3-7. Componentes de reacción de la Master Mix de PCR (NZYtaq)

PCR Mix reaction PCR Mix	Volumen (para 20 µl de reacción)
NZYtaq II 2× Green Master Mix	10 µl
<i>Primers</i> 10 µM	0,5 µl
Agua milli-Q	Añadir hasta los 20 µl

- Añadir 19 µl de Master Mix a cada tubo de PCR.

— Colocar los tubos de PCR en el termociclador y llevar a cabo el programa específico para amplificar el gen deseado (ver Tablas 3-8 a 3-12).

Tabla 3-8. Programa de PCR usado para genotipar el gen *Spo11*

Proceso	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	2 minutos
Desnaturalización	94	20 segundos
Hibridación	61	30 segundos
Polimerización	72	35 segundos
Polimerización final	72	3 minutos

} 34X

Tabla 3-9. Programa de PCR usado para genotipar el gen *Dmc1*

Proceso	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	3 minutos
Desnaturalización	94	20 segundos
Hibridación	60	30 segundos
Polimerización	72	20 segundos
Polimerización final	72	7 minutos

} 33X

Tabla 3-10. Programa de PCR usado para genotipar el alelo *Trip13 moderado*

Proceso	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	3 minutos
Desnaturalización	94	45 segundos
Hibridación	61	60 segundos
Polimerización	72	2 minutos
Polimerización final	72	5 minutos

} 34X

Tabla 3-11. Programa de PCR usado para genotipar el gen *Chk2*

Proceso	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	3 minutos
Desnaturalización	95	45 segundos
Hibridación	60	45 segundos
Polimerización	72	5 segundos
Polimerización final	72	7 minutos

} 35X

Tabla 3-12. Programa de PCR usado para genotipar el alelo *Trip13*^{-/-}

Proceso	°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	3 minutos
Desnaturalización	94	45 segundos
Hibridación	61	60 segundos
Polimerización	72	2 segundos
Polimerización final	72	5 minutos

} 34X

- Correr los productos amplificados en un gel de 1% de agarosa con 8,5 µl de SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific). En el caso de los productos amplificados del alelo *Trip13*^{-/-} correr en un gel de 4% de agarosa por la cercanía entre las bandas producto.
- Leer el gel con el GelDoc XR+ (Bio-Rad) y determinar el tamaño de las bandas amplificadas.

3.2.3 Clonación de genes

3.2.3.1 Extracción de ARN

Para analizar la expresión de los genes deseados, se hizo la extracción y purificación de ARN de testículo usando el kit de RNeasy Plus mini (Qiagen).

Protocolo:

- Cortar un trozo de testículo congelado, un cuarto de un testículo de ratón adulto WT, o un testículo entero en caso de que fuera de un ratón mutante.
- Disgregar el tejido mecánicamente con un émbolo de plástico en un tubo de 1,5 ml.
- Añadir 350 µl de tampón RLT y 10 µl de β-mercaptoetanol y homogeneizar el lisado.
- Centrifugar el lisado 3 minutos a 13200 rpm.
- Transferir el sobrenadante a una columna gDNA Eliminator en un tubo colector de 2ml.
- Centrifugar 1 minuto 13200 rpm. Descartar la columna y guardar el eluido.
- Añadir 350 µl de etanol 70° al eluido y homogeneizar.
- Transferir 350 µl de la mezcla a una columna RNeasy en un tubo colector de 2 ml.
- Centrifugar 1 minuto a 13200 rpm. Descartar el eluido.

- Añadir 700 µl de tampón RW1 a la columna RNeasy, centrifugar 1 minuto a 13200 rpm y descartar el eluido.
- Añadir 500 µl de tampón RPE a la columna RNeasy, centrifugar 2 minutos a 13200 rpm y descartar el eluido.
- Poner la columna RNeasy en un nuevo tubo de 1,5 ml, añadir 30-50 µl de agua RNAsa-free a la columna.
- Centrifugar 1 minuto a 13200 rpm para eluir el ARN en el agua.
- Cuantificar el ARN en el Nanodrop (Thermo Scientific) para saber la concentración.

3.2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

El ARN purificado con el protocolo anterior se transcribió a ADNc mediante el Kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad). Posteriormente se realizó la amplificación del ADNc mediante PCR.

Protocolo de Retrotranscripción (RT):

- Añadir 2 µg de ARN a los componentes de la reacción (**Tabla 3-13**) en un tubo de PCR de 200 µl.

Tabla 3-13. Componentes de la Master Mix de la RT

Componentes	Volumen (para 20 µl de reacción)
5X Mix	4 µl
Transcriptasa inversa	1 µl
ARN	2 µg
Agua milli-Q (libre de nucleasas)	Añadir hasta los 20 µl

- Incubar la mezcla a 42°C durante 30 minutos.
- Inactivar la Transcriptasa inversa a 85°C durante 5 minutos.
- Almacenar el ADNc a -20°C hasta su uso.
- El ADNc obtenido se amplificó con los primers (**Tabla 3-14**) usando la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) (**Tabla 3-15**). El programa de PCR usado (**Tabla 3-16**). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 3-14. Primers usados en la PCR de alta fidelidad

Primer	Secuencia
RT_ATPase_Fw	5' – GTACCGGTATGGCCAGTTG – 3'
RT_ATPase_Rv	5' – CTTTAAATCTGGTCAATCTGAGTCAACAC – 3'

Tabla 3-15. Componentes de la Master Mix de la PCR de alta fidelidad

Componentes	Volumen (para 60 µl de reacción)
5X Tampón HF	10 µl
dNTPs 8 mM	1,25 µl
DMSO	1,5 µl
Primers 10 µM	2 µl
Phusion DNA Polymerase 2U/µl	0,4 µl
ADNc	2 µl
Agua milli-Q (libre de nucleasas)	Añadir hasta los 20 µl

Tabla 3-16. Programa de PCR de alta fidelidad

Proceso	°C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	98	1 minuto	} 35X
Desnaturalización	98	15 segundos	
Hibridación	61	20 segundos	
Polimerización	72	1 minuto	
Polimerización final	72	5 minutos	

3.2.3.3 Purificación de ADN

El ADN amplificado se purificó utilizando el kit NucleoSpin Gel & PCR CleanUp (Macherey-Nagel). Se utilizaron porciones de gel de agarosa que contenían el fragmento de ADN deseado.

Protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Añadir 200 µl de Tampón NTI por cada 100 mg de gel de agarosa, incubar durante 10 minutos a 50°C y mezclar en un *vórtex* hasta que el gel se haya disuelto completamente.
- Colocar una columna del kit en un tubo colector y cargar la muestra.

- Centrifugar durante 30 segundos a 11000g. Descartar el *flow-through* y colocar la columna en un tubo colector nuevo.
- Añadir 700 µl de Tampón NT3 a la columna.
- Centrifugar durante 30 segundos a 11000g.
- Descartar el *flow-through* y colocar la columna en un tubo colector nuevo.
- Incubar la columna durante 5 minutos a 70°C para evaporar el etanol residual del Tampón NT3.
- Colocar la columna en un tubo Eppendorf, añadir 20 µl de Tampón NE e incubar durante 1 minuto a RT.
- Centrifugar durante 1 minuto a 11000g.
- Conservar el ADN a -20°C hasta su uso.

3.2.3.4 Digestión con enzima de restricción y fosforilación de insertos

Se llevó a cabo la digestión de los vectores pEGFP-C1 con FastDigest SmaI (ThermoFisher Scientific) para crear extremos romos y poder clonar los alelos deseados.

Protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Preparar la mezcla de la reacción (**Tabla 3-17**).
- Mezclar e incubar a 37°C durante 10 minutos.
- Parar la reacción a 65°C durante 15 minutos.

Tabla 3-17. Componentes para la digestión con SmaI

Componentes	Volumen (para 50 µl de reacción)
10x Fast Digest buffer	5 µl
Enzima Fast Digest SmaI	5 µl
ADN plasmídico	5 µl
Agua milli-Q (libre de nucleasas)	Añadir hasta los 50 µl

Los productos de PCR se fosforilaron con la Polinucleótido quinasa T4 (Thermo Fisher Scientific) antes de ser insertados en los vectores siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Preparar la mezcla de la reacción (**Tabla 3-18**):

Tabla 3-18. Componentes para la fosforilación del ADN a insertar

Componentes	Volumen (para 50 µl de reacción)
10x Tampón A	1X
ATP 10 mM	1 mM
ADN amplificado	Variable
Polinucleótido quinasa T4	1 µl
Agua Milli-Q	Añadir hasta los 50 µl

- Incubar a 37°C durante 20 minutos.
- Calentar e incubar a 75°C durante 10 minutos.

3.2.3.5 Ligación de ADN

Los insertos de ADN fueron ligados con los vectores pEGFP-C1 utilizando el Kit de Rapid DNA Ligation (Thermo Fisher Scientific). El ratio molar de inserto:vector fue de 3:1.

Protocolo:

- Preparar la reacción de ligación (**Tabla 3-19**).

Tabla 3-19. Componentes de la reacción de ligación del inserto con el plásmido

Componentes	Volumen (para 20 µl de reacción)
5x Tampón de ligación	4 µl
ADN del vector	1 µl
ADN del inserto	Variable
T4 ADN ligasa 5U/µl	1 µl
Agua milli-Q (libre de nucleasas)	Añadir hasta los 20 µl

- Incubar la mezcla durante 15-20 minutos a 22°C.
- Proceder a la transformación.

3.2.3.6 Transformación de *E. coli* y selección de colonias

La propagación del plásmido obtenido como producto de la ligación se hizo en células competentes de *E. coli* DH5α (New England Biolabs).

Protocolo:

- Descongelar 100 μ l de células NEB.
- Añadir 4 μ l de la reacción de ligación y mezclar las células con la mix sin vortexar.
- Incubar la mezcla en hielo durante 30 minutos sin mezclar.
- Realizar un choque térmico a 42°C durante 30-45 segundos sin mezclar.
- Añadir 1 ml de medio LB a la mezcla.
- Incubar a 37°C mezclando a 220 rpm durante 3h.
- Centrifugar la mezcla a 13200 rpm durante 30s.
- Retirar la mayoría del sobrenadante y quedarse con 50 μ l de la mezcla.
- Resuspender el pellet y esparcir las células en placas con medio LB con 50 μ g/ml kanamicina e incubar ON a 37°C.

Para identificar las colonias transformadas que contienen el inserto de ADN, se seleccionaron las colonias y se analizó el inserto mediante PCR.

Protocolo:

- Recoger 16-20 colonias de cada placa e incubar cada una en 1 ml de medio LB con 50 μ g/ml kanamicina a 37°C durante 16h.
- Utilizar 1 μ l de cada colonia incubada como molde de ADN para la reacción de PCR (**Tabla 3-20**). Los primers usados (**Tabla 3-21**) y el programa de PCR usado (**Tabla 3-22**). Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 3-20. Componentes de reacción de PCR para verificar las colonias de *E. coli*

Componentes	Volumen (para 20 μ l de reacción)
10x Tampón de PCR	2 μ l
dNTPs 8 mM	2 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1,36 μ l
Primers 10 μ M	1 μ l
ADN polimerasa 5U/ μ l	0,3 μ l
Colonias	1 μ l
Agua milli-Q	hasta 20 μ l

Tabla 3-21. Primers usados para verificar colonias de *E. coli*

Primer	Secuencia
C1_Forward	5' – CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG – 3'
C1_Reverse	5' – AACCTCTACAAATGTGGTATGGCTG – 3'

Tabla 3-22. Programa de PCR para verificar colonias de *E. coli*

Proceso	°C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	5 minuto	
Desnaturalización	94	30 segundos	} 35X
Hibridación	62	30 segundos	
Polimerización	72	30 segundos	
Polimerización final	72	5 minutos	

3.2.3.7 Extracción del plásmido

A partir de las muestras que presentaban el inserto deseado, se aisló el plásmido utilizando el protocolo de Miniprep de NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) y se secuenció mediante la técnica de secuenciación de Sanger.

Protocolo de Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Centrifugar 1 ml del cultivo de *E. coli* durante 30s a 11000g a RT.
- Descartar el sobrenadante y retirar todo el líquido restante.
- Añadir 250 µl del Tampón A1. Resuspender el pellet.
- Añadir 250 µl del Tampón A2. Mezclar invirtiendo el tubo de 6-8 veces.
- Incubar a RT hasta 5 minutos.
- Añadir 300 µl del Tampón A3. Mezclar invirtiendo el tubo de 6-8 veces hasta que el color azul de la mezcla desaparezca.
- Centrifugar durante 5 minutos a 11000g a RT.
- Colocar una columna NucleoSpin Plasmid en un tubo colector de 2 ml y pipetear un máximo de 700 µl del sobrenadante a la columna.
- Centrifugar durante 1 minuto a 11000g.
- Descartar el *flow-through* y colocar la columna en otro tubo colector. Repetir con el volumen del lisado restante.
- Precalentar el Tampón A4 a 50°C y añadir 500 µl a la columna.

- Centrifugar durante 1 minuto a 11000g.
- Añadir 600 µl del Tampón A4. Centrifugar durante 1 minuto a 11000g. Descartar el *flow-through* y colocar la columna NucleoSpin Plasmid en un nuevo tubo colector.
- Centrifugar durante 2 minutos a 11000g y descartar el tubo colector.
- Incubar la columna durante 10 minutos a 37°C para evaporar el etanol residual del Tampón A4.
- Colocar la columna en un tubo Eppendorf y añadir 30-50 µl de Tampón AE.
- Incubar durante 1 minuto a RT.
- Centrifugar durante 1 minuto a 11000g.
- Almacenar el eluido, que contiene el ADN plasmídico, a -20°C hasta su uso.
- Determinar la concentración del plásmido con Nanodrop.
- Secuenciar mediante la técnica de Sanger para confirmar los resultados.

3.2.4 Extracción de proteínas de testículo de ratón

Este tipo de extracción nos permite obtener una muestra de las proteínas expresadas en testículo para así poder analizar aquellas que nos interesen y determinar su presencia o ausencia en los distintos mutantes.

Protocolo:

- Usar un cuarto del testículo de un ratón WT o todo el testículo en caso de ser mutante.
- Añadir el fragmento a un tubo de 1,5 ml con 250-500 µl de tampón RIPA (50 mM Tris pH=8, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y suplementado con 1X PIC (Inhibidor de proteasas) (Roche Diagnostics) El volumen del tampón depende del tamaño del fragmento de testículo usado.
- Disgregar mecánicamente el tejido con un émbolo de plástico y dejarlo incubar 15 minutos a 4°C.
- Centrifugar durante 30 min a 4°C a 13200 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml, guardar una alícuota de 10 µl para la cuantificación de proteínas y congelar el resto de extracto proteico a -80°C.
- Cuantificar el extracto proteico usando el Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

Protocolo de extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares:

- Usar un cuarto del testículo de un ratón WT y todo el testículo en caso de ser mutante.
- Añadir el fragmento a un tubo de 1,5 ml con 250-500 μ l de tampón de lisis citoplásmica (100 mM HEPES pH 7,9, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl suplementado con 1X PIC (Roche Diagnostics)).
- Disgregar mecánicamente el tejido.
- Centrifugar la suspensión durante 20 minutos a 4°C a 11000g.
- Transferir el sobrenadante (fracción citoplásmica) a un nuevo tubo y almacenar a -80°C.
- Añadir 150 μ l de tampón de lisis nuclear (20 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,42M NaCl, 0,2 mM EDTA y 25% (v/v) de glicerol).
- Resuspender el pellet nuclear y homogeneizar.
- Dejar en agitación durante 30 minutos a RT.
- Centrifugar durante 5 minutos a 21000g.
- Transferir el sobrenadante (fracción nuclear) a un tubo nuevo y almacenar a -80°C.

Determinar la concentración de cada extracto proteico con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific)

- Preparar un set estandarizado de proteínas conteniendo Albúmina Standard (2 mg/ml). Hacer nueve diluciones entre el rango de 0 a 2000 μ g/ml.
- Preparar Working Reagent (WR) mezclando 50 partes del Reagent A con 1 parte del Reagente B.
- Pipetear 10 μ l de cada estándar y de los extractos proteicos en un pocillo de una placa de 96 pocillos.
- Añadir 200 μ l de WR a cada pocillo y mezclar.
- Cubrir la placa e incubar a 37°C durante 30 min.
- Medir la absorbancia de cada muestra a 562 nm con un espectrofotómetro.
- Preparar una curva patrón con las absorbancias del set estandarizado de proteínas.
- Usar la curva patrón para determinar la concentración de cada muestra.

3.2.5 Inmunoprecipitación con crosslink

Es una técnica mediante la cual se consigue purificar una proteína. Se une covalentemente un anticuerpo contra la proteína de interés a unas bolas de agarosa mediante un *crosslink*. Se incuba con el extracto proteico para que el anticuerpo pueda unirse a la proteína de interés presente en la solución. Posteriormente se rompe el enlace entre la proteína y el anticuerpo y se analiza la proteína mediante la técnica de Western Blot.

Protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fischer Scientific):

3.2.5.1 Unión del anticuerpo a las bolas de agarosa A/G

- Preparar 2 ml de 1X *Coupling buffer*.
- Añadir 20 µl del *slurry* (bolas de agarosa A/G y tampón de almacenamiento) a la columna.
- Centrifugar la columna a 1000g x 1 min y descartar el *flow-through*.
- Lavar el *slurry* con 200 µl de 1X *Coupling buffer*. Repetir este paso 2 veces.
- Añadir 10 µg de anticuerpo a la columna.
- Cerrar la columna e incubar a 20°C durante 1-4h u ON a 4°C.
- Colocar la columna en un tubo de colección, centrifugar a 1000g x 1 min recoger el *flow-through* para verificar que el anticuerpo se ha unido.
- Lavar las bolas de agarosa con 100 µl de 1X *Coupling buffer*.
- Lavar las bolas de agarosa con 300 µl de 1X *Coupling buffer* dos veces.

3.2.5.2 Crosslink del anticuerpo con las bolas de agarosa

- Preparar una solución 10X de DSS (suberato de disucinimidil) en DMSO.
- Diluir la solución de DSS 1:10 en DMSO para obtener una solución 2,5 mM DSS.
- Añadir 5 µl de 20x *Coupling buffer*, 18 µl de 2,5 mM DSS y 77 µl de H₂O a la columna con las bolas de agarosa unidas al anticuerpo.
- Cerrar la columna e incubar a 20°C durante 45 min.
- Añadir 50 µl de *Elution buffer*, mezclar suavemente y centrifugar.
- Guardar el *flow-through* para verificar el crosslink del anticuerpo.
- Lavar las bolas de agarosa con 100 µl de *Elution buffer* dos veces.
- Lavar las bolas de agarosa con 200 µl de IP Lysis.

3.2.5.3 *Pre-clearing* del lisado con las bolas de agarosa A/G

- Añadir 20 μl del *slurry* de bolas de agarosa a la columna.
- Centrifugar la columna para eliminar el tampón de almacenamiento.
- Añadir 100 μl de 1X *Coupling buffer* en la columna, centrifugar y descartar el *flow-through*.
- Añadir 10 mg de lisado a la columna e incubar a RT durante 45 min en agitación.
- Centrifugar la columna. Descartar la columna y almacenar el *flow-through* (extracto proteico).

3.2.5.4 Inmunoprecipitación del antígeno

- Lavar la resina 2 veces con *Lysis buffer*. Eliminar el *flow-through* cada vez.
- Incubar el extracto proteico obtenido anteriormente (ver protocolo 3.4.1.3) con las bolas de agarosa en rotación ON a 4°C.
- Poner la columna en un tubo colector y centrifugar 1 min 1000g. Guardar el *flow-through* (lisado sin el antígeno).
- Poner la columna en un nuevo tubo colector.
- Añadir 200 μl de *Lysis buffer* y centrifugar. Hacerlo 2 veces para lavar la columna. Guardar los lavados.
- Lavar con 100 μl de tampón de acondicionamiento 1X
- Poner la columna en un tubo colector y añadir 10 μl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,25%, incubar 1 min y centrifugar.
- Añadir 50 μl de 0,25% TFA, incubar 10 minutos a RT y eluir.
- Proceder a la evaporación del eluido con SpeedVac ON a 35°C (Thermo Fisher Scientific) hasta que no haya líquido en el tubo colector.

3.2.6 Western Blot

Esta técnica se usa para detectar proteínas específicas en los extractos proteicos de las muestras de tejido. Después de la extracción proteica, se corren las muestras en un gel de acrilamida separando las proteínas por su peso molecular y se transfieren posteriormente a una membrana para poder detectar las proteínas de interés con anticuerpos específicos.

3.2.6.1 Preparación del gel

- Preparar el molde del gel.
- Preparar el gel separador del porcentaje deseado dependiendo del tamaño de la proteína estudiada (**Tabla 3-23**).

Tabla 3-23. Receta para preparar el gel separador

Tamaño proteína estudiada (kDa)	25-200	15-100	10-70	10-45
Porcentaje Acrilamida	8%	10%	12%	15%
Agua Milli-Q (ml)	4,6	3,8	3,2	2,2
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0,8% w/v) (ml)	2,6	3,4	4	5
1,5M Tris (pH 8,8) (ml)	2,6	2,6	2,6	2,6
20% (w/v) SDS (μ l)	50	50	50	50
10 % Persulfato de amonio (APS) (μ l)	100	100	100	100
Tetrametiletilenediamina (TEMED) (μ l)	13	13	13	13

- Poner 4,3 ml de la solución de gel separador en el molde.
- Añadir 50 μ l de isopropanol para eliminar las posibles burbujas.
- Dejar solidificar durante al menos 15 minutos.
- Preparar el gel concentrador de 4% (**Tabla 3-24**).

Tabla 3-24. Receta para preparar el gel concentrador

Componentes del gel concentrador 4%	Volumen
Agua Milli-Q (ml)	3 ml
0.5 M Tris pH 6,8 (ml)	1,25 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0,8% w/v) (ml)	670 μ l
10 % APS	50 μ l
20% (w/v) SDS	25 μ l
TEMED	6,5 μ l

- Eliminar el isopropanol decantándolo y eliminando los restos con papel de filtro.
- Añadir el gel concentrador y poner el peine.
- Dejar solidificar el gel concentrador unos 5-10 min.

3.2.6.2 Preparación de las muestras y electroforesis

- Diluir las muestras en el volumen necesario de Laemli 2X (tampón de carga) con β -mercaptoetanol hasta un total de 30 μ l de volumen de muestra.
- Desnaturalizar las muestras a 95°C durante 5-10 minutos
- Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y añadir el *Running Buffer* (25 mM Tris pH 8,8, 190 mM glicina, 0.1% SDS en agua Milli-Q) en el tanque.
- Cargar las muestras en el gel y correrlo a 120V durante 90 minutos.

3.2.6.3 Transferencia semiseca

- Transferir a membranas de PVDF (Bio-Rad) o Nitrocelulosa (Bio-Rad) usando el Transblot Turbo System (Bio-Rad) durante 7 minutos a 25V/1,3A.

3.2.6.4 Incubación de la membrana con los anticuerpos primario y secundario

- Preparar el tampón de bloqueo (20 mM Tris pH 7,4, 137 mM NaCl, 5% leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20)
- Sumergir la membrana en TBS-T (20 mM Tris pH 7,4, 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20) en agitación durante 60 min.
- Añadir el Anticuerpo primario (**Tabla 3-25**) diluido en TBS-T y dejar en agitación ON a 4°C o 1 hora a RT.
- Retirar el anticuerpo primario y lavar la membrana con TBS-T durante 5 min a RT en el agitador. Realizar este proceso 3 veces.
- Añadir el anticuerpo secundario (**Tabla 3-26**) diluido en TBS-T y dejar en agitación a RT durante 60 min.
- Retirar el anticuerpo secundario y lavar la membrana con TBS-T durante 5 min a RT en el agitador. Realizar este proceso 3 veces.

3.2.6.5 Revelado de la señal

- Preparar el sustrato de detección (Clarity Western ECL, Bio-Rad) y añadir 2 ml a la membrana e incubar durante 5 min.
- Exponer la membrana en el Versadoc (Bio-Rad) para adquirir las imágenes.

Los geles pueden ser teñidos antes de transferir para evaluar la presencia de proteínas mediante distintas tinciones:

3.2.6.6 Tinción del gel con nitrato de plata

La tinción del gel de acrilamida con nitrato de plata se utilizó en el protocolo de puesta a punto de la IP de TRIP13 para localizar la porción del gel que contenía la proteína y poder cortar la banda para su análisis por MALDI-TOF.

Protocolo:

- Colocar el gel en un contenedor o bandeja de plástico.
- Incubar el gel en fijador (40% etanol, 10% ácido acético, 50% agua Milli-Q) durante 1h.
- Lavar el gel con agua Milli-Q durante 30 minutos.
- Sensibilizar el gel con 0,02% tiosulfato de sodio durante 30 minutos.
- Lavar el gel con agua Milli-Q durante 5 minutos 3 veces.
- Incubar el gel durante 20 minutos a 4°C con 2.5 g/L nitrato de plata
- Lavar el gel con agua Milli-Q durante 1 minutos dos veces.
- Poner el gel en una cubeta nueva. Lavar el gel en agua Milli-Q durante 1 minuto.
- Revelar el gel con 2.5% (w/v) carbonato de sodio, añadiendo 0,05% formaldehído justo antes del uso durante 15 minutos.
- Lavar en agua Milli-Q durante 20 segundos.
- Parar la reacción con 1.46% (w/v) EDTA sal disódica dihidrato durante 10 minutos.
- Lavar en agua Milli-Q 3 veces durante 5 minutos.
- Almacenar el gel en 1% ácido acético a 4°C hasta su uso.

3.2.6.7 Tinción del gel con Coomassie G-250 (Bio-Rad)

La tinción con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) se utiliza para teñir proteínas en geles de poliacrilamida y se utilizó para comprobar si se realizó correctamente el crosslink del anticuerpo de TRIP13 a las bolas de agarosa.

Protocolo:

- Lavar 3 - 5 min con agua Milli-Q.
- Fijar el gel con 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua Milli-Q durante al menos 1 h.
- Lavar el gel durante 10 min. en agitación con agua Milli-Q. Repetir 2 veces más.
- Cubrir el gel con solución de tinción Coomassie (Bio-Rad).

- Teñir el gel con agitación suave durante 1 hora.
- Lavar durante 30 min con agua Milli-Q. Repetir 2 veces más.
- Revelar el gel.
- Guardar el gel en agua Milli-Q o en ácido acético (1 - 2%).

3.2.6.8 Tinción del gel con SYPRO Ruby

La tinción de geles de poliacrilamida con SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific) permite detectar proteínas con tinción fluorescente.

Protocolo:

- Colocar el gel en un contenedor o bandeja de plástico.
- Fijar durante 30 minutos en 10% metanol, 7% ácido acético.
- Retirar la solución de lavado y cubrir el gel con SYPRO Ruby.
- Teñir el gel con continua y suave agitación durante al menos 3 horas para máxima sensibilidad. Se puede ver tinción en 30 - 90 minutos.
- Lavar el gel en 10% metanol 7% ácido acético durante 30 - 60 min.

3.3 Técnicas histológicas

Los testículos y ovarios se obtuvieron y se procesaron para conseguir cortes histológicos con el fin de realizar análisis mediante tinciones o inmunofluorescencia. Lo primero que se realiza es una fijación para preservar la integridad del tejido. Lo segundo, mediante la inclusión, se sustituye el agua del tejido por parafina. Por último, se secciona el tejido en cortes ultrafino en el microtomo. Para poder teñir las muestras, previamente se tiene que desparafinar e hidratar de nuevo la muestra.

3.3.1 Fijación, inclusión y seccionado

3.3.1.1 Protocolo de fijación e inclusión

- Preparar las soluciones fijadoras: 4% PFA (Paraformaldehído en PBS pH 7,4) y fijador de Bouin (70% ácido pícrico, 25% formaldehído y 5% ácido acético glacial).
- Extraer el órgano del ratón y sumergirlo en 1 ml de solución fijadora ON a 4°C.
- Lavar el tejido con PBS a 4°C dos veces durante 30 minutos.
- Sumergir la muestra en etanol 50% a 4°C durante 30 minutos.

- Sumergir la muestra en etanol 70% a 4°C durante 30 minutos. En este paso la muestra se puede almacenar a 4°C durante unos meses.
- Sumergir la muestra en etanol 85% durante 30 minutos a RT.
- Sumergir la muestra en etanol 96% durante 30 minutos a RT.
- Sumergir la muestra en etanol 100% durante 30 minutos a RT dos veces.
- Sumergir la muestra en Histoclear II (National Diagnostics) durante 30 minutos a RT.
- Poner el tejido en un *cassette* y sumergirlo en una solución de Histoclear II: parafina (1:1) durante 45 minutos a 56°C.
- Sumergir el *cassette* en parafina durante 2h a 56°C.
- Sumergir el *cassette* en un segundo baño de parafina ON a 56°C.
- Introducir un molde de metal y el *cassette* a 60°C en la máquina de inclusión con parafina.
- Abrir el *cassette*, transferir el tejido al molde e incluirlo en parafina orientando bien el tejido en el molde.
- Dejar solidificar el molde con el tejido en la zona fría de la máquina de inclusión.
- Una vez el tejido y el bloque han solidificado, almacenar a 4°C hasta que se proceda a realizar cortes en el microtomo.

3.3.1.2 Protocolo de seccionado

- Seccionar las muestras a 7 µm usando el microtomo (Reichert-Jung) con la orientación apropiada.
- Transferir las secciones a la superficie de un baño precalentado a 45°C.
- Depositar las secciones en un portaobjetos tratado con poli-L-lisina.
- Secar los portaobjetos ON a 37°C y almacenar a RT hasta su uso.

3.3.2 Protocolo de desparafinado y rehidratación

- Desparafinar los portaobjetos con tres lavados de xilol durante 5 minutos.
- Rehidratar el tejido con un gradiente de lavados en etanol:
 - 100% etanol dos veces 3 minutos.
 - 96% etanol dos veces 2 minutos.
 - 70% etanol durante 2 minutos.
 - Agua destilada durante 2 minutos.

3.3.3 Tinción con PAS-Hematoxilina

Para observar las estructuras y morfología de las secciones histológicas, previamente se desparafinaron y rehidrataron, para proceder a realizar la tinción de PAS-Hematoxilina.

3.3.3.1 Protocolo de tinción:

- Oxidar el tejido con 1% ácido periódico en agua destilada durante 10 minutos.
- Lavar dos veces con agua destilada durante 3 minutos.
- Incubar las preparaciones con el reactivo de Schiff durante 10 minutos en oscuridad.
- Lavar dos veces con agua sulfurosa (10% metabisulfito potásico, 0,1M HCl en agua Milli-Q) durante 3 minutos.
- Lavar con agua destilada durante 2 minutos
- Teñir con Hematoxilina (Merck) durante 1 minuto.
- Lavar con agua corriente para eliminar el exceso de hematoxilina durante 1 minuto.
- Deshidratar el tejido con un gradiente de lavados en soluciones con concentraciones crecientes de etanol:
 - 70% etanol durante 2 minutos.
 - 96% etanol dos veces 2 minutos.
 - 100% etanol dos veces 3 minutos.
 - Xileno tres veces durante 5 minutos.
- Poner una gota de medio de montaje DPX (Merck) en cada sección y añadir un cubreobjetos.
- Dejar secar y almacenar a RT hasta su análisis.

3.3.4 Test de TUNEL

Para detectar y cuantificar células en apoptosis en secciones se usó el test de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit con fluoresceína, Roche Diagnostics). Este ensayo se basa en la formación de DSBs originados por la muerte celular programada, los cuales se pueden identificar gracias a que la transferasa deoxinucleotidil terminal, o TdT, catalizará la adición de dUTPs marcados a los extremos de dsADN.

Protocolo:

- Desparafinar y rehidratar las muestras con el protocolo descrito previamente **(Ver protocolo desparafinado y rehidratación 3.5.2)**.
- Lavar con 1X PBS durante 2 minutos a RT.
- Permeabilizar el portaobjetos en 1X PBS con 0,5% Triton X-100 durante 15 min.
- Lavar con 1X PBS durante 2 minutos dos veces.
- Añadir 100 µl de solución de DAKO en cada portaobjetos para reducir el *background* e incubar durante 15 minutos a RT.
- Lavar con 1X PBS durante 2 minutos.
- Añadir 5-10 µl de reacción de TUNEL en cada sección.
- Incubar durante 1h a 37°C en la cámara húmeda.
- Lavar con 1X PBS durante 5 minutos tres veces.
- Montar con 15 µl de DAPI y poner un cubreobjetos y almacenar hasta su análisis.

3.3.5 Inmunofluorescencia sobre secciones histológicas

Para observar las proteínas de interés se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que consiste en la detección de la molécula diana con un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo dirigido contra el anticuerpo primario.

Protocolo:

- Desparafinar y rehidratar el tejido siguiendo el protocolo explicado previamente **(Ver protocolo desparafinado y rehidratación 3.5.2)**.
- Proceder a la exposición del antígeno.

3.3.5.1 Exposición del antígeno

- Precalentar el baño con un *coplin jar* con una solución de citrato de sodio (10 mM de citrato de sodio, 0,05% Tween-20 en agua Milli-Q pH=6) a 95-100°C.
- Sumergir las muestras en la solución de citrato de sodio en el *coplin jar* e incubar durante 20-40 minutos.
- Retirar el *coplin jar* y dejar enfriar durante 20 minutos.

3.3.5.2 Inmunofluorescencia

- Proceder al bloqueo de las preparaciones con solución de bloqueo (0,2% BSA, 0,2% gelatina, 0,05% Tween-20 en 1X PBS) durante 15 minutos a RT en agitación
- Diluir el anticuerpo primario (ver **Tabla 3-25**) en solución de bloqueo.
- Añadir 100 µl de la solución con el anticuerpo primario sobre cada portaobjetos y cubrirlo con Parafilm.
- Incubar las preparaciones a 4°C ON, o a 37°C durante 1h, en una cámara húmeda.
- Lavar las preparaciones con solución de bloqueo durante 3 minutos 4 veces.
- Diluir el anticuerpo secundario (ver **Tabla 3-26**) en solución de bloqueo.
- Añadir 100 µl de la solución con el anticuerpo secundario sobre cada portaobjetos y cubrirlo con Parafilm.
- Incubar durante 1h a 37°C en una cámara húmeda.
- Lavar las preparaciones con solución de bloqueo durante 3 minutos 4 veces.
- Dejar secar las preparaciones a RT y poner 15 µl de 0,1 µg/ml DAPI en *Vectashield* y cubrirlo con un cubreobjetos.
- Almacenar las muestras a 4°C o a -20°C si no se van a observar en un plazo corto de tiempo.

Tabla 3-25. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpos primarios	Hospedador	Dilución IF/WB	Referencia	Proveedor
53BP1	Conejo	1:100/-	Ab21083	Abcam
53BP1	Ratón	1:100/-	MAB3802	Merck
H1T	Conejo de indias	1:200/-		Donado por M.A Handel
HORMAD1	Conejo	1:100/1:1000	67091-1-Ig	Abcam
HSPA2	Conejo	1:100/1:1000	PA5-81895	Invitrogen
Ku70	Conejo	1:100/-	ab92450	Abcam
Mad2l2 (REV7)	Conejo	1:100/1:1000	ab180579	Abcam
γH2AX (Ser139)	Ratón	1:400/-	05-636	Millipore

pPLK1 (T210)	Mouse	1:100/-	558400	BD Pharmingen
RAD51	Conejo	1:200/-	PC130-100UL	Millipore
RPA32/RPA2	Rata	1:100/-	CST2208S	Cell Signalling
RPA32/RPA2	Conejo	1:100/-	ab10359	Abcam
SYCP1	Conejo	1:200/1:1000	ab15090	Abcam
SYCP3	Ratón	1:200/-	ab97672	Abcam
SYCP3	Conejo	1:200/-	ab15093	Abcam
TRIP13	Conejo	1:200/1:2500	19602-1-AP	Proteintech
Histona H3	Ratón	-/1:5000	ab24834	Abcam
β-Tubulina	Conejo	-/1:5000	ab108342	Abcam

Tabla 3-26. Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpos secundarios	Dilución IF/WB	Referencia	Casa comercial
FITC anti-ratón	1:200/-	AB_2338589	Jackson ImmunoResearch Europe
FITC anti-conejo	1:200/-	AB_2337972	Jackson ImmunoResearch Europe
Cy3 anti-ratón	1:200/-	AB_2340813	Jackson ImmunoResearch Europe
Cy3 anti-conejo	1:200/-	AB_2307443	Jackson ImmunoResearch Europe
Alexa Fluor 594 anti- conejo	1:200/-	A-21207	Invitrogen
Cy5 anti-conejo	1:200/-	AB_2340607	Jackson ImmunoResearch Europe

HRP anti-conejo	-/1:10000	1706515	Bio-Rad
HRP anti-ratón	-/1:10000	1706516	Bio-Rad

3.4 Técnicas citológicas

3.4.1 Extensiones de espermatozoides en fresco

Para estudiar los espermatozoides de ratón se pueden preparar extensiones a partir de testículos extraídos en fresco. Debido a que la membrana plasmática y la envoltura nuclear sigue siendo funcional en estas células, se les tiene que hacer un tratamiento hipotónico con sacarosa para poder expandir el volumen celular.

Protocolo:

- Extraer los testículos, decapsularlos y transferirlos a un tubo con 10 ml de GBSS con 0.5 mg/ml colagenasa.
- Incubar 15 minutos a 33°C, moviendo vigorosamente cada 5 minutos hasta que se deshagan los testículos y se separen los túbulos seminíferos.
- Dejar sedimentar los túbulos durante 3-4 minutos y quitar el sobrenadante.
- Lavar dos veces los túbulos con 10 ml de GBSS. Centrifugar a 2400 rpm durante 3 minutos.
- Resuspender los túbulos en 10 ml de GBSS con 0,5mg/ml tripsina y 1 µg/ml DNAsa 1.
- Incubar 12 minutos a 33°C agitando cada 5 minutos.
- Resuspender las células pipeteando 3 minutos para disolver los agregados celulares.
- Inhibir la tripsina añadiendo 0,5 ml de suero fetal bovino (FBS).
- Filtrar la suspensión celular con un filtro de 70 µm.
- Separar la suspensión en 6 tubos Eppendorf, centrifugar a 1000g durante 5 minutos a y retirar el sobrenadante.
- Añadir 80 µl de sacarosa 100 mM en cada tubo, resuspender bien durante 2-3 minutos.
- Añadir 20 µl de la suspensión celular con sacarosa a los portaobjetos.
- Añadir 65 µl de 1% PFA (en agua Milli-Q pH 9,2-9,4; 0,1% Triton X-100) en los portaobjetos.
- Incubar durante 2h a RT en cámara húmeda.

- Dejar secar los portaobjetos al aire.
- Lavar 4 veces con 1% PhotoFlo (Kodak).
- Almacenar los portaobjetos una vez estén secos a -80°C hasta su uso.

3.4.2 Extensiones de espermatoцитos a partir de muestras congeladas

El estudio de espermatoцитos de ratón también se puede hacer a partir de material congelado, lo cual permite su almacenamiento a largo plazo. Al congelar el tejido, el agua del citoplasma se congela, por lo que la membrana plasmática ya no es funcional, y se hace el tratamiento con un detergente, Lipsol en este caso, para expandir el volumen de la célula.

Protocolo:

- Cortar un trozo de testículo congelado con un bisturí, un cuarto de un ratón adulto salvaje, o un testículo entero en caso de que fuera mutante.
- Añadir 25 μl de 1X PBS frío suplementado con 1X PIC (Roche Diagnostics).
- Desmenuzar el trozo de testículo con un bisturí durante 2-3 min.
- Añadir hasta 125 μl de 1X PBS a la suspensión celular.
- Transferir la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y dejar sedimentar durante 15 minutos en hielo.
- Distribuir 25 μl de la suspensión celular en los portaobjetos previamente preparados en una cámara húmeda.
- Añadir 80 μl de 1% Lipsol en la suspensión celular y esperar de 15 a 20 minutos.
- Añadir 150 μl de fijador (1% PFA en agua Milli-Q pH 9,2-9,4; 0,15% Triton X-100 y 1X PI). Escampar la solución por todo el portaobjetos sin mezclar.
- Incubar la suspensión en la cámara húmeda a RT durante al menos 2 horas.
- Dejar secar las preparaciones una vez terminada la incubación.
- Lavar las preparaciones con 1% Photoflo (Kodak) 4 veces durante 2 minutos.
- Dejar secar las preparaciones al aire y almacenar a -80°C hasta su uso.

3.4.3 Preparaciones de espermatoцитos en *squash*

Las preparaciones de *squash* preservan la integridad de la célula conservando su volumen.

Protocolo a partir de material congelado:

- Cortar una pequeña porción del testículo congelado con un bisturí.
- Disgregar el tejido con el bisturí en 30 μ l de solución de fijación (2% Paraformaldehído, 0,05% Triton X100 en PBS, pH=9,4) durante 10 minutos a RT.
- Añadir 6 μ l de la suspensión celular en cada portaobjetos.
- Con un cubreobjetos, ponerlo encima de la suspensión y aplicar presión encima de las células.
- Sumergir el portaobjetos en nitrógeno líquido.
- Almacenar las preparaciones a -80°C .

A las preparaciones de extensiones en fresco, extensiones en Lipsol y extensiones en *squash* se marcaron con inmunofluorescencia para detectar proteínas en los espermatozoides siguiendo el protocolo explicado anteriormente (**ver sección 3.5.5.2**).

3.4.4 Tratamiento con DNAsa I

Se hizo un tratamiento con DNAsa I en extensiones de espermatozoides en lipsol para corroborar que las fusiones de los extremos de los cromosomas involucraban uniones mediadas por ADN.

Protocolo:

- Cortar un trozo de testículo congelado con un bisturí en una placa de Petri.
- Añadir 25 μ l de 1X GBSS frío (pH 7,4) suplementado con 1X PIC (Roche Diagnostics).
- Desmenuzar el tejido durante 2-3 min.
- Añadir hasta 125 μ l de 1X GBSS a la suspensión.
- Transferir la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y dejar sedimentar durante 15 minutos en hielo.
- Distribuir 25 μ l de la suspensión celular en los portaobjetos previamente preparados en una cámara húmeda.
- Añadir 80 μ l de 1% Lipsol diluido en GBSS suplementado con 10U de DNAsa I al portaobjetos durante 2h a 37°C . Preparar un portaobjetos control al que no se le suplemente DNAsa I al GBSS.

- Añadir 150 µl de fijador (1% Paraformaldehído en agua Milli-Q pH 9,2-9,4, 0,15% Triton X-100 y 1X PIC).
- Incubar la suspensión en la cámara húmeda a 37°C durante 2 horas.
- Dejar secar las preparaciones una vez terminada la incubación.
- Lavar las preparaciones con 1% Photoflo (Kodak) 4 veces durante 2 minutos.
- Dejar secar las preparaciones al aire y almacenar a -80°C hasta su uso.

3.4.5 Cultivo de células de testículo con el inhibidor de TRIP13 DCZ0415

Se hizo un tratamiento con el inhibidor de TRIP13, DCZ0415, en células de testículo de ratón adulto *in vitro* durante 24h para evaluar su efecto en la meiosis.

3.4.5.1 Extracción de células

- Extraer los testículos, decapsularlos y transferirlos a un tubo con 10 ml de GBSS con 0,5 mg/ml colagenasa.
- Incubar 15 minutos a 33°C, moviendo vigorosamente cada 5 minutos hasta que se deshagan los testículos y se separen los túbulos seminíferos.
- Dejar sedimentar los túbulos durante 3-4 minutos y quitar el sobrenadante.
- Lavar dos veces los túbulos con 10 ml de GBSS. Centrifugar a 2400 rpm durante 3 minutos.
- Resuspender los túbulos en 10 ml de GBSS con 0,5mg/ml tripsina y 1 µg/ml DNAsa I.
- Incubar 12 minutos a 33°C agitando cada 5 minutos.
- Resuspender las células pipeteando 3 minutos para disolver los agregados celulares.
- Inhibir la tripsina añadiendo 0,5 ml de suero fetal bovino (FBS).
- Filtrar la suspensión celular con un filtro de 70 µm.
- Una vez se ha obtenido la suspensión celular, centrifugar a 1000g durante 5 minutos.
- Resuspender el pellet en medio de cultivo αMEM (Sigma-Aldrich).
- Contar el número de células con una cámara de Neubauer.
- Diluir la suspensión celular para obtener una solución con una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml.

3.4.5.2 Cultivo de células con el inhibidor DCZ0415 en una placa de 24 pocillos

- En los pocillos seleccionados para realizar el tratamiento, cultivar $2,5 \times 10^6$ células/ml de α MEM suplementado con el inhibidor DCZ0415 a la concentración de 15 μ M o 20 μ M (diluido en DMSO para preparar el stock). En los pozos control, cultivar $2,5 \times 10^6$ células/ml en α MEM con el volumen equivalente de DMSO.
- Incubar a 33°C, 5% CO₂ durante 24h.
- Recoger el contenido de cada pozo y depositarlo en un tubo de 1,5ml.
- Centrifugar durante 3 minutos a 3000 rpm. Descartar el sobrenadante.

3.4.5.3 Extensiones de espermatoцитos cultivados

- Resuspender el pellet de cada tubo en 20 μ l de sacarosa 100 mM.
- Transferir los 20 μ l de la suspensión celular en un portaobjetos con 40 μ l de solución de fijación (1% Paraformaldehído, 0,15% Triton X100, con PIC en agua Milli-Q, pH 9,2-9,4).
- Fijar durante 2h a RT en cámara húmeda.
- Abrir la cámara húmeda y dejar secar los portaobjetos.
- Lavar 4 veces con 1% PhotoFlo (Kodak).
- Almacenar una vez esté seco a -80°C hasta su uso.
- Dejar secar las preparaciones al aire y almacenar a -80°C hasta su uso.

3.5 Microscopía, procesamiento de datos y estadística

Las preparaciones teñidas con PAS-Hematoxilina se observaron en un microscopio de campo claro Zeiss Axioskop y las imágenes fueron capturadas con una cámara ProgRes Jenoptik mediante el software ProgRes Capture Pro-2.7.7.

Las preparaciones teñidas fluorescentemente se observaron con un microscopio Axiophot (Zeiss) y las imágenes fueron capturadas con una cámara Point Gray Research, Inc) mediante el software ACO XY Software (A. COLOMA Open Microscopy).

Todas las imágenes se han procesado con el software Adobe Photoshop. La intensidad de la fluorescencia se ha cuantificado con el software ImageJ. Las señales contadas de fluorescencia se han contado manualmente en el software Adobe Photoshop o con el software ImageJ.

El análisis estadístico y generación de gráficos se ha hecho utilizando el software GraphPad Prism 5.

4. Resultados



4.1 Localización de TRIP13 durante la espermatogénesis

En células somáticas de mamífero, TRIP13 se encuentra enriquecido en los cinetocoros lo cual se ha relacionado con su función en la regulación del SAC (Tipton et al., 2012; K. Wang et al., 2014). En células meióticas de levadura, la mayoría de Pch2 se encuentra localizada en el nucleolo durante la profase meiótica y una pequeña fracción colocaliza con el SC formando foci (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). En gusanos y plantas, Pch2 se carga en el complejo a medida que la sinapsis progresa y desaparece del SC en diploteno (Deshong et al., 2014; Miao et al., 2013). Pero en ratón poco se sabe de la localización de TRIP13 durante la profase meiótica.

Para entender mejor las funciones de TRIP13 en la meiosis de ratón, se examinó su localización en secciones histológicas de testículo. Se hizo una inmunolocalización de TRIP13 en secciones de testículo de ratones WT con la contra tinción DAPI, la cual sirve para marcar ADN nuclear (Chazotte, 2011). En los ratones WT se pueden observar los distintos estadios de la espermatogénesis en secciones histológicas de túbulos seminíferos de testículo. En la base de los túbulos seminíferos se encuentran las espermatogonias, en la siguiente capa los espermatocitos y en las capas próximas a luz del túbulo, las espermátidas redondas y las elongadas. En los testículos de ratones WT, la señal de TRIP13 apareció especialmente intensa en el citoplasma de los espermatocitos, si bien se observó también una señal nuclear en forma de foci (**Figura 4-1A**). En levadura, Pch2, además de en el núcleo, también se localiza en el citoplasma (Herruzo et al., 2021). También hubo expresión de TRIP13 en las células postmeióticas (**Figura 4-1A**).

Para confirmar la localización de TRIP13 dentro de las células de testículo, se llevó a cabo un fraccionamiento para separar las fracciones nuclear y citoplásmica del extracto de proteínas de testículo y se analizó mediante WB con un anticuerpo contra TRIP13. La banda de TRIP13 en el extracto proteico de WT apareció alrededor de 50 kDa. También apareció una segunda banda, que posiblemente marque modificaciones postraduccionales. El análisis reveló que TRIP13 se

localiza tanto en la fracción nuclear como en la fracción citoplásmica. Se usó la histona H3 como control de la fracción nuclear y Tubulina como control de la fracción citoplásmica (**Figura 4-1B**). Estos resultados indican que TRIP13 se localiza en el citoplasma y en el núcleo de las células de testículo de ratón.

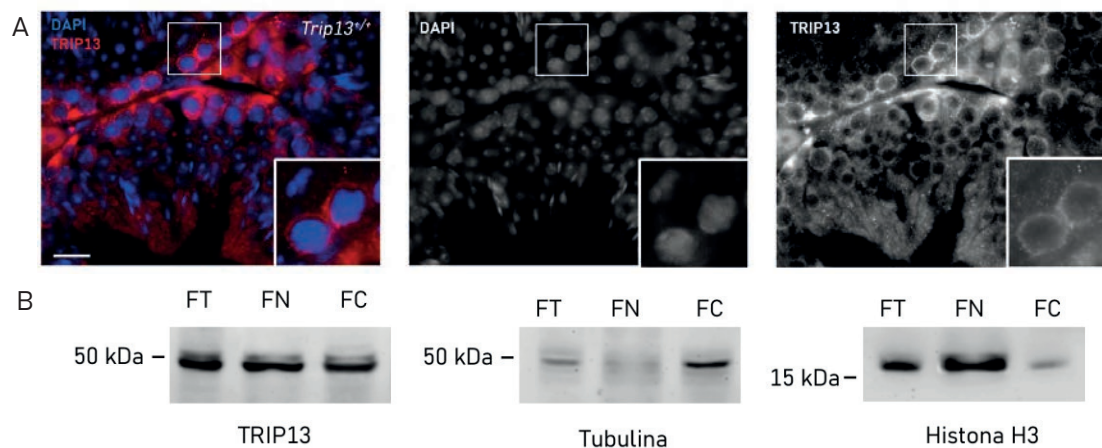


Figura 4-1. TRIP13 se localiza en el núcleo y citoplasma de los espermatocitos WT. **A)** Señal de TRIP13 localizada en espermatocitos WT además de en las células postmeióticas. La imagen magnificada en el recuadro muestra dos espermatocitos con señal de TRIP13 tanto en el citoplasma como en el núcleo. Barra de escala equivale a 20 μ m. **B)** Western Blot contra TRIP13, Tubulina y la histona H3 en extractos proteicos de fracción total de proteínas de testículo (FT), fracción nuclear (FN) y fracción citoplásmica (FC). TRIP13 se encuentra por debajo de la marca de 50 kDa, por lo que se esperaría de su peso molecular de 49 kDa. Se observa que TRIP13 se localiza en ambas fracciones mientras que la mayor parte de Tubulina se encuentra en la fracción citoplásmica y la histona H3 en la fracción nuclear.

Además de la localización de TRIP13 en secciones de testículo, se analizó en más detalle su localización en extensiones de espermatocitos de ratones WT mediante inmunofluorescencia doble contra TRIP13 y SYCP3, para marcar los ejes cromosómicos. En espermatocitos WT, TRIP13 apareció en las porciones sinapsadas en cigoteno tardío, y también en paquiteno temprano, cuya señal es más evidente (**Figura 4-2**). Esta localización es compartida con los ortólogos de TRIP13. Esta localización de TRIP13 en las porciones sinapsadas podría explicar la función de TRIP13 regulando la composición del eje cromosómico durante la profase meiótica (Roig et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). Además de la localización en las regiones sinapsadas del SC, TRIP13 también se encontró preferentemente situada en los telómeros durante toda la profase meiótica, desde leptoteno hasta diploteno, siendo esta señal telomérica mucho más intensa que la que se encuentra en el complejo (**Figura 4-2**). Esta localización de TRIP13 en los telómeros parece exclusiva de mamíferos ya que no se había descrito en ningún otro organismo modelo.

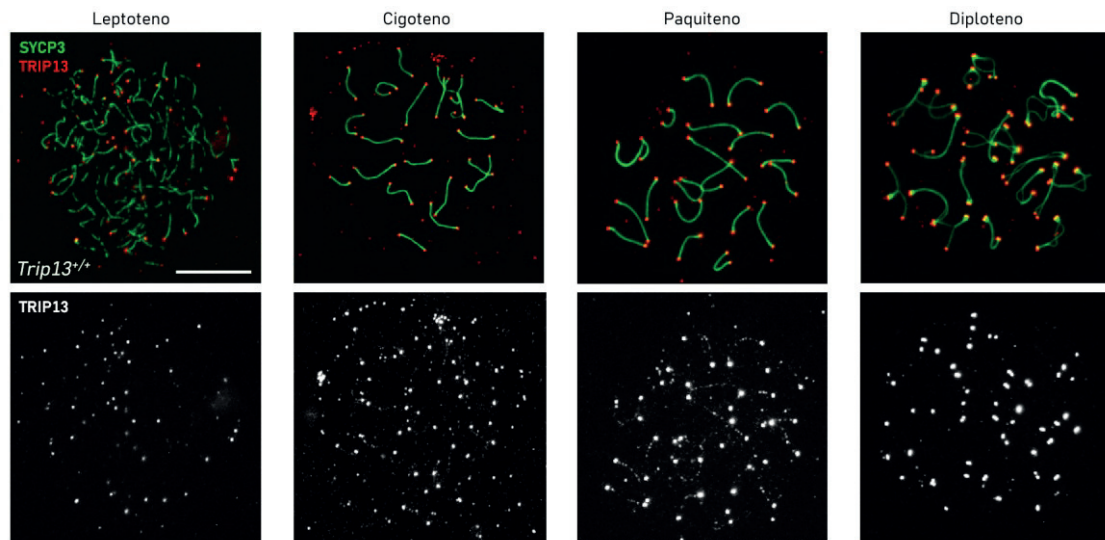


Figura 4-2. TRIP13 se localiza en los telómeros y en las porciones sinapsadas del SC en cigoteno tardío y paquiteno temprano. Doble IF contra SYCP3 (verde) y TRIP13 (rojo) en extensiones de espermatocitos WT desde leptoteno a diploteno. Desde leptoteno hasta diploteno se observa una señal muy intensa de TRIP13 localizada en los telómeros de los cromosomas homólogos. A partir de cigoteno tardío y sobre todo en paquiteno temprano además de la señal en los telómeros también se observa una colocalización de TRIP13 sobre los ejes sinapsados formando foci. Barra de escala equivale a 10 μ m.

4.2 Nuevos modelos murinos para estudiar las funciones de TRIP13 en la profase meiótica

En este trabajo hemos analizado en más detalle algunas de las funciones de TRIP13 como la reparación de los DSBs y su función en la sinapsis de los cromosomas homólogos y para ello, hemos utilizado distintos métodos y estrategias. Hemos usado los mutantes hipomórficos *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{sev/sev}*. Hemos caracterizado por primera vez los modelos murinos *Trip13^{-/-}* y *Trip13^{ATPasaDead}* y también hemos realizado un tratamiento farmacológico *in vivo* e *in vitro* con el inhibidor de TRIP13 DCZ0415 para evaluar los efectos de la inhibición de TRIP13 durante la profase meiótica.

4.2.1 Caracterización fenotípica del mutante *Trip13^{-/-}*

Para estudiar la función de TRIP13 en la meiosis de ratón, históricamente se han usado dos alelos mutantes hipomórficos de *Trip13* (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Los dos mutantes de *Trip13* fueron generados a partir de líneas ESCs que contenían alelos mutados por la inserción de un *gene-trap* en el segundo

(*Trip13^{CH0621}*) o tercer intrón (*Trip13^{RRB047}*) de la secuencia del gen (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Estas mutaciones permiten estudiar el defecto de la expresión de *Trip13* con distinta penetrancia. Mientras que el alelo *Trip13^{RRB047}* (o *Trip13^{mod}*) presenta menos expresión del gen que el alelo salvaje, el alelo *Trip13^{CH0621}* (o *Trip13^{sev}*) consigue reducir casi por completo la expresión del gen. Ambas mutaciones en homocigosis confieren esterilidad (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). El alelo severo no estaba disponible en nuestra colonia de ratones, y solo se disponía de material congelado. Es por ello que en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcos Malumbres (CNIO), se generó el alelo constitutivo *Trip13^{-/-}*.

Mediante la tecnología CRISPR/Cas9, se generó el alelo mutante con una delección de 13 pb en el segundo exón de la secuencia de TRIP13, causando una mutación por cambio del marco de lectura y una producción truncada de la proteína (**Figura 4-3A**). Para comprobar la reducción de la expresión de TRIP13 en los testículos de los ratones mutantes, se analizó mediante WB en un extracto de proteínas de testículo de ratón adulto *Trip13^{-/-}* y se comparó con extractos de testículo de ratones *Trip13^{mod/mod}* y WT. Los testículos de los ratones *Trip13^{-/-}* presentaron una ausencia completa de proteína (**Figura 4-3C**). Comparando la expresión de TRIP13 en el alelo moderado, se observó que éste expresó una cantidad leve de TRIP13 comparada con los ratones WT (**Figura 4-3C**), tal y como se describió previamente (Roig et al., 2010). Estos datos confirman que la expresión de TRIP13 en el mutante moderado se reduce significativamente y no se detecta expresión de la proteína en los testículos del mutante *Trip13^{-/-}*.

También se comprobó la reducción de la expresión de TRIP13 en los mutantes mediante una inmunofluorescencia contra TRIP13 y DAPI en secciones de testículos *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. En homocigosis, la mutación hipomórfica del alelo moderado hace que, a pesar de reducir la expresión de TRIP13 en la mayoría de las células, algunos espermatoцитos posean suficiente cantidad de proteína como para realizar las funciones de TRIP13 correctamente. A estos espermatoцитos se les llama *escapers* (Roig et al., 2010). En las secciones de testículos *Trip13^{mod/mod}* se observó que los espermatoцитos situados cercanos a la luz del túbulo presentaron señal de TRIP13 tanto en el citoplasma como en el núcleo (**Figura**

4-4A). Esta cantidad de TRIP13 sería suficiente como para realizar sus funciones con normalidad y así progresar hasta la luz del túbulo. En cambio, la mayor parte de espermatoцитos de la base del túbulo no presentaron señal (**Figura 4-4A**). En las secciones de testículo *Trip13^{-/-}* no hubo ninguna señal detectable de TRIP13 en ningún espermatoцитo, confirmando la ausencia de TRIP13 (**Figura 4-4B**).

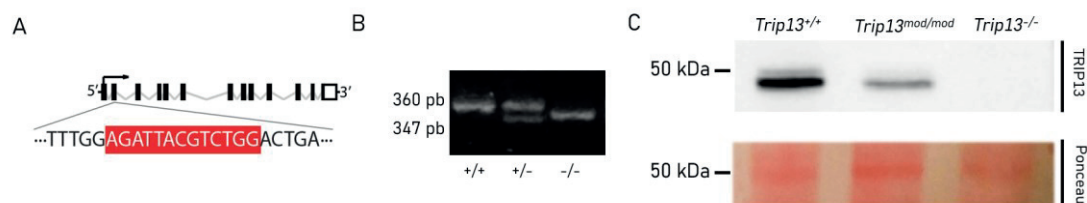


Figura 4-3. Los ratones *Trip13^{-/-}* presentan una ausencia total de expresión de TRIP13. A) Representación esquemática de la mutación introducida mediante CRISPR/Cas9, que consiste en la delección de 13 pb en el segundo exón de la secuencia del gen para generar el mutante constitutivo *Trip13^{-/-}*. **B)** Genotipado por PCR de ratones WT (+/+), heterocigoto (+/-) y homocigoto (-/-) para la mutación en *Trip13*. Se detecta una banda a 360 pb para el alelo WT y una banda a 347 pb para el alelo mutante. **C)** Análisis por WB de extractos proteicos de testículo procedentes de ratones adultos de WT, *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}* con el anticuerpo frente a TRIP13. La banda de TRIP13 aparece alrededor de 50 kDa. En el alelo moderado se observa una reducción de la cantidad de proteína y en el alelo nulo no se detecta expresión de TRIP13. También se muestra la tinción con Ponceau como control de carga.

Se hizo una inmunofluorescencia contra TRIP13 y SYCP3 en extensiones de espermatoцитos de ambos mutantes para corroborar la reducción de la expresión de TRIP13. En el mutante *Trip13^{mod/mod}*, se encontraron dos poblaciones de espermatoцитos con distinta señal de TRIP13, como en las secciones de testículo. Un grupo de espermatoцитos expresó TRIP13 de manera parecida a como lo hicieron los espermatoцитos WT (**Figura 4-2**). TRIP13 se localizó en los telómeros de espermatoцитos en leptoteno, cigoteno y paquiteno. Estas células también presentaron señal en el SC, aunque la señal de TRIP13 fue más tenue que en los espermatoцитos WT (**Figura 4-5A**). Otra población de espermatoцитos no presentaron TRIP13 ni en telómeros ni en las regiones sinapsadas (**Figura 4-5B**), evidenciando que hay una reducción significativa en la expresión de TRIP13 en este mutante (Roig et al., 2010). En el caso de los espermatoцитos *Trip13^{-/-}* no presentaron señal de TRIP13, acorde con la nula expresión de la proteína detectada por WB y la ausencia de señal de TRIP13 en las secciones de testículo, indicando que no hay expresión de la proteína en el mutante (**Figura 4-6**). Estos resultados indican que en el mutante *Trip13^{mod/mod}* se reduce la expresión de TRIP13 y ésta es nula en los testículos del mutante *Trip13^{-/-}*.

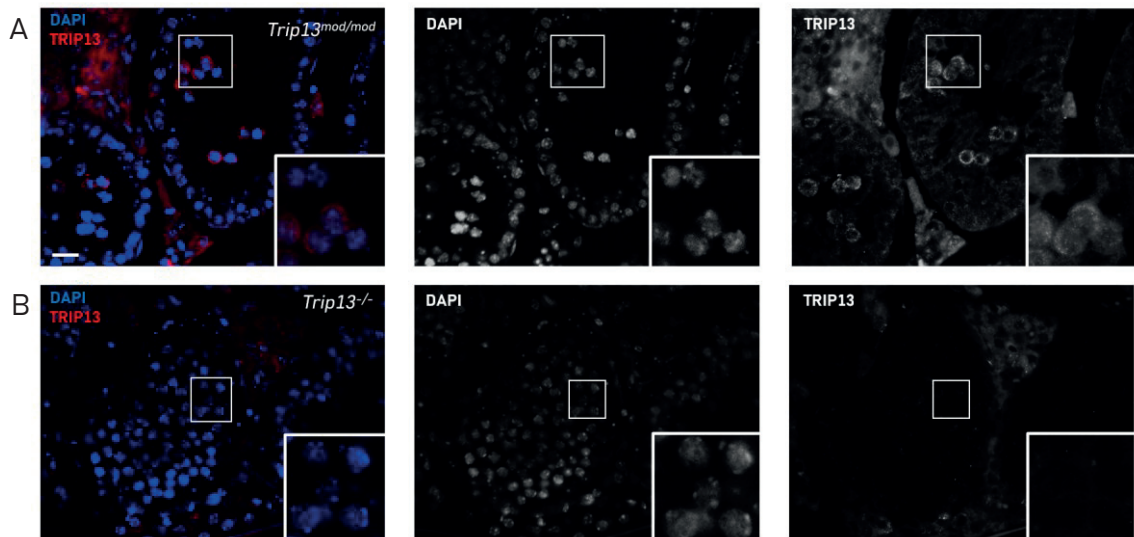


Figura 4-4. Hay ausencia de expresión de TRIP13 en los testículos del mutante *Trip13*^{-/-}. Inmunofluorescencia contra TRIP13 (rojo) y DAPI (azul). **A)** Señal de TRIP13 en secciones de testículo *Trip13*^{mod/mod} en los que se observa como los espermatocitos que se encuentran en la luz del túbulo, los *escapers*, presentan abundante señal de TRIP13. La mayoría de espermatocitos en la base del túbulo no presentan señal de TRIP13. La imagen magnificada en el recuadro muestra cuatro espermatocitos con señal de TRIP13 en el citoplasma y núcleo. Barra de escala equivale a 20 μ m. **B)** Ausencia de señal de TRIP13 en los túbulos seminíferos del ratón *Trip13*^{-/-}. La imagen magnificada en el recuadro muestra cinco espermatocitos sin señal de TRIP13.

Para analizar los efectos de la depleción de *Trip13* en la espermatogénesis de ratón, se llevaron a cabo análisis histológicos en testículos de mutantes *Trip13*^{-/-} y se comparó con secciones de ratones WT. Uno de los primeros indicadores de que una mutación compromete la espermatogénesis es un menor tamaño de los testículos (Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Los testículos del mutante *Trip13*^{-/-} fueron significativamente más pequeños que los de los ratones WT (**Figura 4-7**) (TW/BW (Testis weight/Body weight) 0,68% \pm 0,02, media \pm SD, N=3 en WT; 0,16% \pm 0,01 N=3 en *Trip13*^{-/-}; $p < 0,0001$, T de Student), indicando un bloqueo en la espermatogénesis.

Analizando las secciones histológicas de los túbulos seminíferos mediante tinción de PAS-Hematoxilina en ratones WT, se pueden observar los distintos estadios de la espermatogénesis. En la base de los túbulos se encuentran las espermatogonias, en el siguiente nivel se sitúan los espermatocitos y en la luz del túbulo seminífero las espermátidas redondas y elongadas (**Figura 4-7A**) (Ahmed & de Rooij, 2009).

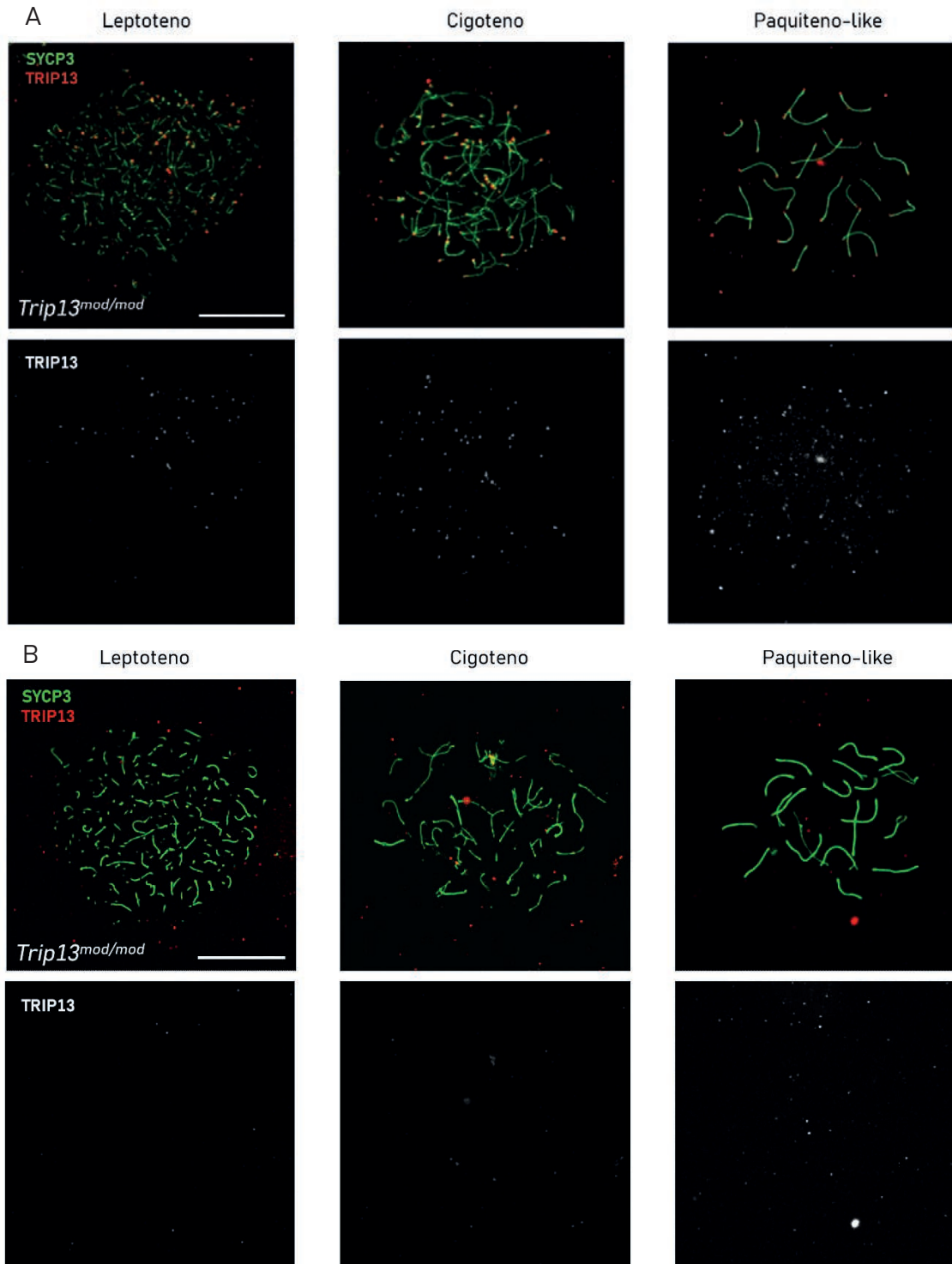


Figura 4-5. Localización de TRIP13 en espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}*. Doble IF contra SYCP3 (verde) y TRIP13 (rojo) en extensiones de espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}* desde leptoteno a paquiteno. **A)** Imágenes representativas de la población de espermatoцитos que presentan señal de TRIP13. La señal se encuentra localizada en los telómeros de los espermatoцитos de leptoteno a paquiteno-like. En los espermatoцитos en paquiteno-like se puede ver la señal localizada en el SC en algunos bivalentes. La señal de telómeros y la del SC es más tenue que la encontrada en espermatoцитos WT. **B)** Imágenes representativas de la población de espermatoцитos sin de señal de TRIP13 de leptoteno a paquiteno-like. Barras de escala equivalen a 10 μm .

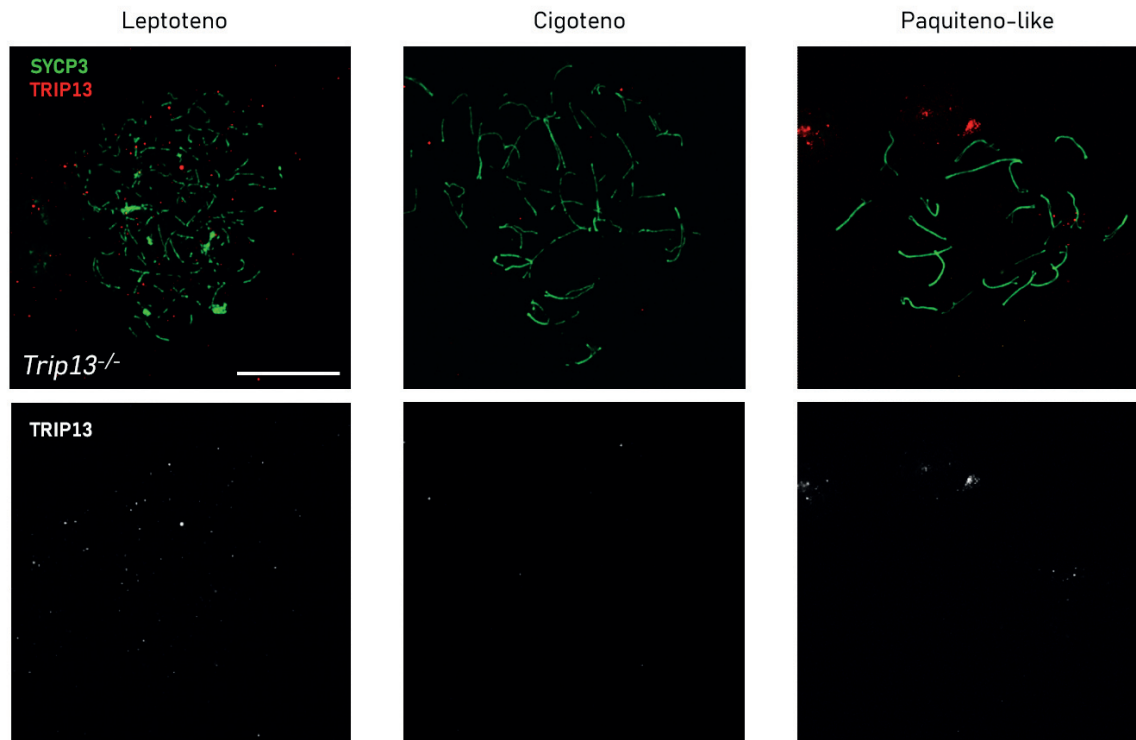


Figura 4-6. Localización de TRIP13 en espermatoцитos *Trip13*^{-/-}. Doble IF contra SYCP3 (verde) y TRIP13 (rojo) en extensiones de espermatoцитos *Trip13*^{-/-} desde leptoteno a paquiteno-like. Se puede observar una ausencia total de señal de TRIP13 en los espermatoцитos. Barra de escala equivale 10 μ m.

En las secciones histológicas del testículo del mutante *Trip13*^{-/-} solo se pudieron observar espermatogonias y espermatoцитos y no hubo presencia de ningún estadio más tardío. El mutante *Trip13*^{-/-} presentó bloqueo en el estadio IV, que corresponde a espermatoцитos que se encuentran en estadio de paquiteno (**Figura 4-7A**). La afectación producida en este mutante de *Trip13*, igual que en los mutantes hipomórficos anteriormente descritos (Roig et al., 2010), provocó su esterilidad y la incapacidad de producir espermatozoides. Estas observaciones indican que TRIP13 es indispensable para completar la espermatogénesis.

Se estudió la presencia de células apoptóticas en los testículos de los ratones mutantes mediante el test de TUNEL (**Figura 4-7B**). Los testículos *Trip13*^{-/-} presentaron un mayor número de células apoptóticas por túbulo (**Figura 4-7D**) ($p < 0,0001$, T de Student) y mayor porcentaje de túbulos con células apoptóticas (9,3% en WT vs. 41,6% en *Trip13*^{-/-}; $p < 0,0001$, Fisher test). Estos resultados indican que TRIP13 es necesaria para la viabilidad de los espermatoцитos.

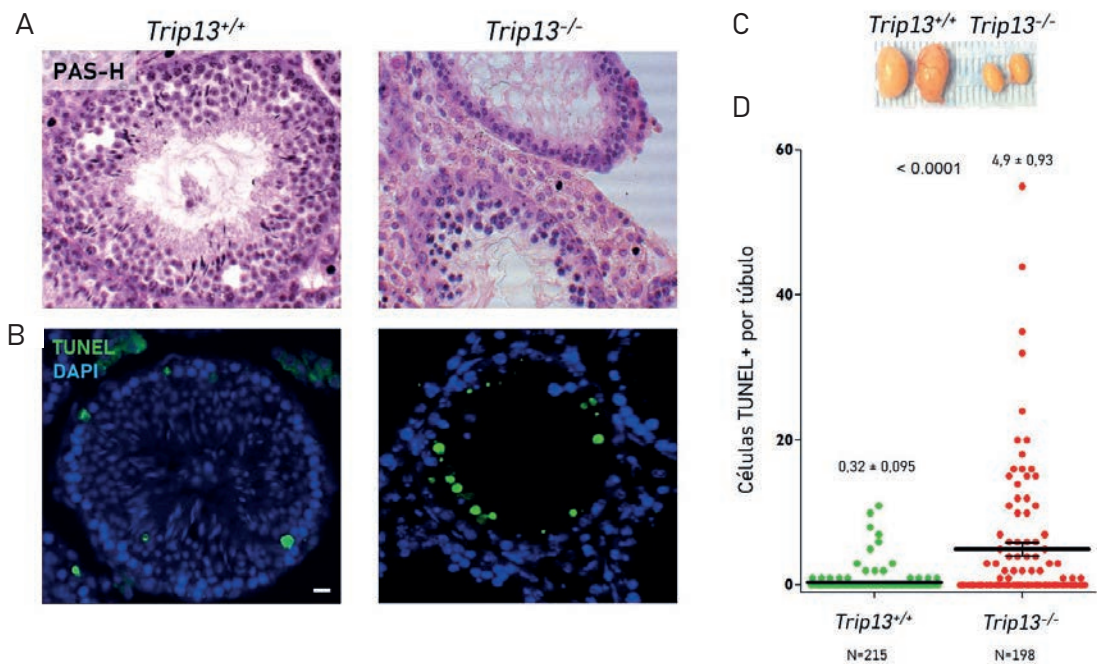


Figura 4-7. Los testículos de los ratones *Trip13*^{-/-} presentan más apoptosis que los testículos de los ratones control. A) Tinción de PAS-Hematoxilina en secciones de testículo de ratones WT y *Trip13*^{-/-}. En las secciones del mutante *Trip13*^{-/-} se observa bloqueo en el estadio IV. **B)** Tinción de TUNEL en secciones de testículo de ratones WT y *Trip13*^{-/-}. La presencia de células apoptóticas se marca en color verde. La barra de escala equivale a 20 μ m. **C)** Comparación de tamaño entre los testículos de ratones WT y *Trip13*^{-/-}. **D)** Gráfico que muestra el recuento de células TUNEL positivas por túbulo en testículos WT y *Trip13*^{-/-}. Se presentan las medias y la SD. La N corresponde al número de túbulos analizados. Análisis T de Student.

La ovogénesis también se vio afectada en las hembras mutantes de *Trip13*^{-/-}. Durante el desarrollo fetal se completa la profase de la meiosis I y los ovocitos se mantienen bloqueados en dictioteno hasta el nacimiento. Después de producirse una muerte masiva de ovocitos, los que sobreviven forman los folículos primordiales cuando son rodeados por una capa de células del estroma ovárico. Estos folículos primordiales serán reclutados a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. Mientras que las hembras WT adultas presentaron folículos en distintos grados de desarrollo, las hembras *Trip13*^{-/-} presentaron una ausencia completa de folículos, (**Figura 4-8**) como ya se había descrito previamente en los ovarios de las hembras *Trip13*^{sev/sev} (Roig et al., 2010). Un bloqueo completo en la foliculogénesis es típico de mutantes que no pueden reparar los DSBs (Di Giacomo et al., 2005), indicando que TRIP13 es necesaria para que se produzca una correcta foliculogénesis.

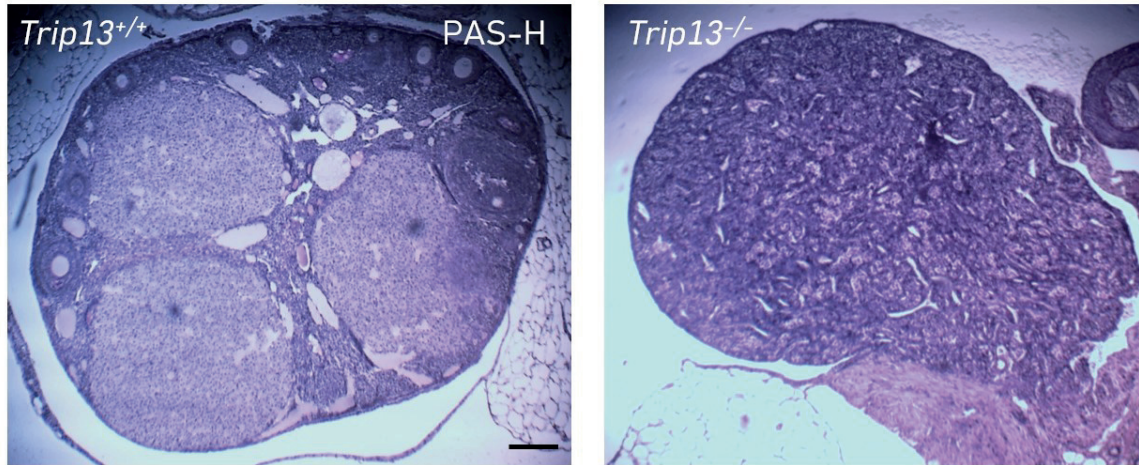


Figura 4-8. Análisis histológico de secciones de ovario de hembras WT y *Trip13*^{-/-}. Tinción PAS-Hematoxilina de secciones de ovario de una hembra adulta WT y una *Trip13*^{-/-}. Nótese que el ovario WT muestra distintos folículos en diferentes estadios de desarrollo. Las secciones del ovario de la hembra *Trip13*^{-/-} muestran una depleción completa de folículos. La barra de escala equivale a 200 μ m.

4.2.1.1 Los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} no progresan más allá de paquiteno-like

Para analizar en más detalle el efecto de la depleción completa de *Trip13* en los espermatoцитos, se examinó cómo se llevaba a cabo la progresión de la sinapsis durante la profase meiótica en estos individuos mutantes. En individuos WT, los distintos estadios de la profase meiótica se pueden clasificar gracias a la presencia de las proteínas de los elementos laterales (SYCP3) y del elemento central (SYCP1) del SC. Durante el estadio de leptoteno, cuando los elementos axiales empiezan a formarse, se pueden observar los primeros fragmentos de SYCP3. En el estadio de cigoteno, comienza la sinapsis de los cromosomas homólogos y se ensamblan los primeros fragmentos de SYCP1. En el estadio de paquiteno, la sinapsis entre los cromosomas homólogos ya se ha completado y ambas proteínas colocalizan. Finalmente, en el estadio de diploteno, los cromosomas desinapsan y solo se mantienen unidos gracias a los quiasmas (**Figura 4-9A**). En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-}, se observó que la sinapsis se inicia de manera normal en leptoteno y cigoteno, pero no se encontraron espermatoцитos con sinapsis completa en paquiteno (**Figura 4-9A**). Estos espermatoцитos fueron clasificados como paquiteno-like debido a que el SC está completamente desarrollado, presentan la acumulación de SYCP3 en los telómeros, conocido como *knob-like*, pero algunos bivalentes no logran sinapsar completamente (**Figura 4-9A**). En estos espermatoцитos se pudo observar como los cromosomas X e Y se encuentran

próximos o incluso sinapsados. La asinapsis de estos mutantes se localizó en los extremos de los bivalentes (puntas abiertas) y en porciones de asinapsis intersticial (burbujas) (**Figura 4-9A**). Para los posteriores análisis, este estadio será comparado con el paquiteno temprano de los individuos control al ser el espermatocito equivalente. La proporción de los distintos estadios de la profase meiótica se encontró completamente alterada en los mutantes *Trip13^{-/-}* en comparación con los ratones WT ($p < 0,0001$, G test). Hubo un exceso de espermatocitos en leptoteno y cigoteno y una acumulación de espermatocitos en paquiteno-like, indicando un bloqueo en la progresión de la profase meiótica (**Figura 4-9B**).

Si se compara las poblaciones de espermatocitos entre los distintos mutantes de *Trip13* utilizados en este estudio (*Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*), se pudo observar que el mutante hipomórfico *Trip13^{mod/mod}* presenta bloqueo meiótico y solo algunos espermatocitos logran progresar hasta diploteno, como se describió anteriormente (Roig et al., 2010). En este mutante, como se ha comentado en secciones anteriores, hay dos poblaciones de espermatocitos en paquiteno. Además de los espermatocitos en paquiteno que completan correctamente la sinapsis (*escapers*), hay otra población de espermatocitos en paquiteno que no consiguen sinapsar completamente los bivalentes (**Figura 4-9B**) y presentan defectos en la sinapsis. La proporción de los distintos estadios de la profase meiótica del mutante *Trip13^{mod/mod}* fue significativamente distinta si se compara con los ratones WT ($p < 0,0001$, G test).

Los espermatocitos *Trip13^{sev/sev}*, en cambio, no son capaces de sinapsar correctamente e igual que ocurre en el mutante *Trip13^{-/-}*, presentan defectos en la sinapsis (**Figura 4-9B**) (Roig et al., 2010). El estadio más tardío que se encontró en los mutantes *Trip13^{sev/sev}* también fue el paquiteno-like. La proporción de los estadios de la profase meiótica entre el mutante *Trip13^{-/-}* y el mutante *Trip13^{sev/sev}* fue muy similar ($p = 0,48$, G test). Estos resultados indican que TRIP13 es indispensable para completar la profase meiótica.

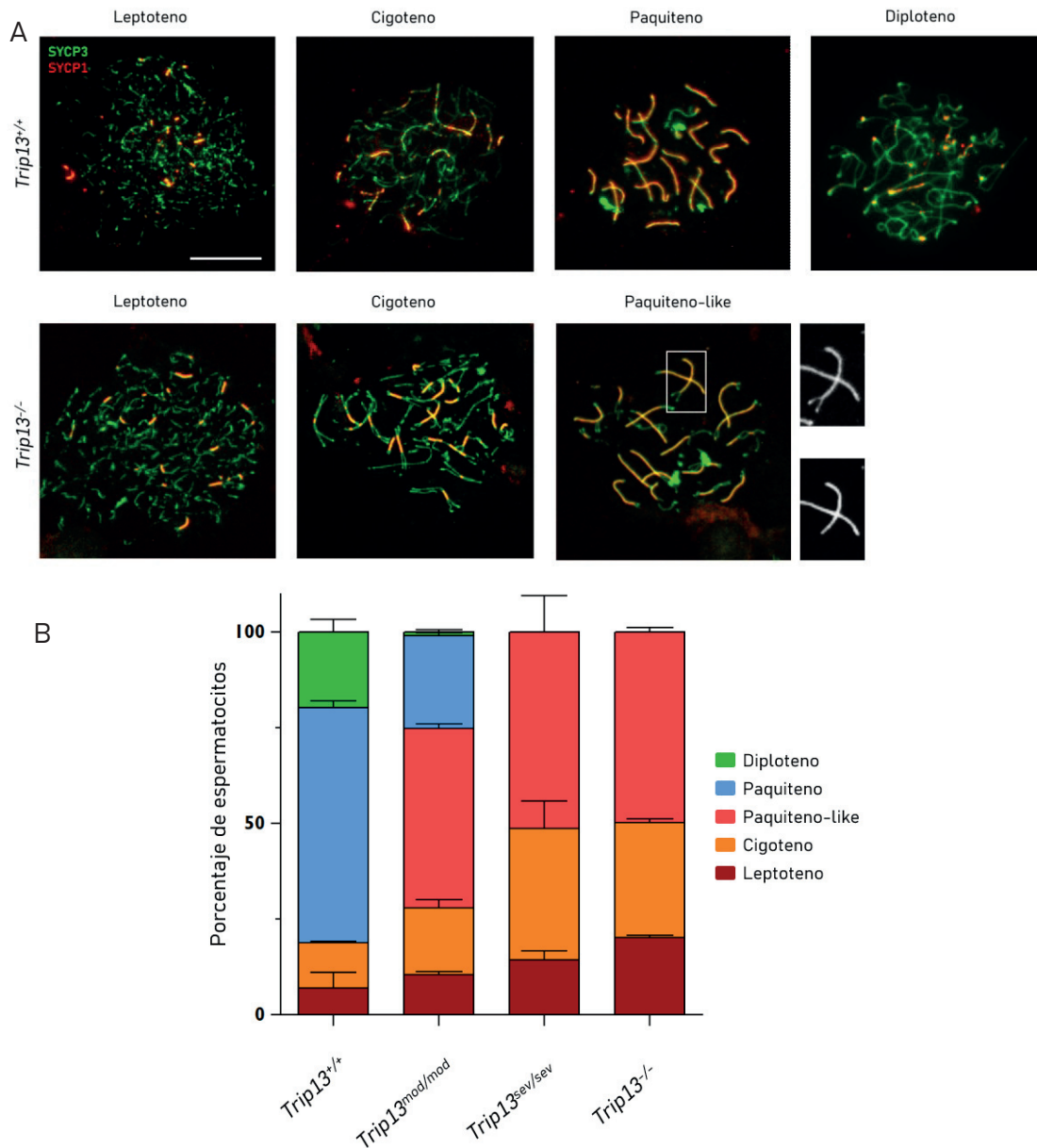


Figura 4-9. Los espermatocitos *Trip13^{-/-}* no progresan más allá de paquiteno-like. A) Imágenes representativas de espermatocitos de *Trip13^{+/+}* y *Trip13^{-/-}* marcados contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo), en los que se observa la progresión de los distintos estadios de la profase meiótica. La progresión de la sinapsis en el mutante *Trip13^{-/-}* en leptoteno y cigoteno comienza igual que en los espermatocitos WT. El estadio más avanzado que se encuentra en el mutante *Trip13^{-/-}* es un espermatocito con abundante asinapsis, el paquiteno-like. En las imágenes magnificadas del recuadro se observa la acumulación *knob-like* de SYCP3 en los telómeros. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de espermatocitos en los distintos estadios de la profase meiótica. Se contaron 400 espermatocitos por genotipo.

4.2.1.2 Los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} acumulan HORMAD1 en las porciones sinapsadas del SC

TRIP13 tiene la capacidad de interactuar con proteínas con dominio HORMA como HORMAD1 y HORMAD2, las cuales forman parte del eje cromosómico, y promueve su depleción una vez se ha producido la sinapsis (Wojtasz et al., 2009). Para analizar como la ausencia de TRIP13 afecta a la depleción de estas proteínas de los ejes, se analizó mediante inmunofluorescencia contra SYCP3 y HORMAD1 en espermatoцитos WT y *Trip13*^{-/-} (**Figura 4-10**). En los ratones WT, HORMAD1 aparece en leptoteno formando fragmentos cortos en los ejes cromosómicos y colocalizando con SYCP3. En cigoteno tardío, HORMAD1 colocaliza con las regiones asinapsadas y desaparece de las porciones sinapsadas cuando se completa la sinapsis. En las porciones sinapsadas del SC la señal de HORMAD1 es muy tenue. En paquiteno, la señal de HORMAD1 solo se observa en las porciones asinapsadas de los cromosomas X e Y con una señal muy intensa. En diploteno, HORMAD1 vuelve a cargarse en las porciones desinapsadas, y la señal intensa en los cromosomas sexuales persiste (**Figura 4-10A**) (Wojtasz et al., 2009). En el caso del mutante *Trip13*^{-/-}, HORMAD1 se cargó en los ejes cromosómicos en el estadio de leptoteno. En cigoteno, HORMAD1 se mostró en las regiones asinapsadas, pero también hubo una persistencia de una señal muy intensa de HORMAD1 en las porciones sinapsadas que se mantuvo también en paquiteno-like (**Figura 4-10B**). Estos resultados confirman que TRIP13 es necesaria para retirar la proteína HORMAD1 de los ejes sinapsados de los cromosomas homólogos, como ya se había descrito previamente (Wojtasz et al., 2009, Roig et al., 2010).

4.2.1.3 La recombinación meiótica se encuentra alterada en el mutante *Trip13*^{-/-}

La recombinación meiótica se inicia en leptoteno cuando la proteína SPO11 produce los DSBs (Keeney et al., 1997). Los DSBs se pueden detectar citológicamente gracias a la presencia de la histona H2AX fosforilada por ATM (γ H2AX) una vez se detecta el daño y comienza la cascada de reparación de los DSBs (Barchi et al., 2008; Boateng et al., 2013; Lange et al., 2011). La reparación de los DSBs se puede monitorizar indirectamente mediante la inmunodetección de distintas proteínas que actúan en este proceso, como γ H2AX, RAD51 y RPA.

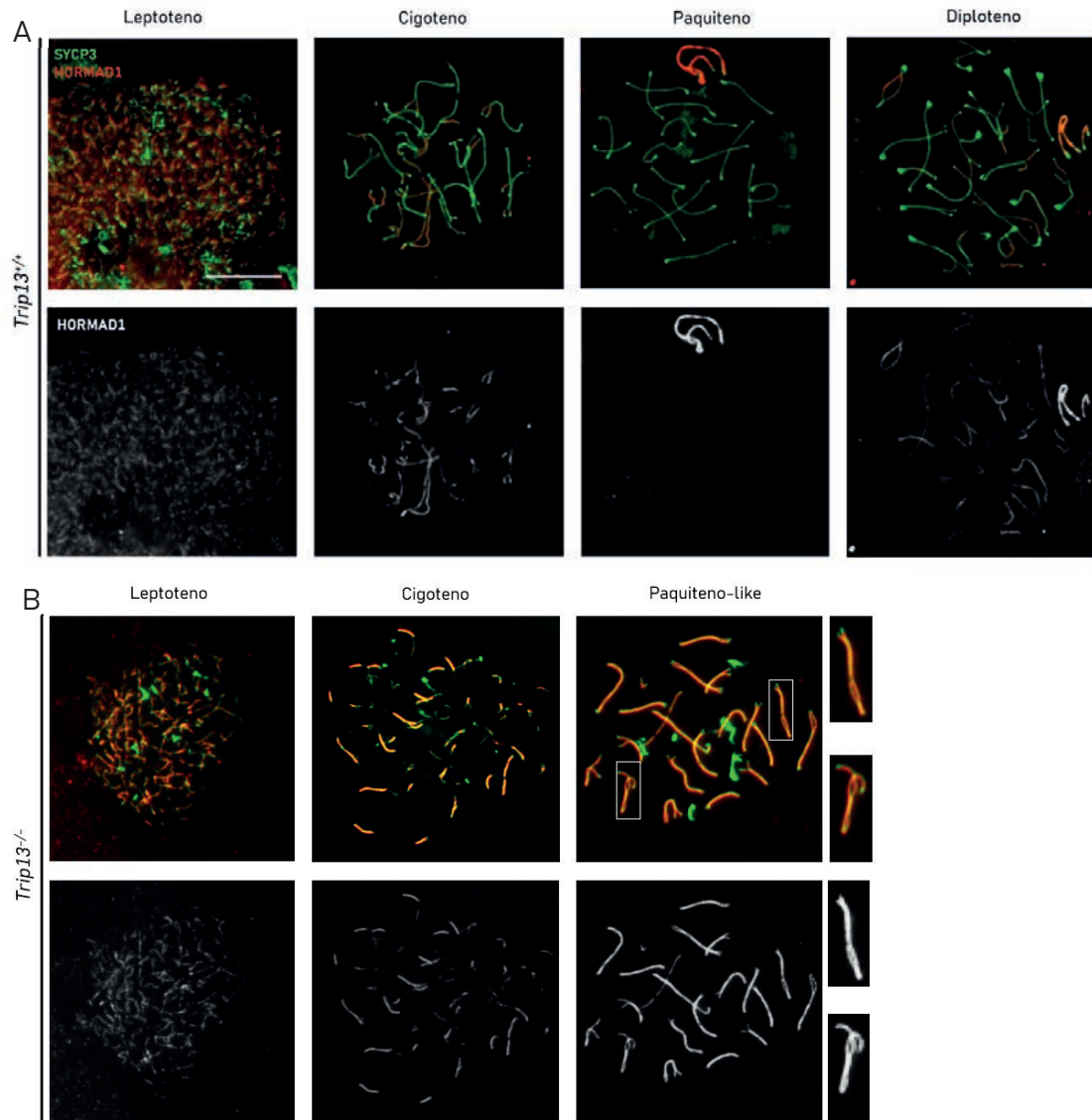


Figura 4-10. Los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} acumulan HORMAD1 en las porciones sinapsadas del SC. Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en espermatoцитos *Trip13*^{+/+} y *Trip13*^{-/-}. **A)** En los ratones WT, en leptoteno y cigoteno, HORMAD1 se asocia con los ejes asinapsados. En paquiteno, los ejes sinapsados no poseen HORMAD1 y la señal queda recluida a las porciones asinapsadas de los cromosomas X e Y, mostrando una señal muy intensa. En diploteno, HORMAD1 vuelve a cargar en las porciones desinapsadas de los autosomas y la señal persiste en los cromosomas X e Y. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** En el mutante *Trip13*^{-/-}, la señal de HORMAD1 persiste tanto en las porciones sinapsadas y asinapsadas en cigoteno y paquiteno-like. En las imágenes magnificadas en los recuadros se observa acumulación de HORMAD1 tanto en las regiones sinapsadas del SC como en porciones asinapsadas de las burbujas y en las puntas abiertas.

Se analizó la reparación de los DSBs mediante una inmunofluorescencia contra la proteína γ H2AX en espermatoцитos WT y *Trip13*^{-/-} (**Figura 4-11**). En los espermatoцитos WT, γ H2AX aparece en leptoteno como una señal extendida por toda la cromatina, marcando los DSBs producidos por SP011. En cigoteno temprano, cuando los elementos axiales empiezan a sinapsar, γ H2AX sigue localizado por toda la cromatina. A partir de cigoteno tardío, γ H2AX va desapareciendo progresivamente de la cromatina y de los autosomas mientras se reparan los DSBs y solo se asocia a aquellas regiones que permanecen asinapsadas. En paquiteno y diploteno, cuando ya se han reparado los DSBs de los autosomas, γ H2AX se encuentra confinada en los cromosomas X e Y formando la vesícula sexual (**Figura 4-11A**). En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-}, en leptoteno y cigoteno, la dinámica de γ H2AX fue similar a los espermatoцитos WT. En cambio, los espermatoцитos en paquiteno-like acumularon γ H2AX en los cromosomas homólogos, tanto en las porciones sinapsadas como asinapsadas. No se formó una vesícula sexual funcional (**Figura 4-11B**). La persistencia de γ H2AX en los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} se describió anteriormente en los mutantes de *Trip13* (Roig et al., 2010). Estos resultados indican que los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} no son capaces de reparar correctamente los DSBs.

RPA recubre los fragmentos de ssADN producto de la resección de los DSBs, evento necesario para promover la carga de RAD51 y DMC1 (Moens et al., 2002). RAD51 y DMC1 reemplazan rápidamente a RPA y permiten la búsqueda e invasión de la hebra homóloga para así producir la recombinación homóloga. Con el marcaje de RAD51 y RPA se permite monitorear como se reparan los DSBs. Así pues, se analizó la progresión de la reparación de los DSBs en el mutante *Trip13*^{-/-} estudiando la presencia de RAD51 en los distintos estadios de la profase meiótica, y comparándolo con lo que ocurre en los espermatoцитos WT (**Figura 4-12, Tabla 4-1**). En los ratones WT (**Figura 4-12A**), RAD51 aparece en leptoteno y se acumula en cigoteno temprano alcanzando su pico máximo con alrededor de 137 foci por célula (**Figura 4-12C, Tabla 4-1**). A medida que la reparación de los DSBs se completa, los foci de RAD51 van disminuyendo hasta que en paquiteno se encuentran confinados principalmente en los cromosomas X e Y (**Figura 4-12C, Tabla 4-1**).

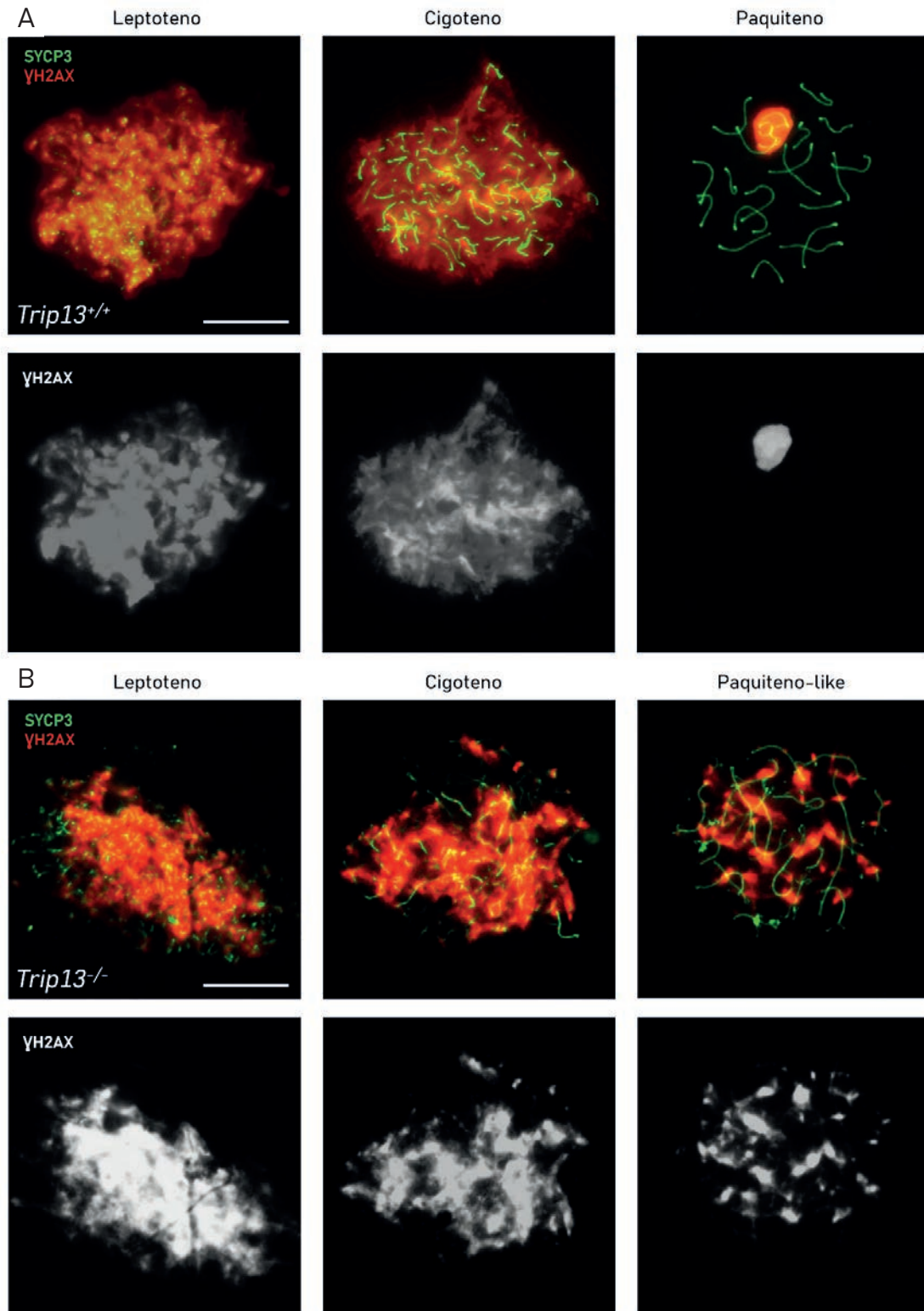


Figura 4-11. Los espermatocitos *Trip13*^{-/-} acumulan DSBs sin reparar en paquiteno-like. Imágenes representativas de espermatocitos *Trip13*^{+/+} y *Trip13*^{-/-} marcados contra SYCP3 (verde) y γH2AX (rojo) **A)** En los espermatocitos WT, en leptoteno y cigoteno la señal de γH2AX aparece extendida por toda la cromatina marcando los DSBs producidos por SPO11. Una vez los DSBs se han reparado, en paquiteno la señal de γH2AX persiste en los cromosomas X e Y formando la vesícula sexual. **B)** En los espermatocitos *Trip13*^{-/-}, en leptoteno y cigoteno, presentan señal de γH2AX que marca los DSBs igual que ocurre en los espermatocitos WT. En paquiteno-like persiste la señal de γH2AX en los cromosomas, indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Las barras de escala equivalen a 10 μm.

En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} (**Figura 4-12B**), en leptoteno temprano ($p < 0,0001$, T de Student), leptoteno tardío ($p = 0,0097$, T de Student) y cigoteno temprano ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-12C, Tabla 4-1**) se observó una disminución de los focos de RAD51 comparado con los controles, tal y como se había descrito previamente en los mutantes *Trip13*^{mod/mod} y *Trip13*^{sev/sev} (Roig et al., 2010). En cigoteno tardío ($p < 0,0001$, T de Student) y paquiteno-like ($p < 0,0001$, T de Student) en cambio, los espermatoцитos presentaron una mayor acumulación de RAD51 en los autosomas del mutante *Trip13*^{-/-} (**Figura 4-12C, Tabla 4-1**), consistente con la señal persistente de γ H2AX observada (**Figura 4-11B**). Como ya se describió anteriormente, en los mutantes hipomórficos de *Trip13*, los DSBs se forman en una cantidad normal y en el mismo momento que en los espermatoцитos WT, y TRIP13 es necesaria para la carga de RAD51 a los DSBs (Pacheco et al., 2015; Roig et al., 2010).

Lo siguiente que se analizó fue la acumulación de RPA en los espermatoцитos (**Figura 4-13, Tabla 4-1**). RPA actúa después de la resección de los DSBs, uniéndose a los ssADN para luego ser reemplazado por RAD51/DMC1 (Moens et al., 2002). En los espermatoцитos WT (**Figura 4-13A**), RPA presentó su pico máximo en leptoteno tardío con alrededor de 207 focos, y fue disminuyendo paulatinamente su número a lo largo de la profase. En paquiteno temprano, hay una población abundante de RPA, que marca principalmente los *D-loops* (**Figura 4-13C, Tabla 4-1**). En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} (**Figura 4-13B**) se observó una disminución de focos de RPA en leptoteno temprano ($p = 0,0117$, T de Student), leptoteno tardío ($p < 0,0001$, T de Student), cigoteno temprano ($p < 0,0001$, T de Student) y cigoteno tardío ($p < 0,0001$, T de Student) comparado con los focos de los espermatoцитos WT. En los paquiteno-like del mutante *Trip13*^{-/-} en cambio, los focos de RPA fueron más abundantes comparado con los espermatoцитos en paquiteno temprano de los ratones WT ($p = 0,0185$, T de Student) (**Figura 4-13C, Tabla 4-1**). Mientras que en los espermatoцитos WT, los focos de RPA disminuyen a lo largo de la profase meiótica, en el mutante *Trip13*^{-/-}, los focos de RPA se mantienen estables entre leptoteno y paquiteno-like indicando que la reparación de los DSBs se ve alterada. Por otro lado, que los focos de RPA sean menos abundantes desde un inicio en los mutantes *Trip13*^{-/-} indica menor carga de RPA a los ssADN. La persistencia de focos de RAD51, RPA y γ H2AX en los espermatoцитos en paquiteno-like indican que la progresión de la reparación de los DSBs se encuentra alterada en los mutantes *Trip13*^{-/-}.

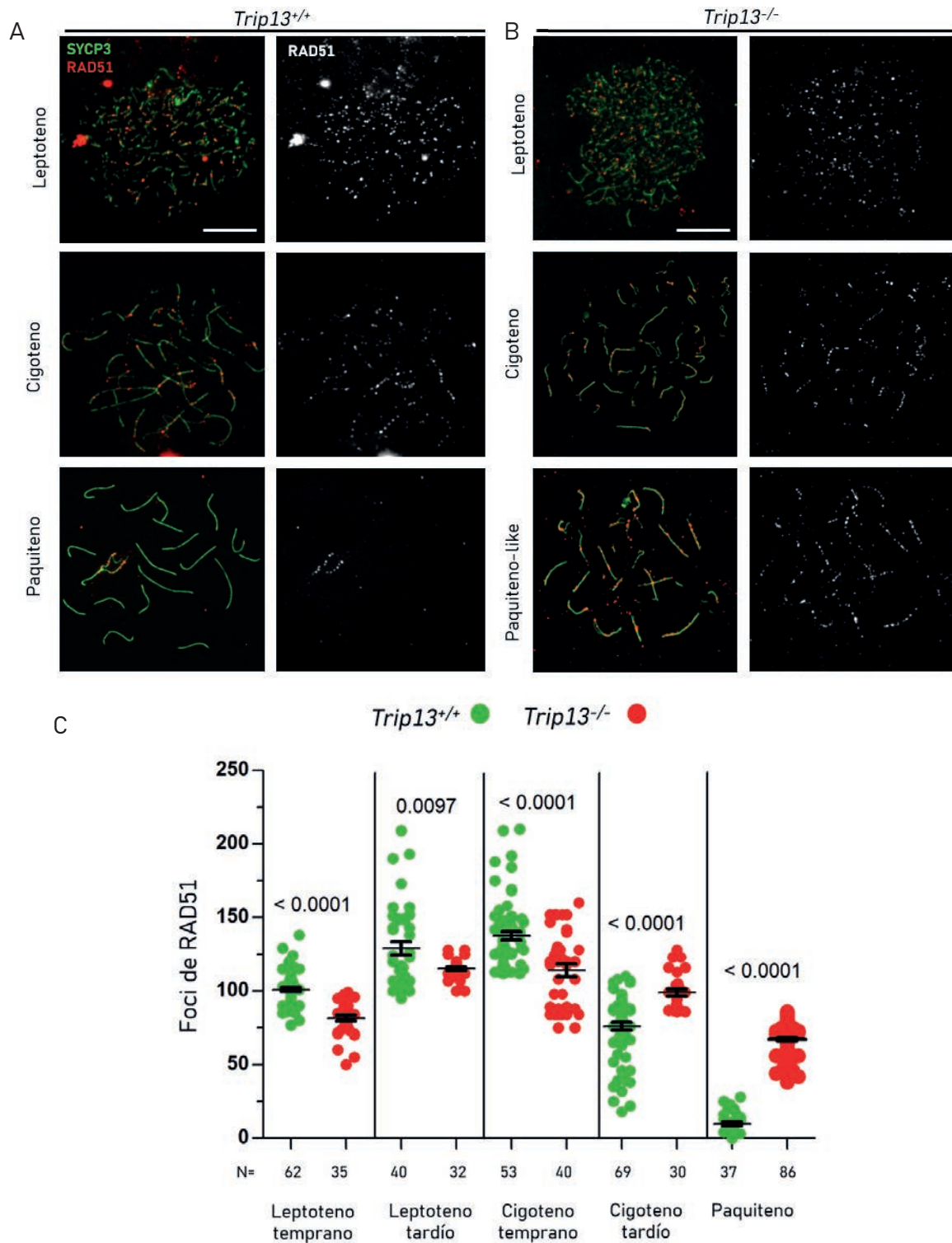


Figura 4-12. La dinámica de RAD51 se encuentra alterada en los espermatocitos *Trip13^{-/-}*. A y B) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RAD51 (rojo) en espermatocitos WT y *Trip13^{-/-}* respectivamente durante la profase meiótica. La barra de escala equivale a 10 μ m. C) Cuantificación de los foci de RAD51 por espermatocito en el estadio indicado. Se aprecia una disminución de los foci en el mutante *Trip13^{-/-}* en leptoteno temprano, leptoteno tardío y cigoteno temprano. A partir de cigoteno tardío y en el paquiteno-like del mutante *Trip13^{-/-}* se observa una persistencia de foci de RAD51 indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

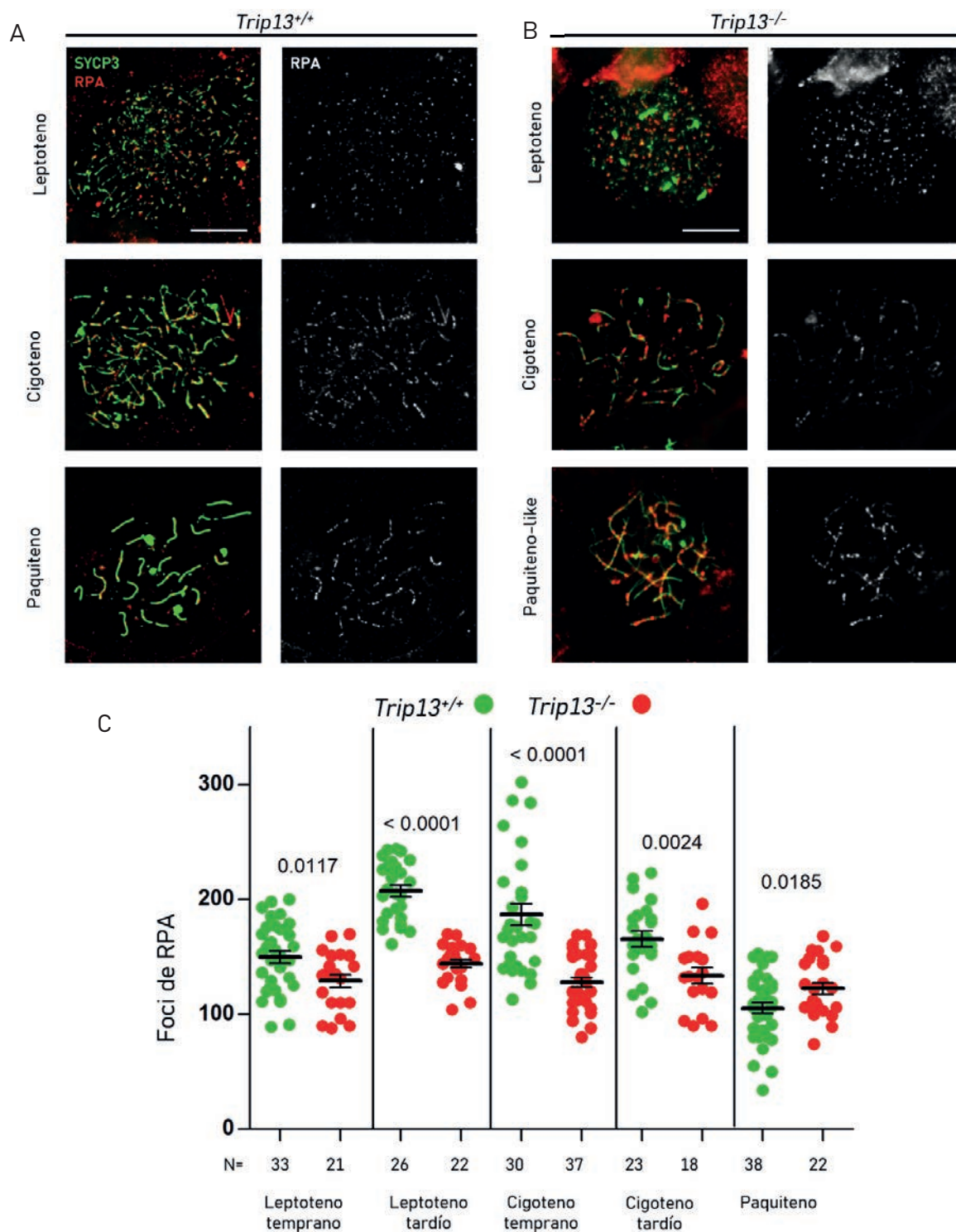


Figura 4-13. La dinámica de RPA se encuentra alterada en los espermatoцитos *Trip13^{-/-}* A y B) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RPA (rojo) en espermatoцитos WT y *Trip13^{-/-}* respectivamente durante la profase meiótica. La barra de escala equivale a 10 μ m. C) Cuantificación de los foci de RPA por espermatoцитo en el estadio indicado. Se aprecia una disminución de los foci en el mutante *Trip13^{-/-}* en leptoteno y cigoteno. En los espermatoцитos *Trip13^{-/-}* en paquiteno-like se observa una mayor acumulación de foci de RPA comparado con los espermatoцитos WT en paquiteno temprano indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

Tabla 4-1. Número de foci presentes en los espermatozoides del estadio indicado en los individuos WT y mutantes *Trip13^{-/-}*. Se muestran los datos de RAD51 y RPA. Se presenta el promedio de foci junto a la SD del número de foci. La N corresponde al número de núcleos analizados.

		Leptoteno temprano	Leptoteno tardío	Cigoteno temprano	Cigoteno tardío	Paquiteno temprano / Paquiteno-like
RAD51	WT	101,1 ± 1,506 N=62	129,0 ± 4,535 N=40	137,6 ± 2,891 N=64	76,23 ± 2,587 N=69	9,757 ± 1,087 N=37
	<i>Trip13^{-/-}</i>	81,74 ± 2,045 N=35	115,2 ± 1,165 N=32	114,1 ± 4,232 N=40	99,07 ± 2,231 N=30	67,48 ± 1,249 N=86
RPA	WT	149,8 ± 5,252 N=33	207,4 ± 5,001 N=26	186,8 ± 9,448 N=30	165,5 ± 6,856 N=23	105,3 ± 4,643 N=38
	<i>Trip13^{-/-}</i>	129,1 ± 5,535 N=21	144,1 ± 3,664 N=22	127,8 ± 3,853 N=37	133,3 ± 7,019 N=18	122,5 ± 5,088 N=22

4.2.2 Caracterización fenotípica del mutante *Trip13^{ATPasaDead}*

TRIP13 pertenece a la familia de las AAA⁺ ATPasas, forma un anillo hexamérico (C. Chen et al., 2014) y usa la energía de la hidrólisis del ATP para cambiar la conformación de sus proteínas diana (Snider et al., 2008). La función ATPasa de TRIP13 es importante para controlar las funciones de Pch2 (C. Chen et al., 2014). Estudios en levadura han demostrado que la actividad ATPasa de Pch2 es crítica para controlar las funciones durante el *checkpoint* meiótico (Herruzo et al., 2016). En ese estudio se generaron dos mutantes para afectar a la función ATPasa: uno de los mutantes se generó mediante la sustitución de la lisina 320 por alanina, mutando el motivo para la unión del ATP (Pch2-K320A). El otro mutante fue generado mediante la sustitución de ácido glutámico 399 por glutamina y se vio afectado el motivo requerido para la hidrólisis del ATP (Pch2-E399Q). Ambas mutaciones fenocopiaron el fenotipo del mutante Pch2 durante el *checkpoint*, pero lo que difería era la localización de las proteínas. Mientras que en el mutante Pch2-E399Q la proteína se localizó en el rADN del nucleolo y formando foci en el SC (de igual manera que lo hace Pch2), en el mutante Pch2-K320A la proteína no se unió a los cromosomas. Además, Pch2-E399Q colocalizó con Hop1 en los cromosomas, evidenciando que es necesaria la hidrólisis del ATP para excluir Hop1 de los ejes cromosómicos (Herruzo et al., 2016). En *C. elegans* se generó un mutante que sí puede unirse a sus sustratos y al ATP, pero no hidrolizarlo (*pch-2^{E253Q}*). Este

mutante fenocopió al mutante de pch-2 y al mutante de CMT-1 (p31^{comet} en mamífero), sugiriendo que se necesita tanto de CMT-1 como de la hidrólisis del ATP para retirar HORMAD de los ejes (Giacopazzi et al., 2020). Estudios *in vitro* con la proteína humana incapaz de hidrolizar ATP (*Trip13*^{E253Q}) también han demostrado que la actividad catalítica de TRIP13 es necesaria para remodelar proteínas con dominio HORMA como REV7 y HORMAD1 (de Krijger et al., 2021; Ye et al., 2017).

Por todos estos antecedentes, quisimos analizar qué funciones de TRIP13 dependen de la función ATPasa en la meiosis de ratón, así que generamos el modelo murino *Trip13*^{ATPasaDead} en colaboración con el laboratorio del Dr. Alberto Pendás (CIC-CSIC, Salamanca).

4.2.2.1 Expresión de TRIP13 en el mutante *Trip13*^{ATPasaDead}

Mediante la tecnología CRISPR/Cas9, se hizo una sustitución de un nucleótido en el residuo 253 de la proteína, produciendo un cambio de aminoácido, de ácido glutámico a glutamina (**Figura 4-15A**), mutación que bloquea la actividad catalítica de TRIP13 (de Krijger et al., 2021). Se realizaron un total de tres sesiones de microinyecciones de embriones. En la primera inyección, se hizo una transferencia de 11 embriones en estadio de 2 células por hembra. En la segunda, se hicieron dos transferencias (23 embriones en estadio de 1 célula) y en la tercera se hicieron dos transferencias (23 embriones en estadio de 2 células). De la primera microinyección nació un único ratón que murió antes de ser destetado, en la segunda no nació ningún ratón y finalmente de la tercera nacieron 11 ratones. De los 11 ratones que nacieron, 8 de ellos presentaban ediciones no deseadas (flanqueando la zona de la mutación puntual o también alelos WT sin editar). Se obtuvieron 3 ratones fundadores (dos machos y una hembra) que presentaron la mutación deseada en heterocigosis. El genotipado se hizo mediante PCR de ADN de la cola, y su genotipo fue *Trip13*^{+/E253Q}, pero se le nombrará como *Trip13*^{ATPasaDead} para facilitar la lectura. El cruce de estos animales con ratones salvajes por más de 4 meses no generó descendencia. Por esta razón, se analizó el fenotipo de las ratones fundadoras. Uno de los machos murió antes de poder ser analizado, y solo se pudieron analizar el macho y la hembra fundadores restantes. Ambos ratones resultaron ser estériles. El análisis histológico de los ovarios de la hembra fundadora mostró una depleción completa de la reserva folicular (**Figura 4-14**).

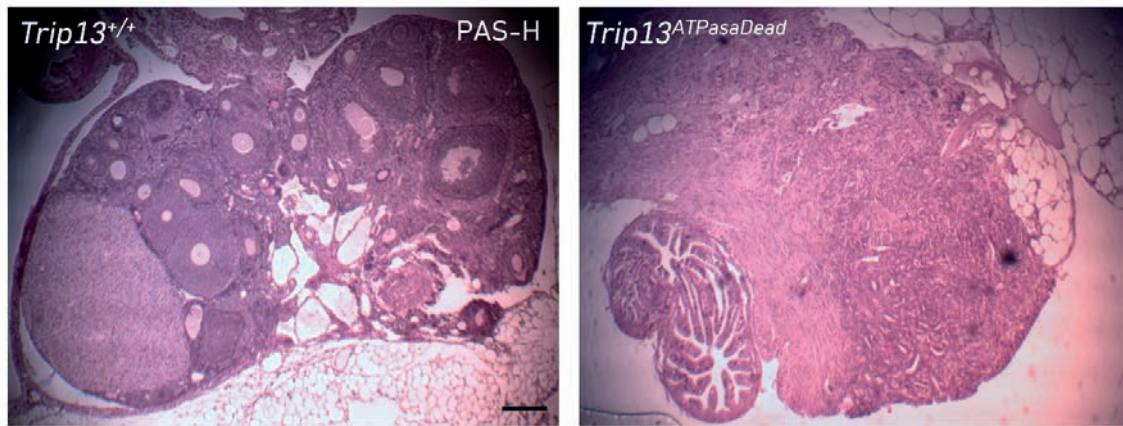


Figura 4-14. Análisis histológico de secciones de ovario de hembras WT y *Trip13*^{ATPasaDead}. Secciones de ovario de ratón adulta de WT y de la mutante *Trip13*^{ATPasaDead} con la tinción PAS-Hematoxilina. Las secciones del ovario de la *Trip13*^{ATPasaDead} muestran una depleción completa de folículos mientras que las secciones de ovario de la hembra WT presentan folículos en distinto grado de desarrollo. La hembra usada como control proviene de la colonia de *Trip13*^{-/-}. La barra de escala equivale a 200µm.

Para caracterizar con más detalle la mutación en los testículos, a partir del ARN extraído de uno de los testículos del macho fundador (**Figura 4-15B**), se amplificaron los dos alelos, se clonaron y se secuenciaron por método Sanger. El análisis reveló la presencia de dos alelos distintos: uno contenía la sustitución deseada de ácido glutámico por glutamina en la posición 253. El otro alelo en cambio no fue alelo salvaje, si no que presentaba una deleción de 3 nucleótidos causando la pérdida del aminoácido ácido aspártico. Este resultado fue una discrepancia entre el genotipo del ADN de la cola con el genotipo de los testículos, quizás debido al efecto de microinyectar en estadio de dos células (**Figura 4-15C**). Se comprobó la expresión de TRIP13 mediante WB en un extracto proteico de testículo del mutante *Trip13*^{ATPasaDead} y se comparó con extractos de testículo WT. La banda de TRIP13 en el extracto WT y del mutante *Trip13*^{ATPasaDead} apareció alrededor de 50 kDa. En el testículo *Trip13*^{ATPasaDead} hubo expresión de TRIP13, pero en menor cantidad, posiblemente debido a que en este mutante, al ser estéril, presentó una ausencia de poblaciones postmeióticas (las cuales expresan TRIP13) que sí se encuentran presentes en los individuos WT (**Figura 4-15D**). Estos datos confirman que hay expresión de TRIP13 en los testículos del mutante *Trip13*^{ATPasaDead}.

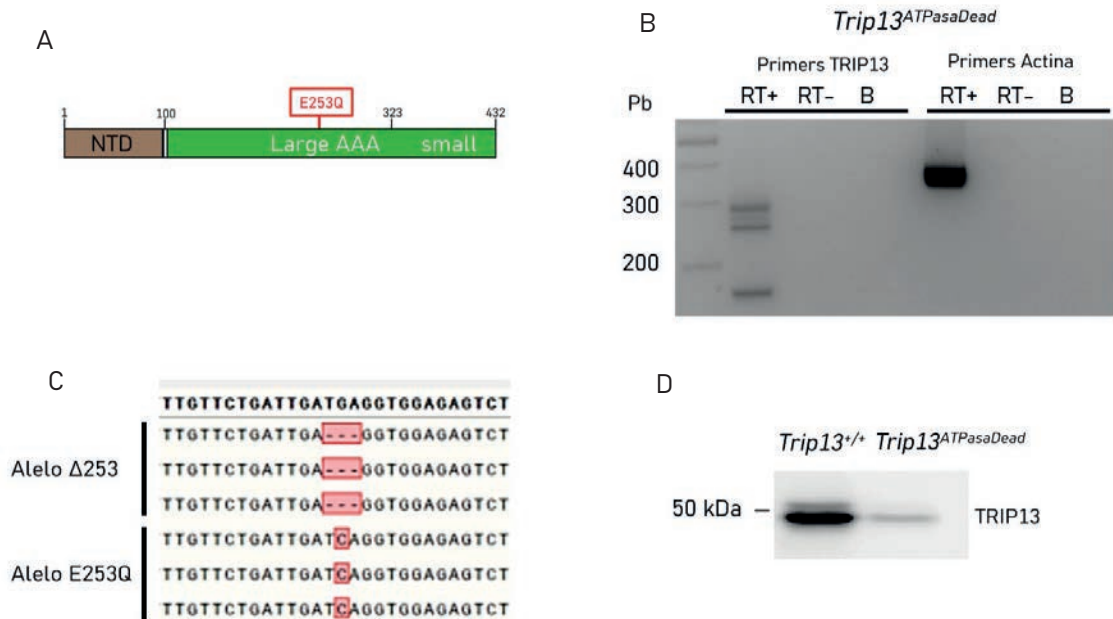


Figura 4-15. Análisis del fenotipo del mutante *Trip13^{ATPaseDead}*. **A)** Representación esquemática de la mutación introducida mediante CRISPR/Cas9 que consiste en la sustitución de un ácido glutámico por glutamina en la posición 253 de la proteína. **B)** RT-PCR en el mutante *Trip13^{ATPaseDead}*. **C)** Secuenciación por método Sanger de los alelos clonados y amplificados. Se muestran 3 clones del alelo $\Delta 253$ en los que se puede observar la delección de 3 nucleótidos. Se muestran 3 clones del alelo E253Q en los que se puede observar la sustitución de un nucleótido, causando la sustitución del ácido glutámico por glutamina. **D)** Detección de TRIP13 mediante WB de extractos proteicos de testículo procedentes de ratones adultos de WT (colonia *Trip13^{-/-}*) y del mutante *Trip13^{ATPaseDead}* con el anticuerpo frente a TRIP13. La banda de TRIP13 aparece alrededor de 50 kDa, a 49 kDa es el tamaño esperado. El mutante *Trip13^{ATPaseDead}* presenta menor cantidad de proteína.

4.2.2.2 La localización de TRIP13 no se ve alterada en los espermatoцитos *Trip13^{ATPaseDead}*

A partir del resultado de la secuenciación de los alelos y de la detección de TRIP13 en el testículo del mutante *Trip13^{ATPaseDead}*, se comprobó la localización de la proteína en los espermatoцитos *Trip13^{ATPaseDead}* mediante IF contra TRIP13 y SYCP3. Como se ha descrito en secciones anteriores, en espermatoцитos WT, TRIP13 se localiza en los telómeros durante toda la profase meiótica y en el SC en cigoteno tardío y sobre todo en paquiteno temprano (**Figura 4-2**). En los espermatoцитos *Trip13^{ATPaseDead}*, TRIP13 también se localizó en los telómeros en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. También se observó en las porciones sinapsadas a lo largo del SC formando foci continuos (**Figura 4-16**).

Además, hubo una acumulación precoz de la proteína en los ejes sinapsados ya que apareció desde cigoteno temprano. La señal en los ejes sinapsados de los espermatocitos en cigoteno y paquiteno-like fue mucho más intensa y clara que la que se pudo observar en los espermatocitos WT (**Figura 4-2**). También hubo algunos espermatocitos en paquiteno-like que, a pesar de presentar la señal de TRIP13 en algunos telómeros, no presentaron ninguna señal en las porciones sinapsadas del SC. En estos casos, la señal en los telómeros fue mucho más tenue que en los espermatocitos que presentaban acumulación de TRIP13 en telómeros y en los ejes sinapsados (**Figura 4-16**). Esto indica que la mutación afecta de distinta manera a los espermatocitos. Estos resultados indican que la localización de TRIP13 en los espermatocitos depende de la función ATPasa de TRIP13, y en su ausencia, se acumula mayor cantidad de TRIP13 en las porciones sinapsadas del SC.

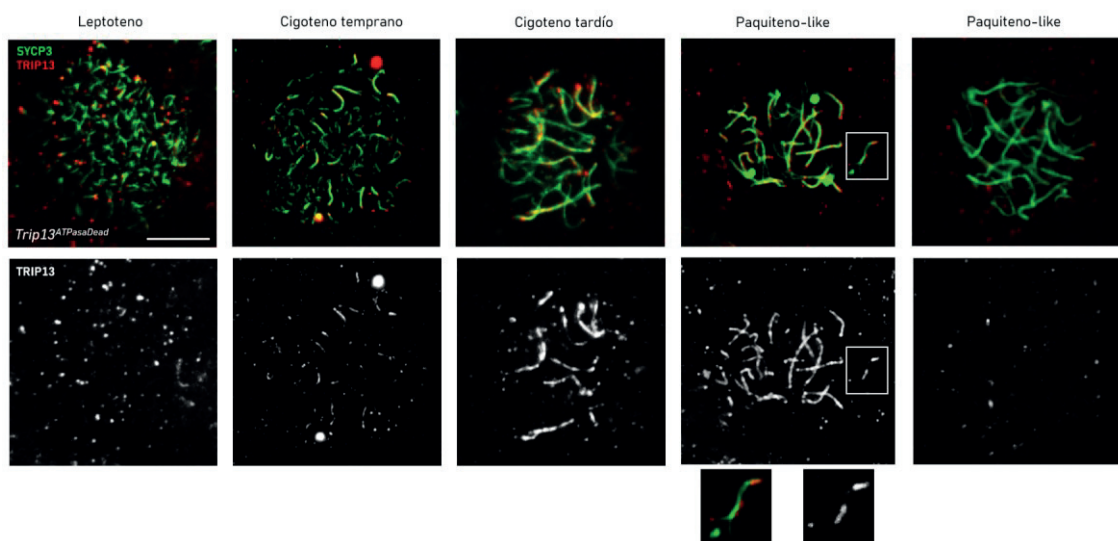


Figura 4-16. TRIP13 se localiza en las porciones sinapsadas del SC en espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}*. Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y TRIP13 (rojo) en extensiones de espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* desde leptoteno a paquiteno-like. Durante toda la profase meiótica se observa una señal intensa de TRIP13 localizada en los telómeros de los cromosomas homólogos. Desde cigoteno temprano hasta paquiteno-like además de la señal en los telómeros también se observa una localización de TRIP13 en los ejes sinapsados. En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestra la señal de TRIP13 en los telómeros y formando foci continuos a lo largo de las porciones sinapsadas del SC. En la última imagen de la derecha se muestra un espermatocito en paquiteno-like con señal tenue en los telómeros y ausencia de señal de TRIP13 en el SC. Barra de escala equivale a 10 μ m.

4.2.2.3 Los espermatoцитos *Trip13^{ATPasaDead}* no progresan más allá de paquiteno-like

A la vista de la esterilidad del macho fundador y a la localización de TRIP13 en los telómeros y en las porciones sinapsadas de los espermatoцитos *Trip13^{ATPasaDead}*, se examinó cómo se llevaba a cabo la progresión de la sinapsis en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*. De manera similar al mutante *Trip13^{-/-}*, el mutante *Trip13^{ATPasaDead}* presentó bloqueo meiótico y el estadio más tardío que se encontró en este mutante fue también un espermatoцитo en paquiteno-like, con abundante asinapsis, tanto en los extremo de los bivalentes, como en forma de burbujas (**Figura 4-17**). La progresión de la profase meiótica en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}* se encontró igualmente alterada, y el porcentaje de espermatoцитos en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like fue muy similar a los mutantes *Trip13^{-/-}* ($p= 0,77$, G test)(**Figura 4-17**). Estos resultados indican que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para la correcta progresión de la profase meiótica y la compleción de la sinapsis.

4.2.2.4 La función ATPasa de TRIP13 es necesaria para retirar las proteínas HORMAD de los ejes sinapsados

TRIP13 promueve la depleción de las proteínas HORMAD1 y HORMAD2 de los ejes cromosómicos una vez se ha producido la sinapsis (Wojtasz et al., 2009). En levadura, el mutante Pch2-E399Q presenta colocación de Pch2 con Hop1 en los cromosomas, evidenciando que la hidrólisis del ATP es necesaria para retirar Hop1 del SC (Herruzo et al., 2016). Para analizar como el bloqueo en la función ATPasa de TRIP13 afecta a la depleción de estas proteínas de los ejes cromosómicos, se analizó mediante inmunofluorescencia contra SYCP3 y HORMAD1 en los espermatoцитos *Trip13^{ATPasaDead}*. Como en el mutante *Trip13^{-/-}*, los espermatoцитos *Trip13^{ATPasaDead}* presentaron persistencia de una señal muy intensa de HORMAD1 tanto en las porciones sinapsadas como las asinapsadas de cigoteno y paquiteno-like (**Figura 4-18**). Estos resultados indican que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para retirar la proteína HORMAD1 de los ejes sinapsados de los cromosomas homólogos.

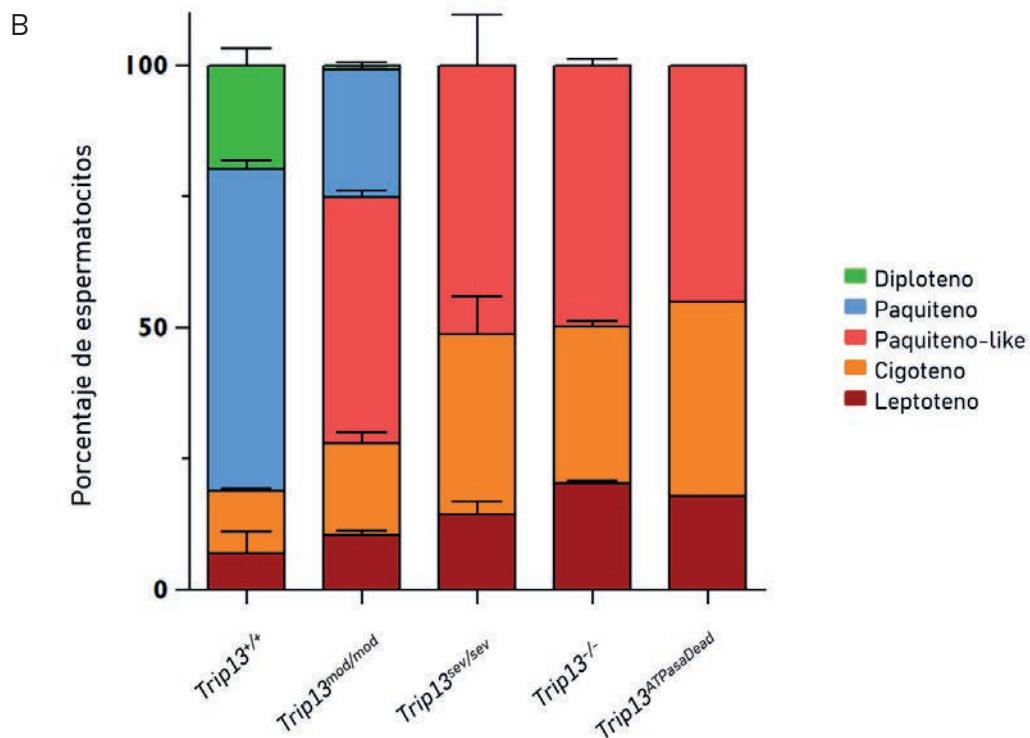
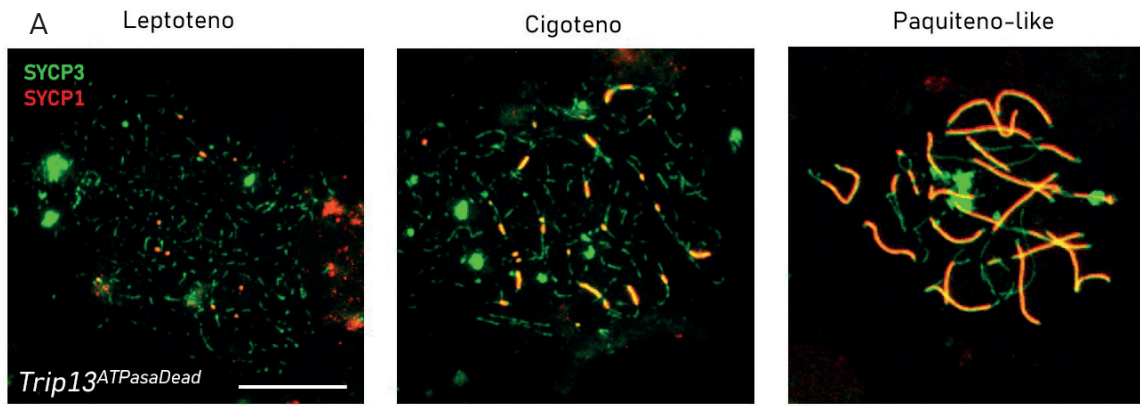


Figura 4-17. Los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* no progresan más allá de paquiteno-like. A) Imágenes representativas de espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* marcados contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo) en los que se observa la progresión de la sinapsis durante la profase meiótica. En los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* en leptoteno y cigoteno, la sinapsis comienza igual que en los espermatocitos WT y *Trip13^{-/-}*. El estadio más avanzado que se encuentra en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}* es el paquiteno-like. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico de barras mostrando el porcentaje de espermatocitos que se encuentran en los distintos estadios de la profase meiótica comparando los distintos mutantes de *Trip13* y WT.

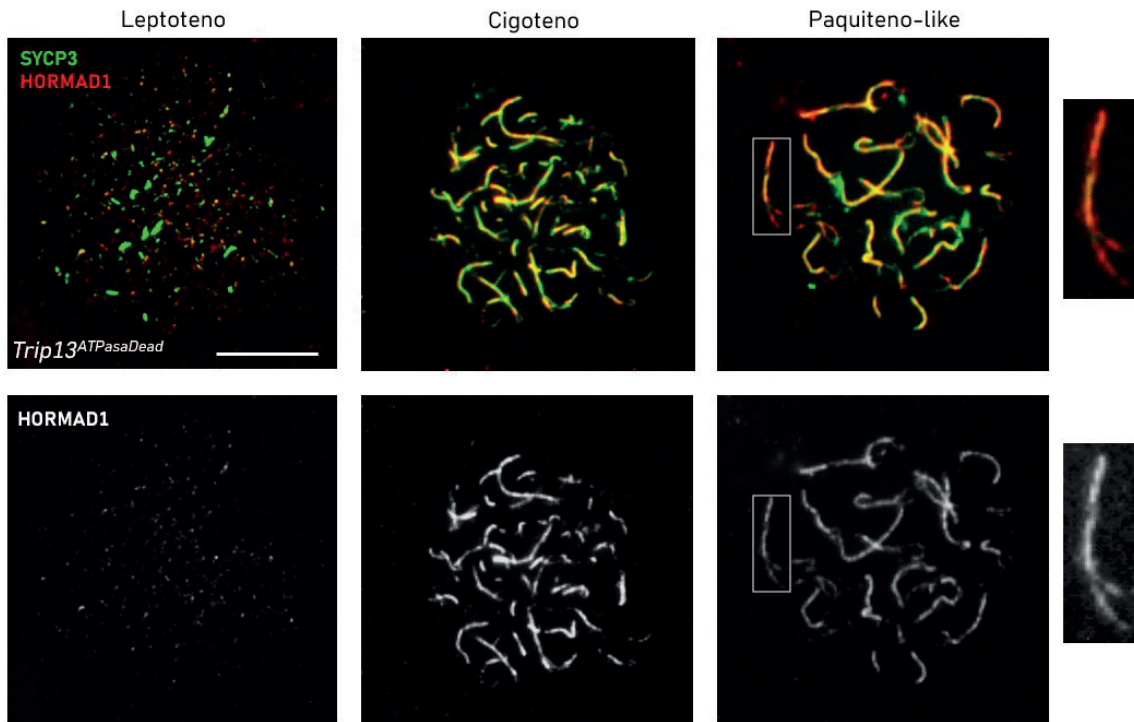


Figura 4-18. La función ATPasa de TRIP13 es necesaria para retirar HORMAD1 de los ejes sinapsados. Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en espermatocitos del mutante *Trip13^{ATPasaDead}*. La señal de HORMAD1 persiste tanto en los ejes sinapsados como en las porciones asinapsadas en cigoteno y paquiteno-like. En las imágenes magnificadas en los recuadros se muestra persistencia de la señal de HORMAD1 tanto en las regiones sinapsadas como en las burbujas y en las puntas abiertas. La barra de escala equivale a 10 μm .

4.2.2.5 Los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* no pueden reparar los DSBs en paquiteno-like

Como TRIP13 es necesaria para reparar los DSBs mediante recombinación meiótica, quisimos evaluar si la función ATPasa también participaba en la reparación de los DSBs. Por ello, se examinó cómo se llevaba a cabo la progresión de la reparación de los DSBs en los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}*. Lo primero que se examinó fue la dinámica de γH2AX . La acumulación inicial de γH2AX fue similar a lo que ocurre en los espermatocitos WT y *Trip13^{-/-}* (**Figura 4-11**) indicando que se producen los DSBs con normalidad en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*. De igual manera a lo que ocurre con los espermatocitos en paquiteno-like del mutante *Trip13^{-/-}*, se observó que los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* en paquiteno-like presentaron abundantes acúmulos de γH2AX en los autosomas (**Figura 4-19**).

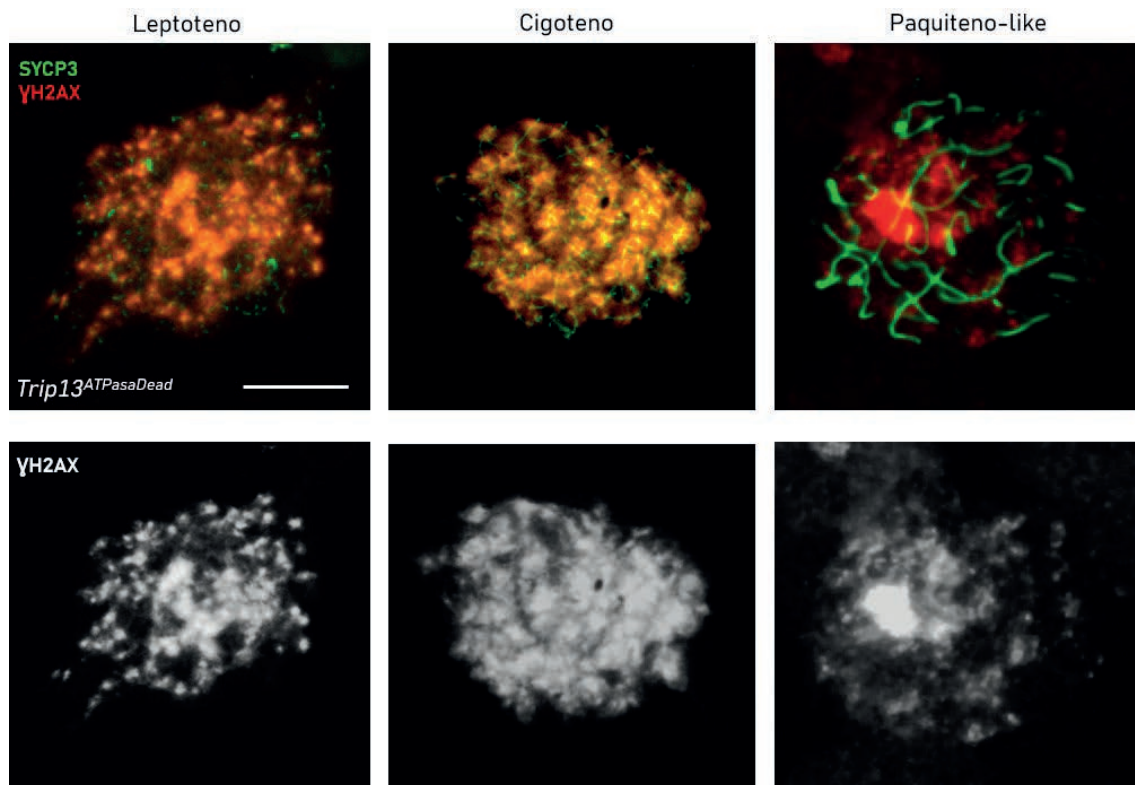


Figura 4-19. Los espermatoцитos $Trip13^{ATPasaDead}$ muestran persistencia de DSBs en paquiteno-like. Imágenes representativas de espermatoцитos $Trip13^{ATPasaDead}$ en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like marcados contra SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo). Los espermatoцитos del mutante $Trip13^{ATPasaDead}$ en leptoteno y cigoteno presentan señal de γ H2AX que marca los DSBs igual que ocurre en los espermatoцитos WT y $Trip13^{-/-}$. En los espermatoцитos $Trip13^{ATPasaDead}$ en paquiteno-like persiste la señal de γ H2AX en los autosomas indicando un defecto en la reparación de los DSBs. La barra de escala equivale a 10 μ m.

También se analizó la distribución de los foci de RAD51 (**Figura 4-20, Tabla 4-2**) y RPA (**Figura 4-21, Tabla 4-2**) en los espermatoцитos $Trip13^{ATPasaDead}$. Sorprendentemente, no se observaron diferencias en los estadios iniciales entre los foci de RAD51 en el mutante $Trip13^{ATPasaDead}$ y los espermatoцитos WT. A partir de cigoteno tardío ($p=0,0004$, T de Student) y paquiteno-like ($p<0,0001$, T de Student) se observó una acumulación de foci de RAD51, indicando un defecto en la reparación de los DSBs en el mutante $Trip13^{ATPasaDead}$ (**Figura 4-20B-C, Tabla 4-2**). Al contrario de lo que ocurrió en los espermatoцитos en estadios iniciales del mutante $Trip13^{-/-}$ (**Figura 4-11**), en el mutante $Trip13^{ATPasaDead}$ no se observaron diferencias entre el número de foci de RAD51 comparado con los espermatoцитos de los individuos usados como control, indicando que la función ATPasa de TRIP13 no es necesaria para controlar la carga de RAD51 en los estadios iniciales pero sí para reparar los DSBs en cigoteno tardío y paquiteno-like.

La dinámica de RPA mostró en los espermatoцитos *Trip13^{ATPasaDead}* que, de igual manera que ocurre con los focos de RAD51, en los estadios iniciales de la profase meiótica no hubo diferencias entre los focos de RPA en los espermatoцитos del mutante *Trip13^{ATPasaDead}* y los espermatoцитos WT. A partir de cigoteno tardío ($p < 0,0001$, T de Student) y en paquiteno-like ($p < 0,0001$, T de Student) sí que se observó una acumulación de focos de RPA indicando un defecto en la reparación de los DSBs en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}* (**Figura 4-21B-C, Tabla 4-2**). Los resultados de la acumulación de γ H2AX en los autosomas y la persistencia de focos de RAD51 y RPA en paquiteno-like en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}* indican que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para que se produzca la correcta reparación de los DSBs pero solo en los estadios avanzados de la profase meiótica.

Tabla 4-2. Número de focos presentes en los espermatoцитos del estadio indicado en los individuos WT y el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*. Se muestran los datos de RAD51 y RPA. Se presenta el promedio de focos junto a la SD del número de focos. La N corresponde al número de núcleos analizados.

		Leptoteno temprano	Leptoteno tardío	Cigoteno temprano	Cigoteno tardío	Paquiteno temprano / Paquiteno-like
RAD51	WT	131,0 ± 4,489 N=33	169,9 ± 7,348 N=35	192,9 ± 7,772 N=22	86,11 ± 5,148 N=27	27,37 ± 2,104 N=30
	<i>Trip13^{ATPasaDead}</i>	142,4 ± 9,372 N=14	182,6 ± 8,495 N=23	187,8 ± 7,544 N=24	126,5 ± 4,121 N=29	98,64 ± 4,478 N=28
RPA	WT	142,2 ± 7,095 N=20	208,2 ± 6,610 N=26	221,8 ± 8,330 N=38	155,7 ± 7,819 N=20	144,0 ± 5,555 N=36
	<i>Trip13^{ATPasaDead}</i>	137,2 ± 7,212 N=30	192,1 ± 5,202 N=20	221,5 ± 7,341 N=28	203,6 ± 4,076 N=31	198,9 ± 3,845 N=64

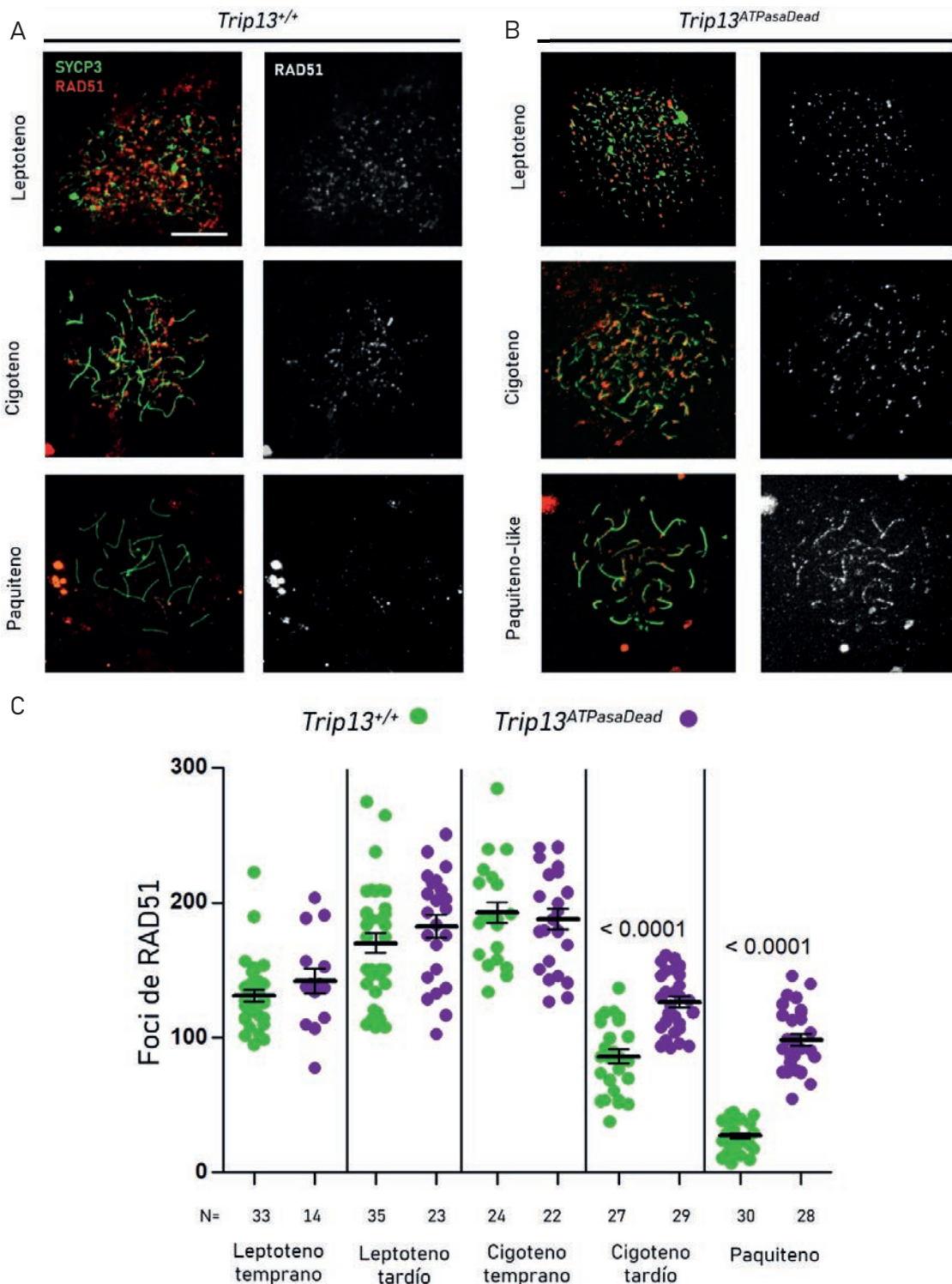


Figura 4-20. Los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* presentan persistencia de RAD51 en paquiteno-like. **A y B** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RAD51 (rojo) en espermatocitos WT y *Trip13^{ATPasaDead}* respectivamente durante la profase meiótica. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C**) Cuantificación del número de foci de RAD51 por espermatocito en el estadio indicado. En los estadios iniciales (leptoteno y cigoteno) no se observan diferencias entre el número de foci entre los espermatocitos WT y espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}*. En los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* en cigoteno tardío y en paquiteno-like se observa una persistencia de foci de RAD51 indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

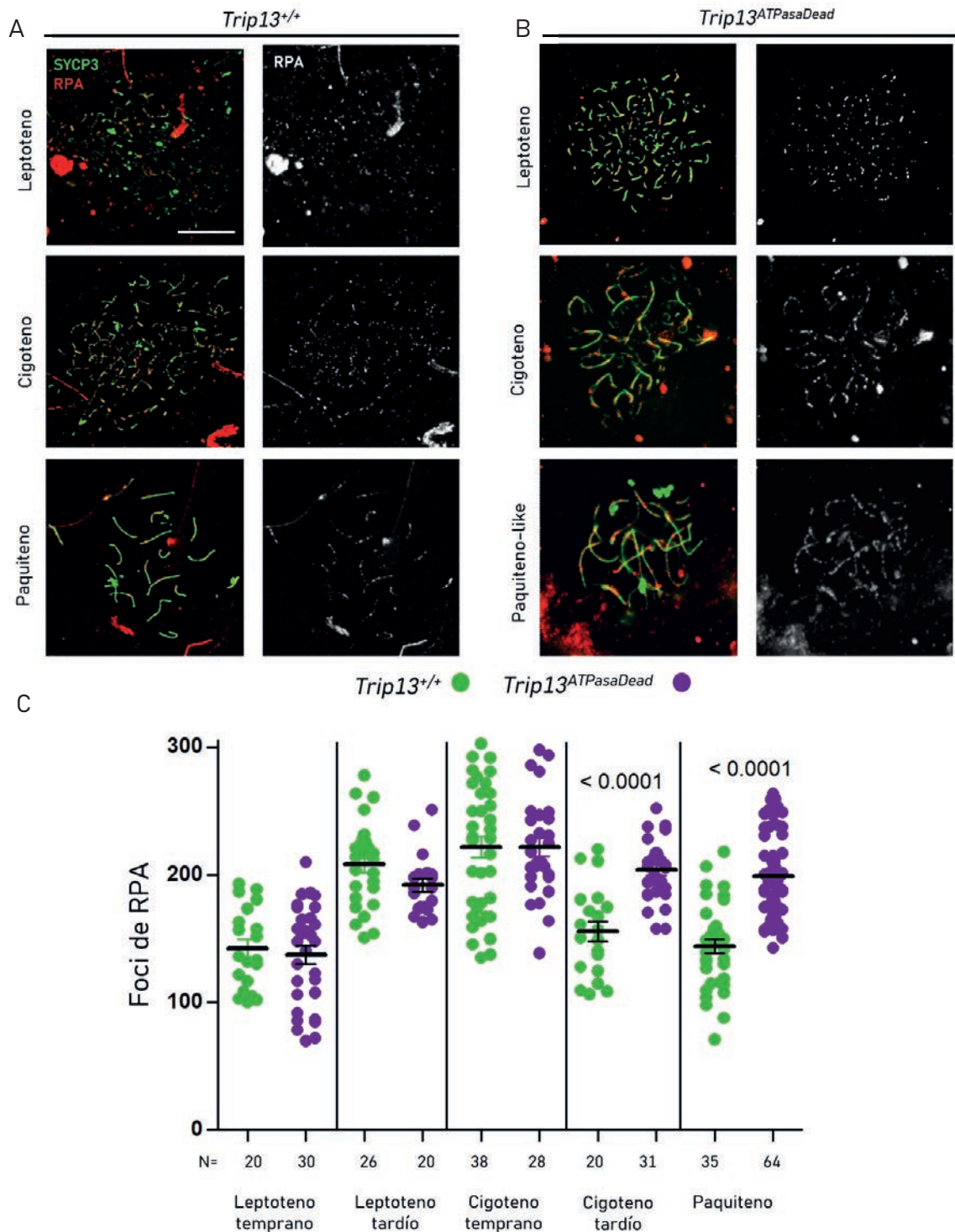


Figura 4-21. Los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* presentan persistencia de foci de RPA en paquiteno-like. A y B Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RPA (rojo) en espermatocitos WT y *Trip13^{ATPasaDead}* respectivamente durante la profase meiótica. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C** Cuantificación del número de foci de RPA por espermatocito en el estadio indicado. En los estadios iniciales (leptoteno y cigoteno) no se observan diferencias entre el número de foci entre los espermatocitos WT y espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}*. En los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* en cigoteno tardío y en paquiteno-like se observa una persistencia de foci de RPA indicando un defecto en la reparación de los DSBs Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.2.3 Tratamiento *in vivo* con el inhibidor DCZ0415

Desde el punto de vista clínico, TRIP13 tiene un rol oncogénico, ya que se encuentra sobreexpresado en múltiples tumores, lo que está asociado con una mala prognosis. Una alta expresión de TRIP13 en las células promueve la reparación del daño del ADN en los tumores, perpetuando la supervivencia de las células tumorales (Y. Chen et al., 2022; Lan et al., 2022; F. Li et al., 2022). La sobreexpresión de TRIP13 también ocasiona la adquisición de resistencia a fármacos antitumorales (Agarwal et al., 2022; Banerjee et al., 2014; Y. Chen et al., 2022; Lan et al., 2022; Xu et al., 2022). Por ello, TRIP13 se ha convertido en una diana terapéutica para tratar gran variedad de tumores. Recientemente se ha creado el inhibidor de TRIP13 DCZ0415. El inhibidor se une covalentemente a los residuos Arg386 (motivo Sensor 2) y Ser187 (motivo Walker A) de TRIP13 e impide su unión al ATP (Y. Wang et al., 2020). El inhibidor ha sido testado en varios ensayos dando buenos resultados en cáncer colorrectal (Agarwal et al., 2022; Y. Chen et al., 2022), carcinoma hepatocelular (Xu et al., 2022) y mieloma múltiple (Y. Wang et al., 2020). En todos los casos que se trató las células tumorales con DCZ0415 se revirtieron los efectos oncogénicos de la alta expresión de TRIP13 en los tumores, prometiendo ser una buena diana terapéutica.

Al no poder establecer una colonia de ratones para estudiar el efecto del bloqueo de la función ATPasa de TRIP13 y solo tener resultados de un solo macho mutante *Trip13^{ATPasaDead}*, se llevó a cabo un tratamiento *in vivo* con el inhibidor DCZ0415 durante 7 días en tres ratones adultos administrando dosis de 25 mg/kg de DCZ0415, tres ratones adultos con una dosis de 50 mg/kg y ratones adultos usados como control (DMSO usado como vehículo). Las dosis fueron administradas mediante inyección intraperitoneal. Se escogieron estas dosis específicas ya que fueron usadas por el mismo ensayo que creó el fármaco para tratar tumores con el DCZ0415 (Y. Wang et al., 2020). Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se eutanasiaron los animales y se extrajeron los testículos para analizar el posible efecto del tratamiento en la espermatogénesis.

4.2.3.1 El tratamiento con DCZ0415 no provoca alteraciones evidentes en la espermatogénesis

La depleción de *Trip13* causa un bloqueo de la progresión de la profase meiótica está bloqueada en el estadio IV (**Figura 4-9 y Figura 4-17**) (Roig et al., 2010). El tratamiento con DCZ0415 durante 7 días no produjo cambios ni en el peso ni el tamaño de los testículos, lo que sugirió que la espermatogénesis no se vio alterada. Se analizaron secciones de testículos teñidos con la tinción PAS-Hematoxilina de los ratones tratados con DMSO y los tratados con DCZ0415. Los túbulos seminíferos presentaron el mismo aspecto del epitelio germinal, con presencia de todos los tipos celulares de la espermatogénesis (**Figura 4-22A**). No se observó ningún bloqueo evidente de la progresión de la espermatogénesis en ningún grupo de animales tratados. El análisis de TUNEL reveló que no había diferencias significativas en el número de células apoptóticas por túbulo ni entre los individuos controles y los tratados con 25 mg/kg ($p = 0,1663$, T de Student) ni los tratados con 50 mg/kg ($p = 0,3731$, T de Student) (**Figura 4-22B,C**). Estos resultados indican que el tratamiento con DCZ0415 no produjo evidentes alteraciones en la progresión de la espermatogénesis.

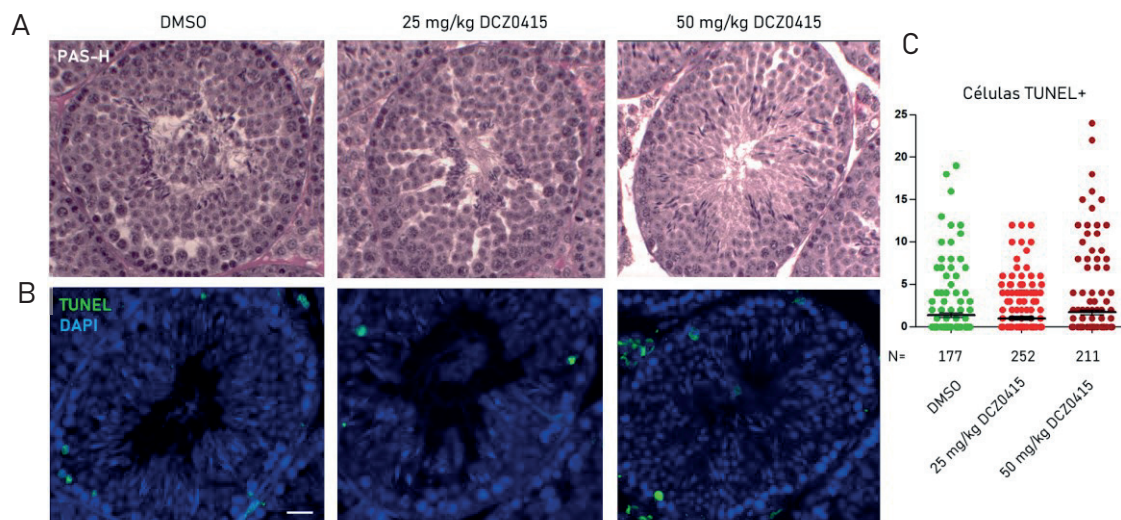


Figura 4-22. El tratamiento con DCZ0415 no altera la progresión de la espermatogénesis ni incrementa la apoptosis en los túbulos seminíferos. A) Tinción PAS-Hematoxilina de secciones representativas de testículo de ratones tratados con DMSO, 25 mg/kg DCZ0415 y 50 mg/kg DCZ0415. **B)** Imágenes representativas de la tinción de TUNEL (verde) y DAPI (azul) en secciones de testículo de ratones tratados con DMSO, 25 mg/kg DCZ0415 y 50 mg/kg DCZ0415. La barra de escala equivale a 20 μ M. **C)** Gráfico que muestra la cuantificación del número de células TUNEL-positivas por túbulo en los tratados con DMSO, 25 mg/kg DCZ0415 y 50 mg/kg DCZ0415. No hay diferencias significativas en el número de células TUNEL-positivas entre los individuos tratados con DMSO, 25 mg/kg DCZ0415 y 50 mg/kg DCZ0415. La N corresponde al número de túbulos analizados.

4.2.3.2 La inhibición de TRIP13 impide la depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados

Una de las funciones de TRIP13 es retirar las proteínas HORMAD1 y HORMAD2 de los ejes cromosómicos una vez se ha completado la sinapsis (**Figura 4-10 y Figura 4-18**) (Roig et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). Se analizó la dinámica de HORMAD1 para comprobar el efecto de la inhibición de TRIP13 en los espermatocitos de los ratones tratados. En los espermatocitos en cigoteno tardío de los individuos tratados con DMSO hubo acumulación de HORMAD1 solo en las porciones asinapsadas de los autosomas (**Figura 4-23A**). En paquiteno temprano, la señal de HORMAD1 se encontró confinada en las porciones asinapsadas de los cromosomas X e Y (**Figura 4-23B**).

En cambio, en los individuos tratados con DCZ0415, en cigoteno tardío se observó cómo, además de una señal intensa en las porciones asinapsadas de los autosomas, también había persistencia de señal de HORMAD1 en los ejes sinapsados (**Figura 4-23A**). En paquiteno temprano, los ejes sinapsados presentaron persistencia de la señal de HORMAD1 además de la señal intensa de los cromosomas sexuales. (**Figura 4-23B**). Estos resultados sugieren que la inhibición de TRIP13 impide la depleción de HORMAD1 de las regiones sinapsadas de cigoteno tardío y paquiteno.

4.2.3.3 Los animales tratados con DCZ0415 presentan una ligera alteración en la profase meiótica

Al no encontrar un bloqueo en el estadio IV ni una afectación evidente en la progresión de la espermatogénesis, se llevó a cabo un análisis citológico de la progresión de la profase meiótica en los animales controles y tratados. Como era esperado, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos tratados con DMSO y con 25 mg/kg de DCZ0415 ($p=0,60$, G test) ni los tratados con 50 mg/kg ($p=0,32$, G test) (**Figura 4-24C**). Estos resultados indican que el tratamiento con DCZ0415 no produce alteraciones significativas en la progresión de la profase meiótica en los ratones tratados.

Dentro de cada estadio de la profase meiótica se puede establecer subestadios en función de distintos parámetros, como son la progresión de la sinapsis y de la reparación de los DSBs. Todo y que no se encontraron diferencias significativas, se

observó una tendencia a acumular espermatoцитos en paquiteno en los animales tratados (**Figura 4-24C**). Por ello, se subclasificaron los espermatoцитos en paquiteno en los animales tratados con DMSO y DCZ0415 en base a la característica forma que adoptan los cromosomas X e Y cuando sinapsan (Page et al., 2012). Se observó que en los individuos tratados había más proporción de espermatoцитos en paquiteno temprano que en paquiteno medio comparado con los individuos controles, en tratados con 25 mg/kg ($p=0,03$, G test) y en tratados con 50 mg/kg ($p=0,04$, G test)(**Figura 4-24C**). Estos resultados sugieren que el tratamiento con DCZ0415 retrasa la transición entre paquiteno temprano a paquiteno medio.

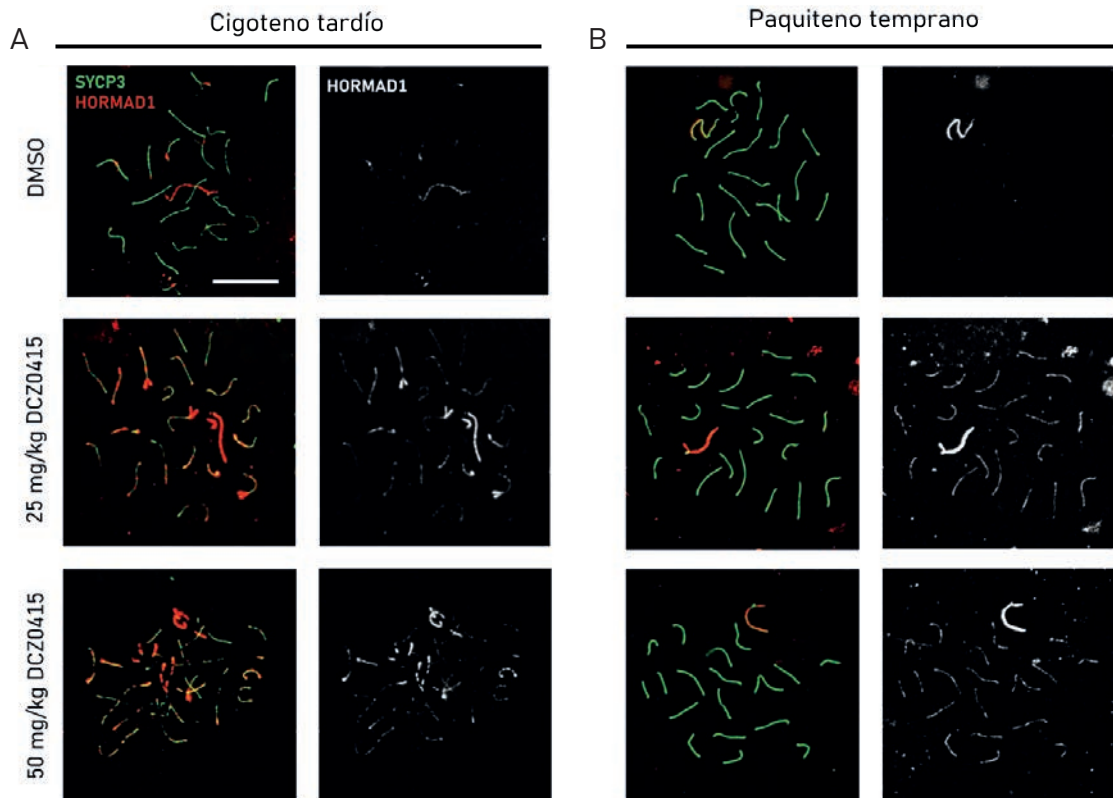


Figura 4-23. Los espermatoцитos tratados con DZC0415 no retiran HORMAD1 de los ejes sinapsados. A y B) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en espermatoцитos de ratones tratados con DMSO, 25 mg/kg y con 50 mg/kg de DCZ0415. **A)** HORMAD1 en espermatoцитos en cigoteno tardío. En los individuos controles HORMAD1 aparece solo en los ejes asinapsados. En los individuos tratados se observa una persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados además de la señal más intensa en las porciones asinapsadas. **B)** HORMAD1 en espermatoцитos en paquiteno temprano. En los individuos controles, HORMAD1 se localiza en las porciones asinapsadas de los cromosomas sexuales. En los individuos tratados se observa una persistencia de HORMAD1 en los autosomas cuando ya han completado la sinapsis además de una señal muy intensa de HORMAD1 en los cromosomas sexuales. La barra de escala equivale a 10 μm .

4.2.3.4 Los animales tratados con DCZ0415 muestran DSBs sin reparar en cigoteno tardío y paquiteno temprano

Como una de las funciones de TRIP13 es participar en la regulación de la reparación de los DSBs (Roig et al., 2010), se analizó si la dinámica de γ H2AX, RAD51 y RPA se veía afectada con el inhibidor DCZ0415. En los espermatoцитos en leptoteno y cigoteno la señal de γ H2AX apareció normal en los individuos control y tratados (no mostrado). Sin embargo, los espermatoцитos en paquiteno temprano acumularon más γ H2AX en los autosomas en los tratados con 25 mg/kg ($p=0,0002$, T de Student) y en los tratados con 50 mg/kg ($p=0,0007$, T de Student) comparado con los espermatoцитos de los ratones tratados con DMSO (**Figura 4-24E**). En los espermatoцитos en paquiteno medio también se observaron más acúmulos de γ H2AX en los autosomas de los tratados con 25 mg/kg ($p=0,0028$, T de Student) y los tratados con 50 mg/kg ($p=0,0002$, T de Student) comparado con los espermatoцитos controles (**Figura 4-24E**).

En cuanto a los foci de RAD51 y RPA, en los espermatoцитos en leptoteno temprano, leptoteno tardío y cigoteno temprano no se observaron diferencias entre el número de foci de RAD51 encontrado en los espermatoцитos de los individuos controles y en los tratados (**Figura 4-25, Tabla 4-3**). En cigoteno tardío, se observó una acumulación de foci de RAD51 en los espermatoцитos de los ratones tratados con 25 mg/kg ($p=0,0037$, T de Student) y con 50 mg/kg ($p=0,0012$, T de Student) comparado con los espermatoцитos control. En paquiteno temprano, las diferencias del número de foci de RAD51 de los dos grupos de individuos tratados con los controles fueron aún más significativas ($p<0,0001$, T de Student) (**Figura 4-25, Tabla 4-3**). En cuanto a la dinámica de foci de RPA en los espermatoцитos (**Figura 4-26, Tabla 4-3**), se observó que en leptoteno temprano, leptoteno tardío y cigoteno temprano tampoco hubo diferencias entre los espermatoцитos controles y los tratados. A partir de cigoteno tardío se observó una mayor acumulación de foci de RPA en los espermatoцитos tratados con 25 mg/kg ($p=0,0210$, T de Student) y con 50 mg/kg ($p=0,0028$, T de Student). En los espermatoцитos en paquiteno temprano se encontraron diferencias en los ratones tratados con 25 mg/kg y 50 mg/kg ($p<0,0001$, T de Student) (**Figura 4-26, Tabla 4-3**). Estos resultados indican que el tratamiento con DCZ0415 produce un defecto en la reparación de los DSBs pero solo a partir de cigoteno tardío.

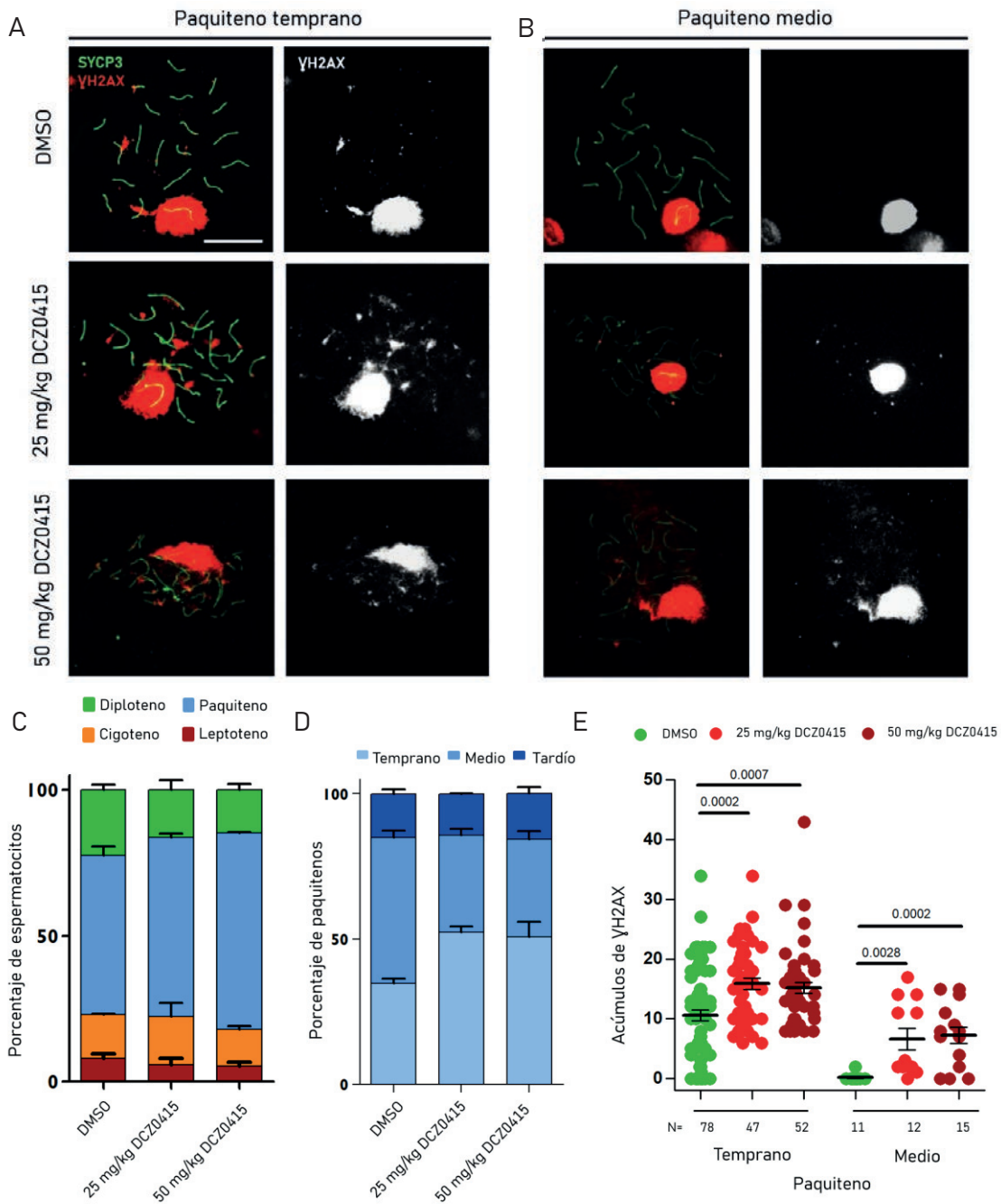


Figura 4-24. Los espermatoцитos en paquitenos tempranos y paquitenos medios de los individuos tratados con DCZ0415 acumulan más γ H2AX en los autosomas. Imágenes representativas de espermatoцитos de individuos tratados con DMSO, 25 mg/kg DCZ0415 y 50 mg/kg DCZ0415 marcados contra SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo) en **A**) Paquitenos tempranos y en **B**) Paquitenos medios. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C**) Gráfico de barras mostrando el porcentaje de espermatoцитos en los distintos estadios de la profase meiótica en los individuos controles y tratados. **D**) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de espermatoцитos en el subestadio de paquitenos indicado en los espermatoцитos de individuos controles y tratados. **E**) Recuento del número de acúmulos de γ H2AX encontrados en espermatoцитos en paquitenos tempranos y paquitenos medios en controles y tratados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

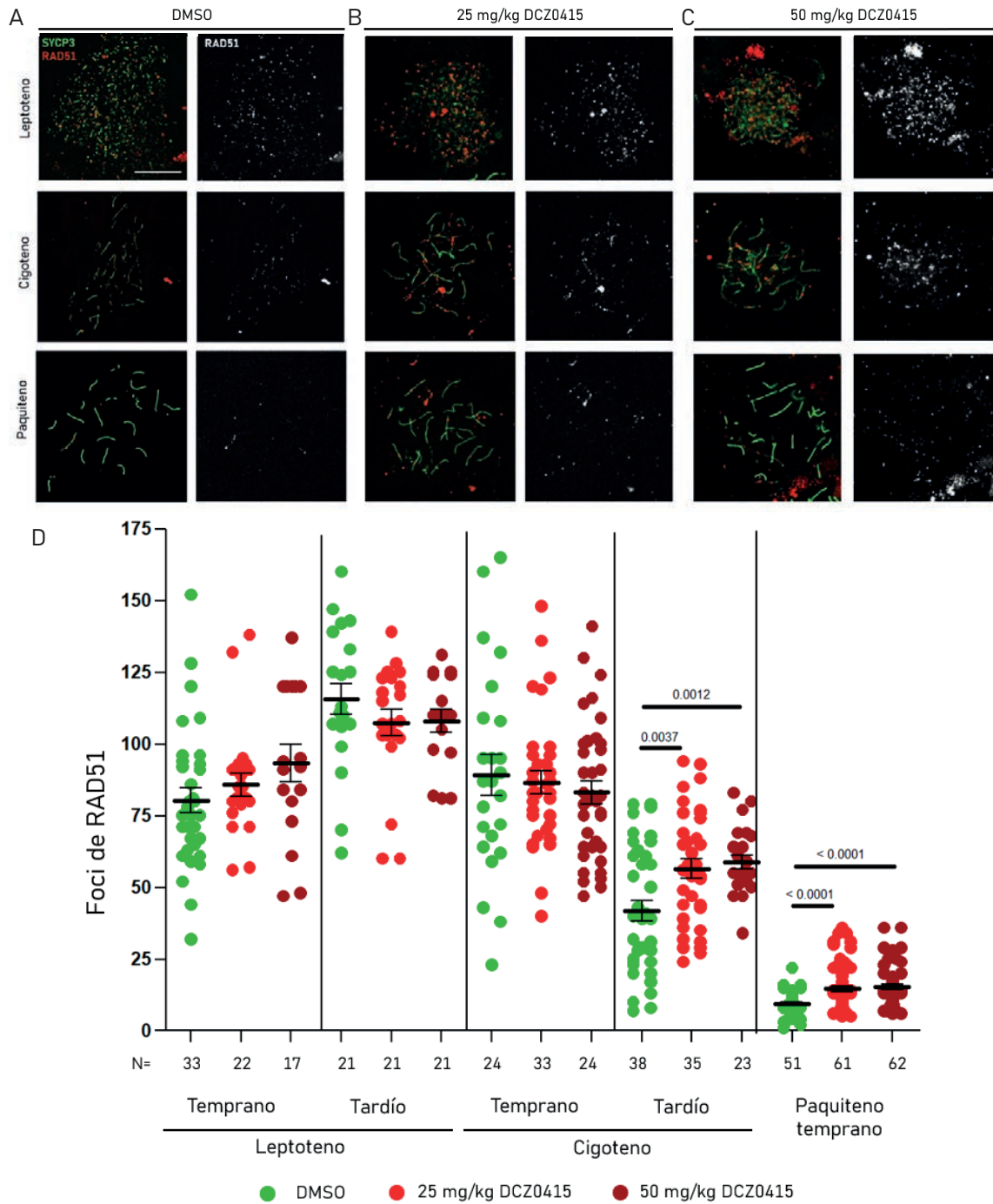


Figura 4-25. Los espermatocitos de ratones tratados con DCZ0415 acumulan RAD51 en cigoteno tardío y paquiteno temprano. A, B y C) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RAD51 (rojo) en espermatocitos de ratones tratados con DMSO, con 25 mg/kg y con 50 mg/kg de DCZ0415 respectivamente. La barra de escala equivale a 10 μ m. **D)** Cuantificación del número de foci de RAD51 obtenido por espermatocito en los ratones tratados con DMSO, con 25 mg/kg y con 50 mg/kg de DCZ0415 respectivamente en el estadio indicado. Se aprecia una acumulación de RAD51 en cigoteno tardío y paquiteno temprano en los ratones tratados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

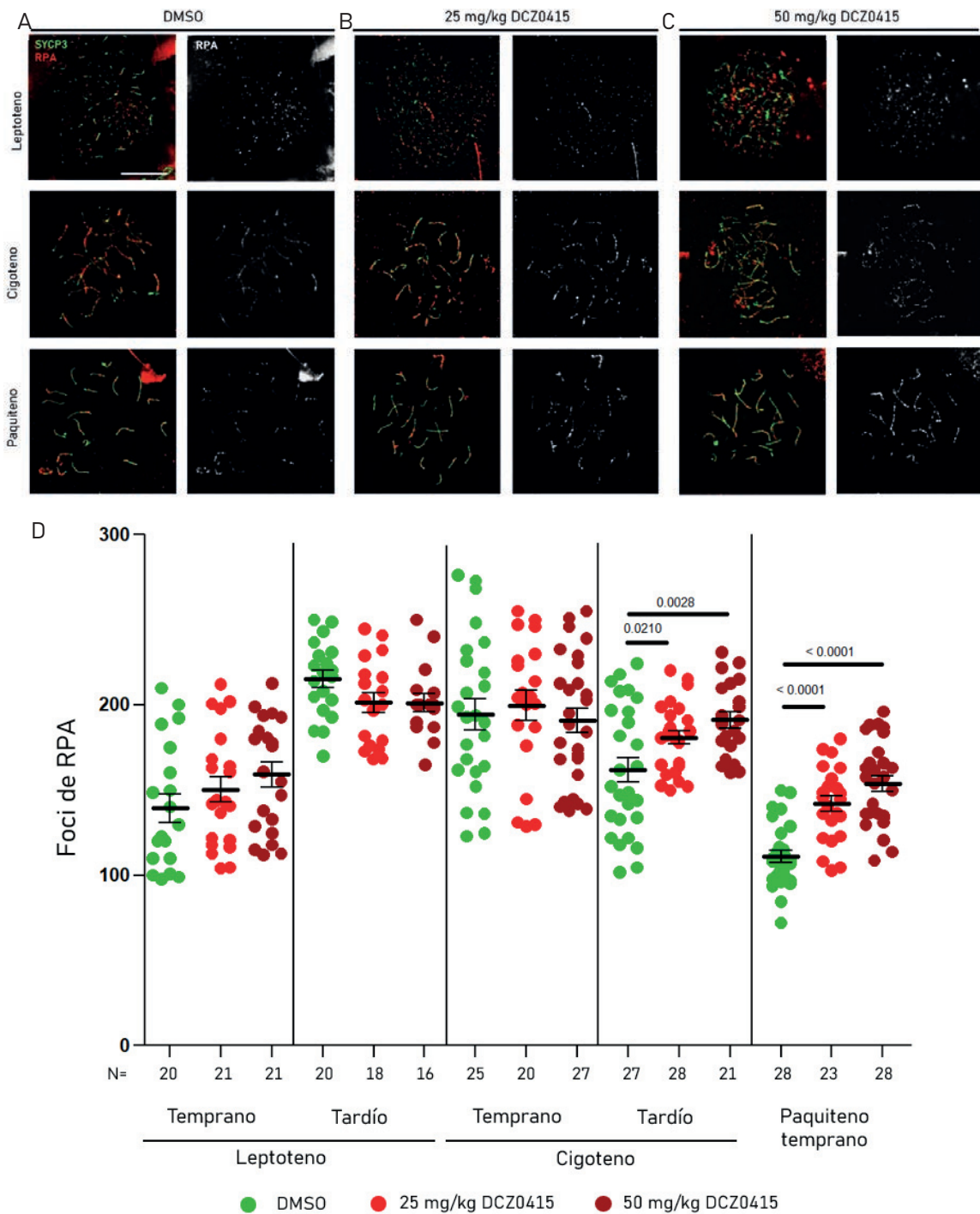


Figura 4-26. Los espermatoцитos de ratones tratados con DCZ0415 acumulan RPA en cigoteno tardío y paquiteno temprano. A, B y C) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RPA (rojo) en espermatoцитos de ratones tratados con DMSO, con 25 mg/kg y con 50 mg/kg de DCZ0415 respectivamente. La barra de escala equivale a 10 μ m. **D)** Cuantificación de los foci de RPA encontrados por espermatoцитo de ratones controles, tratados con 25 mg/kg y tratados con 50 mg/kg respectivamente en el estadio indicado. Se aprecia una acumulación de RPA en cigoteno tardío y paquiteno temprano en los tratados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

Tabla 4-3. Número de foci presentes en los espermatoцитos del estadio indicado en los individuos tratados con DMSO, 25 mg/kg DCZ0415 y 50 mg/kg DCZ0415. Se muestran los datos de RAD51 y RPA. Se presenta el promedio de foci junto a la SD del número de foci. La N corresponde al número de núcleos analizados.

		Leptoteno temprano	Leptoteno tardío	Cigoteno temprano	Cigoteno tardío	Paquiteno temprano
RAD51	DMSO	80,33 ± 4,252 N=33	115,6 ± 5,308 N=21	89,17 ± 7,293 N=24	41,71 ± 3,569 N=38	9,333 ± 0,5744 N=51
	25 mg/kg DCZ0415	85,77 ± 4,104 N=22	107,5 ± 4,592 N=21	86,61 ± 4,023 N=33	56,54 ± 3,388 N=35	14,69 ± 1,033 N=61
	50 mg/kg DCZ0415	93,29 ± 6,498 N=17	108,0 ± 4,107 N=16	83,08 ± 3,921 N=37	58,70 ± 2,434 N=23	15,40 ± 0,8896 N=62
RPA	DMSO	139,3 ± 8,249 N=20	215,1 ± 4,941 N=20	194,4 ± 9,046 N=25	161,7 ± 7,283 N=27	111,0 ± 3,563 N=28
	25 mg/kg DCZ0415	150,3 ± 7,369 N=21	201,3 ± 6,024 N=18	199,7 ± 9,011 N=20	180,9 ± 3,641 N=28	141,9 ± 4,514 N=23
	50 mg/kg DCZ0415	159,0 ± 7,192 N=21	201,2 ± 5,388 N=16	191,0 ± 7,255 N=27	191,0 ± 4,810 N=21	153,7 ± 4,599 N=28

4.2.4 Cultivo *in vitro* de células de testículo y tratamiento con DCZ0415

La inhibición *in vivo* de TRIP13 produjo un efecto en los espermatoцитos en cigoteno y paquiteno temprano, en los que se vio una persistencia de la señal de HORMAD1, además de presentar un defecto en la reparación de los DSBs en esos estadios. En cambio, no se observó un fenotipo de asinapsis, el cual sí está presente en los mutantes de *Trip13* y en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*. Para confirmar que la inhibición de TRIP13 funcionó en células de testículo, se puso a punto un cultivo de espermatoцитos de ratón adulto durante 24h. Se cultivaron $2,5 \times 10^6$ células por pocillo en medio de cultivo α MEM suplementado con el inhibidor DCZ0415 a la concentración de 15 μ M o 20 μ M. En los pocillos control, se cultivó $2,5 \times 10^6$ células en α MEM con el volumen equivalente de DMSO. El tratamiento se hizo con las concentraciones del inhibidor que fueron usadas anteriormente (Y. Wang et al., 2020). Al completarse las 24h de tratamiento, se recolectaron las células en cultivo y se procedió a realizar extensiones de espermatoцитos y un análisis citológico para comprobar el efecto de la inhibición de TRIP13 *in vitro*.

4.2.4.1 El tratamiento *in vitro* con DCZ0415 causa una acumulación de células en paquiteno-like

Para analizar el efecto de la inhibición de TRIP13 en células de testículo en cultivo, se hizo el recuento de los diferentes estadios de la profase meiótica. En las extensiones de los espermatocitos control, se observó una progresión de la profase meiótica normal comparable a la de ratones WT, con la mayoría de espermatocitos en estadio de paquiteno (**Figura 4-27**). De manera interesante, los espermatocitos tratados con DCZ0415 mostraron una alteración en la progresión de la profase meiótica. Los pocillos tratados con concentración de 15 μ M del inhibidor mostraron una tendencia a acumular espermatocitos en cigoteno y paquiteno-like ($p=0,07153$, G test) (**Figura 4-27B**). Los espermatocitos de los pocillos tratados con la concentración de 20 μ M de DCZ0415 mostraron una progresión de la profase meiótica alterada comparada con los espermatocitos control ($p<0,0001$, G test), ya que hubo una acumulación de espermatocitos en estadios tempranos: en leptoteno (14,6%), cigoteno (22,2%) y paquiteno-like (30,7%). Estas células clasificadas como paquiteno-like fueron espermatocitos que presentaron bivalentes con extremos abiertos por los telómeros. Además, con el tratamiento de 20 μ M también se redujo el porcentaje de espermatocitos en paquiteno (26,2%) y diploteno (6,4%) (**Figura 4-27B**). Estos resultados indican que el tratamiento con 20 μ M de DCZ0415 durante 24h en células de testículo provocó una acumulación de células con asinapsis terminal.

Un efecto que se observó en los individuos tratados con el inhibidor *in vivo* fue la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados en paquiteno. Por ello, se analizó si la inhibición de TRIP13 en cultivo provocaba algún efecto en la localización de HORMAD1. Las células cultivadas con DMSO presentaron una dinámica de HORMAD1 normal (**Figura 4-27**). Las células que poseían puntas abiertas en los tratados con 20 μ M acumulaban HORMAD1 en las regiones asinapsadas, pero no en las porciones sinapsadas del SC (**Figura 4-27**). También hubo espermatocitos que presentaron persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados en cigoteno temprano, cigoteno tardío y paquiteno temprano. Estos espermatocitos no presentaron asinapsis terminal (**Figura 4-28**). Estos resultados sugieren que el tratamiento con DCZ0415 provocó que un grupo de espermatocitos acumularan HORMAD1 en los ejes sinapsados, y por otro lado, la inhibición de TRIP13 también

causó una acumulación de células que presentaron asinapsis terminal. Posiblemente se estén observando dos grupos de células a las que la inhibición ha hecho su efecto: en las primeras, la inhibición les causó que no se pudiera retirar HORMAD1 de los ejes sinapsados. El segundo grupo, posiblemente fueran espermatoцитos que ya habían retirado HORMAD1 de los ejes sinapsados cuando se inhibió TRIP13, y solo causó asinapsis terminal.

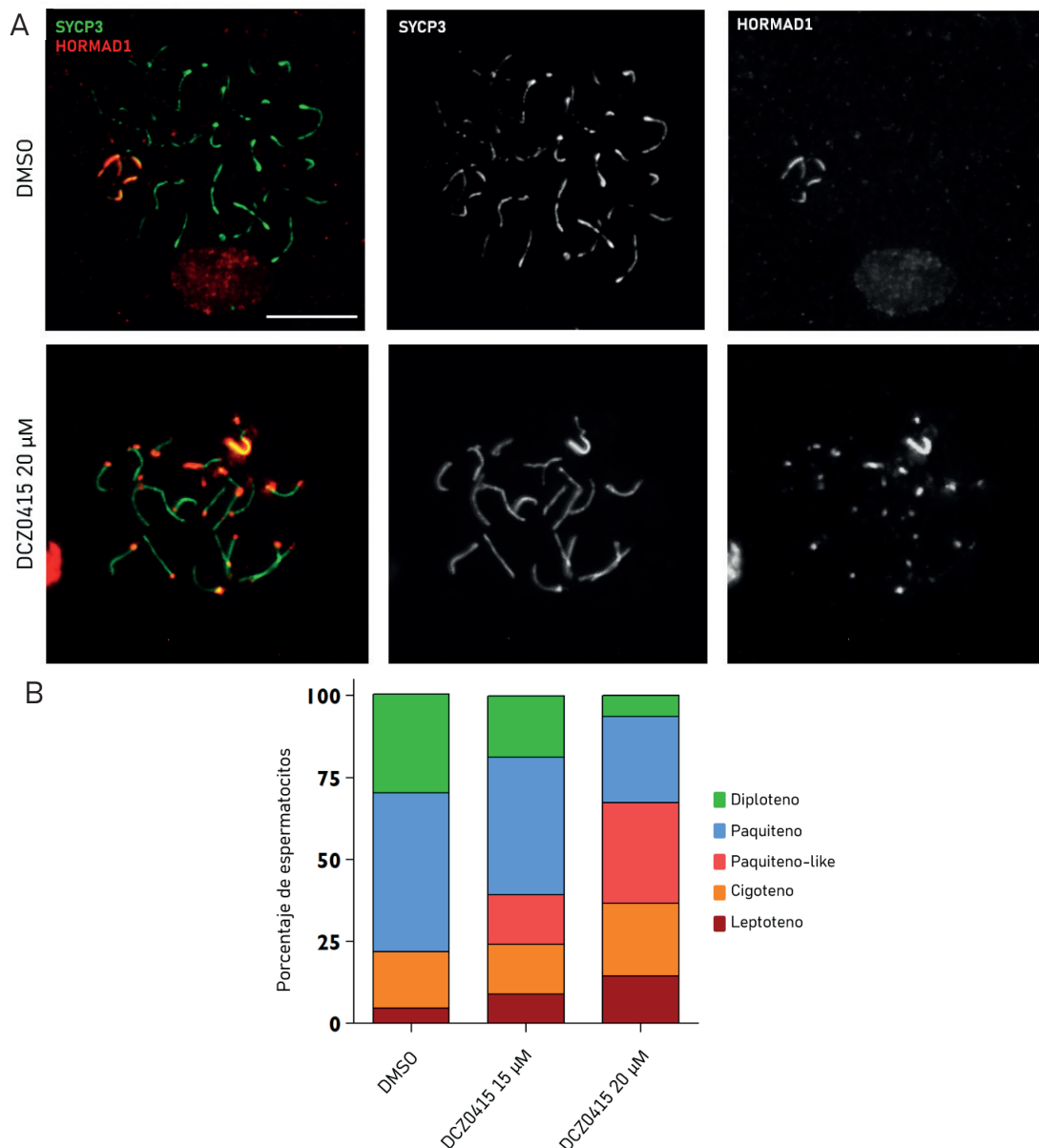


Figura 4-27. El tratamiento con el inhibidor DCZ0415 provoca una acumulación de células con puntas abiertas. A) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en espermatoцитos DMSO y tratados con 20 μM. Se observa algunos bivalentes con asinapsis terminal y presencia de HORMAD1 en las porciones asinapsadas. La barra corresponde a 10 μm. **B)** Gráfico de barras mostrando la progresión de la profase meiótica en células tratadas con DMSO, con DCZ0415 15 μM y DCZ0415 20 μM. Los espermatoцитos tratados con DCZ0415 20 μM se acumularon en los estadios tempranos de la profase meiótica, y hubo mayor acumulación de paquiteno-like con bivalentes asinapsis terminal.

DCZ0415 20 μ M

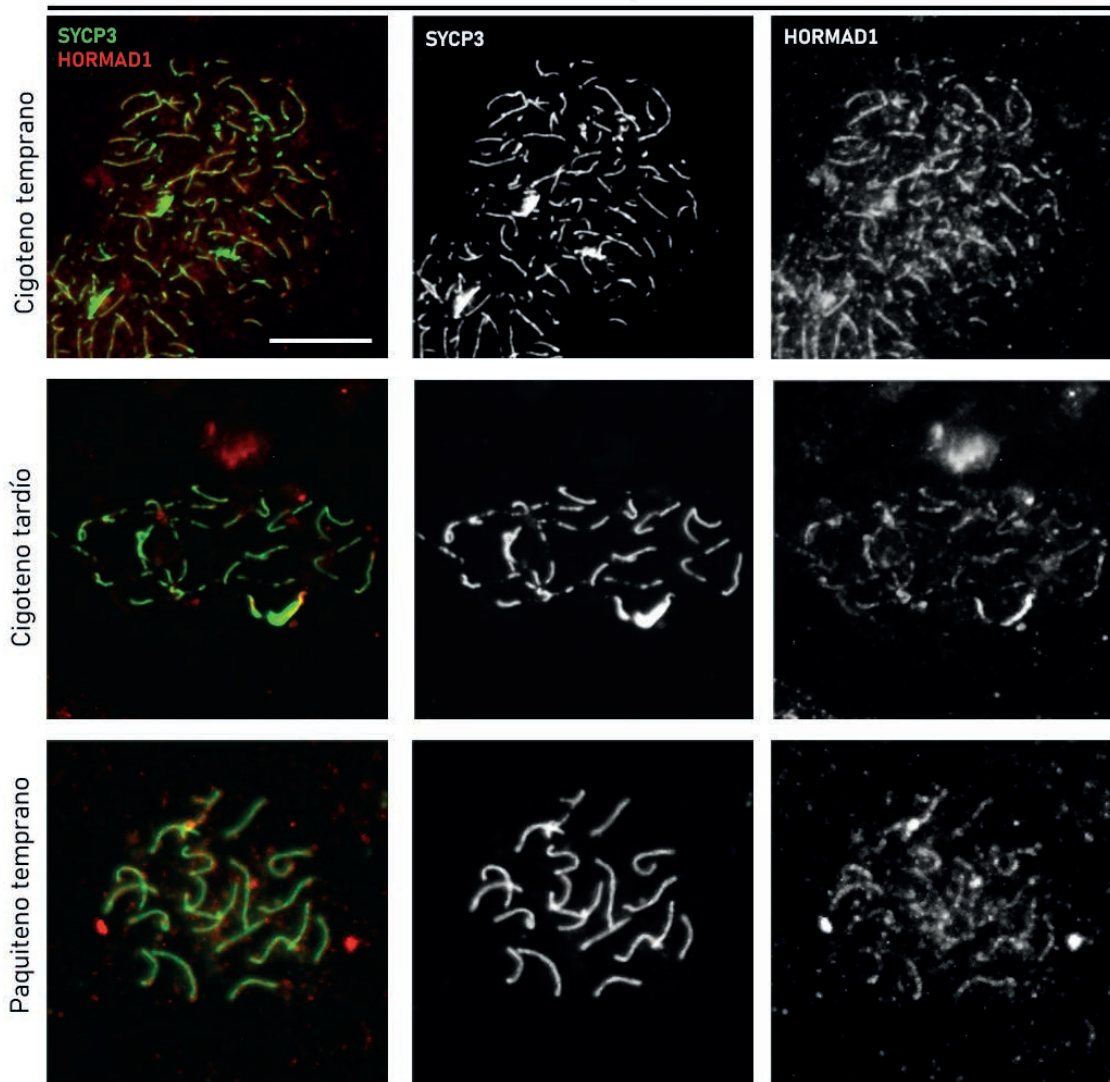


Figura 4-28. El tratamiento con DCZ0415 causó un defecto en la eliminación de HORMAD1 de los ejes sinapsados. **A)** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en espermatocitos tratados con 20 μ M. En algunos espermatocitos en cigoteno y paquiteno temprano se pudo observar una persistencia de HORMAD1 en todos los ejes cromosómicos. La barra corresponde a 10 μ m.

4.2.5 Caracterización fenotípica del mutante *Hormad1*^{3HA/3HA}

En estudios *in vitro*, se ha comprobado que se requiere el extremo N-terminal de HORMAD1 para que se produzca la interacción entre TRIP13 y HORMAD1 y su depleción de los ejes sinapsados (Ye et al., 2017). Para estudiar qué parte del fenotipo de los mutantes de *Trip13* se debe a la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados, se obtuvieron muestras de testículo del modelo murino *Hormad1*^{3HA/3HA} en colaboración con el laboratorio del Dr. Attila Toth (TU Dresden).

El modelo *Hormad1*^{3HA/3HA} se generó mediante CRISPR/Cas9 insertando el tag 3xHA en el segundo exón de la secuencia de *Hormad1*. El ratón es estéril, el tamaño de los testículos es menor que el de los individuos WT y presenta bloqueo en la espermatogénesis.

4.2.5.1 No se retira HORMAD1 de los ejes sinapsados en el mutante

Hormad1^{3HA/3HA}

Para comprobar que los mutantes *Hormad1*^{3HA/3HA} no pueden retirar HORMAD1 de los ejes sinapsados, se estudió la expresión de la proteína en los espermatoцитos. La carga inicial de la proteína no se ve afectada por el marcaje 3HA ya que en leptoteno y cigoteno la carga de HORMAD1 es similar a los espermatoцитos WT (**Figura 4-29**). A partir de cigoteno, una vez la sinapsis de los cromosomas se va completando, HORMAD1 persistió en los ejes sinapsados. En paquiteno-like esta persistencia de la proteína fue evidente ya que HORMAD1 y SYCP3 colocalizaron en todos los autosomas sinapsados y también en los cromosomas sexuales (**Figura 4-29**). Estos resultados indican que el marcaje 3HA en HORMAD1 impide su depleción de los ejes sinapsados.

4.2.5.2 Los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} no progresan más allá de paquiteno-like

A la vista de la esterilidad y el tamaño reducido de los testículos se examinó cómo se llevaba a cabo la progresión de la sinapsis en los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} mediante la inmunolocalización de las proteínas SYCP3 y SYCP1. La progresión de la profase meiótica en el mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} también se mostró alterada, presentando bloqueo meiótico y acumulación de espermatoцитos en cigoteno y paquiteno-like. La proporción de estadios de la profase meiótica fue similar al mutante *Trip13*^{-/-} (p=0,3, G test) (**Figura 4-29**). Los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} presentaron un inicio de la sinapsis normal en leptoteno y cigoteno. El estadio más tardío que se encontró en el mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} fue un paquiteno-like similar al descrito en los mutantes de *Trip13*, mostrando asinapsis por los extremos, aunque los defectos fueron más sutiles ya que muchos bivalentes sí conseguían sinapsar correctamente (**Figura 4-29**). Estos resultados sugieren que la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados del *Hormad1*^{3HA/3HA} impide la correcta progresión de la profase meiótica.

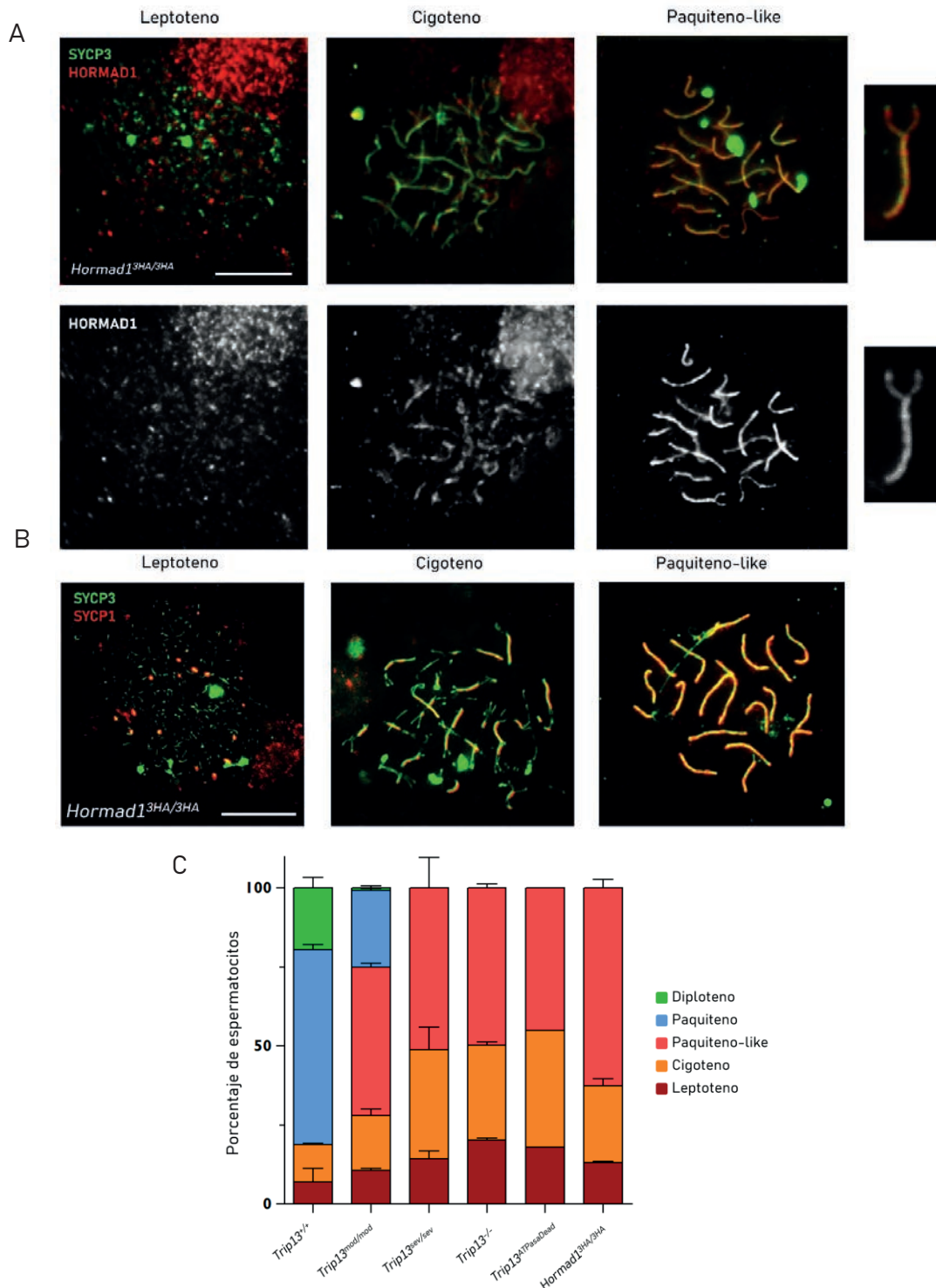


Figura 4-29. Los espermatocitos *Hormad1*^{3HA/3HA} no retiran HORMAD1 de los ejes sinapsados y no progresan más allá de paquiteno-like. A) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y HORMAD1 (rojo) en espermatocitos *Hormad1*^{3HA/3HA}. En leptoteno y cigoteno la carga de HORMAD1 es normal, pero a partir de cigoteno tardío y en paquiteno-like la señal de HORMAD1 persiste tanto en las porciones sinapsadas y asinapsadas de los ejes cromosómicos. En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestran HORMAD1 tanto en las regiones sinapsadas y en las puntas abiertas. **B)** Imágenes representativas de espermatocitos del mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} marcados contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). El estadio más avanzado que se encuentra en el mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} es un paquiteno-like. La barra de escala equivale a 10 μm. **C)** Gráfico de barras mostrando el porcentaje de espermatocitos en los distintos estadios de la profase meiótica.

4.2.5.3 El mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} presenta DSBs sin reparar en paquiteno-like

Debido a que la progresión de la profase meiótica en el mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} se encuentra alterada igual que en los ratones *Trip13*^{-/-} y que los espermatoцитos del mutante *Trip13*^{-/-} acumulan DSBs sin reparar, se examinó cómo se llevaba a cabo la reparación de los DSBs en los espermatoцитos del mutante *Hormad1*^{3HA/3HA}. De igual manera que en la caracterización de los mutantes anteriores, se analizó la dinámica de γ H2AX, RAD51 y RPA en los espermatoцитos del mutante *Hormad1*-3HA. La señal de γ H2AX apareció normal en leptoteno y cigoteno. Los espermatoцитos en paquiteno-like presentaron una señal persistente de γ H2AX en los autosomas. Algunos espermatoцитos en paquiteno-like presentaron una vesícula sexual, aunque otros paquiteno-like tuvieron defectos en la formación de una vesícula sexual bien formada (**Figura 4-30**).

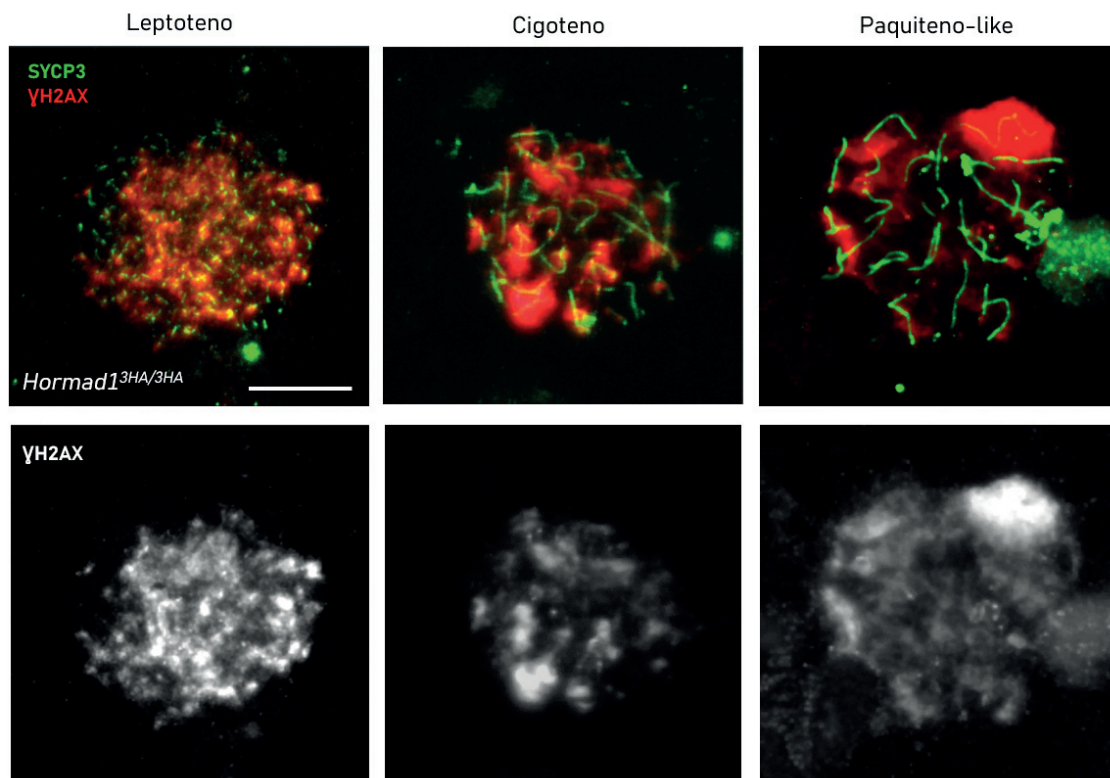


Figura 4-30. Los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} en paquiteno-like acumulan DSBs sin reparar. Imágenes representativas de espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like marcados contra SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo). En los espermatoцитos leptoteno y cigoteno γ H2AX aparece normal. En los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} en paquiteno-like, persiste la señal de γ H2AX en los autosomas indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Algunos espermatoцитos presentan una vesícula sexual bien formada. La barra de escala equivale a 10 μ m.

También se analizó la distribución de los foci de RAD51 y RPA en los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA}. No se encontraron diferencias en el número de foci de RAD51 presente en los espermatoцитos controles y *Hormad1*^{3HA/3HA} (**Figura 4-31, Tabla 4-4**) en leptoteno temprano, leptoteno tardío y cigoteno temprano. A partir de cigoteno tardío (p=0,0137, T de Student) y en paquiteno-like (p<0,0001, T de Student) hubo mayor acumulación de foci de RAD51 en los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} (**Figura 4-31, Tabla 4-4**). En cuanto a la distribución de los foci de RPA (**Figura 4-32, Tabla 4-4**) en los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA}, no se encontraron diferencias entre los espermatoцитos controles y los de los mutantes *Hormad1*^{3HA/3HA} en leptoteno temprano y leptoteno tardío, pero sí en cigoteno temprano (p=0,085, T de Student), aunque en cigoteno tardío no se encontraron diferencias. Finalmente los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} en paquiteno-like (p<0,0017, T de Student) mostraron mayor acumulación de foci de RPA. (**Figura 4-32C, Tabla 4-4**). Estos resultados indican que hay un defecto en la reparación de los DSBs en los espermatoцитos en paquiteno-like del mutante *Hormad1*^{3HA/3HA}.

Tabla 4-4. Número de foci presentes en los espermatoцитos del estadio indicado en los individuos *Hormad1*^{+/+} y los mutantes *Hormad1*^{3HA/3HA}. Se muestran los datos de RAD51 y RPA. Se presenta el promedio de foci junto a la SD del número de foci. La N corresponde al número de núcleos analizados.

		Leptoteno temprano	Leptoteno tardío	Cigoteno temprano	Cigoteno tardío	Paquiteno temprano / Paquiteno-like
RAD51	<i>Hormad1</i> ^{+/+}	128,2 ± 3,557 N=32	158,8 ± 6,219 N=30	154,3 ± 7,453 N=23	98,92 ± 7,658 N=24	14,39 ± 0,8510 N=57
	<i>Hormad1</i> ^{3HA/3HA}	133,3 ± 4,175 N=26	155,1 ± 6,399 N=23	146,3 ± 6,094 N=22	122,1 ± 4,951 N=25	79,78 ± 2,315 N=79
RPA	<i>Hormad1</i> ^{+/+}	159,3 ± 5,179 N=20	207,1 ± 9,014 N=19	225,3 ± 4,668 N=34	181,5 ± 4,110 N=25	150,7 ± 6,514 N=28
	<i>Hormad1</i> ^{3HA/3HA}	158,3 ± 9,739 N=21	195,4 ± 3,302 N=52	211,1 ± 2,813 N=42	180,8 ± 3,237 N=52	173,4 ± 3,698 N=57

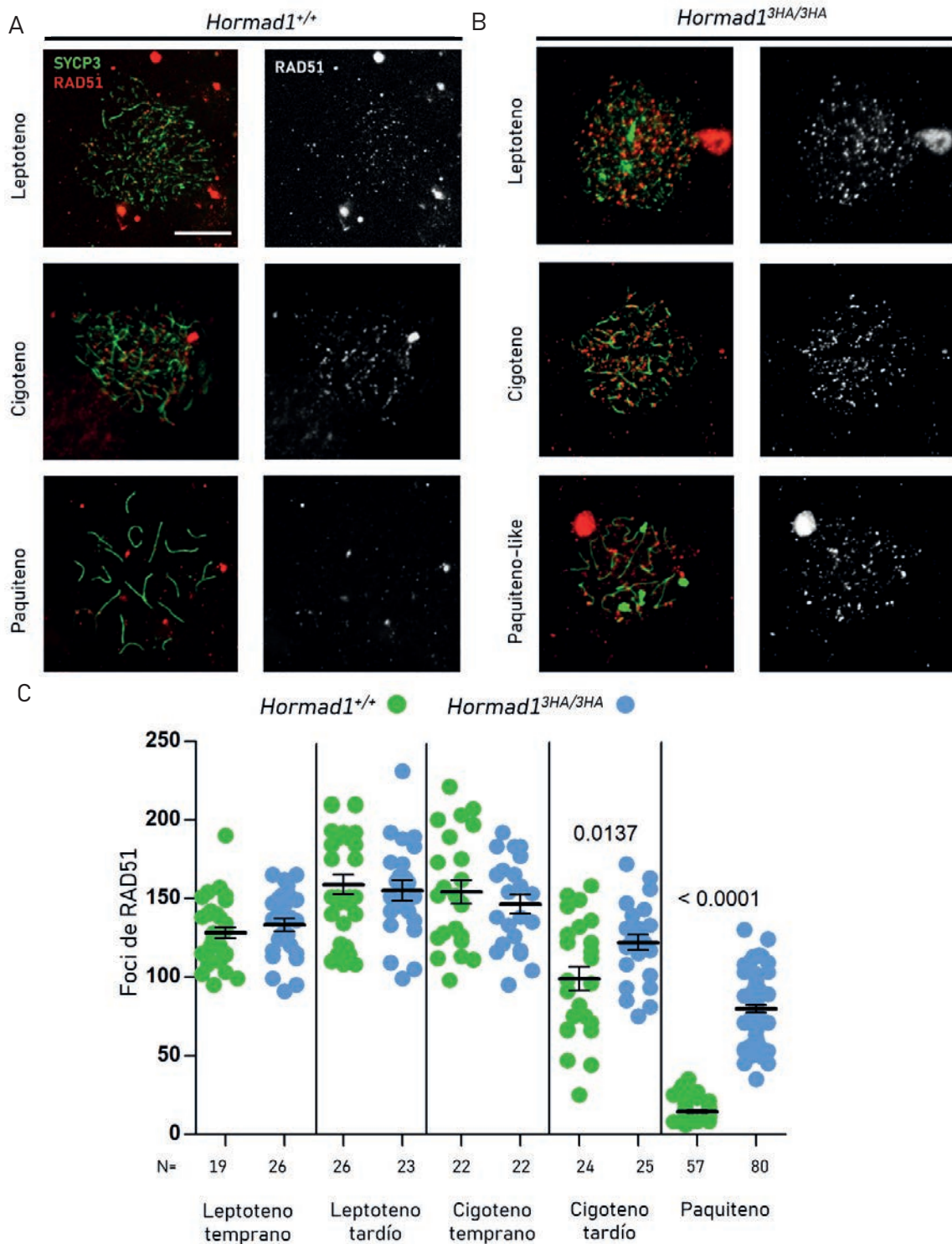


Figura 4-31. Los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} presentan persistencia de RAD51 en cigoteno tardío y paquiteno-like. A y B Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RAD51 (rojo) en espermatoцитos *Hormad1*^{+/+} y *Hormad1*^{3HA/3HA} respectivamente durante la profase meiótica. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C**) Cuantificación de los foci de RAD51 por espermatoцитo y genotipo en el estadio indicado. No se aprecian diferencias significativas entre los foci de RAD51 entre leptoteno y cigoteno temprano entre los espermatoцитos controles y los del mutante *Hormad1*^{3HA/3HA}. A partir de cigoteno tardío y en el paquiteno-like del mutante *Hormad1*^{3HA/3HA} se observa una acumulación de RAD51 indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados

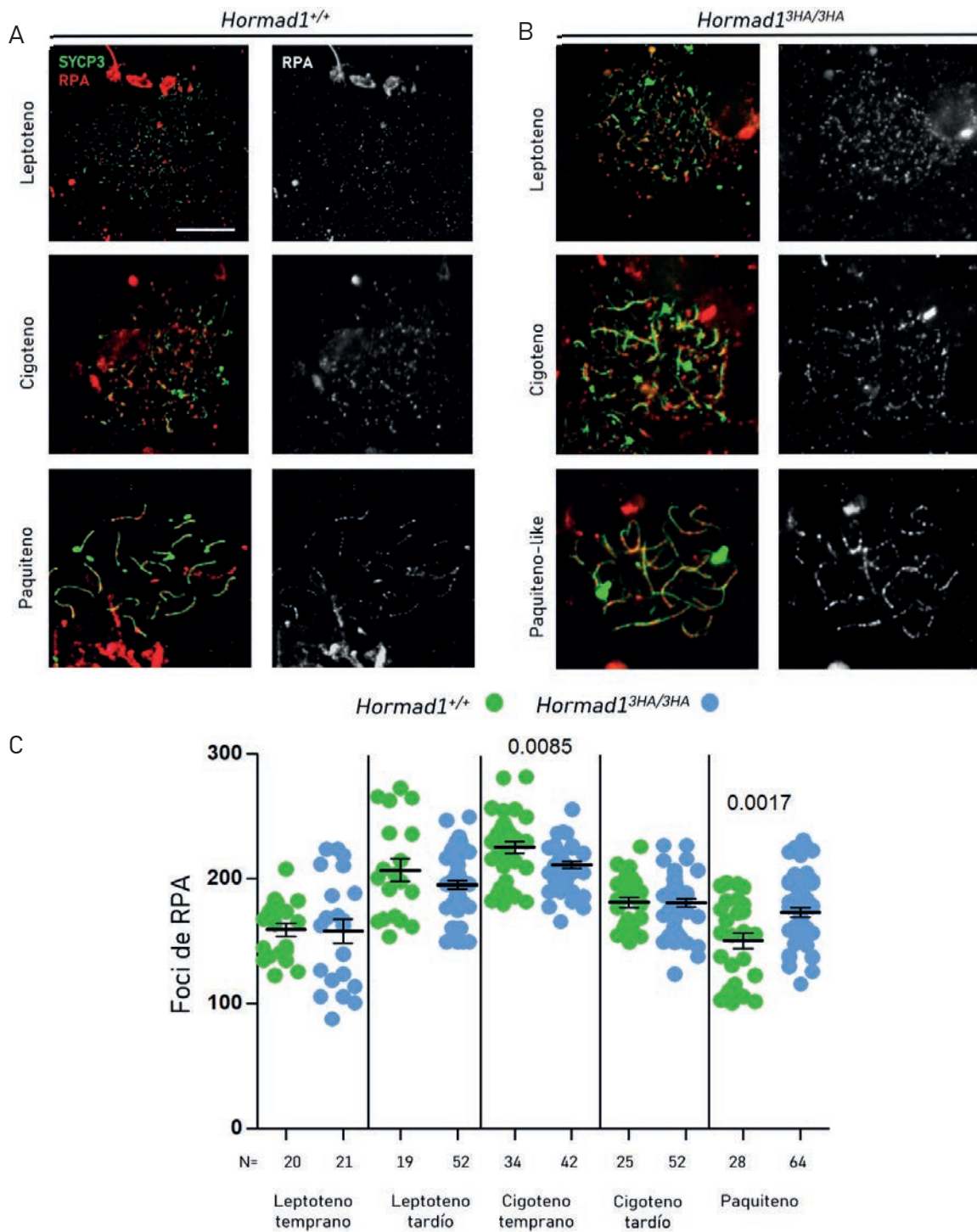


Figura 4-32. Los espermatocitos *Hormad1^{3HA/3HA}* presentan persistencia de RPA en paquiteno-like. **A y B)** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RPA (rojo) en espermatocitos *Hormad1^{+/+}* y *Hormad1^{3HA/3HA}* respectivamente durante la profase meiótica. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Cuantificación de los foci de RPA por espermatocito y genotipo en el estadio indicado. En leptoteno temprano y leptoteno tardío no se observan diferencias entre los espermatocitos control y los *Hormad1^{3HA/3HA}*. En cigoteno temprano los espermatocitos *Hormad1^{3HA/3HA}* presentan menos foci de RPA, aunque en cigoteno tardío no hay diferencias. Los espermatocitos en paquiteno-like acumulan más foci de RPA que los espermatocitos control, indicando un defecto en la reparación de los DSBs. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.3 Función de TRIP13 en la elección de la vía de reparación de los DSBs

TRIP13 es una proteína que pertenece a la familia de las AAA+ ATPasas, y con la capacidad de unión e hidrólisis del ATP puede remodelar proteínas que poseen el dominio HORMA. Algunas de las funciones de TRIP13 se relacionan con la capacidad de remodelar estas proteínas (Cardoso da Silva & Vader, 2021). En meiosis, TRIP13 se encarga de retirar las proteínas HORMAD de los ejes una vez han completado la sinapsis (Wojtasz et al., 2009). En mitosis, TRIP13 se localiza en los cinetocoros y remodela la proteína MAD2 para activar el SAC (Ma & Poon, 2016). También se ha comprobado como en células somáticas, TRIP13 está involucrado en la elección de la vía de reparación de los DSBs, inhibiendo la reparación por NHEJ en favor de la reparación por HR. Esto lo hace mediante el desensamblaje del complejo Shieldin, en el cual se encuentra la proteína con dominio HORMA REV7 (Clairmont et al., 2020; Sarangi, Clairmont, & D'Andrea, 2020). Ya que mutantes de *Trip13*^{-/-} presentan defectos en la reparación de los DSBs por HR, ya que presentan menor carga de RAD51 y RPA, y DSBs sin reparar en paquiteno-like, se analizó si TRIP13 participaba en la elección de la vía de reparación de los DSBs en espermatoцитos de ratón.

4.3.1 Los mutantes de *Trip13* presentan menos DSBs no reparados

En trabajos realizados en nuestro grupo de investigación, se estudió si TRIP13 participaba en la eliminación de ovocitos como consecuencia de la activación del *checkpoint* de sinapsis. Para ello se analizaron dos modelos de ratones que tienen problemas de sinapsis, *Spo11*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-}, y se compararon los ovarios de estas hembras con los ovarios de las mutantes *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} respectivamente (Martínez-Marchal, 2019). La mutación de TRIP13 no produjo rescate en el número de ovocitos *Spo11*^{-/-} (Martínez-Marchal, 2019), como ya se había descrito previamente (X. Li & Schimenti, 2007). Sin embargo, las hembras *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} sí mostraron un rescate en el número de folículos, reflejado por el incremento en el número de folículos primordiales y folículos primarios (Martínez-Marchal, 2019). Para explicar este rescate se postularon dos hipótesis.

La primera explicación fue que TRIP13 participara en el *checkpoint* de sinapsis, pero solo en presencia de DSBs producidos por SPO11. La segunda hipótesis fue que TRIP13 participa en la elección de la ruta de reparación de los DSBs, inhibiendo la reparación por NHEJ y promoviendo la reparación por HR, como pasa en células somáticas (Clairmont et al., 2020). Si TRIP13 participase en la elección de la ruta de reparación de los DSBs, en los ovocitos *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}* una parte de los DSBs, que no podrían ser reparados por HR debido a la ausencia de DMC1, podrían ser reparados mediante NHEJ.

Con tal de ver si TRIP13 regulaba la reparación de los DSBs durante la meiosis, lo primero que se analizó fue la presencia de DSBs no reparados en los espermatozoides mutantes de *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* y lo comparamos con los espermatozoides del mutante *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}*. En los espermatozoides *Dmc1^{-/-}*, los DSBs no pueden ser reparados eficientemente, debido a los defectos en la búsqueda del cromosoma homólogo, y en consecuencia, estos mutantes acumulan DSBs sin reparar y presentan un bloqueo en un estadio paquiteno-like con abundante asinapsis (Pittman et al., 1998; Yoshida et al., 1998). La ablación de CHK2 en estos mutantes evita la muerte de los espermatozoides por activación del *checkpoint* de recombinación, aunque acabarán muriendo poco después por defectos de sinapsis.

Si TRIP13 participa en la elección de la vía de reparación de los DSBs, la mutación de *Trip13* en estos espermatozoides permitiría reparar una parte de los DSBs por NHEJ, reduciendo la cantidad de daño no reparado presente en estos espermatozoides. En efecto, analizando la presencia de acúmulos de γ H2AX presentes en los espermatozoides en paquiteno-like de ambos mutantes (**Figura 4-33**), se observó una reducción significativa de daño no reparado en los espermatozoides *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}* ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-33C**). También se analizó la acumulación de γ H2AX en los espermatozoides *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}* y se observó la misma tendencia. Los espermatozoides doble mutantes de *Dmc1* y *Trip13* acumularon γ H2AX en paquiteno-like que los espermatozoides *Dmc1^{-/-}* ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-33C**). Estos resultados indican que la depleción de *Trip13* comporta una reducción del número de acúmulos de γ H2AX.

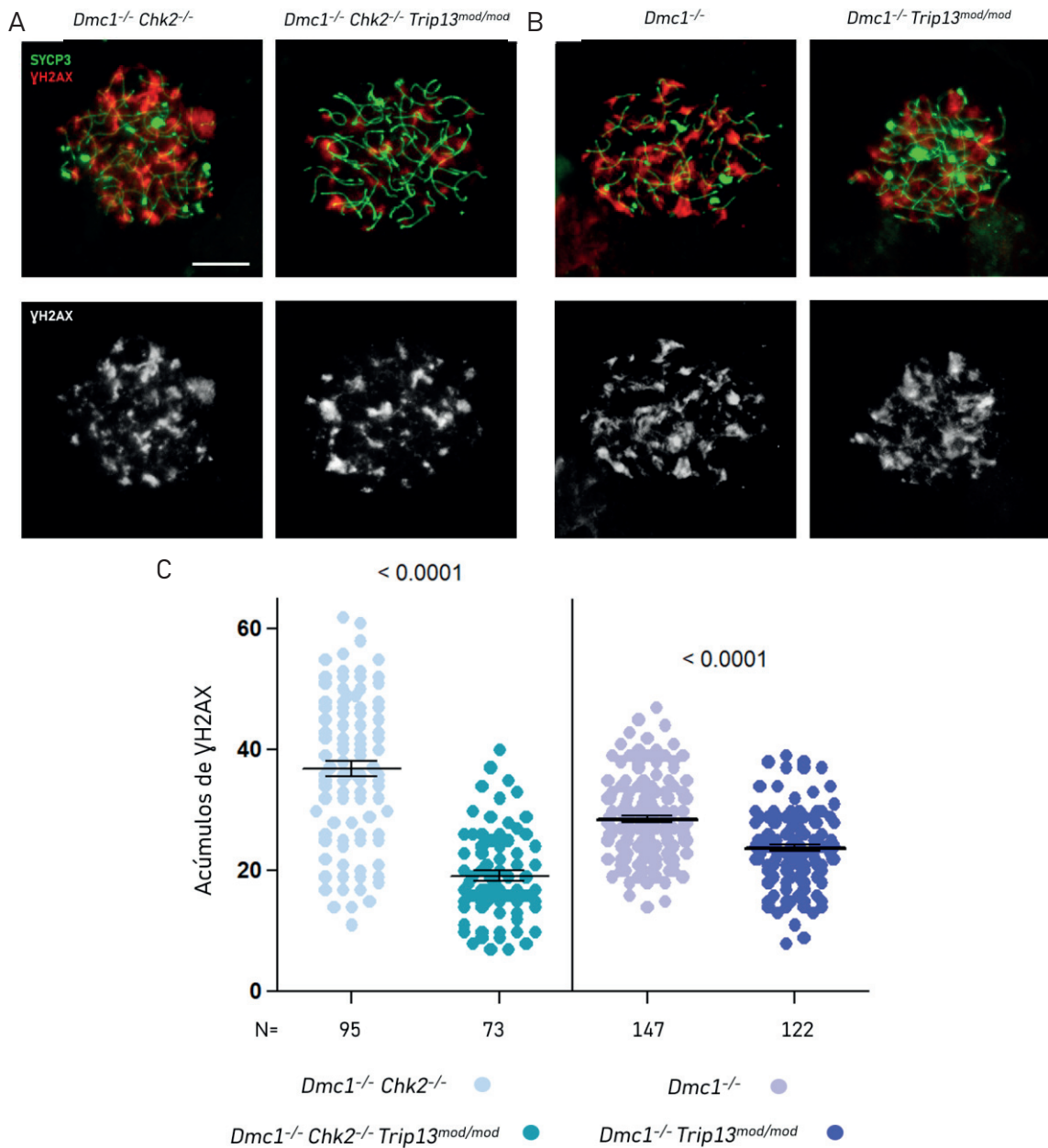


Figura 4-33. Los mutantes de *Trip13* presentan menos acúmulos de γ H2AX. A y B) Imágenes representativas de espermatocitos *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}*, *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}Trip13^{mod/mod}*, *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-}Trip13^{mod/mod}* respectivamente en paquiteno-like marcados contra SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo). La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico mostrando los acúmulos de γ H2AX en espermatocitos en paquiteno-like en los mutantes mencionados. Se puede observar como los mutantes de *Trip13* presentan menos acúmulos de γ H2AX. Análisis T de Student.

Debido a que los mutantes de *Trip13* presentaron menor acumulación de γ H2AX en paquiteno-like, lo siguiente que se analizó fue si estos mutantes también presentaban menos marcadores de recombinación meiótica como RAD51 y RPA. Se analizó la dinámica de RAD51 en los espermatocitos en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like de los mutantes *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}* y *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}Trip13^{mod/mod}* (**Figura**

4-34, Tabla 4-5). Los espermatocitos *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}Trip13^{mod/mod}* presentaron menor cantidad de foci de RAD51 en leptoteno ($p < 0,0001$, T de Student), cigoteno ($p < 0,0001$, T de Student) y paquiteno-like que los espermatocitos *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}* ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-34C, Tabla 4-5**). La misma tendencia se observó en los mutantes *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}* (**Figura 4-35, Tabla 4-5**), en los que espermatocitos *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}* también presentaron una reducción en el número de foci de RAD51 en leptoteno ($p = 0,0139$, T de Student), cigoteno ($p < 0,0001$, T de Student) y paquiteno-like ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-35C, Tabla 4-5**).

A continuación, se analizó la presencia de ssADN gracias al marcaje de RPA. El análisis de la dinámica de RPA en los espermatocitos de los mutantes *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}* (**Figura 4-36C, Tabla 4-5**) reveló la misma tendencia que en los análisis anteriores con γ H2AX y RAD51. En los espermatocitos de *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}*, RPA se encontró en menor cantidad en leptoteno ($p = 0,0314$, T de Student), cigoteno ($p = 0,0004$, T de Student) y paquiteno-like ($p < 0,0001$, T de Student) comparado con el mutante *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* (**Figura 4-36C, Tabla 4-5**). En el caso de los mutantes *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}* (**Figura 4-37, Tabla 4-5**), los mutantes de *Trip13* presentaron menor cantidad de foci de RPA en leptoteno ($p = 0,0050$, T de Student), cigoteno ($p < 0,0001$, T de Student) y paquiteno-like ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-37C, Tabla 4-5**).

La depleción de *Chk2* en los espermatocitos causó que, al no activarse el *checkpoint* de recombinación, estos mutantes presentaron un mayor número de acúmulos de γ H2AX, de foci de RAD51 y de RPA en todos los estadios y en ambos mutantes (*Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}*) comparados con los mutantes *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}*. Los resultados de que en los mutantes de *Trip13* hubo menor acumulación de γ H2AX, menor número de foci de RAD51 y de RPA indican que la recombinación meiótica parece reducida en ausencia de TRIP13.

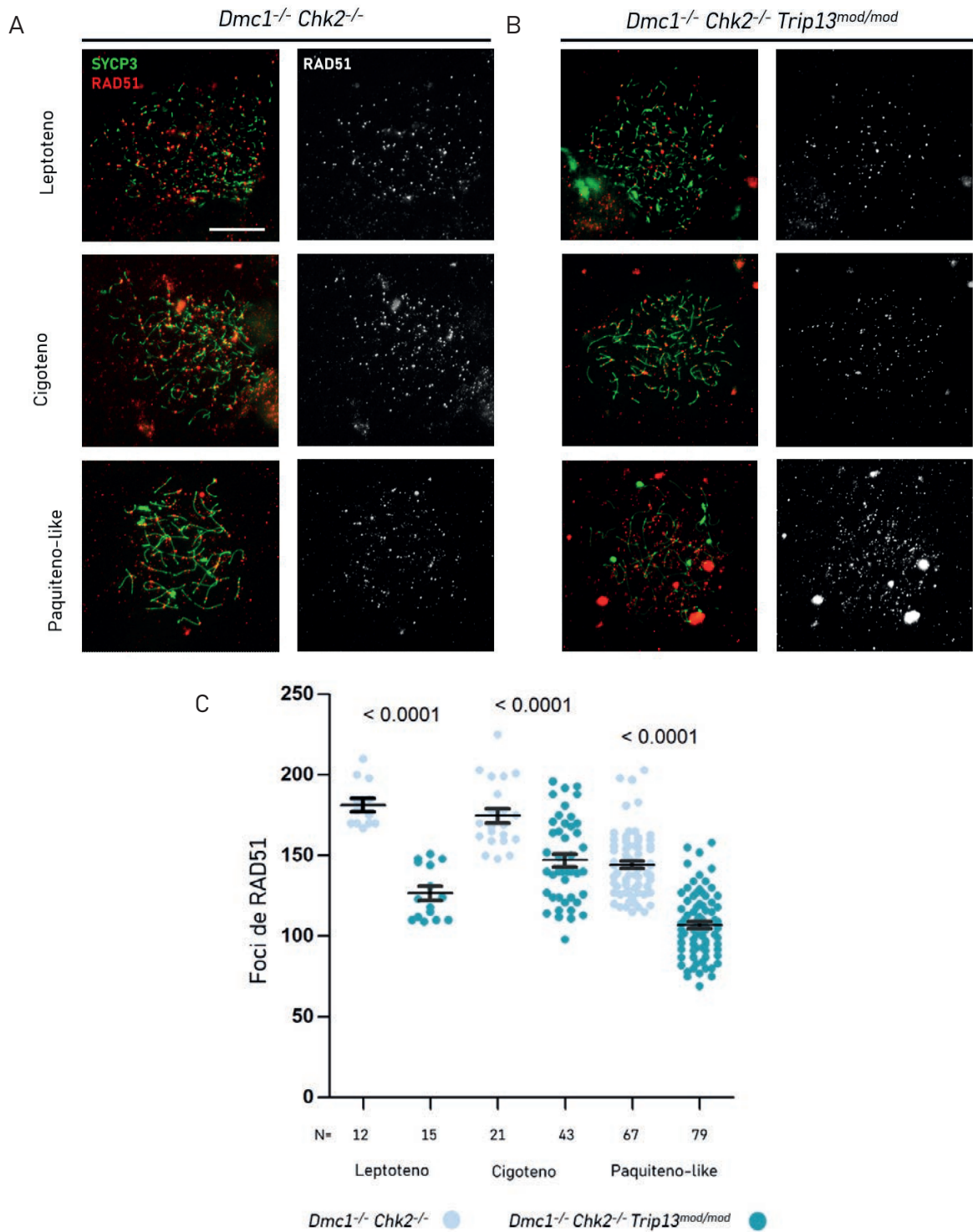


Figura 4-34. Los mutantes de *Trip13* presentan menos foci de RAD51. **A)** Imágenes representativas de espermatocitos *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. **B)** Espermatocitos *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}* en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico mostrando la cuantificación de los foci de RAD51 en los estadios mencionados en espermatocitos *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}*. Se aprecia menor acumulación de foci de RAD51 en los espermatocitos mutantes de *Trip13*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

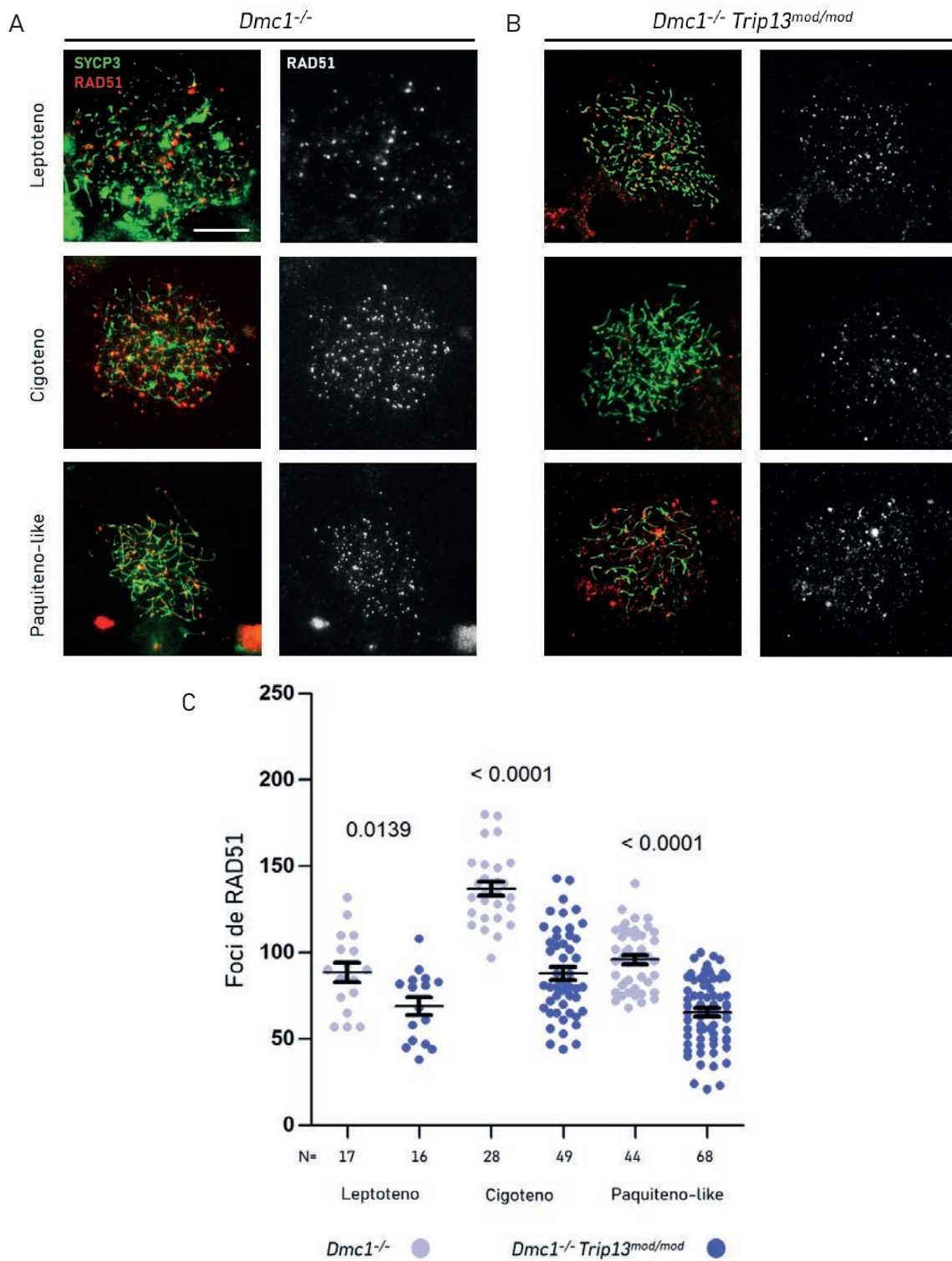


Figura 4-35. Los mutantes de *Trip13* presentan menos foci de RAD51. A) Imágenes representativas de espermatocitos *Dmc1^{-/-}* en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. **B)** Espermatocitos *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}* en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico mostrando la cuantificación de los foci de RAD51 en los estadios mencionados en espermatocitos *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Trip13^{mod/mod}*. Se aprecia menor acumulación de foci de RAD51 en los espermatocitos mutantes de *Trip13*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

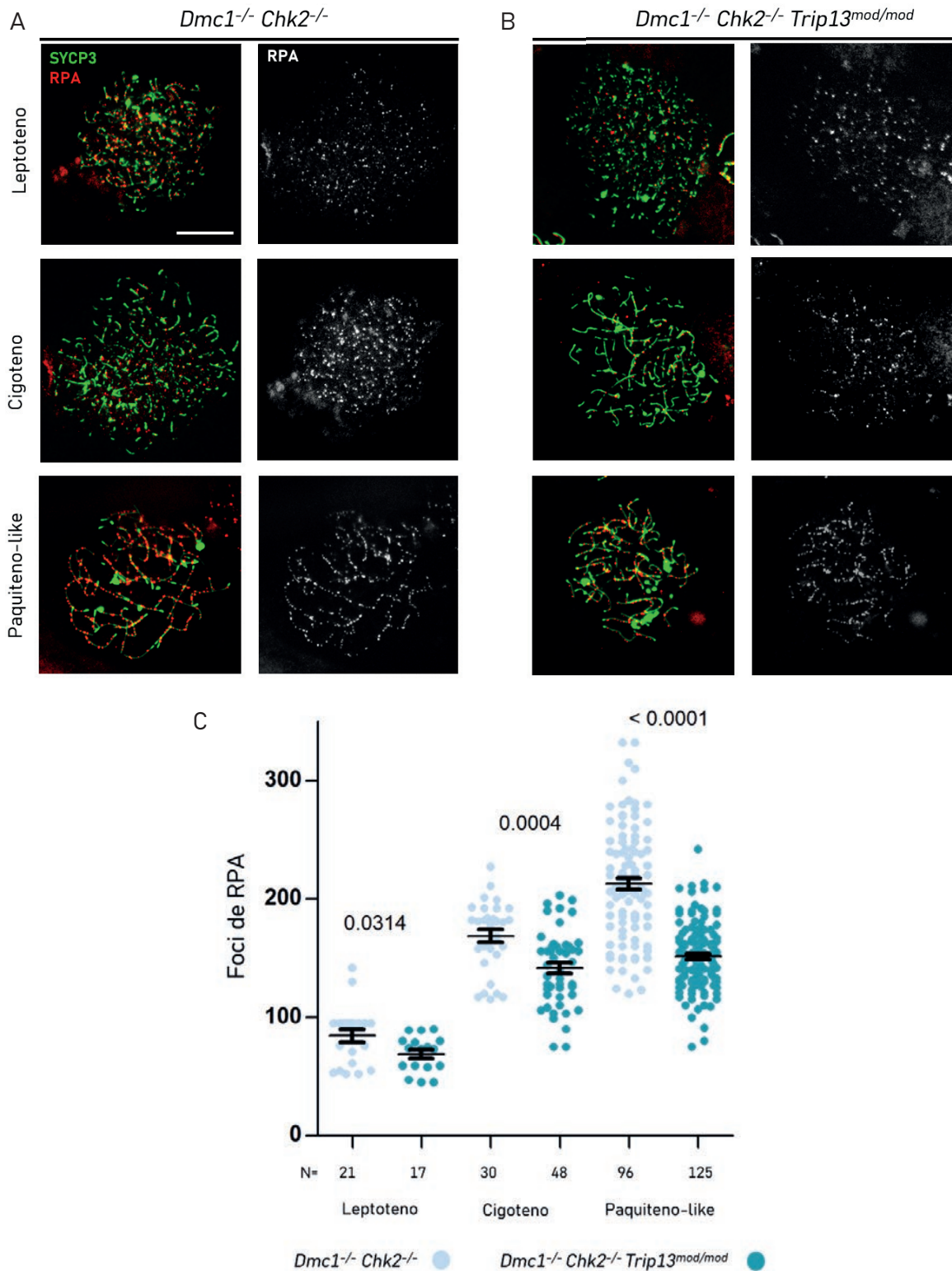


Figura 4-36. Los mutantes de *Trip13* presentan menos foci de RPA. A) Imágenes representativas de espermatocitos *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. **B)** Espermatocitos *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico mostrando la cuantificación de los foci de RPA en los estadios mencionados en espermatocitos *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Se aprecia menor acumulación de foci de RPA en los espermatocitos mutantes de *Trip13*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

Tabla 4-5. Número de foci presentes en los espermatoцитos del estadio indicado en los individuos *Dmc1*^{-/-}, *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-}, *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Se muestran los datos de RAD51 y RPA. Se presenta el promedio de foci junto a la SD del número de foci. La N corresponde al número de núcleos analizados.

	Leptoteno	Cigoteno	Paquiteno-like	
RAD51	<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Chk2</i> ^{-/-}	181,4 ± 4,118 N=12	174,7 ± 4,508 N=21	144,3 ± 2,436 N=67
	<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Chk2</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	126,6 ± 4,247 N=15	147,1 ± 4,028 N=43	106,9 ± 2,238 N=79
	<i>Dmc1</i> ^{-/-}	88,59 ± 5,493 N=17	137,0 ± 3,905 N=28	95,93 ± 2,629 N=44
	<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	68,94 ± 5,125 N=16	87,94 ± 3,642 N=49	65,49 ± 2,389 N=68
RPA	<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Chk2</i> ^{-/-}	88,24 ± 5,055 N=21	168,7 ± 5,532 N=30	212,7 ± 4,973 N=96
	<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Chk2</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	68,82 ± 3,484 N=17	141,6 ± 4,605 N=48	151,4 ± 2,547 N=125
	<i>Dmc1</i> ^{-/-}	80,05 ± 6,989 N=22	145,3 ± 12,33 N=31	215,1 ± 8,718 N=90
	<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	48,45 ± 4,605 N=11	91,86 ± 4,721 N=37	133,0 ± 5,664 N=107

4.3.2 Los mutantes de *Trip13* presentan más marcadores de NHEJ

En células somáticas, TRIP13 interactúa con el complejo Shieldin, la función del cual es inhibir la resección de los DSBs, promoviendo su reparación por NHEJ y, por lo tanto, inhibiendo la reparación por HR (Clairmont et al., 2020). REV7 es una proteína con dominio HORMA que forma parte del complejo Shieldin, junto a SHLD1, SHLD2 y SHLD3. SHLD3 interacciona con REV7 mediante el dominio *safety belt* de REV7. TRIP13 tiene la capacidad de disociar el complejo REV7-SHLD3, lo cual causa la disolución del complejo Shieldin (Clairmont et al., 2020). En células somáticas, cuando se elimina TRIP13, los DSBs son reparados por NHEJ y cuando se sobreexpresa TRIP13, se reparan por HR, por lo tanto, TRIP13 regula la elección de la vía de reparación de los DSBs (Clairmont et al., 2020; de Krijger et al., 2021). Después de detectar que la depleción de *Trip13* en los mutantes *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} causó una menor acumulación de daño no reparado y una menor presencia

de marcadores de HR, lo siguiente que quisimos comprobar es si los mutantes de *Trip13* presentan más factores relacionados con el complejo Shieldin y la vía de reparación por NHEJ durante la profase meiótica. Como TRIP13 interactúa con REV7 para desensamblar el complejo Shieldin en células somáticas, nuestra hipótesis fue que tendría una función similar en meiosis, por lo que los mutantes de *Trip13* presentarían más REV7.

Para comprobarlo, se hizo una inmunofluorescencia contra REV7 y SYCP3 en espermatocitos de ratones WT, *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. La señal de REV7 en los espermatocitos WT apareció en leptoteno como foci discretos pero muy intensos y siempre en los extremos de los fragmentos de SYCP3. En cigoteno también se pudo ver la señal intensa en los extremos de los cromosomas. En paquiteno temprano no se observó señal de REV7 ni en los cromosomas ni en la cromatina. A partir de paquiteno tardío apareció una señal en toda la cromatina que se intensificó en diploteno. La señal de REV7 ignoró la porción de cromatina de la vesícula sexual tanto en paquiteno como en diploteno (**Figura 4-38**).

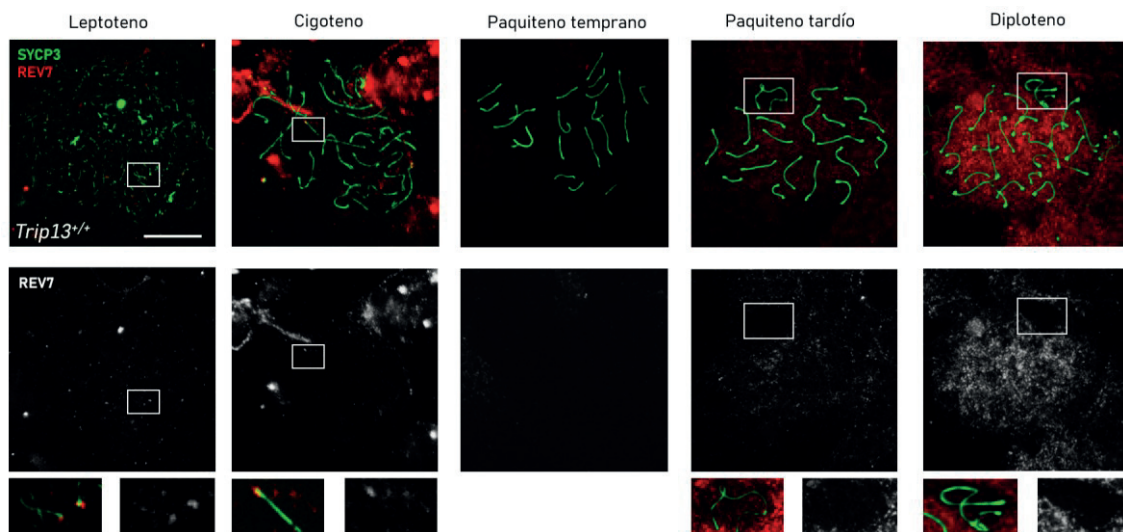


Figura 4-38. Dinámica de REV7 en espermatocitos WT. Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y REV7 (rojo) en espermatocitos WT. Las imágenes magnificadas en los recuadros de los espermatocitos en leptoteno y cigoteno muestra los foci intensos de REV7 en los extremos de los fragmentos de los ejes cromosómicos. En paquiteno temprano no se detecta ninguna señal de REV7. A partir de paquiteno tardío hay una señal extendida por toda la cromatina que se intensifica en diploteno. En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestra la vesícula sexual en paquiteno tardío y diploteno en los que se observa que no hay señal de REV7. La barra de escala equivale a 10 μ m.

En los espermatoцитos de los mutantes *Trip13^{mod/mod}* (Figura 4-39) y *Trip13^{-/-}* (Figura 4-40), REV7 también apareció como foci intensos en los fragmentos de SC en los estadios de leptoteno y cigoteno. En el estadio de paquiteno-like de los mutantes de *Trip13* hubo una acumulación de agregados de REV7 en la cromatina. Los foci de REV7 en leptoteno y cigoteno en los espermatoцитos mutantes de *Trip13* fueron más abundantes que en los espermatoцитos WT ($p < 0,0001$, T de Student) (Figura 4-40B, Tabla 4-6). Cabe destacar que en el paquiteno temprano de WT no había señal alguna de REV7. Estos resultados indican que en los mutantes de *Trip13* hay más foci de REV7 que en los espermatoцитos control.

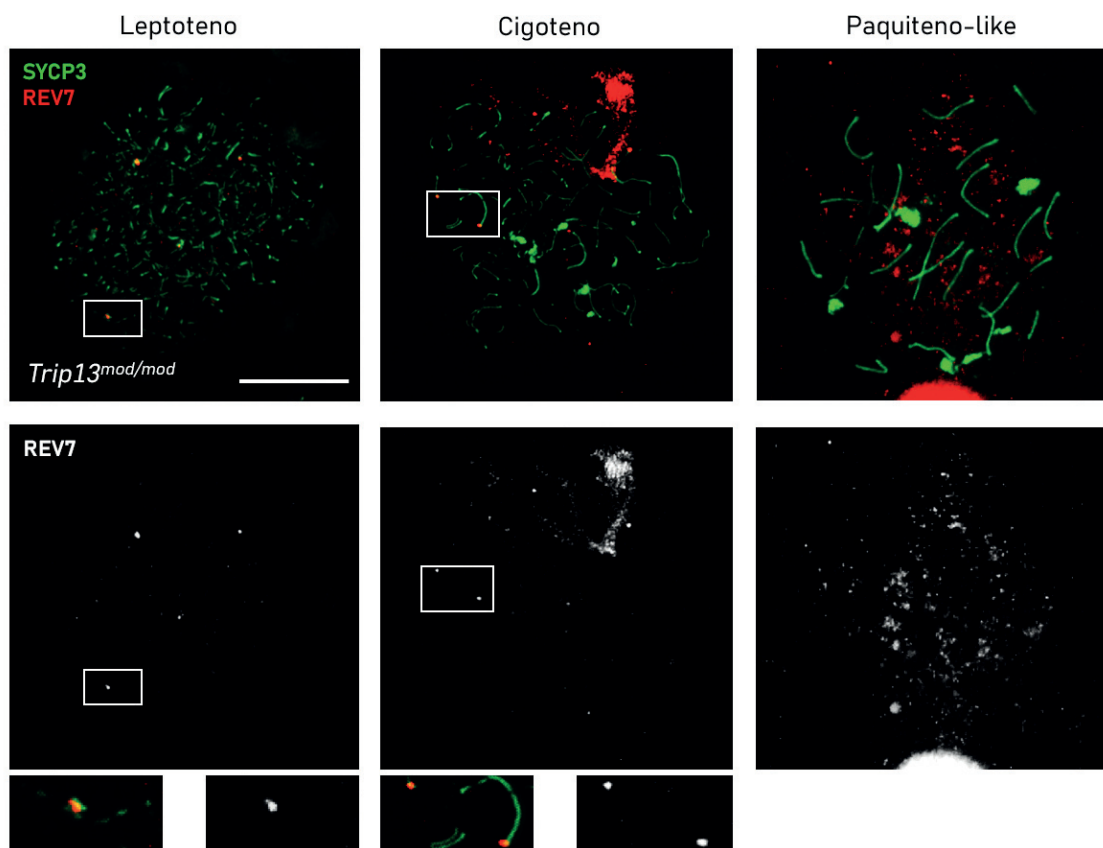


Figura 4-39. Los espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}* presentan REV7 en leptoteno y cigoteno. Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y REV7 (rojo) en espermatoцитos en los estadios mencionados del mutante *Trip13^{mod/mod}*. Las imágenes magnificadas en los recuadros muestran los foci intensos en los extremos de los fragmentos de SC en leptoteno y cigoteno. En paquiteno-like hay agregados de REV7 por la cromatina. La barra de escala equivale a 10 μm.

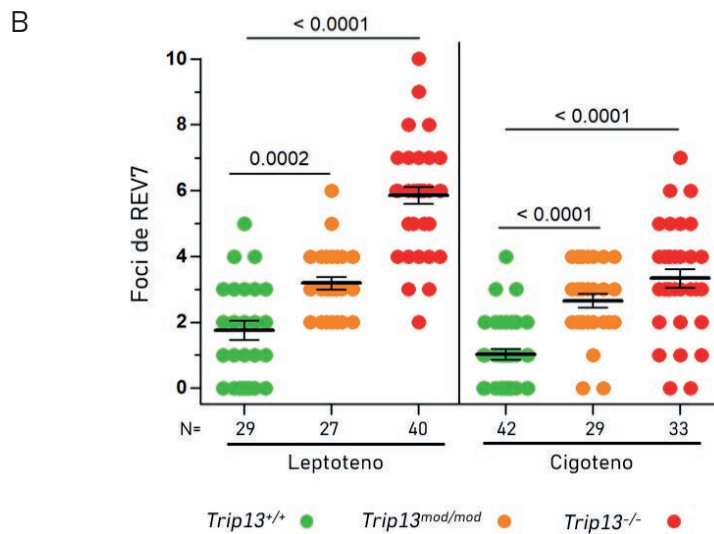
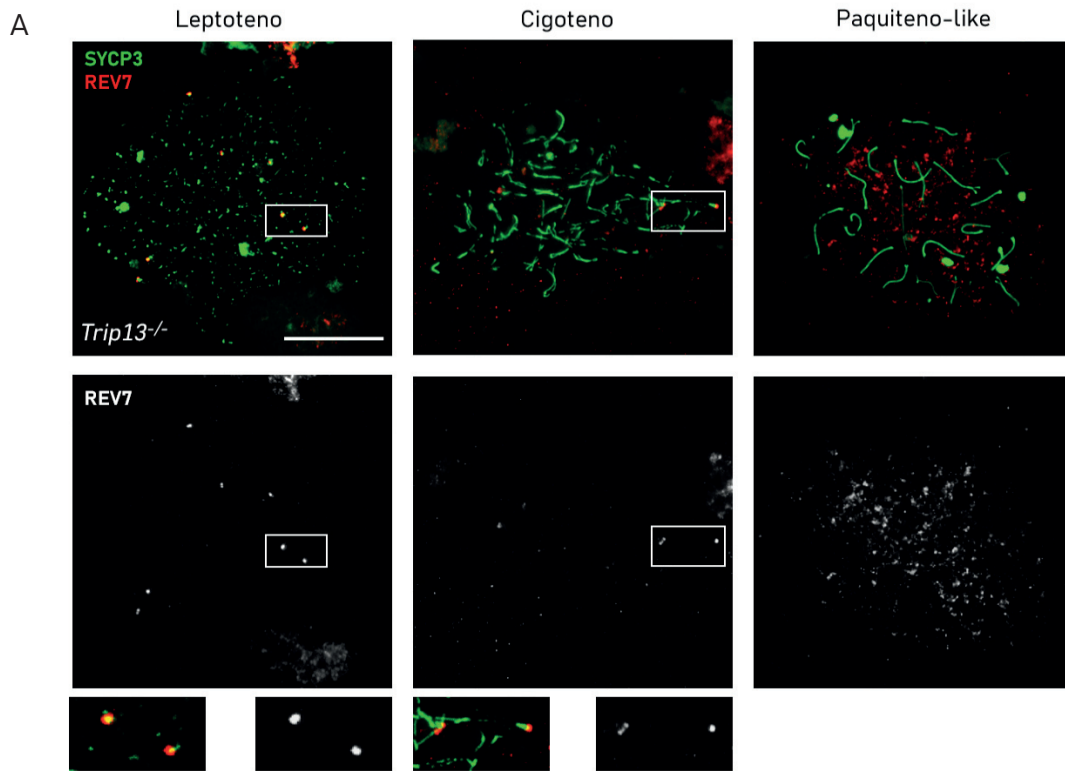


Figura 4-40. Los mutantes de *Trip13* presentan más REV7 en leptoteno y cigoteno que los espermatocitos WT. A) Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y REV7 (rojo) en espermatocitos *Trip13^{-/-}* en los estadios mencionados. Las imágenes magnificadas en los recuadros muestran los foci intensos en los extremos de los fragmentos de los ejes cromosomicos en leptoteno y cigoteno. En paquiteno-like hay agregados de REV7 por la cromatina. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico que muestra la cuantificación de los foci de REV7 en espermatocitos en leptoteno y cigoteno de ratones WT, *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. Se observa una mayor acumulación de foci de REV7 en ambos mutantes y en ambos estadios. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

También se analizó la presencia de REV7 en los mutantes *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}*, *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-}Trip13^{mod/mod}* (**Figura 4-41**), *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-}Trip13^{mod/mod}* (**Figura 4-42**). REV7 también se expresó en los espermatoцитos en leptoteno y cigoteno de los cuatro mutantes. Los espermatoцитos en paquiteno-like también acumularon REV7 en forma de agregados en la cromatina. Los espermatoцитos *Dmc1^{-/-}Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}* presentaron más foci de REV7 en leptoteno ($p < 0,0001$, T de Student), cigoteno ($p < 0,0001$, T de Student) y paquiteno-like ($p = 0,0011$, T de Student) (**Figura 4-41C, Tabla 4-6**). En los espermatoцитos *Dmc1^{-/-}Trip13^{mod/mod}*, REV7 también fue más abundante en los espermatoцитos en leptoteno ($p = 0,0003$, T de Student), cigoteno ($p = 0,0240$, T de Student) y paquiteno-like ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-42C, Tabla 4-6**). Estos resultados indican que hay mayor acumulación de REV7 en los primeros estadios de la profase meiótica en ausencia de *Trip13* en los mutantes de *Dmc1*.

Por último, se analizó si había REV7 en mutantes que no producen DSBs y si la ausencia de *Trip13* modificaba su número. Por ello, se estudió la presencia de REV7 en espermatoцитos *Spo11^{-/-}* y *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* (**Figura 4-43**). En los mutantes *Spo11^{-/-}* no se producen los DSBs dependientes de SPO11, y como consecuencia, los cromosomas homólogos no pueden aparearse ni sinapsar entre ellos (Baudat et al., 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000). En estos mutantes, al no producirse los DSBs dependientes de SPO11, no esperaríamos encontrar REV7. Si bien es cierto, se ha descrito que los espermatoцитos *Spo11^{-/-}* también presentan daño en el ADN. Sorprendentemente, el análisis reveló que los espermatoцитos *Spo11^{-/-}* también presentaron REV7 en los extremos de los ejes cromosómicos, pero la deficiencia de *Trip13* no causó diferencias en el número de foci de REV7 en leptoteno ($p = 0,7884$, T de Student), cigoteno ($p = 0,7171$, T de Student) ni paquiteno-like ($p = 0,2232$, T de Student) (**Figura 4-43C, Tabla 4-6**).

Estos resultados sugieren que en ausencia de DSBs, la deficiencia de *Trip13* no produce diferencias en el número de foci de REV7, y que los foci que se observan podrían ser artefactuales o presencia basal de la proteína en las células.

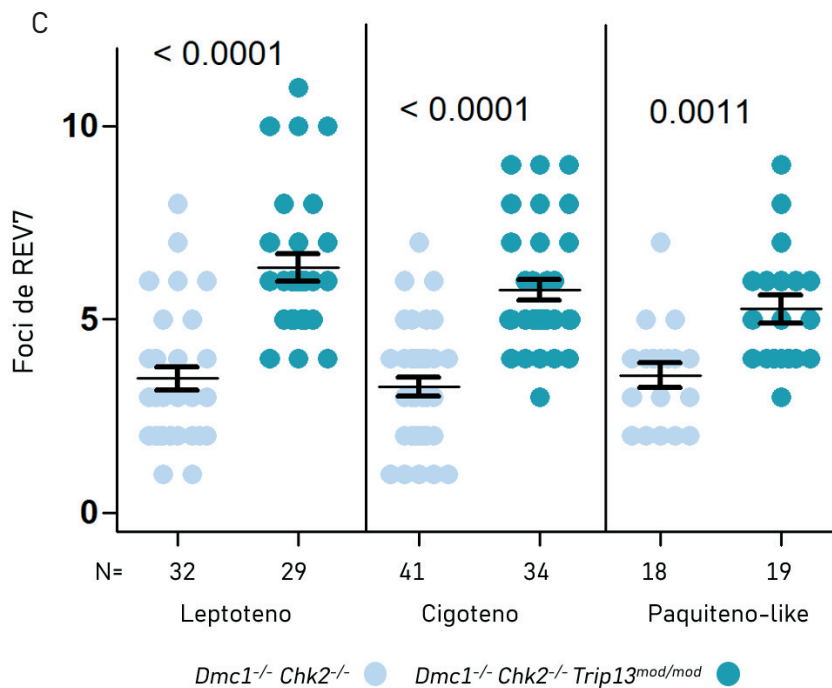
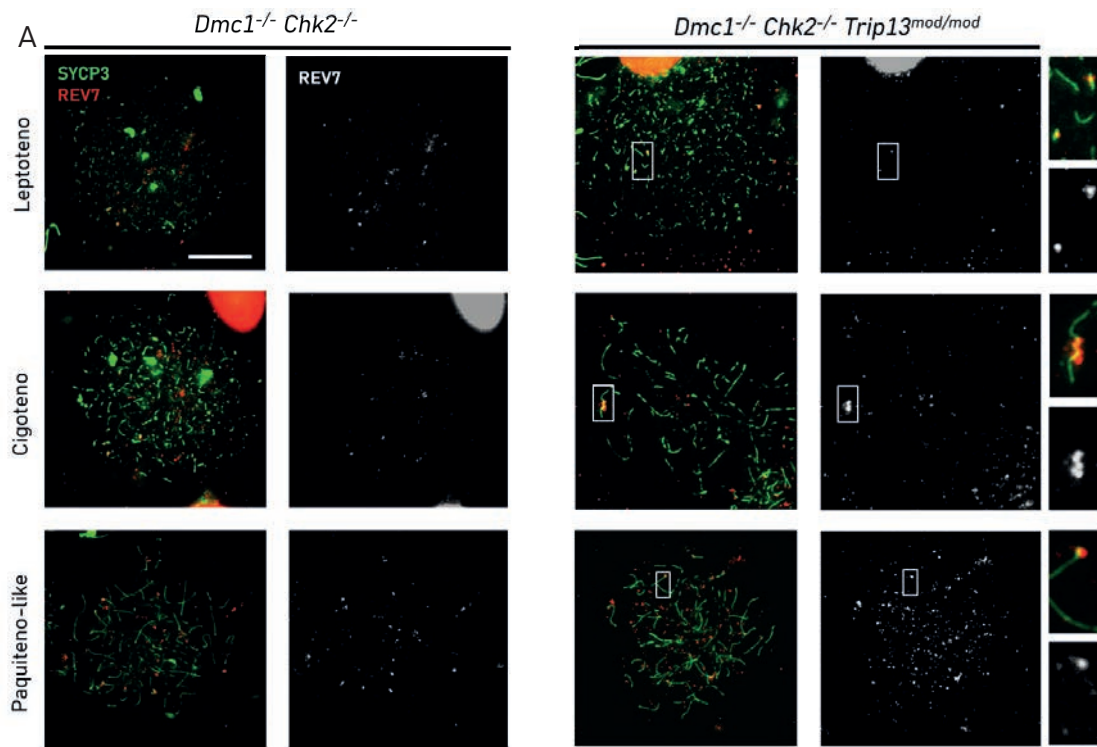


Figura 4-41. Dinámica de REV7 en espermatoцитos *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}*. **A y B)** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y REV7 (rojo) en espermatoцитos *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-} Trip13^{mod/mod}*. Las imágenes magnificadas en los recuadros muestran los foci intensos en los extremos de los fragmentos de los ejes cromosómicos. En paquiteno-like hay agregados de REV7 por la cromatina además de los foci en los extremos de los cromosomas. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico que muestra la cuantificación de los foci de REV7 observados en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. Se observa una mayor acumulación de foci de REV7 en los mutantes de *Trip13*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

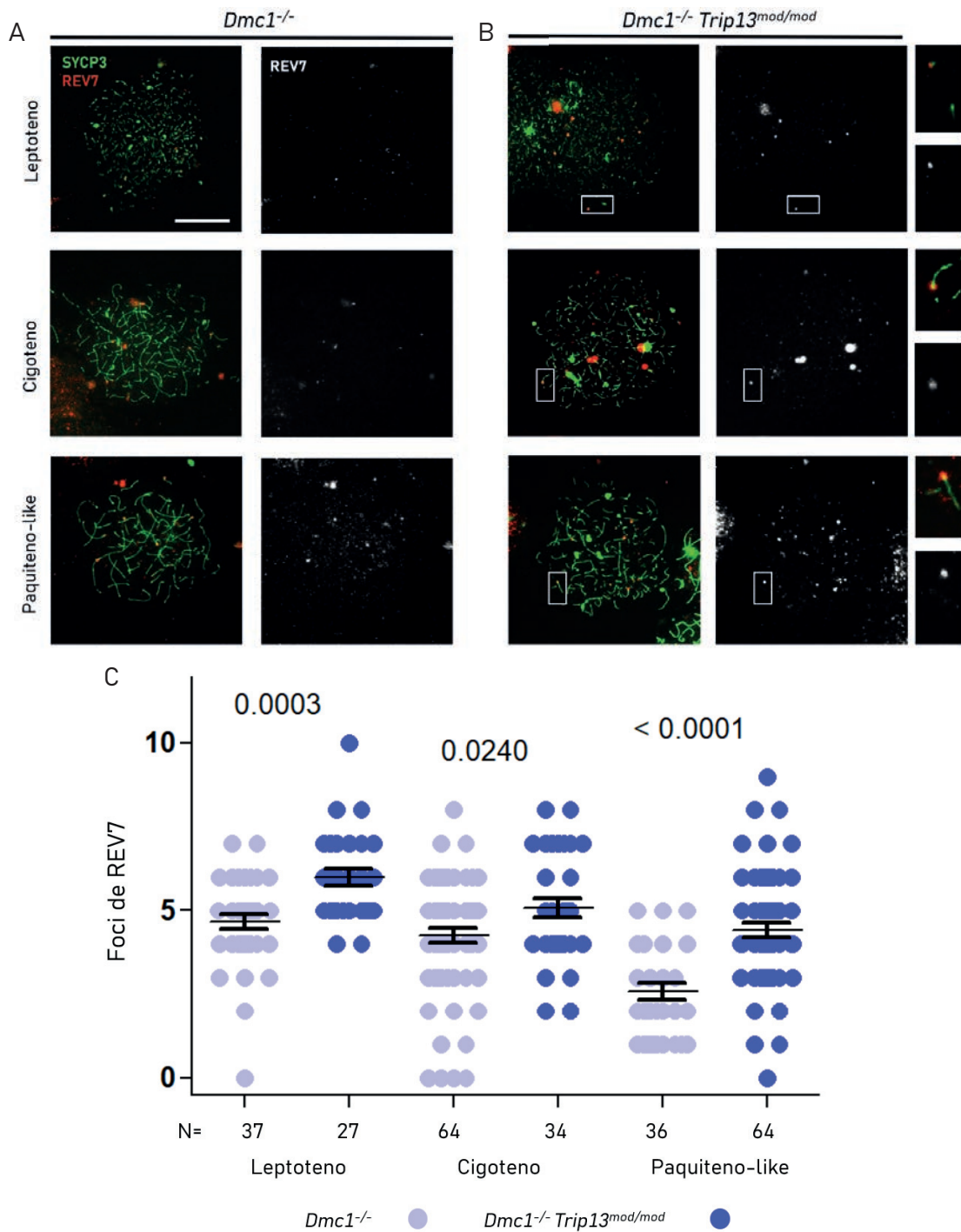


Figura 4-42. Dinámica de REV7 en espermatocitos *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. **A y B)** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y REV7 (rojo) en espermatocitos *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Las imágenes magnificadas en los recuadros muestran los foci intensos en los extremos de los fragmentos de los ejes cromosómicos. En paquiteno-like hay agregados de REV7 por la cromatina además de los foci en los extremos de los cromosomas. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico que muestra la cuantificación de los foci de REV7 observados en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. Se observa una mayor acumulación de foci de REV7 en los mutantes de *Trip13*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

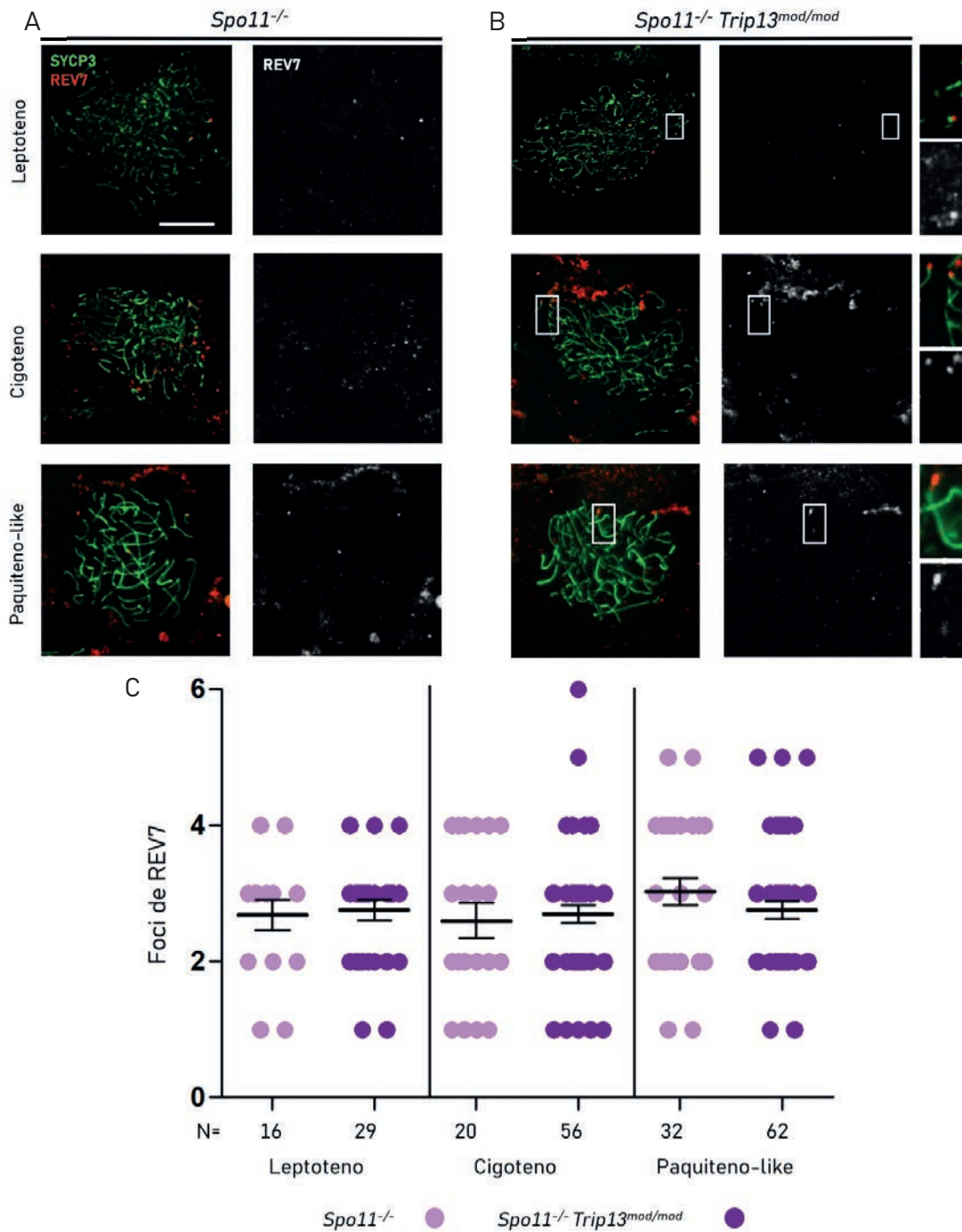


Figura 4-43. Dinámica de REV7 en espermatocitos *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. **A y B)** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y REV7 (rojo) en espermatocitos *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Las imágenes magnificadas en los recuadros muestran los foci intensos en los extremos de los fragmentos de los ejes cromosómicos. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C)** Gráfico que muestra la cuantificación de los foci de REV7 en leptoteno, cigoteno y paquiteno. No se observan diferencias en el número de foci en los mutantes analizados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

Tabla 4-6. Número de foci presentes en los espermatoцитos del estadio indicado en los individuos indicados. Se muestran los datos de REV7. Se presenta el promedio de foci junto a la SD del número de foci. La N corresponde al número de núcleos analizados.

	Leptoteno	Cigoteno	Paquiteno-like
<i>Trip13</i> ^{+/+}	1,759 ± 0,2922 N=29	1,024 ± 0,1686 N=42	/
<i>Trip13</i> ^{mod/mod}	3,185 ± 0,1927 N=27	2,655 ± 0,2122 N=29	/
<i>Trip13</i> ^{-/-}	5,850 ± 0,2596 N=40	3,333 ± 0,2876 N=33	/
<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Chk2</i> ^{-/-}	3,469 ± 0,3078 N=32	3,268 ± 0,2395 N=41	3,556 ± 0,3154 N=18
<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Chk2</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	6,345 ± 0,3519 N=29	5,765 ± 0,2705 N=34	5,263 ± 0,3574 N=19
<i>Dmc1</i> ^{-/-}	4,676 ± 0,2228 N=37	4,250 ± 0,2216 N=64	2,583 ± 0,2468 N=36
<i>Dmc1</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	6,000 ± 0,2615 N=27	5,088 ± 0,2780 N=34	4,422 ± 0,2291 N=64
<i>Spo11</i> ^{-/-}	2,688 ± 0,2183 N=16	2,600 ± 0,2555 N=20	3,031 ± 0,1982 N=32
<i>Spo11</i> ^{-/-} <i>Trip13</i> ^{mod/mod}	2,759 ± 0,1542 N=29	2,696 ± 0,1297 N=56	2,758 ± 0,1232 N=62

4.3.3 Los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} presentan acúmulos de 53BP1

Seguidamente, analizamos la localización de la proteína 53BP1, que protege los DSBs para evitar su resección y así promover su reparación por NHEJ (Gupta et al., 2018; Ward et al., 2003), en los espermatoцитos WT y *Trip13*^{-/-}. Para estudiar la localización de esta proteína, se usaron dos anticuerpos contra 53BP1, uno de conejo y el otro de ratón.

Con el anticuerpo de conejo, en los espermatoцитos WT, 53BP1 apareció a partir de paquiteno medio y tardío, pero no mostró señal en los espermatoцитos en leptoteno, cigoteno ni paquiteno temprano (**Figura 4-44A**), tal y como ya se había descrito (Enguita-Marruedo et al., 2019). En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} en cambio, no se detectó ninguna señal con este anticuerpo en ningún espermatoцитo (**Figura 4-44A**). Con el anticuerpo contra 53BP1 de ratón, la única señal detectable

en los espermatoцитos de WT se encontró en los cromosomas sexuales X e Y en paquiteno de manera muy tenue (**Figura 4-44B**).

En el mutante *Trip13*^{-/-} sin embargo, se detectó una señal muy intensa de 53BP1, parecida a acúmulos de γ H2AX, en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like por la cromatina y los autosomas (**Figura 4-44C**), similar a la señal detectada en espermatoцитos en paquiteno después de ser irradiados (Enguita-Marruedo et al., 2019). Se cuantificó el porcentaje de extremos de los bivalentes en espermatoцитos en paquiteno-like, tanto abiertos como cerrados, que presentaron acumulación de 53BP1. Los extremos abiertos de los paquiteno-like *Trip13*^{-/-} presentaron más acúmulos de 53BP1 que los extremos cerrados ($p < 0,00001$, G test) (**Figura 4-44D**). Se testaron ambos anticuerpos en espermatoцитos *53bp1*^{-/-} y no se detectó señal con ninguno de los dos anticuerpos (datos no mostrados). Estos resultados indicaron que los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} acumulan 53BP1.

4.3.4 Se acumula más Ku70 en ausencia de *Trip13*

También se analizó la expresión de la proteína Ku70, la cual está involucrada en la protección de los extremos de ADN durante la NHEJ (Chang et al., 2017). Se comprobó la localización de Ku70 mediante inmunofluorescencia contra Ku70 y γ H2AX en secciones de testículo de ratones WT y *Trip13*^{mod/mod}. En los túbulos seminíferos de los ratones WT, Ku70 se expresó en espermatoцитos en paquiteno y diploteno (**Figura 4-45**), como ya se había descrito previamente (Ahmed et al., 2013; Enguita-Marruedo et al., 2019). En los túbulos del mutante *Trip13*^{mod/mod} en cambio, Ku70 y γ H2AX colocalizaron en los espermatoцитos tanto en la vesícula sexual como en los acúmulos en la cromatina (**Figura 4-46**).

También se analizó la expresión de Ku70 en extensiones de espermatoцитos WT y del mutante *Trip13*^{-/-}. Coincidiendo con la expresión de Ku70 en secciones de testículo, no se observó señal de Ku70 en los espermatoцитos WT en los primeros estadios de la profase meiótica. A partir de paquiteno tardío y en diploteno, Ku70 se encontró en la vesícula sexual y expresó una señal por la cromatina del espermatoцитo (**Figura 4-47A**). En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-}, Ku70 apareció en cigoteno y paquiteno-like en la cromatina (**Figura 4-47B**). Estos resultados indican que hay acumulación de Ku70 en los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} en estadios tempranos.

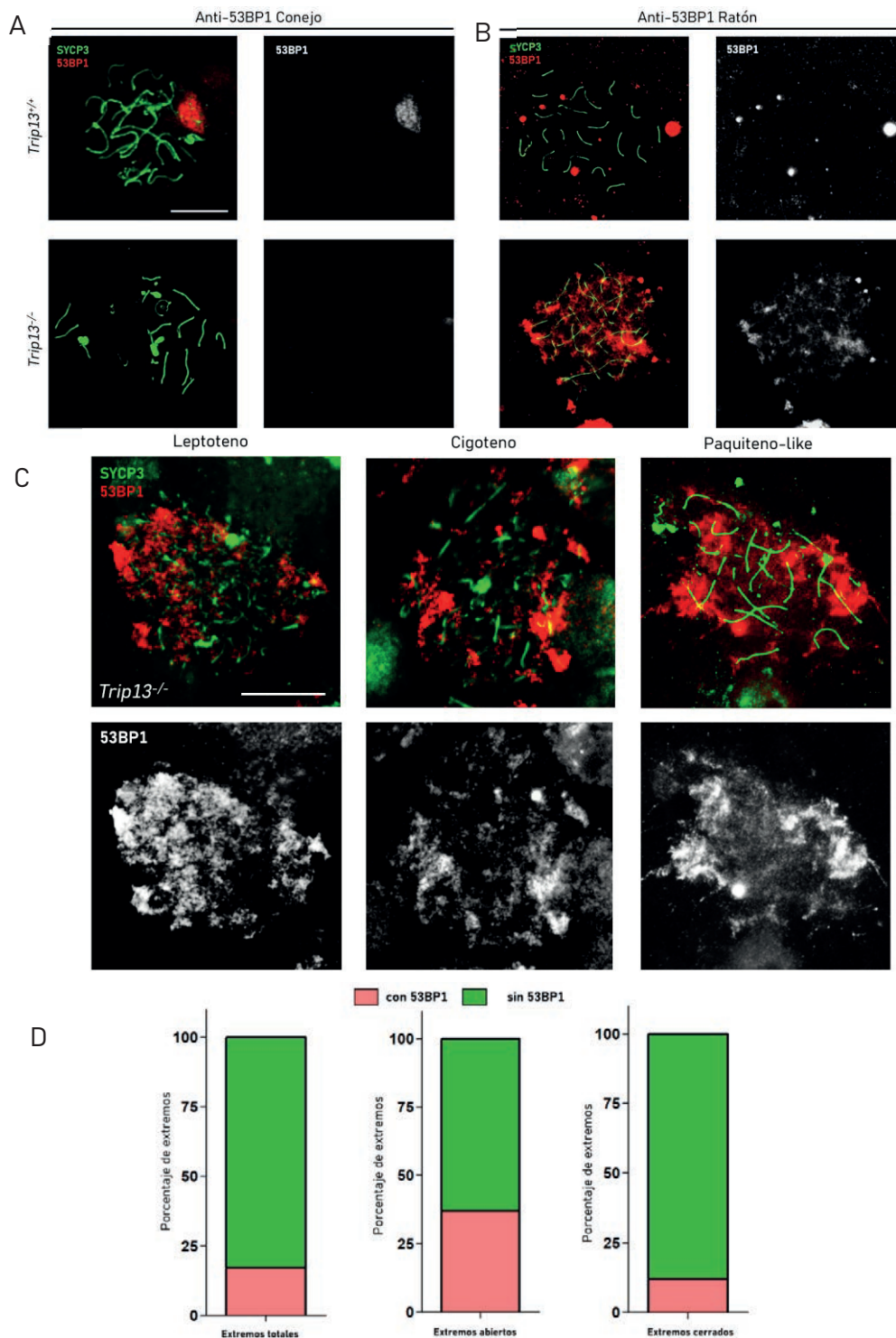


Figura 4-44. Los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} acumulan 53BP1. **A)** Imágenes representativas de espermatoцитos en paquiteno de *Trip13*^{+/+} y paquiteno-like de *Trip13*^{-/-} marcados contra SYCP3 (verde) y 53BP1 de conejo (rojo). **B)** Imágenes representativas de espermatoцитos en paquiteno de *Trip13*^{+/+} y paquiteno-like de *Trip13*^{-/-} marcados contra SYCP3 (verde) y 53BP1 de ratón (rojo). **C)** Imágenes representativas de espermatoцитos en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like del mutante *Trip13*^{-/-} marcados contra SYCP3 (verde) y 53BP1 Ms (rojo). La barra de escala equivale a 10 μ m. **D)** Gráficos mostrando el porcentaje de extremos de bivalentes de espermatoцитos *Trip13*^{-/-} en paquiteno-like del con presencia o ausencia de 53BP1. El gráfico de la izquierda muestra los extremos totales, el del centro los extremos abiertos y el de la derecha los extremos cerrados. Núcleos analizados para el recuento: 27.

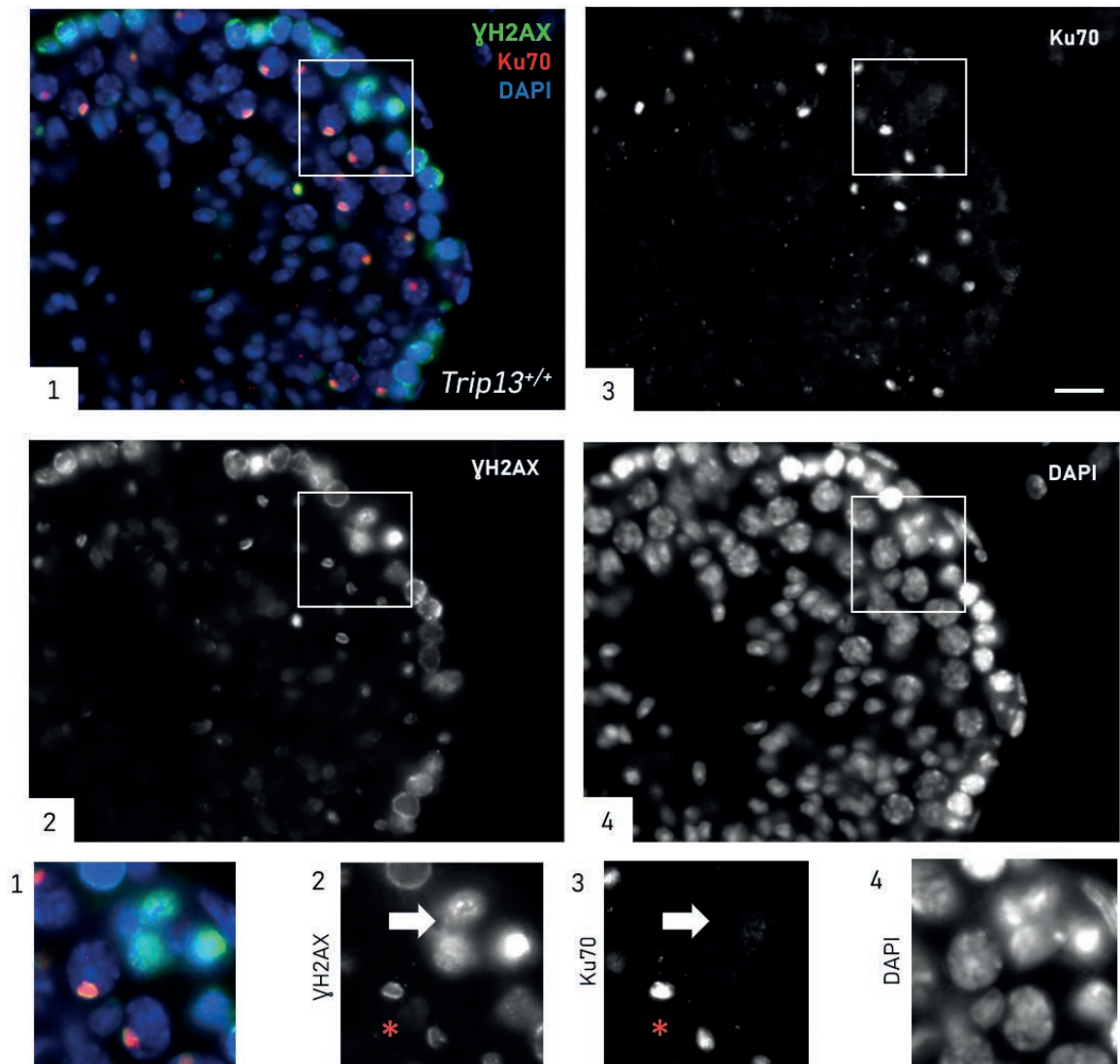


Figura 4-45. Ku70 se expresa en espermatocitos WT en paquiteno y diploteno. A) Imágenes representativas de secciones de testículo de ratón *Trip13^{+/+}* marcados contra γ H2AX (verde), Ku70 (rojo) y DAPI (azul). Las imágenes magnificadas en los recuadros destacan espermatocitos con señal de γ H2AX en la cromatina sin expresión de Ku70 marcados con una flecha. También se puede observar dos espermatocitos con vesícula sexual marcada con una señal γ H2AX y Ku70 que colocaliza marcados con un asterisco rojo. La barra de escala equivale a 20 μ m.

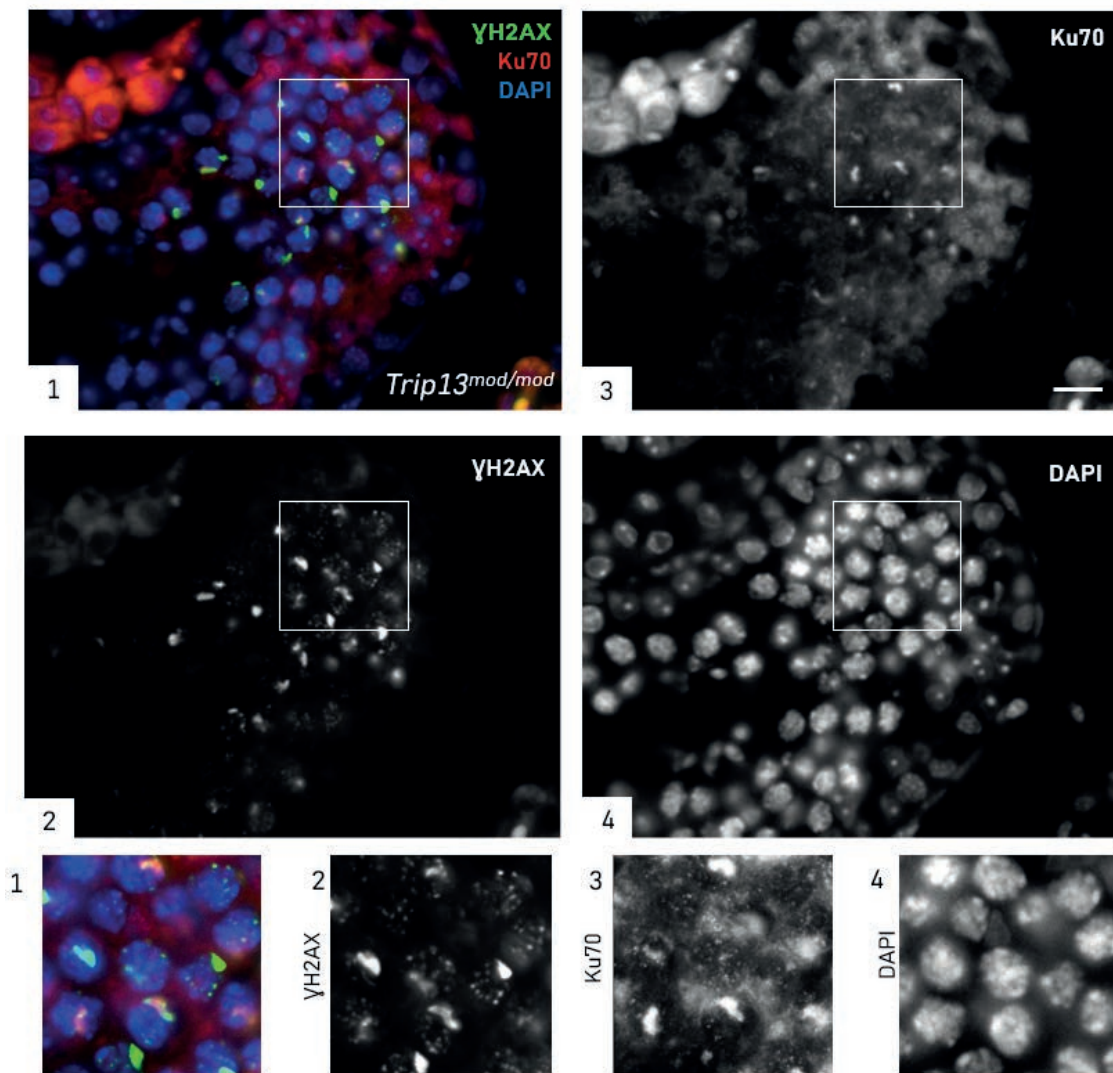


Figura 4-46. Los espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}* en estadios tempranos presentan Ku70. A) Imágenes representativas de secciones de testículo del mutante *Trip13^{mod/mod}* marcados contra γ H2AX (verde), Ku70 (rojo) y DAPI (azul). Las imágenes magnificadas en los recuadros destacan espermatoцитos que presentan acúmulos de γ H2AX en la cromatina y en la vesícula sexual con señal de Ku70 que colocaliza con γ H2AX. La barra de escala equivale a 20 μ m.

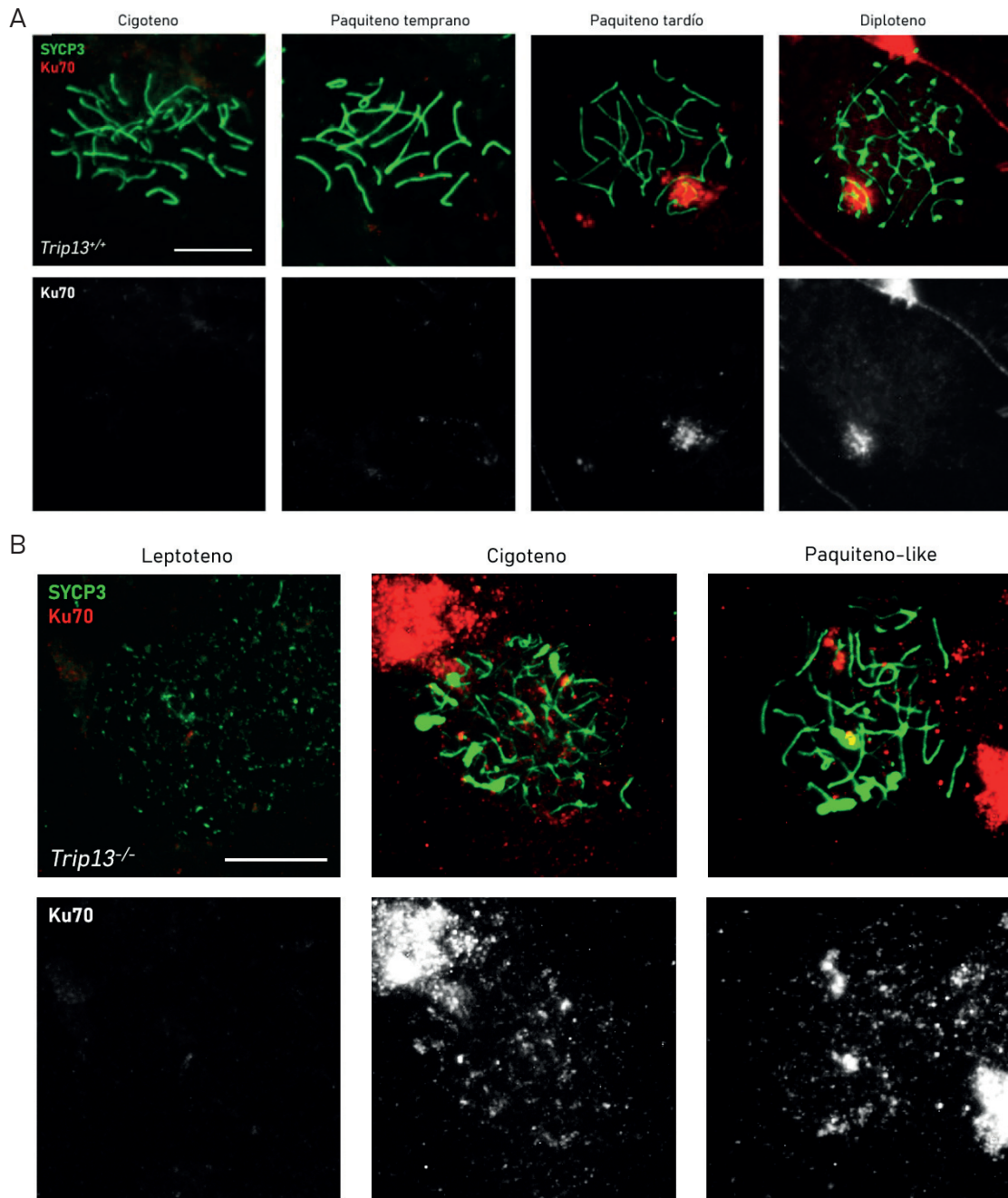


Figura 4-47. Los espermatocitos *Trip13*^{-/-} en cigoteno y paquiteno-like presentan Ku70. A) Imágenes representativas de extensiones de espermatocitos *Trip13*^{+/+} en cigoteno, paquiteno temprano, paquiteno tardío y diploteno marcados contra SYCP3 (verde) y Ku70 (rojo). Ku70 no se expresa en los primeros estadios de la profase meiótica, y a partir de paquiteno medio-tardío y en diploteno se expresa en la vesícula sexual. **B)** Imágenes representativas de extensiones de espermatocitos *Trip13*^{-/-} en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like marcados contra SYCP3 (verde) y Ku70 (rojo). En cigoteno y paquiteno-like hay acumulación de Ku70 por la cromatina. La barra de escala equivale a 10 μ m.

4.4 Estudio de la función telomérica de TRIP13 durante la meiosis

El hallazgo de que TRIP13 se encuentra localizada en los telómeros durante la profase meiótica sugiere que podría estar participando en algunos eventos relacionados con el funcionamiento del telómero durante la meiosis. En levadura PCH2 evita la producción de DSBs en las secuencias repetitivas del ADN ribosomal (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). Durante la meiosis, la formación de DSBs alrededor de secuencias repetitivas está bien controlada, ya que estas porciones son susceptibles de sufrir recombinación homóloga no alélica (NAHR), lo cual puede generar inestabilidad genómica, como por ejemplo translocaciones o fusiones cromosómicas. Así que hipotetizamos que una posible función de TRIP13 en los telómeros podría ser la protección de estos extremos durante la profase meiótica.

4.4.1 No hay más formación de DSBs en los telómeros en ausencia de TRIP13

Si TRIP13 participa en la protección de los telómeros evitando la formación de los DSBs, se esperaría que los mutantes de *Trip13* tuvieran más telómeros con daño en el ADN. Lo primero que se investigó fue si se encontraban marcadores de DSBs en los telómeros mediante inmunofluorescencia contra γ H2AX en paquiteno temprano de WT y paquiteno-like de los mutantes de *Trip13* (**Figura 4-48A**). El recuento de extremos de los autosomas con γ H2AX reveló que en los ratones WT el 26% de extremos presentan γ H2AX frente al 74% de extremos con ausencia de γ H2AX. En el análisis de la presencia de γ H2AX en los espermatoцитos mutantes de *Trip13* en paquiteno-like se observó que el porcentaje de extremos de los autosomas con γ H2AX tanto en el mutante *Trip13^{mod/mod}* (26,5%) como en el mutante *Trip13^{-/-}* (31%) fue similar a los espermatoцитos WT ($p=0,92$, G test en *Trip13^{mod/mod}*; $p=0,43$, G test en *Trip13^{-/-}*) (**Figura 4-48B**). También se midió la distancia del telómero hasta el primer acúmulo de γ H2AX en el SC y tampoco se encontraron diferencias entre los espermatoцитos WT y los *Trip13^{mod/mod}* ($p=0,4809$, T de Student) y *Trip13^{-/-}* ($p=0,09$, T de Student) (**Figura 4-48C**). Estos resultados sugieren que no hay más formación de DSBs en los telómeros en ausencia de TRIP13.

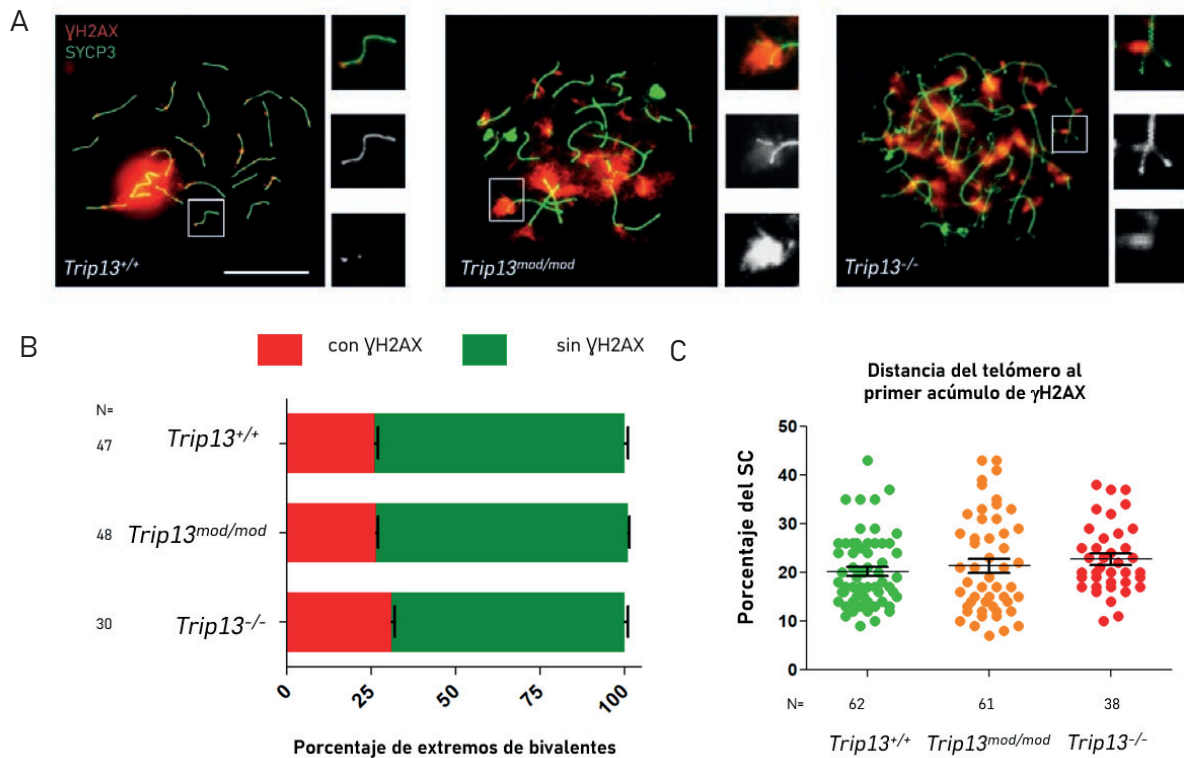


Figura 4-48. No se producen más DSBs en los telómeros en ausencia de *Trip13*. **A)** Imágenes representativas de espermatocitos WT en paquiteno temprano, y en paquiteno-like de los mutantes *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}* con marcaje contra SYCP3 (verde) y γ H2AX (rojo). Las imágenes magnificadas de los recuadros muestran foci de γ H2AX en los extremos de los bivalentes. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico de barras comparando el porcentaje de extremos de los autosomas con o sin γ H2AX en espermatocitos WT, *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. **C)** Gráfico comparando la distancia del telómero hasta el primer acúmulo de γ H2AX en espermatocitos WT, *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. La N corresponde al número de núcleos analizados.

Como la presencia de γ H2AX en los telómeros fue similar en WT y los mutantes de *Trip13*, quisimos comprobar si estos DSBs se reparaban mediante recombinación homóloga. Para ello, se analizó la presencia de RAD51 en los telómeros de los espermatocitos WT en paquiteno y paquiteno-like de los mutantes de *Trip13* (**Figura 4-49A**). En el recuento de foci de RAD51 solo se tuvo en cuenta los foci que se localizaban en los telómeros para el análisis. No se encontraron diferencias en cuanto al número de foci de RAD51 presentes en los telómeros en los ratones WT y en los mutantes *Trip13^{mod/mod}* ($p=0,2638$, T de Student), *Trip13^{sev/sev}* ($p=0,7091$, T de Student) y *Trip13^{-/-}* ($p=0,5120$, T de Student)(**Figura 4-49B**). Estos resultados sugieren que la recombinación meiótica no está alterada en los telómeros en ausencia de TRIP13.

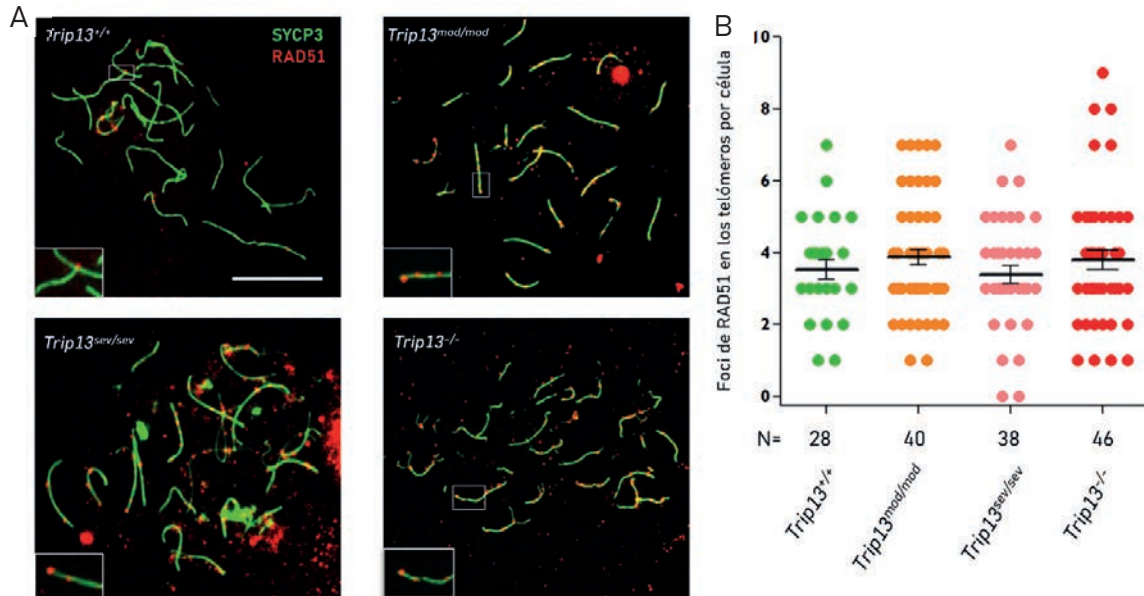


Figura 4-49. La recombinación meiótica no está alterada en los telómeros en ausencia de *Trip13*. **A)** Imágenes representativas del marcaje contra SYCP3 (verde) y RAD51 (rojo) en espermatocitos en paquiteno temprano de WT, y paquiteno-like de los mutantes *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*. Las imágenes magnificadas de los recuadros muestran los foci de RAD51 en los telómeros. La barra de escala equivale a 10 μm. **B)** Gráfico de barras que muestra el número de foci de RAD51 en los telómeros de los espermatocitos en paquiteno de los ratones WT, y en paquiteno-like de los mutantes *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*. No se observan diferencias en cuanto al número medio de foci de RAD51 en los telómeros por célula. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.4.2 Los mutantes de *Trip13* presentan más fusiones entre cromosomas

El hallazgo de que los mutantes de *Trip13* presentan foci de REV7 y 53BP1 en los extremos podría indicar una posible función de TRIP13 inhibiendo la reparación vía NHEJ en los telómeros. De hecho, se ha relacionado 53BP1 con promover la movilidad de telómeros disfuncionales (Dimitrova et al., 2008). Los telómeros tienen un rango limitado de movimiento, pero cuando son dañados, su movilidad se incrementa significativamente, lo que podría promover que dos telómeros disfuncionales se acercaran lo suficiente, permitiendo a la maquinaria de NHEJ unir los dos extremos (Dimitrova et al., 2008).

Nuestra hipótesis es que si TRIP13 previene la fusión telomérica vía NHEJ, en los espermatocitos de los mutantes de *Trip13* esperaríamos encontrar más fusiones por los telómeros que en los espermatocitos WT. Por ello, se llevó a cabo el recuento de la presencia de fusiones cromosómicas en los espermatocitos en

paquiteno temprano de WT y en paquiteno-like de mutantes de *Trip13* mediante el marcaje contra SYCP3 y TRF2 como marcador telomérico (De Lange, 2005).

En los espermatoцитos WT de los ratones y los mutantes de *Trip13*, TRF2 aparece en los telómeros de los cromosomas como una señal intensa (**Figura 4-50A**). Se hizo el recuento de espermatoцитos en paquiteno que contenían cromosomas fusionados por los telómeros. Se consideraron fusiones cromosómicas aquellos casos en los que se encontraron dos ejes cromosómicos, marcados con SYCP3, lo suficientemente cercanos por los telómeros, o directamente unidos, de manera que solo se detectara una señal de TRF2 entre ellos. En los ratones WT, la gran mayoría de espermatoцитos en paquiteno temprano no presentaron fusiones (96,1%) y solo el 3,9% presentaron una fusión cromosómica (**Figura 4-50B**). En los espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}*, el 13% presentaban al menos una fusión y el 1% presentaba más de una fusión por célula (**Figura 4-50B**). En los mutantes *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*, la mitad de los espermatoцитos analizados presentaron al menos una fusión por célula (**Figura 4-50B**). La diferencia en la frecuencia de fusiones entre los espermatoцитos WT y *Trip13^{mod/mod}* ($p=0,017$, G test), *Trip13^{sev/sev}* ($p<0,0001$, G test) y *Trip13^{-/-}* ($p<0,0001$, G test) fueron estadísticamente significativas (**Figura 4-50B**). Estos resultados indican que TRIP13 previene la formación de fusiones teloméricas en los espermatoцитos.

Una de las características de los espermatoцитos de los mutantes de *Trip13* es la incapacidad de sinapsar completamente por los extremos. Esto es más evidente en los mutantes *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}* en los que hay más frecuencia de bivalentes con puntas abiertas (**ver apartado 4.5.1**). Para averiguar si las fusiones se daban entre telómeros sinapsados o no sinapsados en los mutantes de *Trip13*, se llevó a cabo un análisis en los espermatoцитos en paquiteno-like que presentaban fusiones y qué fracción de estas se producían entre telómeros no sinapsados y cuales entre telómeros sinapsados. En los mutantes *Trip13^{mod/mod}* el 86% de las fusiones se produjeron entre telómeros sinapsados, y solo el 13% entre telómeros asinapsados (**Figura 4-50C**). En los mutantes *Trip13^{sev/sev}* en cambio, el 73% de fusiones se dio entre extremos asinapsados (**Figura 4-50C**). En los ratones *Trip13^{-/-}*, las fusiones entre extremos asinapsados se dio en el 79,2% del total de las fusiones (**Figura 4-50C**). Estos resultados sugieren que TRIP13 es necesaria para evitar las fusiones de los telómeros asinapsados.

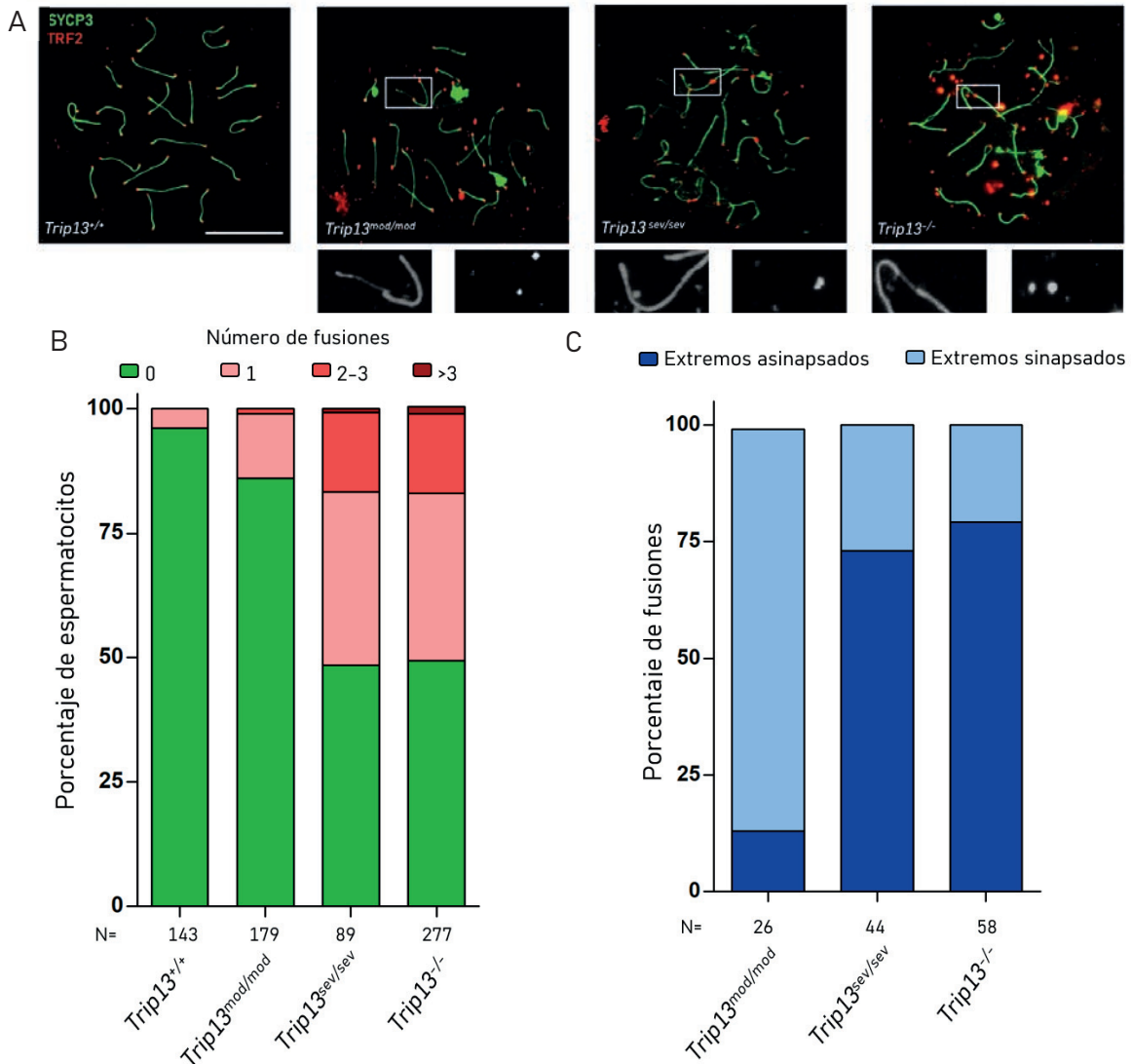


Figura 4-50. TRIP13 es necesaria para evitar las fusiones teloméricas. **A)** Imágenes representativas de espermatocitos WT, *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}* con marcaje contra SYCP3 (verde) y TRF2 (rojo) en paquiteno temprano de WT y paquiteno-like de los mutantes. Las imágenes magnificadas de los recuadros muestran ejemplos de fusiones entre cromosomas. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico de barras comparando la proporción de espermatocitos WT, *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}* que presentan fusiones. **C)** Gráfico de barras comparando la proporción de fusiones que ocurren en extremos sinapsados o extremos asinapsados en paquiteno-like de los mutantes de *Trip13*. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.4.3 Las fusiones involucran uniones de ADN

Seguidamente, se testó si las fusiones que presentaban los mutantes de *Trip13* involucraban uniones físicas de ADN. Para ello se prepararon extensiones de espermatocitos suplementado con DNAsa I (o sin DNAsa I en los portaobjetos control) en espermatocitos de WT y *Trip13^{-/-}*. Al finalizar el tratamiento con DNAsa I, se terminó el protocolo de extensión de espermatocitos (ver protocolo 3.4.4 para

más detalles). En este experimento, debido a la larga exposición al Lipsol (durante 2h) y que los cromosomas se dispersaron por el portaobjetos, se analizó la frecuencia de bivalentes fusionados encontrada respecto al total de bivalentes analizados (**Figura 4-51B**). Se comparó la frecuencia de fusiones tanto en los portaobjetos tratados con DNAsa I con la de los controles. En WT, en los portaobjetos control sin DNAsa I se encontró un 0,32% de fusiones, mientras que en los portaobjetos tratados con DNAsa I la frecuencia fue del 0,15% ($p=0,063$, T de Student) (**Figura 4-51C**). En los mutantes *Trip13^{-/-}*, en los portaobjetos sin tratamiento con DNAsa I se observó un 1,29% de fusiones, lo cual fue significativamente mayor a lo observado en el WT ($p=0,0002$, T de Student) y confirma que la ausencia de TRIP13 promueve las fusiones cromosómicas. Mientras en los portaobjetos tratados con DNAsa I este porcentaje se redujo significativamente hasta un 0,25% ($p= 0,0032$, T de Student). Estos resultados sugieren que las fusiones teloméricas de los mutantes de *Trip13* involucran uniones de ADN.

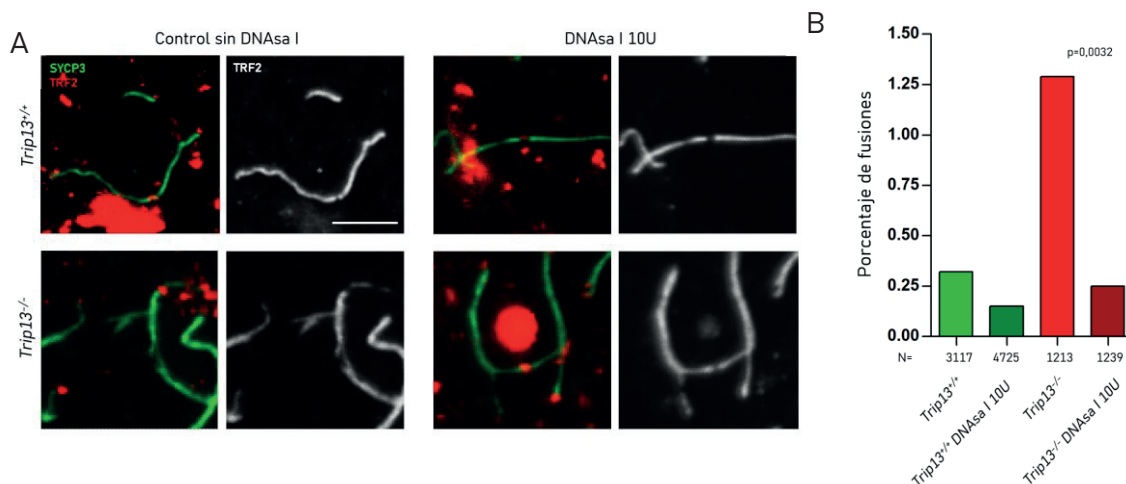


Figura 4-51. Las fusiones teloméricas en los espermatocitos *Trip13^{-/-}* involucran uniones de ADN. **A)** Imágenes representativas de fusiones cromosómicas en bivalentes de ratones *Trip13^{+/+}* y *Trip13^{-/-}* sin DNAsa I como control y con DNAsa I 10U. La barra corresponde a 2 μ M. **B)** Gráfico de barras que muestra la proporción de fusiones en ratones *Trip13^{+/+}* y *Trip13^{-/-}* sin DNAsa I y con DNAsa I 10U. Se observa que el tratamiento con DNAsa I en los espermatocitos *Trip13^{-/-}* reduce el porcentaje de fusiones encontradas. Análisis T de Student. La N corresponde al número de cromosomas analizados.

4.4.4 Las fusiones de cromosomas son dependientes de 53BP1

En estudios con células con telómeros disfuncionales, se comprobó que las células con 53BP1 presentaban un 33% de fusiones, mientras que en las células *53bp1*^{-/-} la frecuencia se redujo hasta el 0,6%, indicando que 53BP1 participa en promover las fusiones de telómeros disfuncionales (Dimitrova et al., 2008). En los mutantes de *Trip13* hemos comprobado que 53BP1 se acumula en los extremos, y que en ausencia de *Trip13* hay más fusiones teloméricas que involucran telómeros asinapsados. Por ello, analizamos si las fusiones que se observaron en los mutantes de *Trip13* eran dependientes de 53BP1. Gracias a nuestra colaboración con el laboratorio de la Dra. Maria Jasin (MSKCC, EE.UU.), pudimos obtener muestras de testículo de ratones *53bp1*^{-/-} y *53bp1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod}. Nuestra hipótesis fue que la mutación de *Trip13* no afectaría a la frecuencia de fusiones encontrada en los espermatoцитos *53bp1*^{-/-}.

Los mutantes de *53bp1* presentaron un nivel de fusiones parecido al observado en los animales WT (**Figura 4-52**). De manera interesante, no se observaron diferencias significativas entre la frecuencia de fusiones encontradas en los espermatoцитos de *53bp1*^{-/-} y *53bp1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} ($p=0,8485$, G test) (**Figura 4-52**). Tampoco se encontraron diferencias entre el número de fusiones presentes en espermatoцитos de ambos mutantes (**Figura 4-52**). El mutante *Trip13*^{mod/mod} presentó una mayor frecuencia de fusiones ($p= 0,05$, G test) así como un mayor número de fusiones por célula que los mutantes *53bp1*^{-/-} ($p=0,008$, T de Student) y *53bp1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} ($p=0,007$, T de Student) (**Figura 4-52**). Estos resultados sugieren que las fusiones teloméricas de los mutantes de *Trip13* son dependientes de 53BP1 y por tanto, posiblemente sean producto de la reparación por NHEJ.

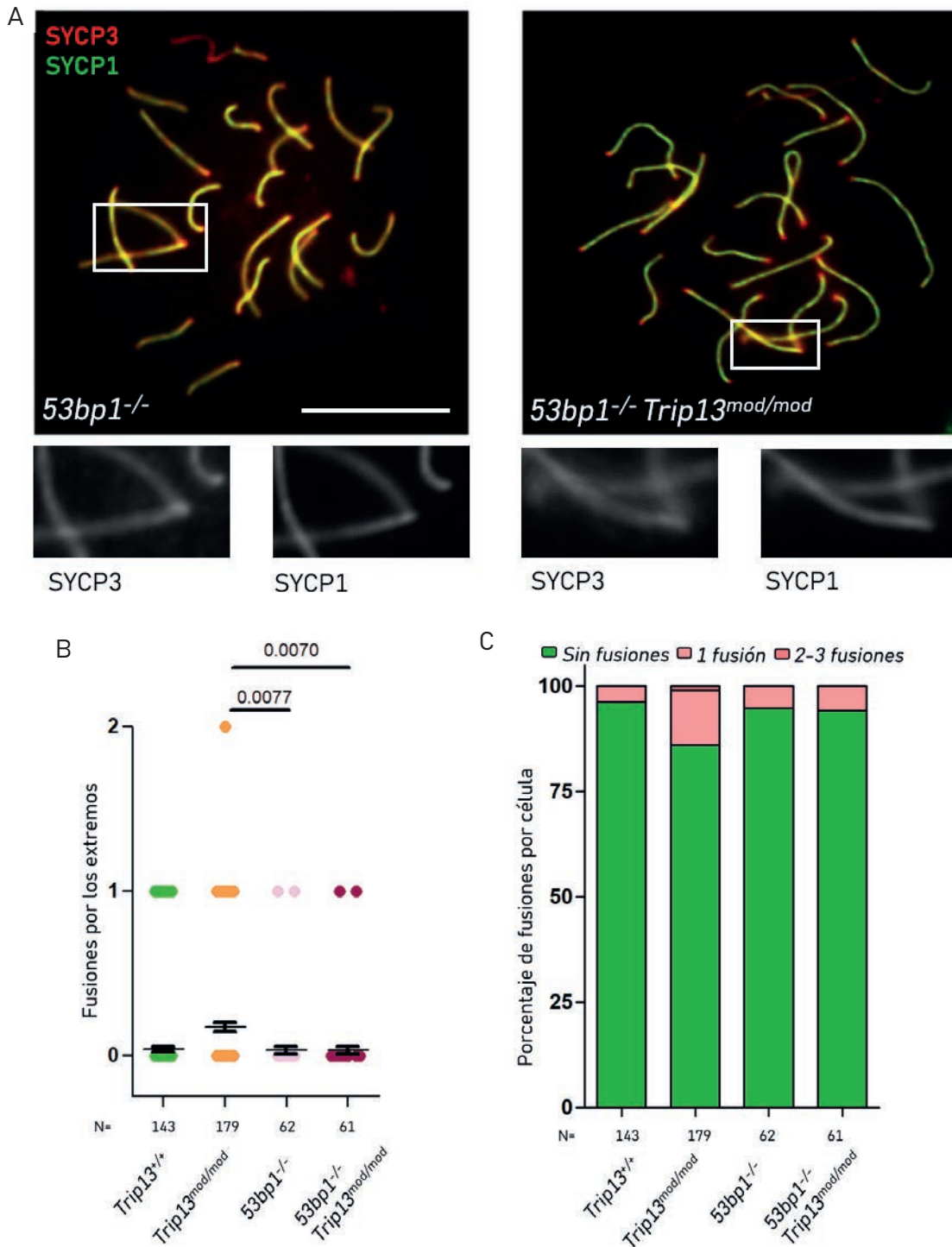


Figura 4-52. Las fusiones teloméricas de los mutantes de *Trip13* son dependientes de *53BP1*. **A)** Imágenes representativas de espermatocitos *53bp1*^{-/-} y *53bp1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} con marcaje contra SYCP1 (verde) y SYCP3 (rojo) en paquiteno temprano. Las imágenes magnificadas de los recuadros muestran fusiones entre cromosomas. La barra de escala equivale a 10 μm. **B)** Recuento de fusiones por célula en paquiteno de WT, *Trip13*^{mod/mod}, *53bp1*^{-/-} y *53bp1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod}. Análisis T de Student. **C)** Gráfico de barras comparando la proporción de espermatocitos que presentan fusiones en WT, *Trip13*^{mod/mod}, *53bp1*^{-/-} y *53bp1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod}. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.4.5 Los mutantes de *Trip13* presentan más fusiones en ausencia de DSB

Se quiso comprobar también si las fusiones observadas en los mutantes de *Trip13* eran dependientes de la formación de DSBs. Por ello, se estudió la presencia de fusiones en los espermatoцитos *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} (**Figura 4-53A**). El análisis reveló que en ausencia de SPO11, la fusión entre cromosomas es más frecuente y una gran mayoría (86%) de los espermatoцитos presentaban al menos una fusión por célula (**Figura 4-53B**). Este incremento en la frecuencia de fusiones en los espermatoцитos *Spo11*^{-/-} comparado con los de los ratones WT (**Figura 4-50B**) podría deberse a la incapacidad de los cromosomas homólogos de aparear entre ellos, y este hecho favorezca que haya más telómeros disponibles para producir fusiones. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la frecuencia de fusiones que se encontraban por célula frente al total de señales de TRF2 por célula. El análisis reveló que las fusiones relativas en los espermatoцитos *Spo11*^{-/-} eran más abundantes que en WT ($p < 0,0001$, T de Student) y que en *Trip13*^{mod/mod} ($p < 0,0001$, T de Student). Por otro lado, el análisis de fusiones en los espermatoцитos *Spo11*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} reveló que todos los espermatoцитos presentaban al menos una fusión, mostrando una mayor cantidad de fusiones que los espermatoцитos *Spo11*^{-/-} ($p < 0,0001$, G test). La cantidad relativa de fusiones encontrada entre los espermatoцитos *Spo11*^{-/-} y los espermatoцитos *Spo11*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} también fueron significativas más altas ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-53B**). En ausencia de los DSBs producidos por SPO11 hay más fusiones, y por lo tanto estas fusiones se producen a partir de roturas que no son inducidas por SPO11. Los resultados sugieren que además TRIP13 evita las fusiones cromosómicas, incluso cuando no se producen los DSBs meióticos.

Por último, se analizó la frecuencia de fusiones teloméricas en ausencia de *Dmc1* para comprobar si las fusiones eran dependientes de HR (**Figura 4-53A**). Entre los espermatoцитos *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} no hubo diferencias ni en la frecuencia de fusiones en los espermatoцитos ($p = 0,4645$, G test) ni entre el porcentaje de fusiones relativas ($p = 0,0912$, T de Student) (**Figura 4-53B**). Estos resultados indican que cuando la recombinación meiótica está comprometida, la ausencia de TRIP13 no causa un aumento en las fusiones teloméricas.

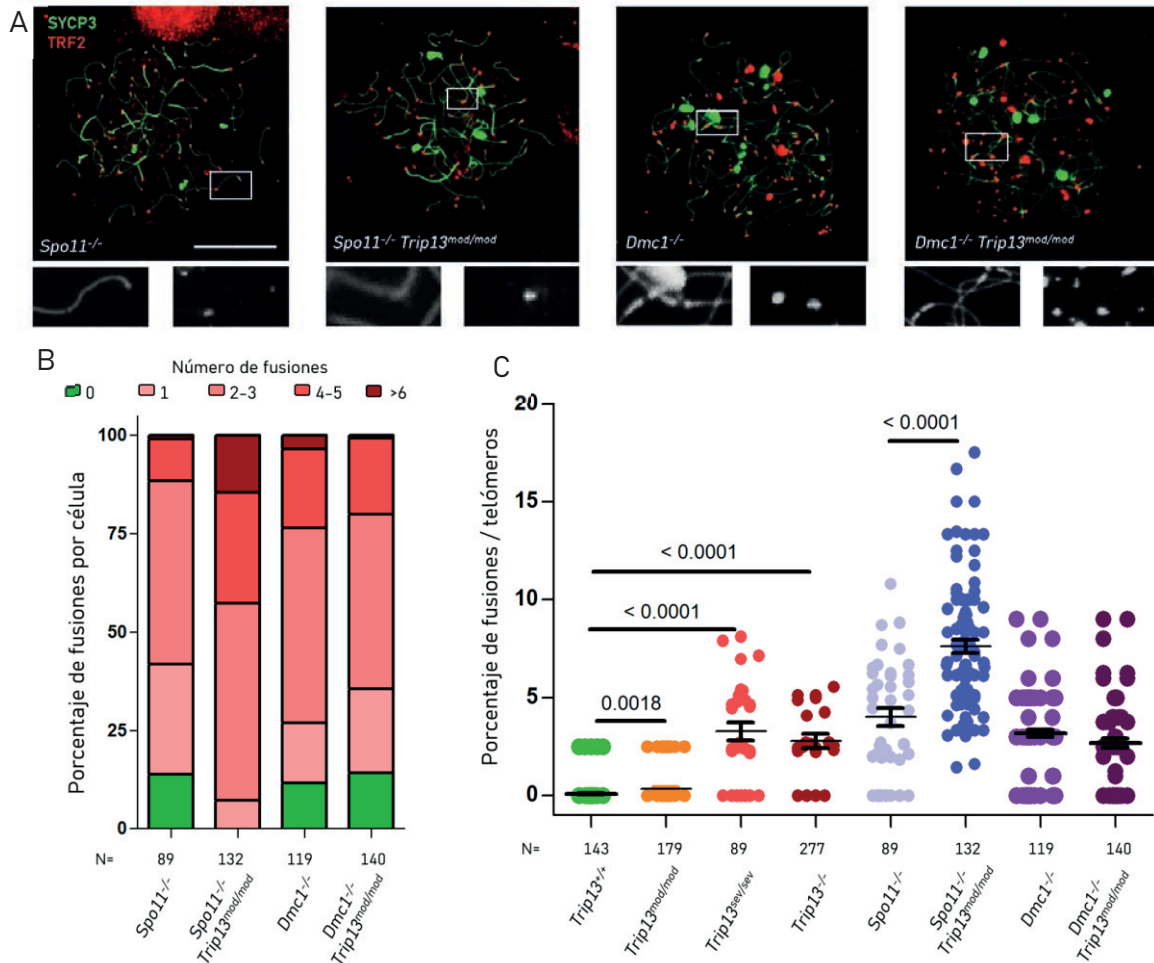


Figura 4-53. TRIP13 previene la fusión telomérica en ausencia de *Spo11*. **A)** Imágenes representativas de espermatocitos con marcaje contra SYCP3 (verde) y TRF2 (rojo) en paquiteno-like de los mutantes *Spo11*^{-/-}, *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}, *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Las imágenes magnificadas de los recuadros muestran fusiones entre cromosomas. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de fusiones por célula en paquiteno-like de los mutantes mencionados. **C)** Gráfico que muestra la cantidad relativa de fusiones teloméricas por espermatocito en los genotipos mencionados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.5 Función de TRIP13 en la sinapsis de los cromosomas homólogos

Durante la profase meiótica, los cromosomas homólogos aparean y estabilizan esta unión mediante el ensamblaje del SC. La sinapsis se puede observar y monitorizar mediante el marcaje de las proteínas de los elementos laterales (SYCP3) y los elementos centrales (SYCP1). En los espermatocitos WT, los primeros fragmentos de los elementos laterales aparecen en leptoteno. A partir de cigoteno, los cromosomas homólogos sinapsan, y aparece SYCP1 entre ellos. En paquiteno, los autosomas están completamente sinapsados y las proteínas SYCP3 y SYCP1 colocalizan en todos los autosomas, menos en las regiones asinapsadas de los cromosomas sexuales X e Y, que solo sinapsan por la región PAR. En diploteno, los cromosomas homólogos desinapsan, y solo se mantienen unidos por los quiasmas.

Cuando se caracterizaron los mutantes hipomórficos, se observó que en los espermatocitos *Trip13^{sev/sev}* la sinapsis se iniciaba de manera normal en leptoteno y cigoteno, pero no se encontraron espermatocitos en paquiteno completamente sinapsados (Roig et al., 2010). El estadio más avanzado de este mutante presentó una morfología de paquiteno-like, parecido a un espermatocito WT en estadio de cigoteno tardío de, ya que a pesar de que el SC se formaba de manera correcta entre los cromosomas homólogos y presentaban las acumulaciones típicas en los telómeros, mostraban asinapsis por los extremos y asinapsis intersticial (Roig et al., 2010). En el mutante moderado los defectos en la sinapsis fueron más sutiles y había espermatocitos que sí lograban sinapsar correctamente. Por ello, se sugirió que la presencia de TRIP13 era necesaria para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos. En este apartado se analizará en más detalle las anomalías sinápticas presentes en los mutantes de *Trip13* para entender como la implicación de TRIP13 en la sinapsis de los cromosomas homólogos. Además, se mostrarán datos que sugieren que lo que ocurre en los espermatocitos de los mutantes de *Trip13* no es una asinapsis de los cromosomas, si no una desinapsis prematura de los cromosomas homólogos.

4.5.1 Los mutantes de *Trip13* presentan defectos en la sinapsis

Analizando en más detalle los autosomas de los espermatoцитos en paquiteno-like de los mutantes de *Trip13* se pudieron observar principalmente dos defectos sinápticos. La primera anomalía sináptica fue la presencia de una asinapsis terminal en forma de puntas abiertas por los telómeros de los autosomas, que adoptan la morfología de letra Y. En estos extremos asinapsados había presencia de SYCP3, pero no depósito de SYCP1 (**Figura 4-54A**). Se cuantificó la frecuencia de puntas abiertas en espermatoцитos de ratones WT y de los distintos mutantes de *Trip13* analizados en este trabajo. En los ratones WT, la asinapsis terminal se encontró en el 4,23% de los espermatoцитos, que correspondieron a espermatoцитos que se encontraban en el estadio de cigoteno tardío, en los cuales se está completando la sinapsis de los cromosomas homólogos. En el mutante *Trip13^{mod/mod}* se observó que la frecuencia de espermatoцитos con asinapsis terminal era mucho más frecuente (39,8%) que en los espermatoцитos WT. El análisis de la frecuencia de asinapsis terminal en los mutantes *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}* reveló que más de la mitad de espermatoцитos (52,2% y 51,5% respectivamente) presentaron asinapsis terminal (**Figura 4-54B**).

El segundo defecto presente en los mutantes de *Trip13* fue la asinapsis intersticial, clasificada como “burbuja” por la forma que adopta (**Figura 4-54A**), tal y como se describió previamente (Roig et al., 2010). Este defecto solo se encontró en los autosomas de espermatoцитos de los mutantes en paquiteno-like pero no en los espermatoцитos WT en cigoteno tardío. En el mutante *Trip13^{mod/mod}* la presencia de “burbujas” encontrada en los espermatoцитos en paquiteno-like fue muy poco frecuente (3,4%) (**Figura 4-54C**). En cambio, se encontró que un 22,8% de espermatoцитos en paquiteno-like del mutante *Trip13^{sev/sev}* y un 27,1% del mutante *Trip13^{-/-}* presentaron este defecto en los autosomas (**Figura 4-54C**). Estos resultados sugieren que la presencia de TRIP13 es un factor limitante para que se produzcan defectos en la sinapsis de los cromosomas, e indican que TRIP13 es necesaria para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos.

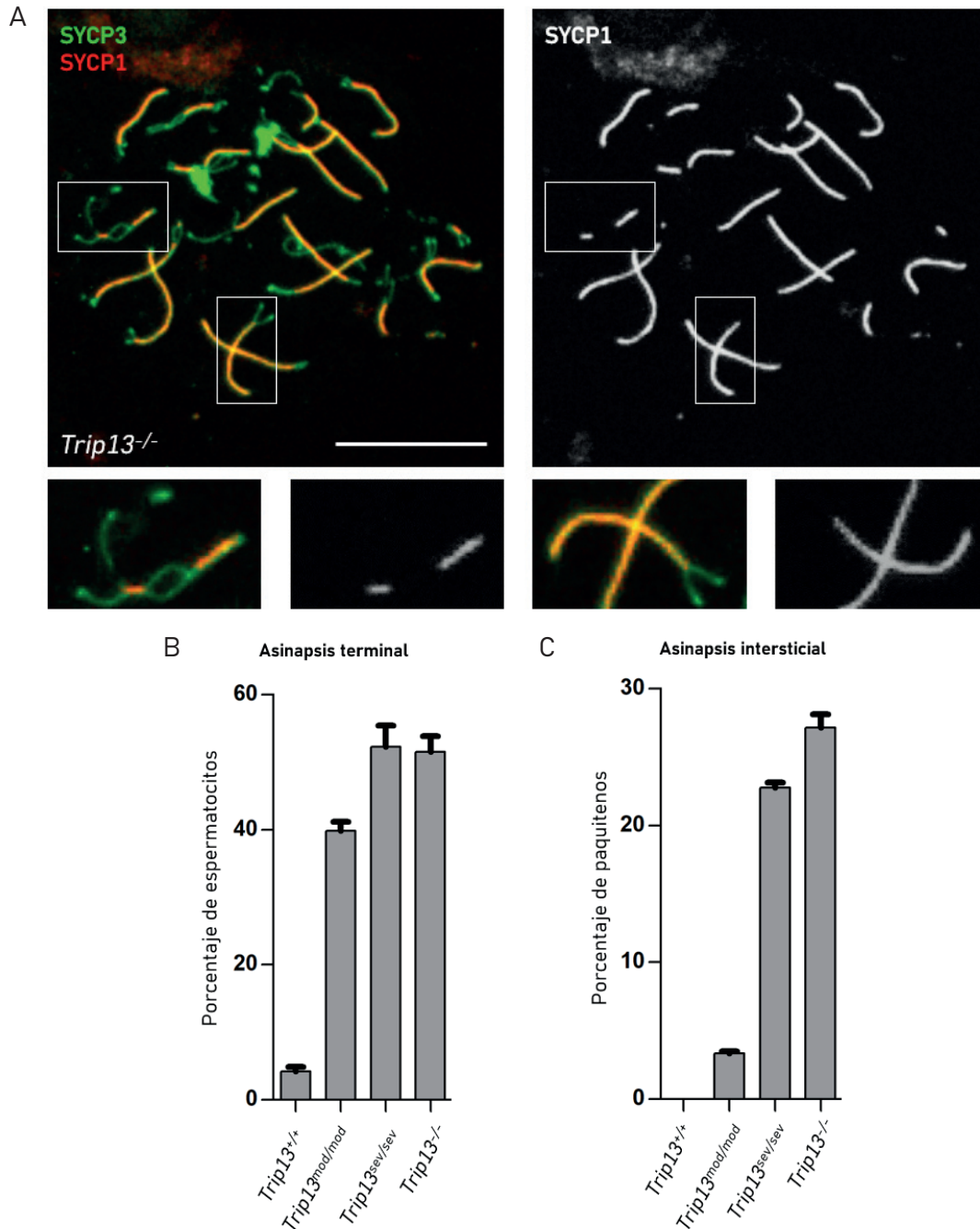


Figura 4-54. TRIP13 es indispensable para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos. **A)** Imágenes representativas de un espermatoцito *Trip13^{-/-}* en paquiteno-like contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). En las imágenes magnificadas de los recuadros de la izquierda se presenta un autosoma con asinapsis intersticial en forma de “burbuja”, por la ausencia de SYCP1. En las imágenes magnificadas de los recuadros de la derecha se observa un autosoma con asinapsis terminal que adopta forma de “Y” por la forma que adoptan los extremos abiertos y la ausencia de SYCP1. La barra de escala equivale a 10 μm . **B)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatoцитos que presentan asinapsis terminal. **C)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatoцитos en paquiteno-like que presentan asinapsis intersticial. Se contaron 200 espermatoцитos para el recuento de asinapsis terminal y 100 para el recuento de asinapsis intersticial. Se usaron 3 animales para cada recuento, y 2 para el mutante *Trip13^{sev/sev}*.

4.5.2 Estudio de los interactores de TRIP13 en testículo

TRIP13 con su función ATPasa tiene la capacidad de cambiar la conformación de proteínas con dominio HORMA (Hop1, REV7, MAD2). Esta interacción con proteínas HORMA explican sus funciones regulando el SAC mediante la interacción con MAD2 (Alfieri et al., 2018), la depleción de HORMAD1 y HORMAD2 de los ejes sinapsados (Wojtasz et al., 2009) o la participación de TRIP13 en la elección de la vía de reparación del ADN, promoviendo la HR e inhibiendo la NHEJ induciendo cambios conformacionales del complejo Shieldin, el cual incluye la proteína REV7 (Clairmont et al., 2020). Además, estudios recientes muestran que TRIP13 tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas que no tienen dominio HORMA (Y. Gao et al., 2019; Ho & Burgess, 2011; Lan et al., 2022). Sin embargo, poco se sabe sobre las proteínas con las que interactúa TRIP13 durante la profase meiótica de mamíferos.

Para dilucidar más acerca de la función de TRIP13 en la profase meiótica, y entender más acerca de la localización de TRIP13 en los telómeros y en los ejes cromosómicos, se buscaron posibles proteínas que interactuasen con TRIP13. Lo primero que se puso a punto fue la técnica de co-IP en bolas de agarosa para inmunoprecipitar TRIP13 en extractos proteicos de testículos de ratón adulto. Como la banda de TRIP13 en WB aparece alrededor de 50 kDa, se tuvo que unir covalentemente el anticuerpo de TRIP13 a las bolas de agarosa, para evitar posible contaminación por inmunoglobulinas. Se comprobó la eficacia de la co-IP de TRIP13 analizando el contenido del eluido de la IP, mediante la inmunodetección de TRIP13 en el eluido (**Figura 4-55A**). Se comprobó que la mayor parte de TRIP13 se encontraba en la fracción eluida, aunque también se encontró proteína en la fracción no retenida y en los lavados. Para analizar los posibles interactores de TRIP13, se corrió el eluido de la IP en un gel de electroforesis, se tiñó el gel con nitrato de plata para marcar las proteínas de la fracción eluida (**Figura 4-55B**). Se detectó mucha señal alrededor de 50 kDa y 25 kDa, señal que podría enmascarar la detección de TRIP13 (49 kDa) y podría deberse a contaminación por anticuerpos endógenos, por lo que realizó un *pre-clearing* del extracto proteico para eliminar las inmunoglobulinas endógenas de la muestra.

Se procedió a analizar la fracción eluida mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF) en colaboración con el Laboratorio de Proteómica de CSIC-UAB. El análisis de las proteínas del eluido de TRIP13 no fue concluyente, ya que solo se pudo detectar contaminación por anticuerpos y un solo péptido de una proteína que podría ser TRIP13, de acuerdo a la digestión virtual de la proteína (**Figura 4-55C**).

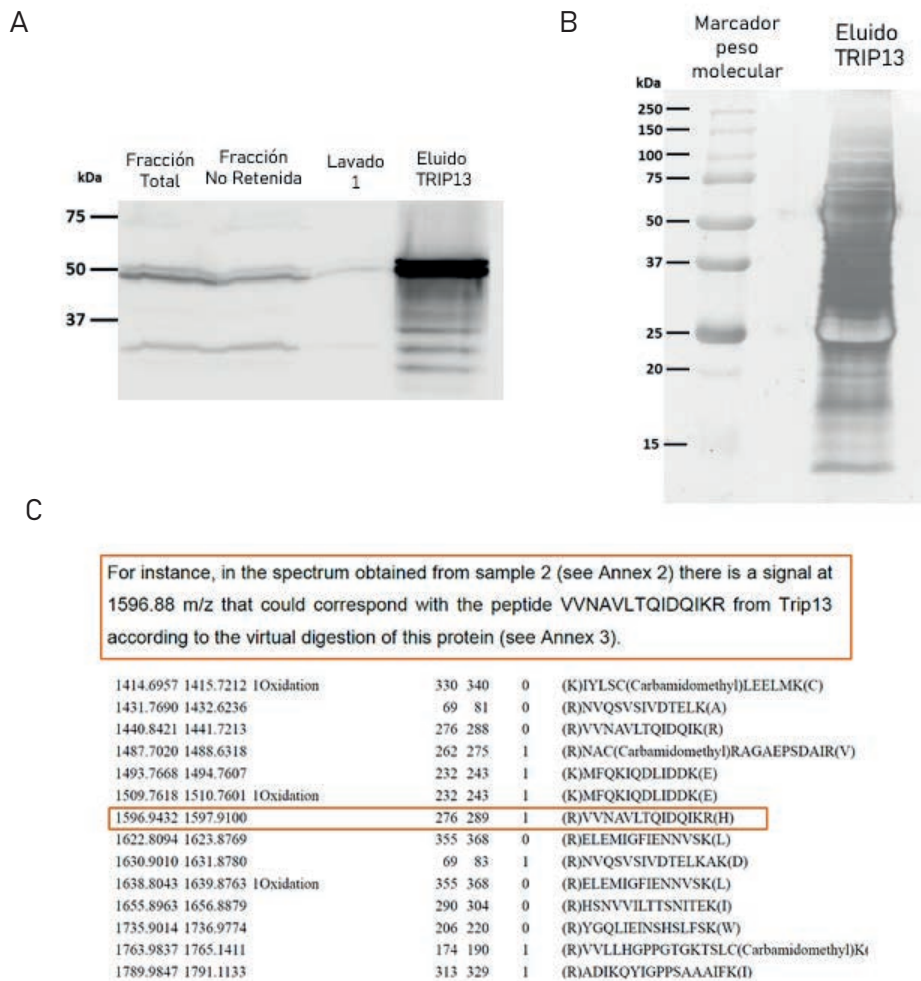


Figura 4-55. Puesta a punto de la co-IP de TRIP13. **A)** Imagen representativa de la comprobación de la eficacia de la técnica de co-IP de TRIP13 mediante la inmunodetección de TRIP13. La Fracción Total corresponde al extracto proteico de testículo de ratón. La Fracción No Retenida corresponde al extracto proteico una vez se ha realizado la co-IP, que revela la porción de TRIP13 que no se retiene a la bolas de agarosa. Los Lavados corresponden a la fracción de TRIP13 unida al anticuerpo de TRIP13 que se elimina con los lavados. La fracción del Eluido de TRIP13 corresponde a la fracción de TRIP13 unida al anticuerpo de TRIP13 y posteriormente eluida. **B)** Tinción con nitrato de plata de la fracción eluida de TRIP13. Se observó mucha tinción intensa al tamaño de 50 kDa y 25 kDa, que correspondieron con las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos respectivamente, enmascarando la posible detección de TRIP13 (49 kDa). **C)** Análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) del eluido de la co-IP de TRIP13. Se detectó en su mayoría contaminación por inmunoglobulinas, y un solo péptido que podría ser TRIP13, de acuerdo a la digestión virtual de la proteína.

Por estas razones, una compañera de nuestro laboratorio (Cristina Madrid Sandín) durante su Trabajo de Fin de Máster completó la puesta a punto de la técnica de co-IP de TRIP13 en 3 ratones juveniles de WT y 2 mutantes *Trip13*^{-/-} como control del experimento. Se seleccionaron ratones juveniles de 12 días, ya que así se aumentaba la proporción de células en cigoteno y paquiteno temprano, y también se evitaba que en el extracto proteico hubiera contaminación de cualquier tipo celular postmeiótico. Se ajustaron las cantidades de anticuerpo y extracto proteico de la co-IP y se consiguió recuperar gran parte de TRIP13 en el eluido y que apenas quedara TRIP13 en la fracción no retenida y los lavados.

Posteriormente se procedió al análisis de las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas en colaboración con el laboratorio del Dr. Riccardo Zenezini Chiozzi (Universidad de Utrecht, Países Bajos). A partir de la lista de las posibles proteínas interactoras de TRIP13 y para analizar los datos de manera más sencilla, se obtuvieron los valores de iBAQ (*intensity based absolute quantification*) al dividir la intensidad total de una proteína por el número de péptidos trípticos de entre 7 y 30 aminoácidos de longitud (**Figura 4-56A**).

Para comprobar la validez fisiológica de los resultados obtenidos, se seleccionó la proteína HSPA2 como posible interactor de TRIP13 dado que su función es necesaria para desinapsar los cromosomas homólogos (Dix et al., 1997). Nuestra hipótesis fue que HSPA2 podría tener una función en los defectos de sinapsis que se observaron en los mutantes de *Trip13*. Para comprobar la posible interacción entre TRIP13 y HSPA2, se sobreexpresó TRIP13 en células HEK293T y se procedió a realizar una co-IP a partir de los extractos proteicos de las células transfectadas. La cantidad de TRIP13 fue mayor en las células que sobreexpresaron la proteína. También se consiguió recuperar HSPA2 en el eluido y se observó que la cantidad de HSPA2 fue mayor en las células que sobreexpresaron TRIP13 (**Figura 4-56B**). Después de comprobar la interacción de HSPA2 y TRIP13 en cultivos celulares, se comprobó también en extractos proteicos de testículos de ratones adultos. Se inmunoprecipitó TRIP13 y en el eluido se pudo recuperar parte de HSPA2 que se detectó en la fracción total. También se encontró una gran cantidad de HSPA2 en la fracción no retenida y en los lavados (**Figura 4-56C**). Estos resultados indican que TRIP13 y HSPA2 interactúan *in vivo*.

A	Proteína	Descripción	iBAQ WT	iBAQ Trip13 ^{-/-}	Diferencia (log10)	Número de péptidos	% Cobertura de secuencia única
	TRIP13	<i>Pachytene checkpoint protein 2 homolog</i>	8.9	4.1	4.7	32	65
	HAX1	<i>HCLS1 Associated protein X-1</i>	7.6	6.0	1.6	3	18,4
	LAMB1	<i>Laminin subunit β-1</i>	7.1	5.5	1.6	41	32,3
	DNAJB12	<i>DnaJ homolog subfamily B member 12</i>	6.6	5.1	1.6	13	44,7
	BOD1L	<i>Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1</i>	5.3	4.3	1.0	16	7,7
	ARGLU1	<i>Arginine and glutamate-rich protein 1</i>	7.1	6.2	1.0	11	28,4
	PLAAT3	<i>Phospholipase A and acyltransferase 3</i>	8.4	7.5	0.9	2	18,5
	SFR1	<i>Swi5-dependent recombination DNA repair protein 1 homolog</i>	5.8	5.2	0.7	9	38,9
	HSPA2	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>	6.6	6.0	0.6	42	55,6
	ZFP57	<i>Zinc finger protein 57</i>	7.6	7.2	0.4	1	2,4
	MAD2L1	<i>Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A</i>	5.4	5.5	0	5	24,4

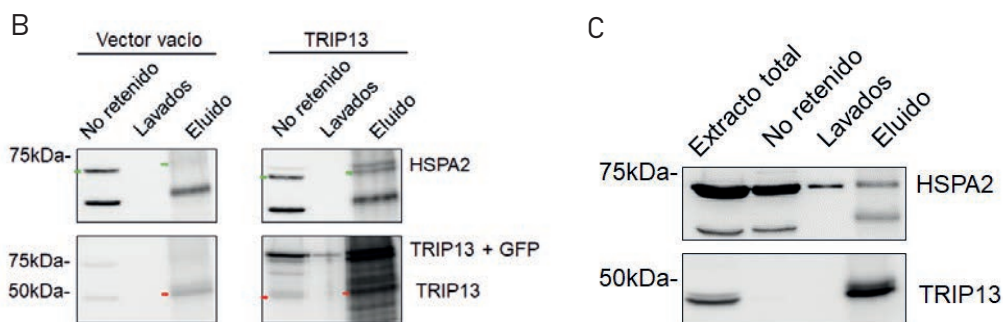


Figura 4-56. Análisis de la interacción entre TRIP13 y HSPA2. A) Lista de posibles interactores de TRIP13. **B)** En el extracto proteico de las células transfectadas con vector vacío se aprecia como hay HSPA2 (flecha verde) en la fracción no retenida. En la membrana de las células transfectadas con el vector de TRIP13 puede verse cómo aparece HSPA2 (flecha verde) tanto en la fracción no retenida como en la fracción eluida. La flecha roja señala la proteína TRIP13 nativa (49 kDa). **C)** En el extracto total de proteínas de testículo de ratón WT se detecta tanto TRIP13 como HSPA2. En la fracción eluida se recuperan ambas proteínas. *Experimentos realizados por Cristina Madrid Sandín.*

4.5.3 HSPA2 se encuentra desregulada en los mutantes de *Trip13*

Nuestra hipótesis fue que HSPA2 participaba en los defectos de sinapsis de los cromosomas homólogos de los mutantes de *Trip13*. Si la hipótesis era correcta, esperaríamos que en los testículos *Trip13*^{-/-} hubiera mayor expresión de HSPA2. Para estudiar en más detalle la posible interacción de TRIP13 con HSPA2 y su función en la sinapsis de los cromosomas homólogos, se analizó la localización de la proteína mediante inmunofluorescencia contra HSPA2 en secciones histológicas de testículo y en extensiones de espermatoцитos de ratones WT y de mutantes de *Trip13*.

En secciones histológicas de testículo, se hizo un marcaje triple contra HSPA2, H1T, marcador de células que se han progresado más allá de paquiteno medio y contra γ H2AX para ver el marcaje de los DSBs y la vesícula sexual. En los testículos WT, la señal de HSPA2 apareció como una señal muy intensa sobre todo en el citoplasma de las células (**Figura 4-57**). Esta señal además colocalizó en células positivas para la señal de H1T, tanto las que presentaban vesícula sexual (paquiteno tardío o diploteno) como las que no (células postmeióticas)(**Figura 4-57**). Interessantemente, HSPA2 no se expresó en células que presentaban abundante señal de γ H2AX (leptoteno o cigoteno temprano) ni en células que presentaban una incipiente vesícula sexual (cigoteno tardío o paquiteno temprano) (**Figura 4-57**). Estos resultados indican que HSPA2 se expresa en espermatocitos H1T positivos y células postmeióticas en testículos WT.

Al analizar la localización de HSPA2 en secciones histológicas de testículo *Trip13*^{-/-}, se observó como había dos grupos de espermatocitos con diferente señal de HSPA2. La primera población de espermatocitos presentaron abundante señal de HSPA2 en el citoplasma y en el núcleo (**Figura 4-58**). Estos espermatocitos eran paquiteno-like por los acúmulos de γ H2AX visibles. La otra población de espermatocitos presentaron una señal citoplasmática más tenue y correspondió con estadios más tempranos por la mayor acumulación de γ H2AX en la cromatina (**Figura 4-58**). Además, en los mutantes de *Trip13*^{-/-} HSPA2 se expresó en espermatocitos H1T negativos. Estos resultados sugieren que la localización de HSPA2 está desregulada en el mutante *Trip13*^{-/-}.

Seguidamente, se estudió en más detalle la localización de HSPA2 en extensiones de espermatocitos para comprobar si HSPA2 se localizaba en el SC. En espermatocitos WT, en leptoteno, cigoteno y paquiteno temprano no hubo expresión de HSPA2 (**Figura 4-59**). A partir de paquiteno medio y tardío, HSPA2 apareció en la cromatina como una señal pan nuclear, que se volvió más intensa en los espermatocitos en diploteno (**Figura 4-59**). Además, la señal de HSPA2 colocalizó con algunos telómeros en paquiteno tardío y diploteno. En este último estadio HSPA2 también se acumuló en el SC (**Figura 4-59**). La localización de HSPA2 en la cromatina en los espermatocitos WT coincide con el momento en el que se produce la desinapsis de los cromosomas homólogos.

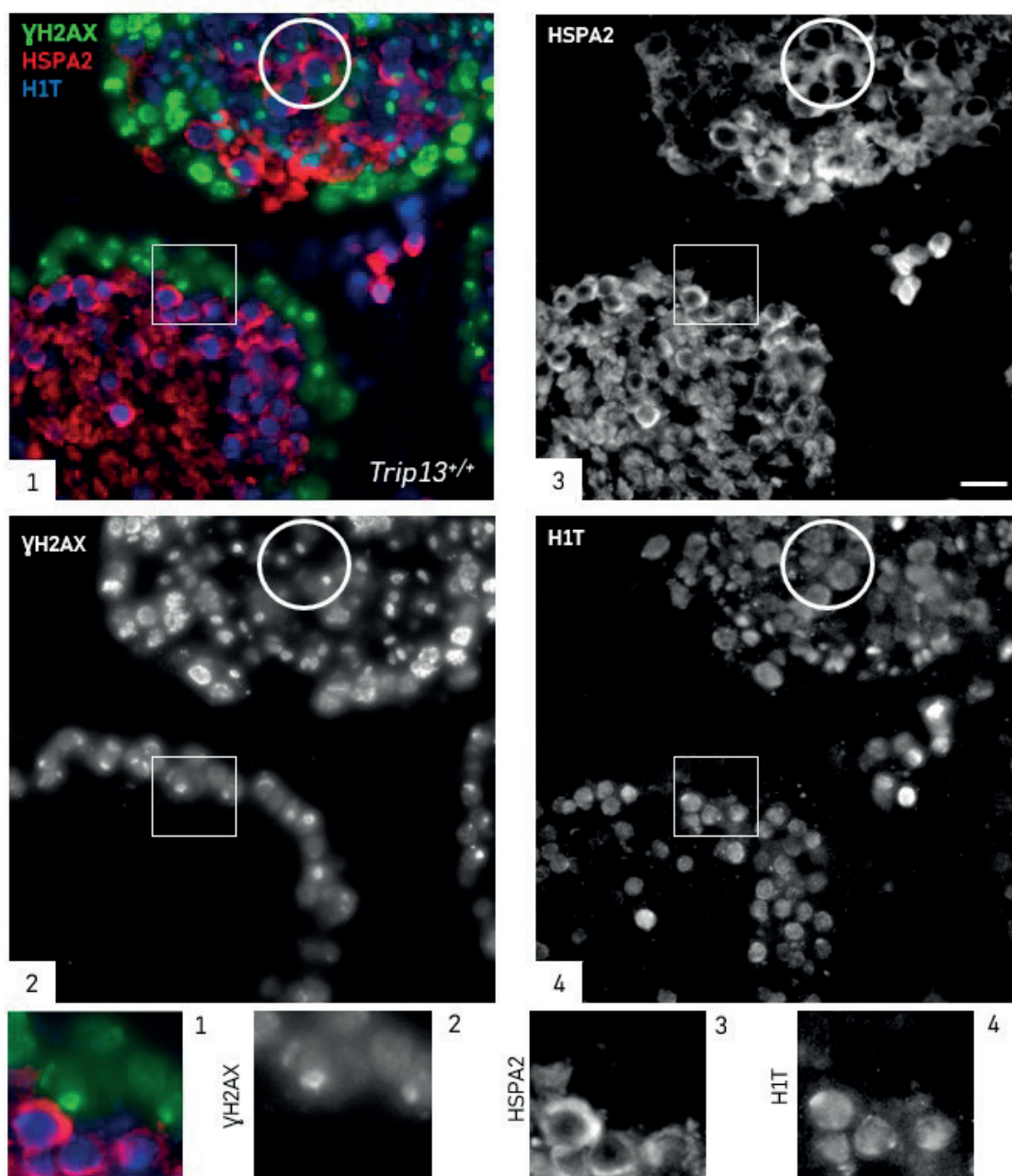


Figura 4-57. HSPA2 se expresa en espermatoцитos tardíos y en células postmeióticas de ratones WT. Imágenes representativas de secciones de testículo de ratones WT con marcaje de γ H2AX (verde), HSPA2 (rojo) y H1T (azul). En el círculo se destacan células H1T positivas, con una vesícula sexual visible y tinción muy intensa de HSPA2 en el citoplasma. En el recuadro magnificado se destacan en una porción de túbulo seminífero en la que hay células postmeióticas H1T positivas con señal intensa de HSPA2. Y una capa de células suprayacente compuesta por espermatoцитos que no expresan H1T, posiblemente paquiteno temprano por la presencia de una vesícula sexual incipiente. En esta se aprecia una total ausencia de la señal de HSPA2. La barra de escala equivale a 20 μ m.

En los espermatoцитos en leptoteno de los mutantes *Trip13^{mod/mod}* no había expresión de HSPA2 (Figura 4-60A), pero en los espermatoцитos en cigoteno y paquiteno-like sí que hubo acumulación de HSPA2 en forma de abundantes agregados por la cromatina que no necesariamente coincidían con el SC. HSPA2 no colocalizó con los telómeros (Figura 4-60A).

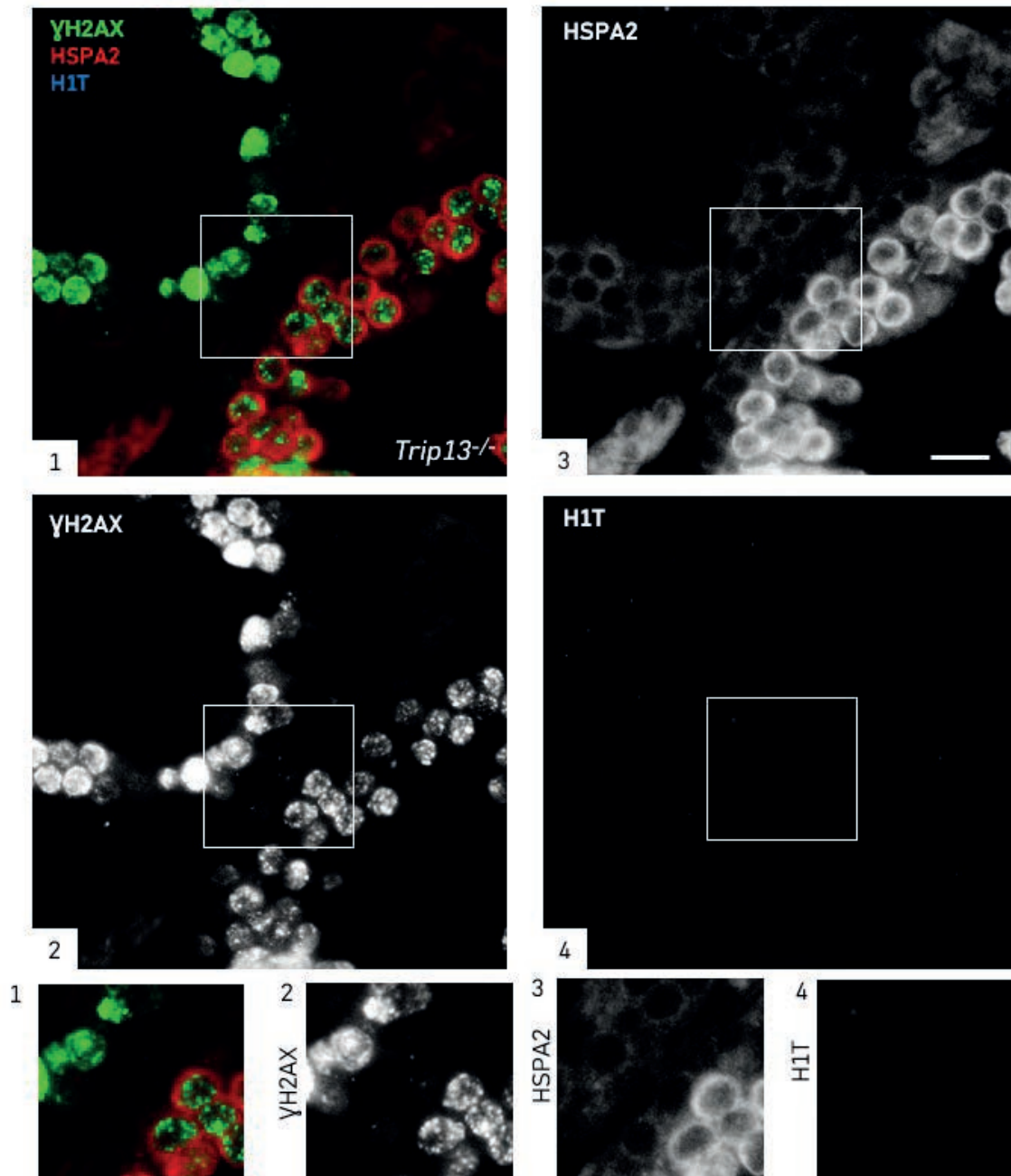


Figura 4-58. HSPA2 se expresa en espermatoцитos H1T negativos en el mutante *Trip13^{-/-}*. Imágenes representativas de secciones de testículos de ratones *Trip13^{-/-}* con marcaje de γ H2AX (verde), HSPA2 (rojo) y H1T (azul). En el recuadro magnificado se destacan dos grupos de espermatoцитos. El grupo del túbulo superior de la imagen son espermatoцитos con señal de γ H2AX y HSPA2 en el citoplasma pero de manera tenue. El túbulo de la parte inferior son espermatoцитos que también presentan acumulación de γ H2AX, pero la señal de HSPA2 es muy intensa. En ambos casos, no hay señal de H1T. La barra de escala equivale a 20 μ m.

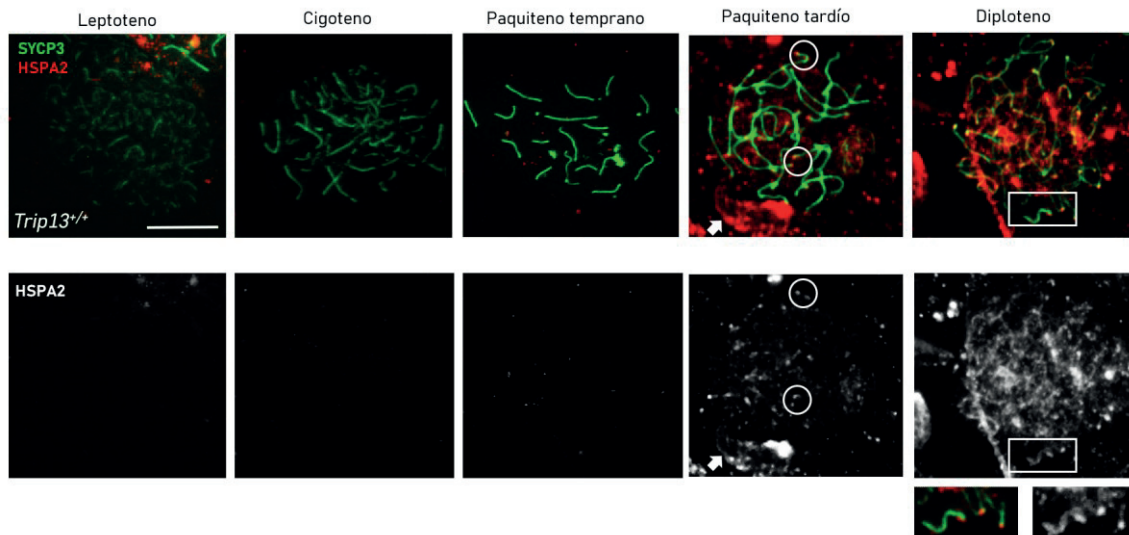


Figura 4-59. HSPA2 se expresa a partir de paquiteno tardío en espermatoцитos WT. Imágenes representativas de extensiones de espermatoцитos WT contra SYCP3 (verde) y HSPA2 (rojo). HSPA2 no se expresa en leptoteno, cigoteno y paquiteno temprano. A partir de paquiteno tardío y diploteno, aparece en forma de señal pan nuclear. En las imágenes en los círculos se destaca la señal de HSPA2 en los telómeros en paquiteno tardío. En las imágenes magnificadas en los recuadros de diploteno se observa como HSPA2 colocaliza con el SC y también en los telómeros de diploteno. La barra de escala equivale a 10 μ M.

Esta acumulación difiere de la localización de HSPA2 en los paquiteno tardío y diploteno de los ratones WT. Curiosamente, en los pocos espermatoцитos en diploteno del mutante moderado, la localización y acumulación de HSPA2 fue idéntica a los diploteno de los espermatoцитos WT, sugiriendo que estos espermatoцитos poseen suficiente TRIP13 como para progresar a diploteno y expresar HSPA2 correctamente.

En los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} también se pudo apreciar la acumulación precoz de HSPA2. Mientras que en leptoteno no se observó señal (**Figura 4-60B**), a partir de cigoteno y sobre todo en paquiteno-like, HSPA2 también se expresó en la cromatina en forma de agregados. HSPA2 tampoco se localizó en los telómeros del paquiteno-like en el mutante *Trip13*^{-/-} (**Figura 4-60B**).

Con tal de evaluar el defecto relativo a la localización de HSPA2 en los mutantes de *Trip13*, se cuantificaron estos agregados presentes en la cromatina en cigoteno y paquiteno-like. El análisis de los agregados de HSPA2 reveló que en cigoteno y paquiteno-like, el mutante moderado ($p < 0,0001$, T de Student) y el mutante *Trip13*^{-/-} ($p < 0,0001$, T de Student) presentaron más agregados en la cromatina que los espermatoцитos WT (**Figura 4-60C**). Estos resultados sugieren que hay una acumulación precoz de HSPA2 en ausencia de *Trip13*.

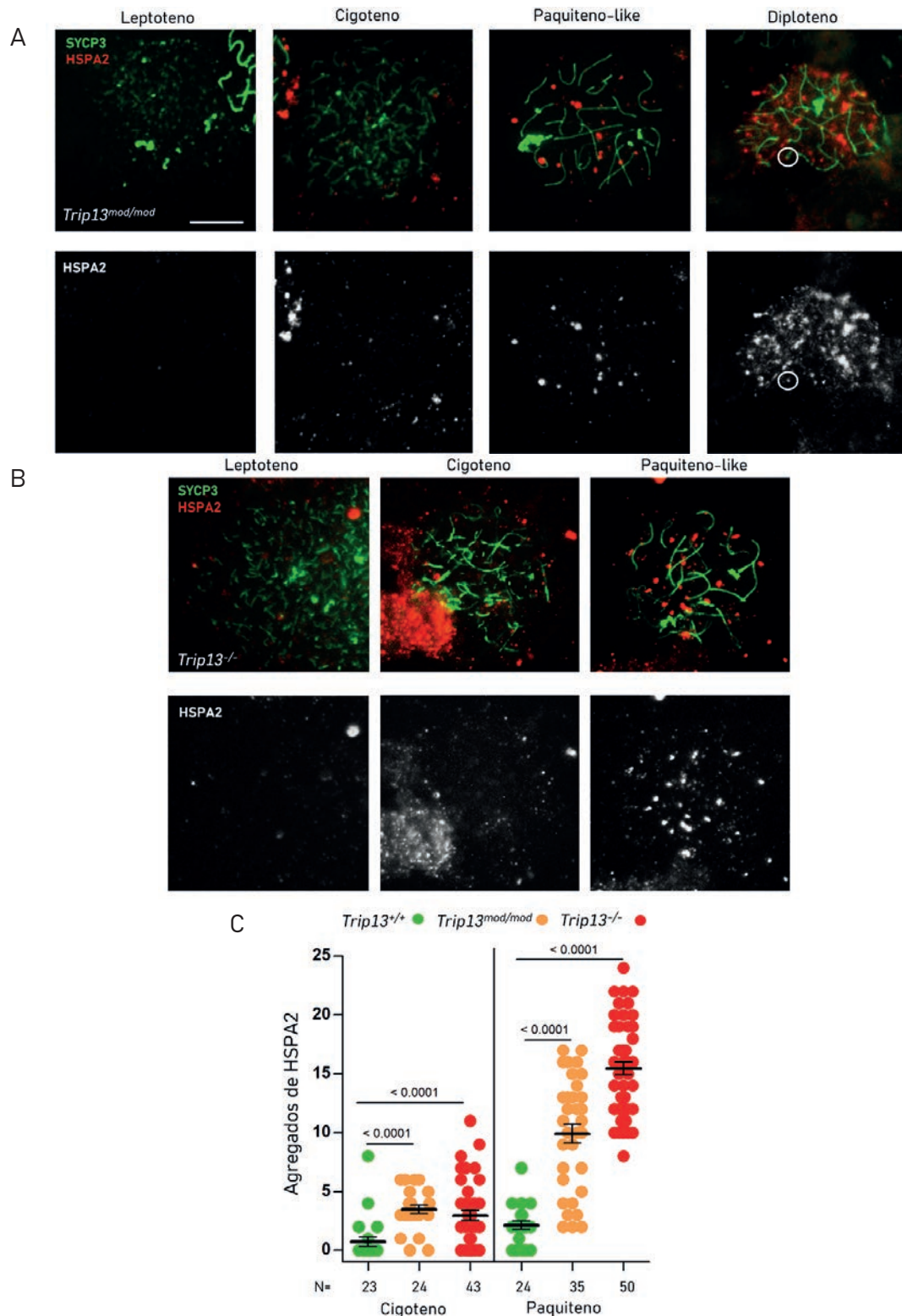


Figura 4-60. HSPA2 se acumula de manera precoz en los mutantes de *Trip13*. Imágenes representativas de extensiones de espermatocitos en el estadio indicado con marcaje contra SYCP3 (verde) y HSPA2 (rojo). **A y B** En los espermatocitos *Trip13^{mod/mod}* y espermatocitos *Trip13^{-/-}* HSPA2 empieza a aparecer en cigoteno tardío y se acumula en paquiteno-like en forma de agregados por la cromatina. En los espermatocitos *Trip13^{mod/mod}* que llegan a diploteno hay una acumulación similar a los diplotenos WT. El círculo señala HSPA2 en los telómeros. La barra equivale a 10 μ m. **C** Gráfico que muestra el recuento de agregados de HSPA2 en cigoteno y paquiteno de WT y paquiteno-like en *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.5.4 PLK1 se encuentra desregulada en los mutantes de *Trip13*

HSPA2 es una proteína necesaria para que se produzca la desinapsis y que se expresa a partir de paquiteno medio en los espermatoцитos de WT (Dix et al., 1997). El hallazgo de que HSPA2 y TRIP13 interaccionan y que HSPA2 aparece en los mutantes de *Trip13* en paquiteno temprano indican que HSPA2 se encuentra desregulada en los mutantes de *Trip13*. Esto sugiere que los defectos de sinapsis observada en los autosomas de los mutantes de *Trip13* podrían deberse a una desinapsis prematura de los cromosomas. Para comprobar esta hipótesis, se analizó si se encontraban más factores que controlan la desinapsis desregulados en los mutantes de *Trip13*. Se seleccionó la proteína PLK1, la cual tiene una función conocida promoviendo la desinapsis de los cromosomas (Jordan et al., 2012). Durante la transición de G2 a metafase, diversas proteínas del SC, entre ellas SYCP1, SYCP2, TEX12 y HORMAD1, sufren fosforilaciones mediadas por PLK1. Estas fosforilaciones serían necesarias para promover la desinapsis. SYCP1 contiene un dominio PBD (*Protein Binding Domain*) susceptible de ser fosforilado por CDK1 y por PLK1 (Jordan et al., 2012).

Para el análisis de la localización de PLK1 se utilizó la forma fosforilada de PLK1 en T210 (a partir de ahora pPLK1 en el texto), la forma activa de PLK1 (Tsvetkov & Stern, 2005). En extensiones en fresco de espermatoцитos WT, se observó como a partir de paquiteno medio pPLK1 localizó en el SC de los autosomas y también en los cromosomas sexuales X e Y, en los que la señal mostrada fue más intensa. Además, se presentó una señal pan nuclear en la cromatina en los espermatoцитos en estadios tardíos (**Figura 4-61A**). En los espermatoцитos en leptoteno, cigoteno y paquiteno temprano no hubo señal en el SC, pero se pudieron observar algunos agregados en la cromatina parecidos a los agregados de HSPA2 (**Figura 4-61A**).

De manera interesante, en los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} se observó una acumulación prematura de pPLK1 en el SC. La señal de pPLK1 apareció en las porciones sinapsadas del SC ya en cigoteno temprano y en paquiteno-like. En cuanto a los cromosomas sexuales, pPLK1 solo se encontró en la región PAR cuando estaba sinapsada, pero no en las porciones asinapsadas de los

cromosomas X e Y. Además, en la cromatina de los espermatocitos *Trip13*^{-/-} también se observó una acumulación de agregados de pPLK1, pero no hubo una señal pan nuclear intensa como en los espermatocitos en paquiteno tardío y diploteno de los ratones WT (**Figura 4-61 B**).

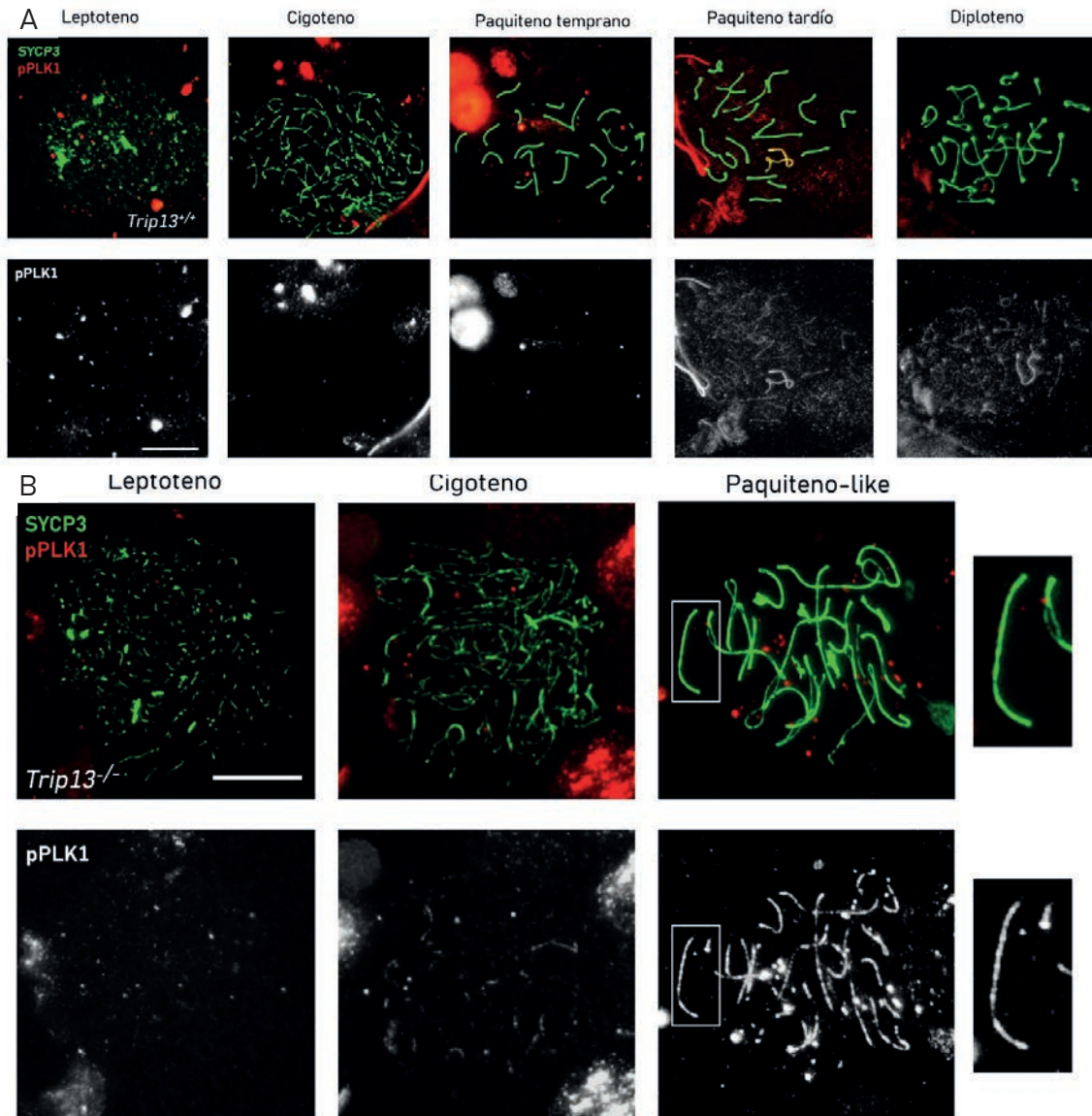


Figura 4-61. Los espermatocitos *Trip13*^{-/-} acumulan pPLK1 de manera prematura. Imágenes representativas de extensiones en fresco de espermatocitos *Trip13*^{+/+} y *Trip13*^{-/-} teñidos contra SYCP3 (verde) y pPLK1 (rojo). **A)** En ratones WT, de leptoteno a diploteno hay agregados de pPLK1 en la cromatina. En paquiteno medio y diploteno además hay una señal pan nuclear intensa y pPLK1 colocaliza con el SC. **B)** En el mutante *Trip13*^{-/-} también hay agregados en la cromatina. En cigoteno y paquiteno-like hay señal de pPLK1 en las porciones asinapsadas del SC. Las barras de escala equivalen a 10 μ m.

En extensiones de espermatocitos provenientes de testículo congelado, los agregados en la cromatina fueron mucho más abundantes. En los espermatocitos WT, de leptoteno a paquiteno temprano se observaron agregados de pPLK1 por la

cromatina. A partir de paquiteno medio y en diploteno, los agregados en la cromatina fueron más abundantes y apareció una señal pan nuclear intensa. No se detectó señal de pPLK1 en el SC en los espermatoцитos WT (**Figura 4-62**).

En cambio, en los espermatoцитos *Trip13^{-/-}*, además de presentar abundantes agregados en la cromatina, pPLK1 sí que apareció en las porciones sinapsadas del SC en cigoteno y paquiteno-like (**Figura 4-63A**). Se cuantificó el número de agregados de pPLK1 presentes en la cromatina de los espermatoцитos WT, *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*. Los agregados de pPLK1 fueron más abundantes en los espermatoцитos del mutante moderado en cigoteno ($p=0,0006$, T de Student) y paquiteno-like ($p=0,0036$, T de Student) comparados con los espermatoцитos WT. En el mutante *Trip13^{-/-}*, de igual manera, en cigoteno ($p=0,0004$, T de Student) y paquiteno-like ($p=0,013$, T de Student) los agregados de pPLK1 también fueron más abundantes que en los espermatoцитos WT (**Figura 4-63B**). Estos resultados sugieren que en ausencia de *Trip13* hay más acumulación de pPLK1 en la cromatina de los espermatoцитos, y la señal del SC aparece de manera prematura. El hallazgo de que HSPA2 y PLK1 se encuentran desreguladas en los mutantes de *Trip13* sugiere que podría ocurrir una desinapsis prematura de los autosomas.

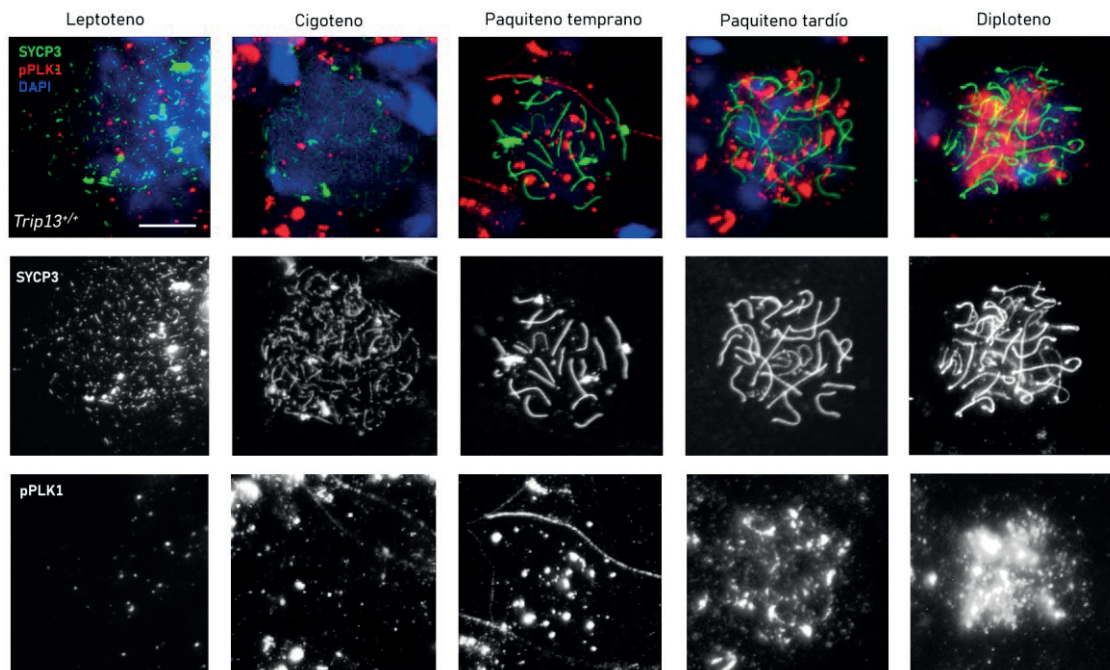
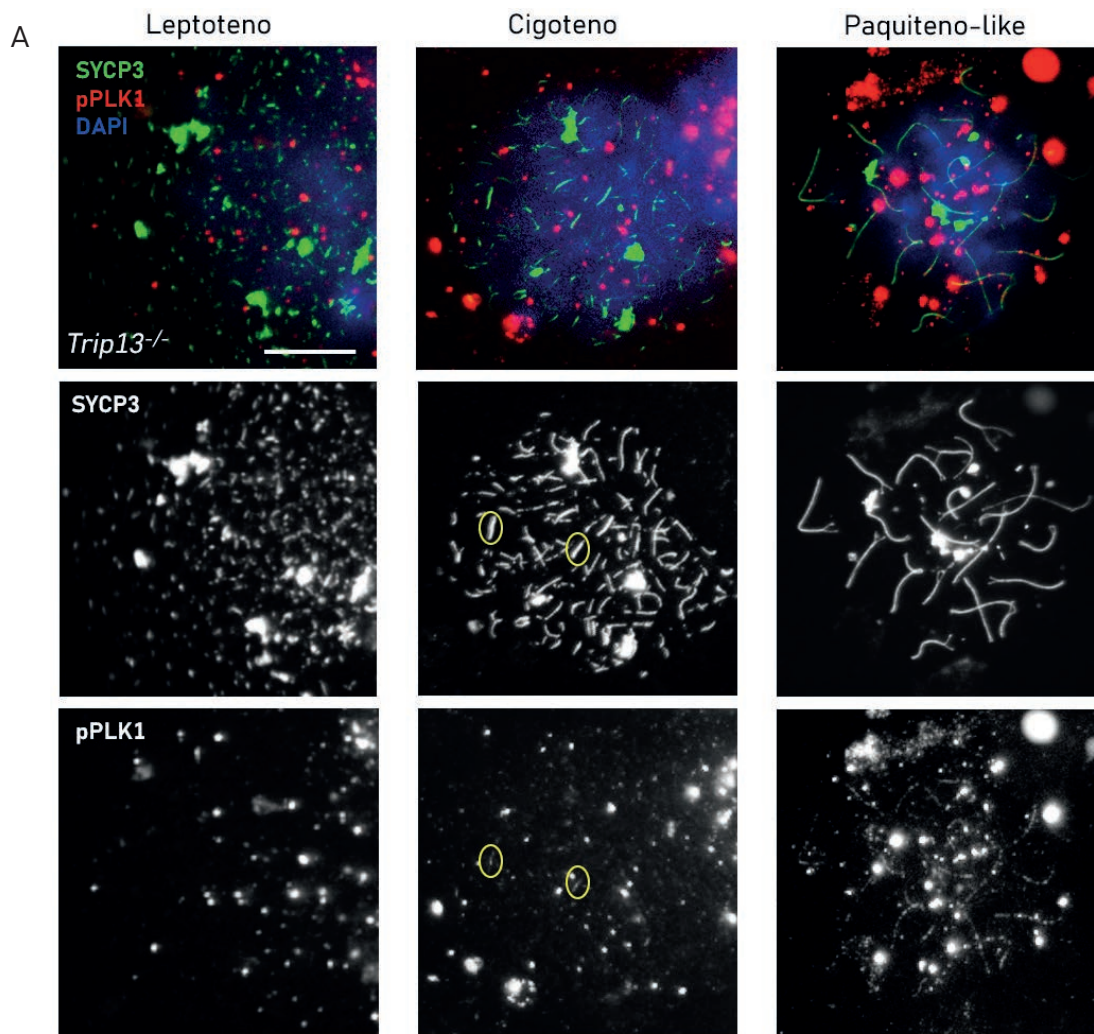


Figura 4-62. pPLK1 aparece en forma de agregados por la cromatina en espermatoцитos WT. Imágenes representativas de extensiones de espermatoцитos de testículo congelado de ratones WT marcados contra SYCP3 (verde) y pPLK1 (rojo). De leptoteno a diploteno hay abundantes agregados de pPLK1 en la cromatina. A partir de paquiteno medio hasta diploteno hay una señal pan nuclear intensa. La barra equivale a 10 μ m.



Trip13^{+/+} ● *Trip13*^{mod/mod} ● *Trip13*^{-/-} ●

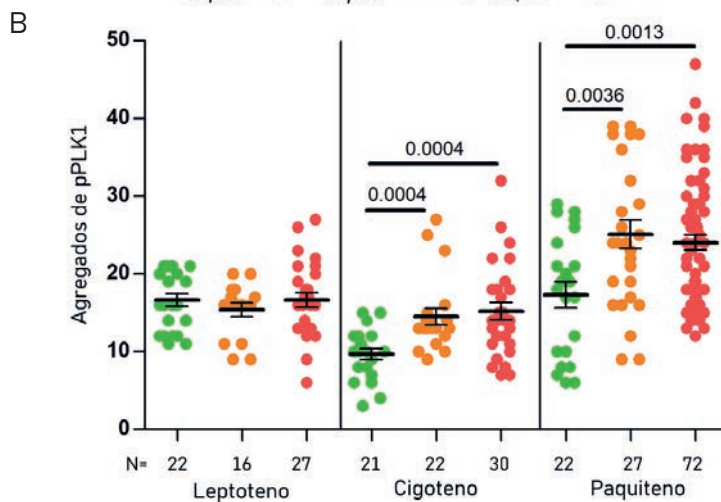


Figura 4-63. Los mutantes de *Trip13* acumulan pPLK1 de manera prematura. A) Imágenes representativas de extensiones de testículo congelado de ratones *Trip13*^{-/-} contra SYCP3 (verde) y pPLK1 (rojo). En los espermatoцитos en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like hay agregados de pPLK1 en la cromatina. En cigoteno (círculos amarillos) y paquiteno-like en el SC hay señal de pPLK1 en las porciones sinapsadas del SC La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico mostrando la cuantificación de agregados de pPLK1 en leptoteno, cigoteno y paquiteno temprano de ratones WT y paquiteno-like de los mutantes de *Trip13*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.5.5 La función de TRIP13 en la sinapsis es independiente de su función en la recombinación

Como hemos comprobado, los espermatoцитos de los mutantes de *Trip13* presentan defectos en la compleción de la sinapsis de los cromosomas homólogos. Además, en ausencia de TRIP13 se observa una carga prematura de HSPA2 y pPLK1, dos factores que controlan la desinapsis, en los espermatoцитos de los mutantes. TRIP13 también se requiere para completar la recombinación meiótica (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Por ello, quisimos estudiar si los defectos de sinapsis en los mutantes de *Trip13* eran independientes de su función en la recombinación. Por ello, se analizó como se producía la sinapsis en mutantes que no producen DSBs (mutantes *Spo11^{-/-}*) o cuando los DSBs se forman pero no se pueden reparar eficientemente por recombinación meiótica (mutantes *Dmc1^{-/-}*), y se comparó con los mutantes *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* y *Dmc1^{-/-}Trip13^{mod/mod}* mediante inmunofluorescencia contra la SYCP3 y SYCP1.

La sinapsis en los espermatoцитos de los mutantes *Spo11^{-/-}* y *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* comenzó con normalidad en cigoteno, donde se forman pequeños fragmentos de SC. A partir de cigoteno, los espermatoцитos quedan bloqueados en un estadio en paquiteno-like y estos presentan una sinapsis aberrante (**Figura 4-64**). Estos espermatoцитos se pudieron dividir en tres categorías: 1) Núcleos con pequeños fragmentos de SC y poco numerosos, pero con AE mucho más largos de lo habitual, 2) Núcleos con fragmentos relativamente largos de SC, pero los AE se formaban entre cromosomas no homólogos y 3) Núcleos con 40 univalentes con los AE completamente formados, pero sin ningún fragmento de SC, como ya se describió anteriormente (Baudat et al., 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000).

Al analizar la sinapsis en ambos mutantes, se observó que los espermatoцитos *Spo11^{-/-}* presentaban muchos fragmentos de SYCP1, mientras que en el *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* estos fragmentos eran mucho menos abundantes ($p < 0,0001$, T de Student). Además, los fragmentos de SC de los espermatoцитos *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* eran más largos ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-64C**). Curiosamente, en el *Spo11^{-/-}* se encontraron muchos fragmentos de SYCP1 muy cortos, parecidos a foci, por todos los ejes cromosómicos, que eran muy poco abundantes en los espermatoцитos *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}*.

En los espermatocitos *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} la sinapsis también empieza cigoteno y también hay bloqueo meiótico en paquiteno-like. La mayoría de los espermatocitos en este estadio avanzado poseen 40 AE ensamblados, pero presentan sinapsis entre cromosomas no homólogos. Solo algunos espermatocitos consiguen ensamblar algunos fragmentos de SC, en los que se observa colocalización de SYCP3 y SYCP1 (**Figura 4-64B**). También se recontó el número de fragmentos de SYCP1 y se midió su longitud y de manera similar a lo que ocurría en los mutantes *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod}, los espermatocitos *Dmc1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} en paquiteno-like presentaban menos fragmentos de SYCP1 ($p < 0,0001$, T de Student), pero más largos ($p = 0,0059$, T de Student) (**Figura 4-64D**). Estos resultados indican que la ausencia de TRIP13 promueve la disolución de los SCs y que la participación de TRIP13 en la sinapsis es independiente de su función en la recombinación meiótica.

Debido al hallazgo de que en ausencia de TRIP13 en los mutantes *Spo11*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} provoca que haya menos fragmentos de SC, se estudió la expresión de HSPA2 y pPLK1 en los espermatocitos de estos mutantes. El análisis de HSPA2 en estos mutantes reveló que la proteína se expresa en los espermatocitos de los mutantes *Spo11*^{-/-}, *Spo11*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod}, *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} (**Figura 4-65**) ya en cigoteno, y se observó una mayor acumulación de HSPA2 en forma de agregados por la cromatina en el estadio más avanzado de estos mutantes, el paquiteno-like. La cuantificación de los agregados de HSPA2 en la cromatina reveló que los espermatocitos de los mutantes de *Trip13* presentaban mayor acumulación de la proteína. En los espermatocitos *Spo11*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} los agregados fueron más abundante en cigoteno ($p < 0,0001$ t test) y en paquiteno-like ($p < 0,0001$ t test) (**Figura 4-65C**).

En los espermatocitos del mutante *Dmc1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod} los agregados de HSPA2 fueron más abundantes en leptoteno ($p < 0,0001$ t test), cigoteno ($p < 0,0001$ t test) y paquiteno-like ($p < 0,0001$ t test) (**Figura 4-65D**). Estos resultados indican que en ausencia de TRIP13 se acumula una mayor cantidad de agregados de HSPA2 en la cromatina de los espermatocitos.

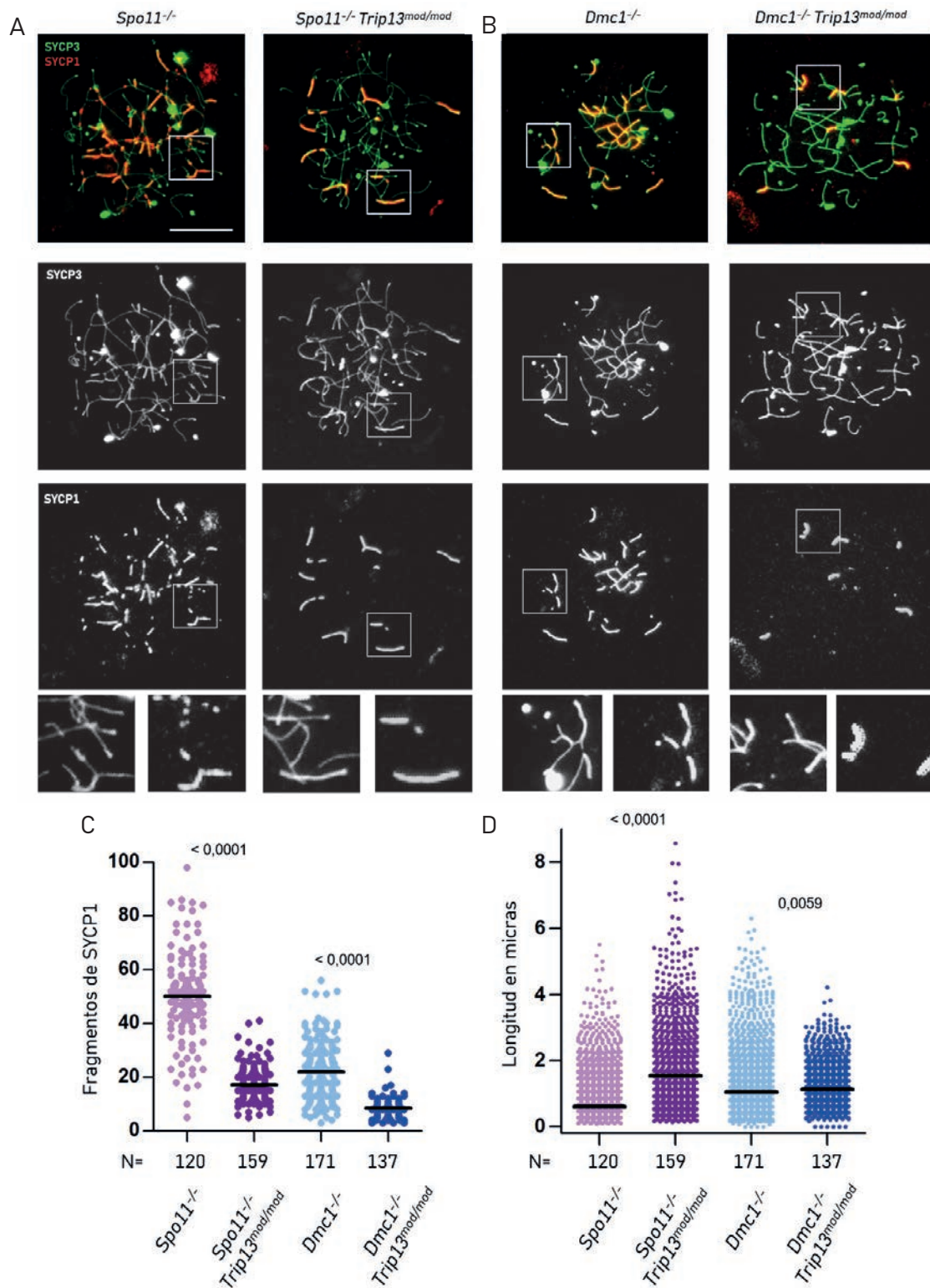


Figura 4-64. Los mutantes de *Trip13* presentan menos fragmentos de SC y estos son más largos. Imágenes representativas de espermatocitos en paquiteno-like en **A** *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} **B** *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} marcados contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestran como los mutantes *Spo11*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} presentan más fragmentos cortos de SYCP1 que los mutantes dobles. La barra de escala equivale a 10 μ m. **C**) Gráfico que muestra el recuento del número de fragmentos de SYCP1 en los mutantes indicados en paquiteno-like **D**) Gráfico que muestra la longitud en micras de los fragmentos de SYCP1 en los mutantes indicados en paquiteno-like. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

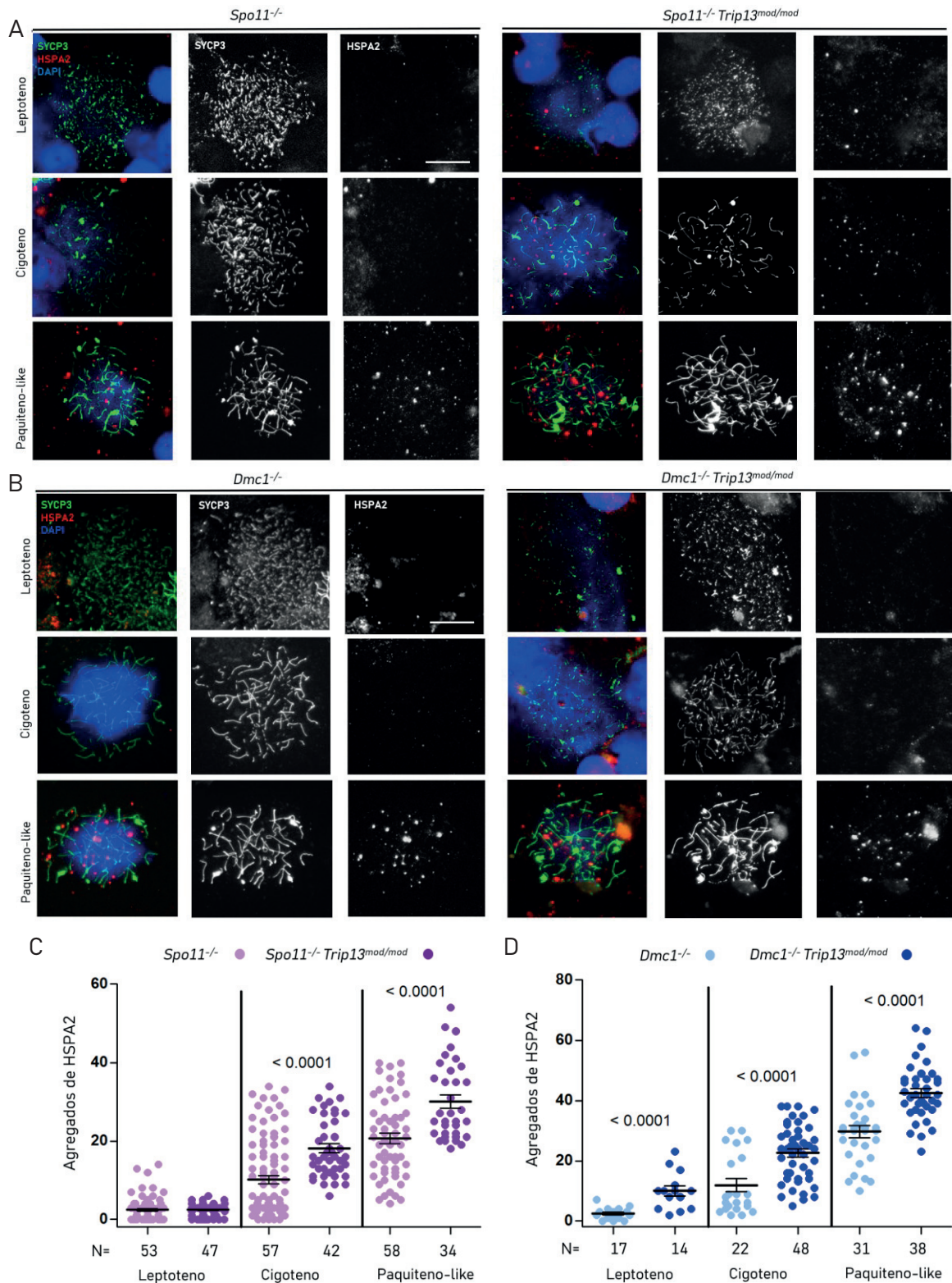


Figura 4-65. Los mutantes de *Trip13* acumulan más HSPA2 en la cromatina. Imágenes representativas de espermatocitos en los estadios mencionados marcados contra SYCP3 (verde), HSPA2 (rojo) y DAPI (azul) en: **A)** *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} **B)** *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Las barras de escala equivalen a 10 μ m. **C y D)** Gráficos mostrando el recuento de agregados de HSPA2 en el estadio y mutante mencionados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

En cuanto a pPLK1, también se presentó en forma de agregados en la cromatina en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like de los mutantes (**Figura 4-66**). La cuantificación de los agregados de pPLK1 en la cromatina reveló que los espermatoцитos de los mutantes de *Trip13* presentaban mayor acumulación de agregados en la cromatina.

En los espermatoцитos *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* fueron más abundantes en leptoteno ($p=0,023$, T de Student), cigoteno ($p=0,0008$, T de Student) y paquiteno-like ($p=0,0024$, T de Student) (**Figura 4-66C**). En el mutante *Dmc1^{-/-}Trip13^{mod/mod}* los agregados de pPLK1 en la cromatina también fueron más abundantes en leptoteno ($p=0,0367$ t test), cigoteno ($p=0,015$ t test) y paquiteno-like ($p=0,0328$ t test) (**Figura 4-66D**). En estos mutantes no se pudo observar una señal de pPLK1 que colocalizara con el SC en ningún estadio como ocurría en los espermatoцитos *Trip13^{-/-}*, pero se cuantificó cuantos agregados estaban en contacto con el SC y en ambos casos los mutantes de *Trip13* presentaban mayor porcentaje de colocalización con el SC que los mutantes *Spo11^{-/-}* ($p<0,0001$ t test) y *Dmc1^{-/-}* ($p<0,0001$ t test)(**Figura 4-66E**). Estos resultados muestran que se acumula mayor cantidad de agregados de pPLK1 en la cromatina de los espermatoцитos en ausencia de TRIP13.

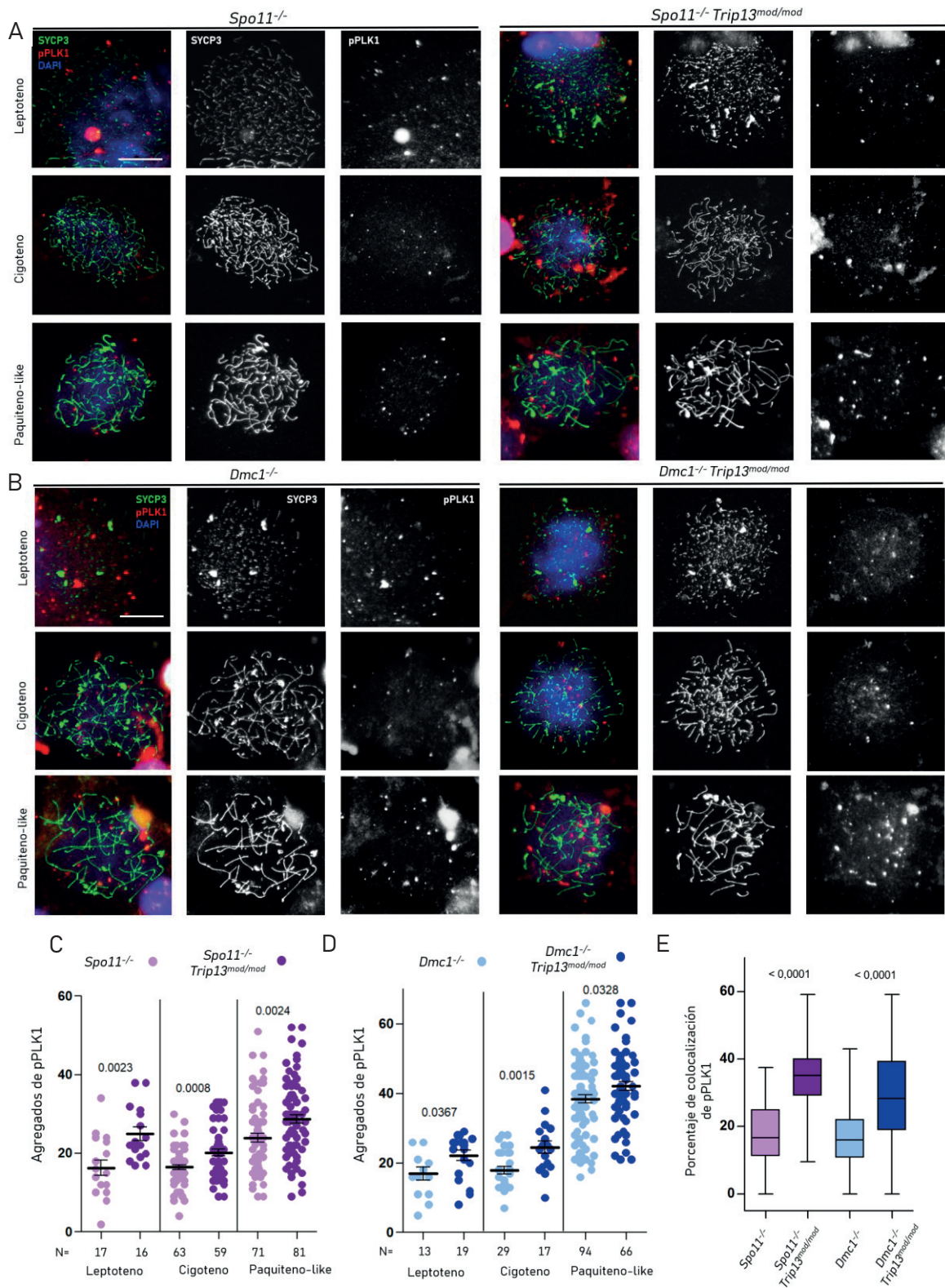


Figura 4-66. Los mutantes de *Trip13* acumulan más pPLK1 en la cromatina. Imágenes representativas de espermatocitos en los estadios mencionados marcados contra SYCP3 (verde), pPLK1 (rojo) y DAPI (azul) en: **A**) *Spo11*^{-/-} y *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} **B**) *Dmc1*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod}. Las barras de escala equivalen a 10 μ m. **C** y **D**) Gráficos mostrando el recuento de agregados de pPLK1 en el estadio y mutante mencionados. **E**) Gráfico mostrando el porcentaje de colocalización de los agregados de pPLK1 en contacto con el SC de en los espermatocitos en paquiteno-like de los mutantes mencionados. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.5.6 La función ATPasa de TRIP13 es necesaria para evitar la desinapsis prematura

Como la función ATPasa de TRIP13 se ha relacionado con el remodelado de las proteínas HORMA, quisimos saber si la función ATPasa de TRIP13 era necesaria para la regulación de la desinapsis. En la caracterización del mutante *Trip13^{ATPasaDead}*, se observó que el mutante presentó bloqueo meiótico y que los espermatocitos no progresaban más allá de un espermatocito en paquiteno-like. La frecuencia de asinapsis terminal en los espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* fue del 53,3% (**Figura 4-67B**) y la de asinapsis intersticial un 26,3% (**Figura 4-67B**), frecuencias muy similares a las encontradas en los mutantes *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*. Estos resultados indican que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos.

Como los datos se obtuvieron de un solo animal *Trip13^{ATPasaDead}*, se analizó si los animales tratados *in vivo* con el inhibidor DCZ0415 durante 7 días presentaban el mismo fenotipo. Los animales tratados no mostraron diferencias en la proporción de células mostrando puntas abiertas en los ratones tratados (8%) y los controles (8,1%). Tampoco se encontraron burbujas en estos individuos (**Figura 4-67C**). Estos resultados se pueden explicar por el hecho de que el tratamiento *in vivo* no produjo alteraciones en la progresión de la profase meiótica ni se encontró más espermatocitos en paquiteno-like. En cambio, en el tratamiento *in vitro* en células de testículo con DCZ0415 sí hubo efecto, ya que se observó que a la concentración de 20 μ M había un 30,7% de espermatocitos que presentaron autosomas con asinapsis terminal frente al 6,8% de los tratados con DMSO (**Figura 4-27B**).

Estos resultados indican que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para prevenir la desinapsis precoz de los cromosomas homólogos.

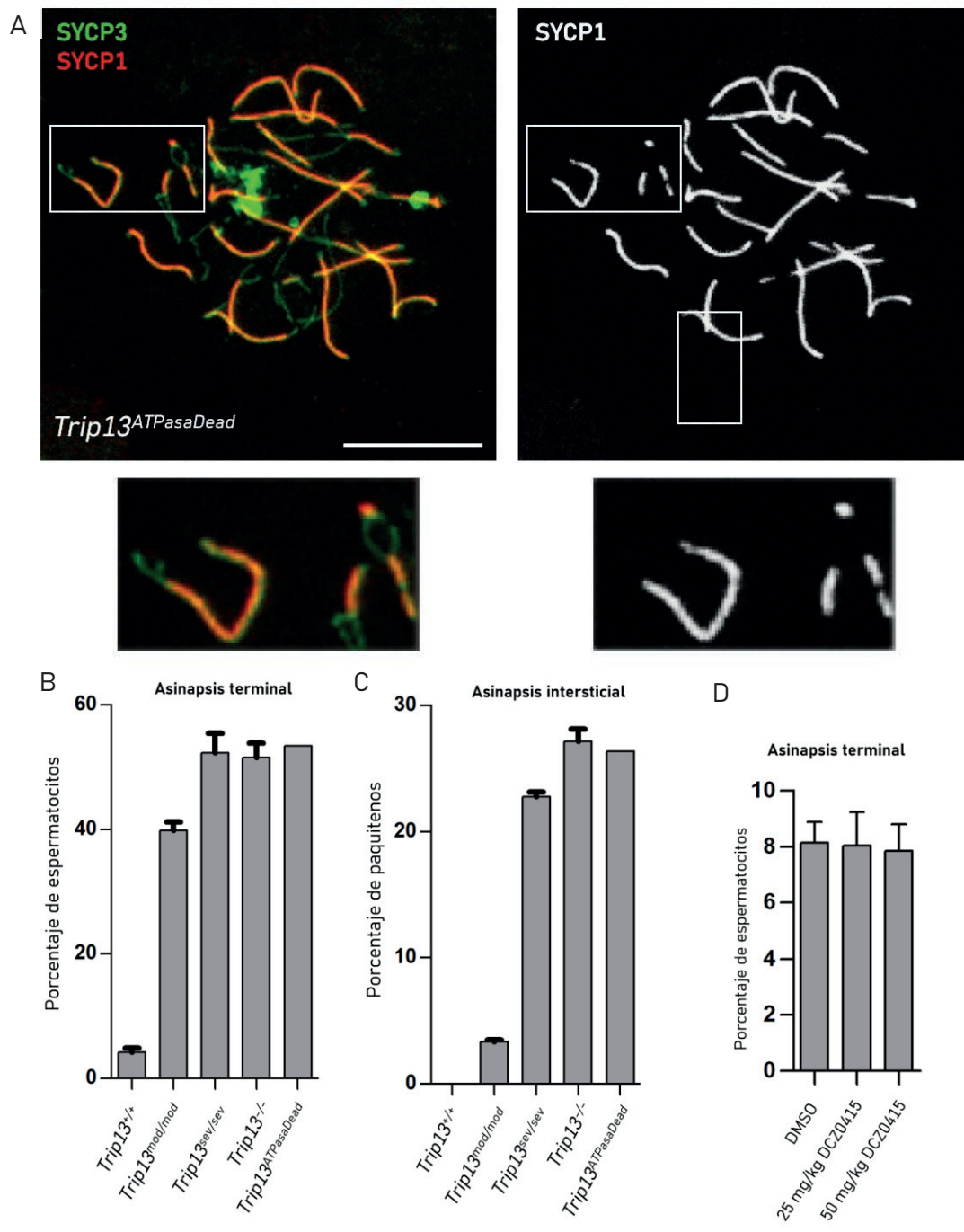


Figura 4-67. La función ATPasa de TRIP13 es indispensable para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos. **A)** Imágenes representativas de un espermatoцito *Trip13^{ATPasaDead}* en paquiteno-like marcado contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestra un autosoma (izquierda) con asinapsis terminal y un autosoma (derecha) con asinapsis intersticial en forma de “burbuja”. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatoцитos que presentan asinapsis terminal. **C)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatoцитos en paquiteno-like que presentan asinapsis intersticial. **D)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatoцитos que presentan asinapsis terminal en los animales tratados con DMSO y con DCZ0415.

4.5.7 La función ATPasa de TRIP13 previene la acumulación precoz de HSPA2 y PLK1

HSPA2 se acumula de manera precoz en los espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}*, de manera que los espermatoцитos en paquiteno-like presentan abundantes agregados de HSPA2 en la cromatina (**Figura 4-60**). Quisimos estudiar si la función ATPasa de TRIP13 era necesaria para controlar la carga de HSPA2 en la cromatina de los espermatoцитos. Para ello, analizamos la presencia de HSPA2 en espermatoцитos *Trip13^{ATPasaDead}*. Observamos que este mutante también presentó acumulación precoz de HSPA2 en la cromatina (**Figura 4-68A**). En el recuento del número de agregados de HSPA2 en la cromatina de los paquiteno-like se pudo observar que el rango es más amplio que en los mutantes *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}* ya que había células que poseían solo 3 agregados, mientras que otros espermatoцитos acumularon hasta 32 agregados en la cromatina (**Figura 4-68B**). En los animales tratados con el inhibidor no se observaron diferencias en la carga de HSPA2, la cual fue igual que la apareció en los espermatoцитos de los ratones WT. En las células tratadas en cultivo no se observó HSPA2 en los espermatoцитos. Estos resultados sugieren que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para evitar una acumulación precoz de HSPA2 en estadios tempranos de la profase meiótica.

Seguidamente, se comprobó si la función ATPasa de TRIP13 era necesaria para controlar la acumulación de pPLK1 en los mutantes *Trip13^{ATPasaDead}*. En este mutante también se observó una acumulación de agregados de pPLK1 en la cromatina de los espermatoцитos y en las porciones sinapsadas del SC en cigoteno y paquiteno-like (**Figura 4-69A**). La cuantificación de agregados en paquiteno-like reveló que en este mutante acumulaba más pPLK1 en la cromatina que los espermatoцитos en paquiteno temprano de los ratones WT, pero menos que en los espermatoцитos *Trip13^{-/-}* ($p < 0,0001$, T de Student) (**Figura 4-69B**). En los individuos tratados con el inhibidor DCZ0415 no se observaron diferencias en la expresión de PLK1, la cual era igual que en los individuos WT. En las células tratadas en cultivo tampoco se observó pPLK1 en los espermatoцитos. Estos resultados sugieren que la función ATPasa de TRIP13 es necesaria para evitar una acumulación precoz de pPLK1 en la cromatina de los espermatoцитos tempranos y en el SC.

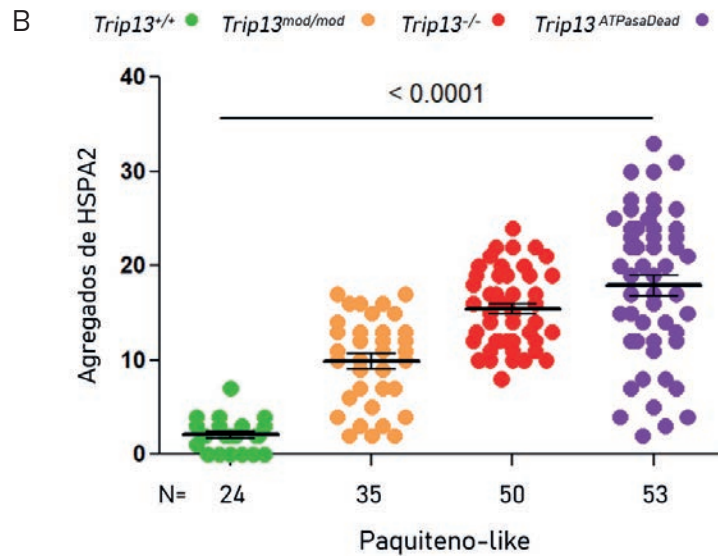
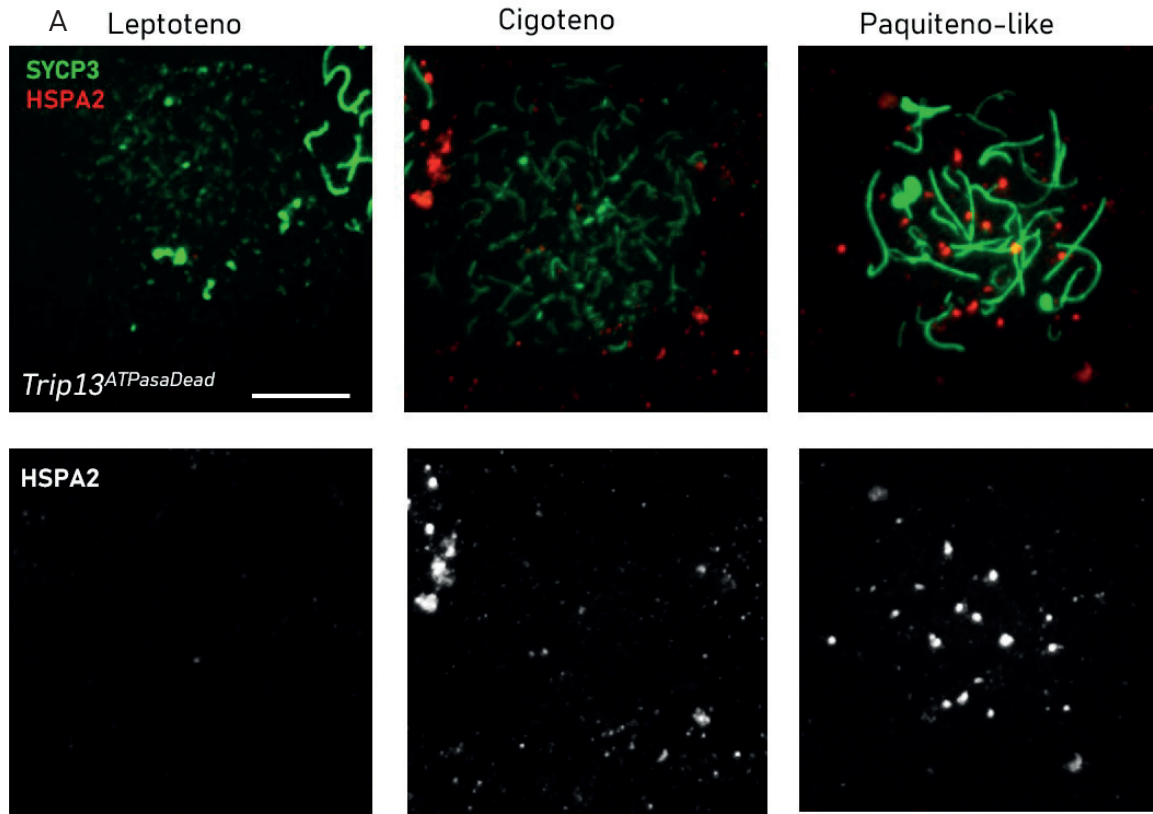


Figura 4-68. Se requiere la función ATPasa de TRIP13 para evitar la acumulación precoz de HSPA2. A) Imágenes representativas de extensiones de espermatocitos *Trip13^{ATPasaDead}* en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like contra SYCP3 (verde) y HSPA2 (rojo). La señal de HSPA2 empieza a aparecer en cigoteno y se acumula en paquiteno-like en forma de agregados por la cromatina. La barra de escala equivale a 10 μ m. B) Gráfico que muestra el recuento de agregados de HSPA2 en paquiteno de WT y paquiteno-like de *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{-/-}* y *Trip13^{ATPasaDead}*. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

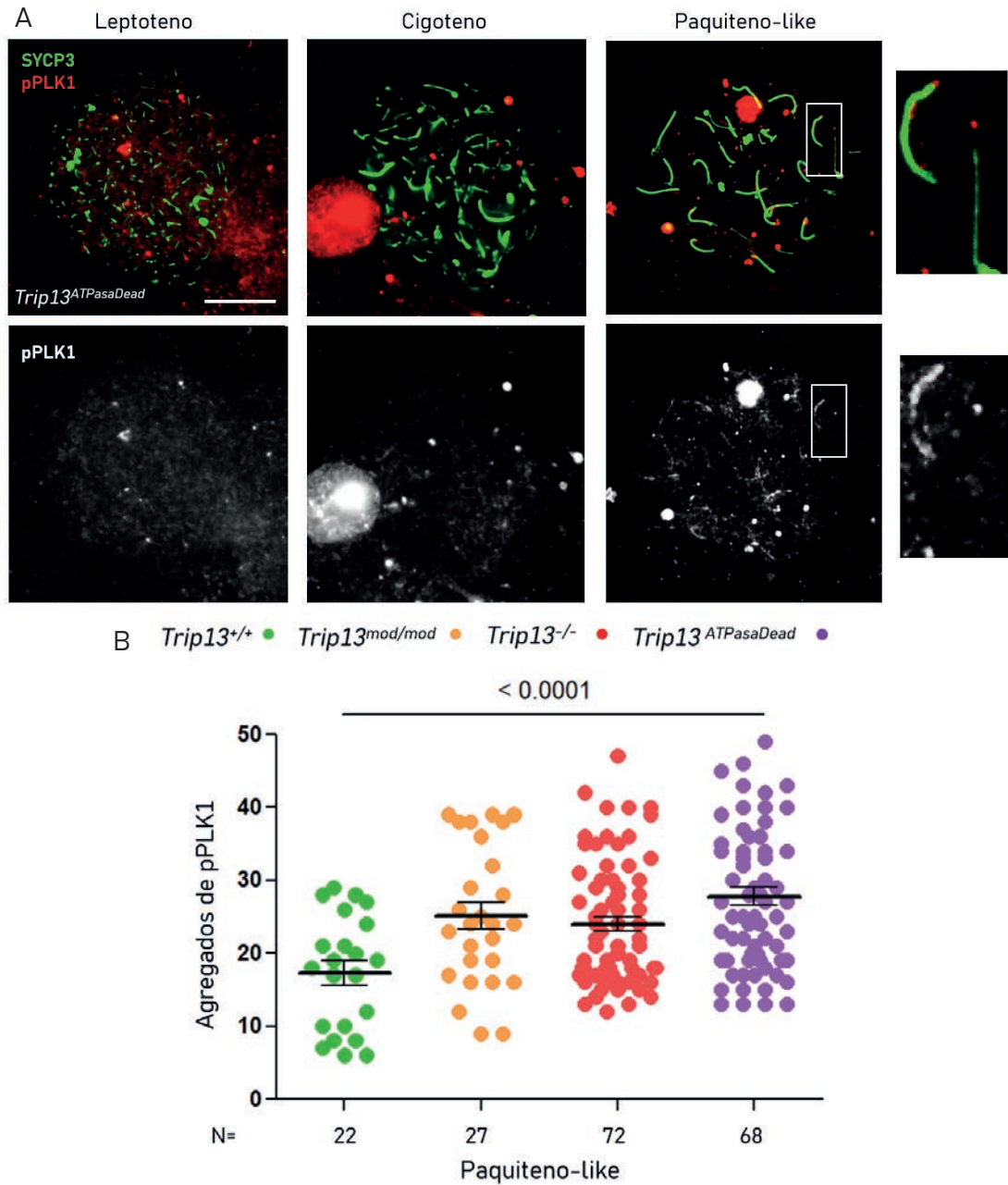


Figura 4-69. Se requiere la función ATPasa de TRIP13 para evitar la acumulación precoz de pPLK1. Imágenes representativas de extensiones de espermatocitos $Trip13^{ATPasaDead}$ contra SYCP3 (verde) y pPLK1 (rojo). En los espermatocitos en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like hay agregados de pPLK1 en la cromatina. En cigoteno y paquiteno-like hay señal de pPLK1 en las porciones sinapsadas del SC. En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestran dos autosomas. El de la izquierda presenta pPLK1 en el SC mientras que el de la derecha muestra ausencia de señal. La barra representa 10 μ m. **B)** Gráfico que muestra el recuento de agregados de pPLK1 en paquiteno de WT y paquiteno-like de $Trip13^{mod/mod}$, $Trip13^{-/-}$ y $Trip13^{ATPasaDead}$. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.

4.5.8 La persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados impide completar la sinapsis

Quisimos saber si los problemas de desinapsis en los mutantes de *Trip13* se deben también a la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados. Los mutantes *Hormad1^{3HA/3HA}* también mostraron un bloqueo meiótico y el estadio más avanzado de la profase meiótica encontrado fue un espermatozoido en paquiteno-like. La progresión de la profase meiótica fue muy similar al mutante *Trip13^{-/-}* (**Figura 4-29**). Al analizar los espermatozoidos *Hormad1^{3HA/3HA}* en paquiteno-like, se observó que poseía los defectos sinápticos típicos de los mutantes de *Trip13* (**Figura 4-70A**). La frecuencia de espermatozoidos que presentaban asinapsis terminal fue del 42,5% (**Figura 4-70B**) y la de espermatozoidos en paquiteno-like con asinapsis intersticial un 3,7% (**Figura 4-70C**). Ambas frecuencias fueron muy similares a las observadas en el mutante *Trip13^{mod/mod}*. La mayoría de autosomas de los espermatozoidos *Hormad1^{3HA/3HA}* en paquiteno-like conseguían sinapsar en su mayoría, aunque no se observaron espermatozoidos en que todos los autosomas mostraran una sinapsis completa. Estos resultados indicaron que la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados produce anomalías en la sinapsis pero más leves que los encontrados en el mutante *Trip13^{-/-}* y el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*.

También se observó una expresión precoz de HSPA2 en los espermatozoidos en paquiteno-like (**Figura 4-71A**). En este mutante, hubo células en paquiteno-like que no expresaron señal de HSPA2, mientras que hubo otras células que acumularon más de 35 agregados de la proteína (**Figura 4-71B**). Estos resultados indicaron que se requiere la depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados para la correcta localización de HSPA2 en los espermatozoidos.

En los espermatozoidos *Hormad1^{3HA/3HA}* también se observó una expresión precoz de PLK1 en cigoteno tardío y paquiteno-like tanto en la cromatina como en los ejes sinapsados, aunque la señal fue más tenue que la encontrada en los mutantes de *Trip13* y en espermatozoidos del mutante *Trip13^{ATPasaDead}* (**Figura 4-72A**). Los agregados en la cromatina fueron menos abundantes que en los mutantes de *Trip13* y no hubo diferencias con la acumulación de los espermatozoidos WT ($p=0,6504$, T de Student) (**Figura 4-72B**). Estos resultados sugieren que la presencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados no influye en el número de agregados de pPLK1 en la cromatina pero sí en la presencia en el SC.

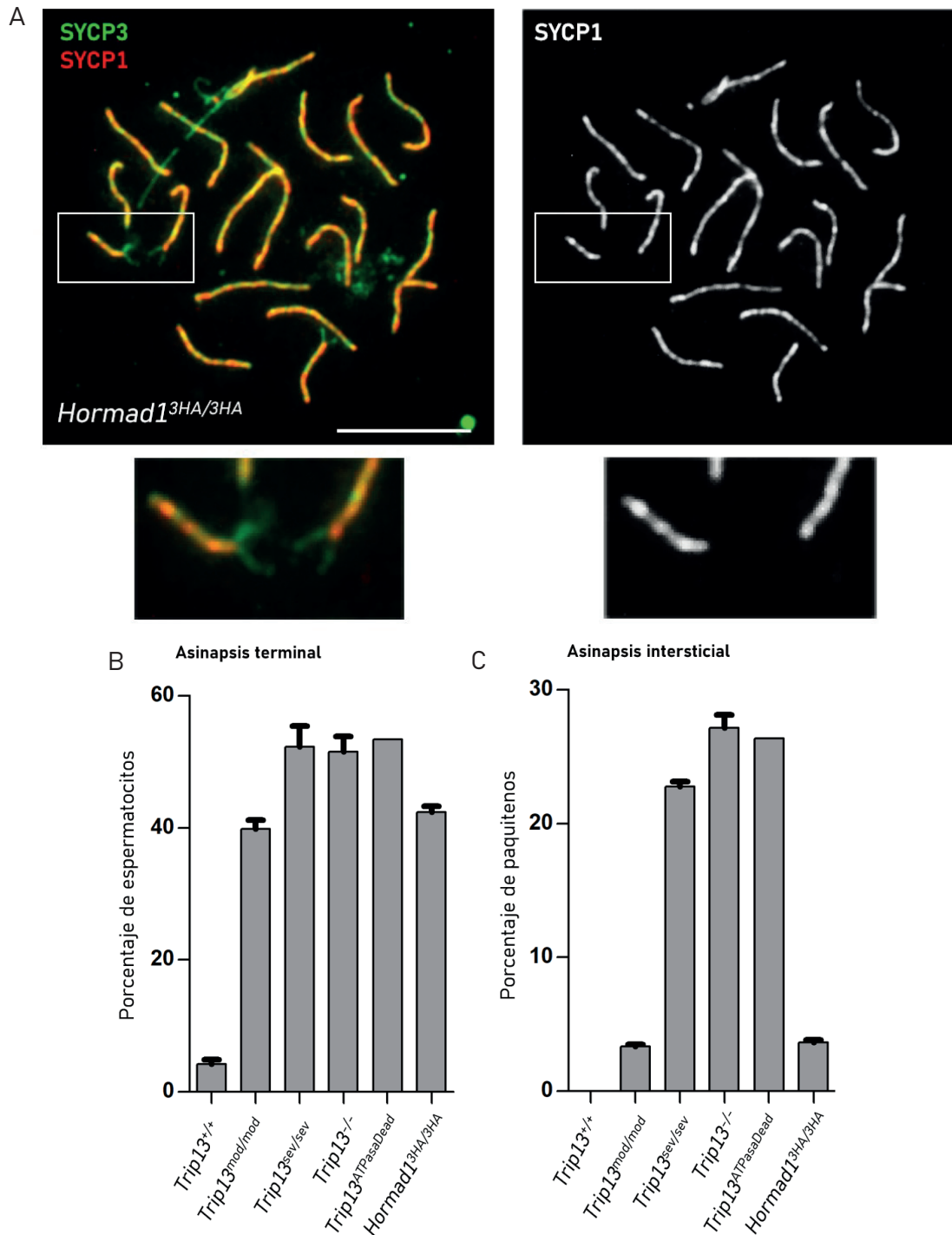


Figura 4-70. La depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados es necesaria para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos. A) Imágenes representativas de un espermatocito *Hormad1*^{3HA/3HA} en paquiteno-like marcado contra SYCP3 (verde) y SYCP1 (rojo). En las imágenes magnificadas de los recuadros se muestran dos autosomas con asinapsis terminal. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatocitos que presentan asinapsis terminal **C)** Gráfico que muestra el porcentaje de espermatocitos en paquiteno-like que presentan asinapsis intersticial.

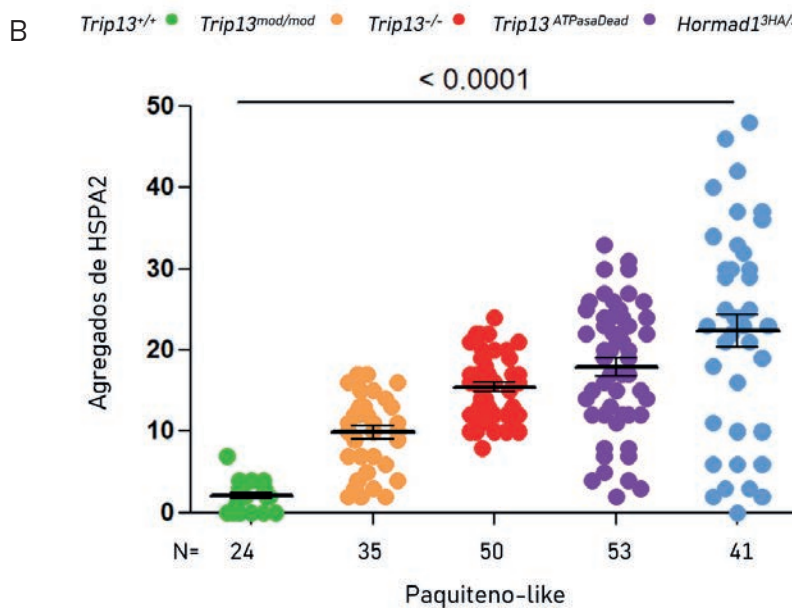
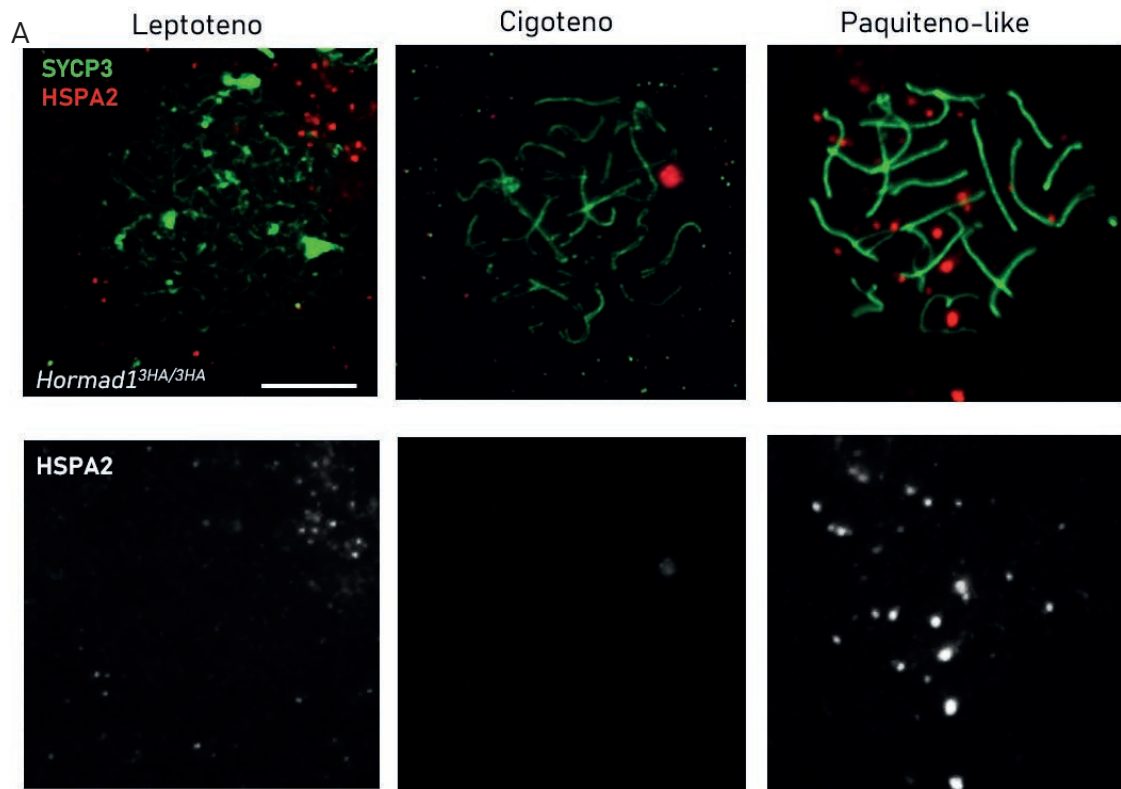
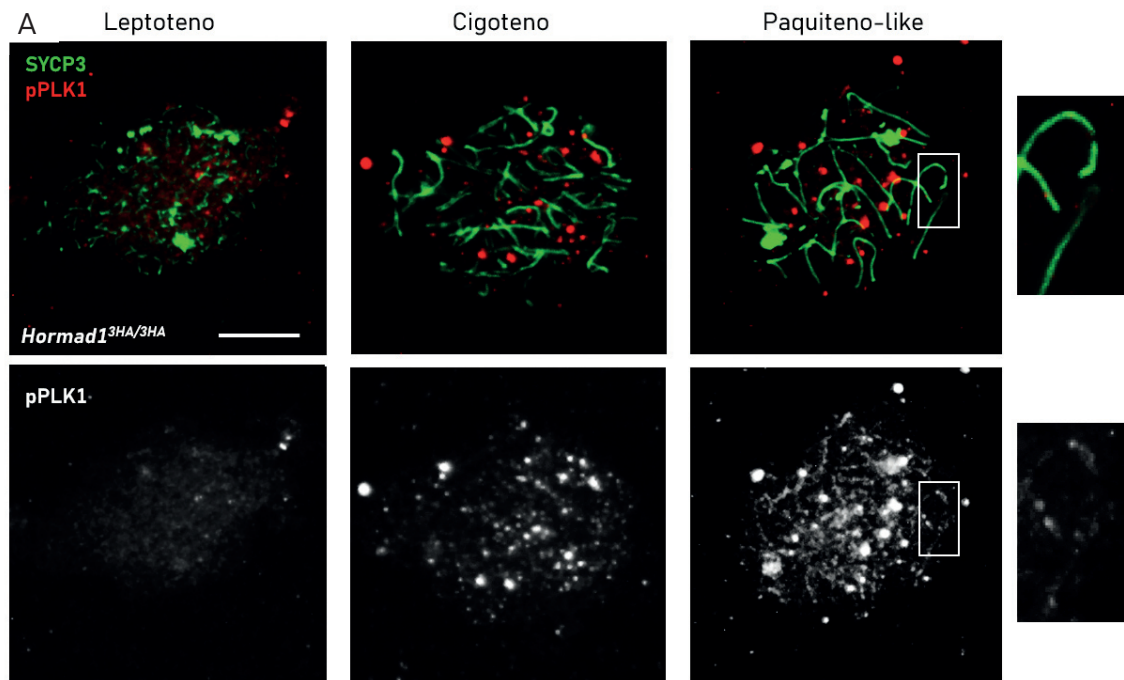


Figura 4-71. Se requiere la depleción de HORMAD1 mediante TRIP13 para evitar la acumulación precoz de HSPA2 en paquiteno-like. Imágenes representativas de extensiones de espermatocitos *Hormad1*^{3HA/3HA} en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like con marcaje contra SYCP3 (verde) y HSPA2 (rojo). La señal de HSPA2 empieza a aparecer en cigoteno tardío y se acumula en paquiteno-like en forma de agregados por la cromatina. La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico que muestra el recuento de agregados de HSPA2 en paquiteno temprano en WT y en paquiteno-like de *Trip13*^{mod/mod}, *Trip13*^{-/-}, *Trip13*^{ATPasaDead} y *Hormad1*^{3HA/3HA}. Análisis T de Student. La N corresponde al número de núcleos analizados.



B *Trip13^{+/+}* ● *Trip13^{mod/mod}* ● *Trip13^{-/-}* ● *Trip13^{ATPasaDead}* ● *Hormad1^{3HA/3HA}* ●

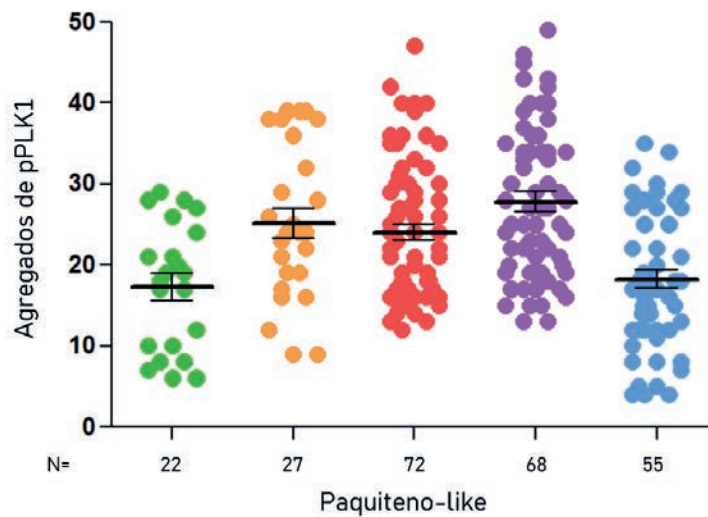


Figura 4-72. Los mutantes *Hormad1^{3HA/3HA}* presentan pPLK1 en los ejes sinapsados del SC. A) Imágenes representativas de espermatocitos *Hormad1^{3HA/3HA}* en leptoteno, cigoteno y paquiteno-like teñidos contra SYCP3 (verde) y pPLK1 (rojo). La barra de escala equivale a 10 μ m. **B)** Gráfico que muestra el recuento de agregados de pPLK1 en paquiteno temprano en WT y en paquiteno-like de *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{-/-}*, *Trip13^{ATPasaDead}* y *Hormad1^{3HA/3HA}*. La N corresponde al número de núcleos analizados.

5. Discusión



5.1 Nuevos modelos para estudiar la función de TRIP13 en la meiosis

En este trabajo hemos usado distintos modelos murinos y aproximaciones farmacológicas para analizar las distintas funciones de TRIP13 durante la profase meiótica. Al principio del siglo XXI, se generaron dos mutantes murinos hipomórficos para el estudio de la función de TRIP13. Los dos mutantes de *Trip13* fueron generados a partir de líneas ESCs que contenían alelos mutados por la inserción de un *gene-trap* en el segundo (*Trip13^{CH0621}*) o tercer intrón (*Trip13^{RRB047}*) de la secuencia del gen (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Estas mutaciones permitieron estudiar el defecto de *Trip13* con distinta penetrancia. Mientras que el *Trip13^{RRB047}* (o *Trip13^{mod}*) presenta menos expresión del gen que el alelo salvaje, el *Trip13^{CH0621}* (o *Trip13^{sev}*) consigue reducir casi por completo la expresión del gen. Ambas mutaciones en homocigosis confieren esterilidad y los machos presentan testículos de menor tamaño. En su momento, se constató que más del 90% de ratones destetados que morían eran homocigotos para la mutación del clon RRB047, por lo que la mutación confería una letalidad embrionaria parcial, ya que algunos ratones conseguían sobrevivir (X. Li & Schimenti, 2007). En los primeros estudios y análisis de este trabajo se usaron los mutantes hipomórficos de *Trip13*. En nuestras colonias estabuladas, pudimos mantener el alelo hipomórfico moderado, pero al alelo severo no estuvo disponible, por lo que solo se pudo utilizar para su análisis mediante muestras congeladas.

Más recientemente, se pudo obtener el modelo murino mutante *Trip13^{-/-}* y fundar una nueva colonia en nuestro estabulario. Este mutante fue generado gracias a la técnica CRISPR/Cas9 mediante una delección de 13 pb en el segundo exón de la secuencia de *Trip13*. La segregación de los alelos (sub-Mendeliana) fue muy similar a la segregación caracterizada de los alelos hipomórficos (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010), por lo que en este caso la mutación solo produjo una letalidad embrionaria parcial en los ratones mutantes. Los ratones macho *Trip13^{-/-}* presentaron testículos de menor tamaño comparado con los testículos WT. En los análisis histológicos se comprobó que, igual que en los mutantes hipomórficos (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010), los túbulos seminíferos del mutante *Trip13^{-/-}* no contenían células postmeióticas, indicando que se requiere

TRIP13 para completar la espermatogénesis. Pudimos comprobar también la ausencia total de la expresión de TRIP13 en testículos de ratones *Trip13^{-/-}* mediante la técnica de Western Blot. En cambio, se observó que los testículos de los mutantes *Trip13^{mod/mod}* sí contenían una pequeña cantidad de TRIP13. Las hembras *Trip13^{-/-}* mostraron un fenotipo similar a las hembras de los alelos hipomórficos, con una total depleción de folículos en los ovarios (Roig et al., 2010), confirmando que TRIP13 es necesaria para completar la foliculogénesis. Gracias a la obtención del alelo *Trip13^{-/-}* se pudo utilizar para estudiar el efecto de la depleción total de la proteína en la gametogénesis y las funciones de TRIP13, y compararlo con los efectos de la depleción parcial (*Trip13^{mod/mod}*) y la expresión salvaje de la proteína.

TRIP13 pertenece a la familia de las AAA⁺ ATPasas (K. Wang et al., 2014) y usa la energía de la hidrólisis del ATP para producir cambios conformacionales a otras proteínas. Por ahora, solo se ha demostrado que produzca cambios conformacionales a proteínas que poseen el dominio HORMA (Ye et al., 2017). La función de la actividad ATPasa de TRIP13/Pch2 ha sido estudiada ya en levadura (Herruzo et al., 2016), *C.elegans* (Giacopazzi et al., 2020) y en estudios *in vitro* con la proteína humana (de Krijger et al., 2021; Ye et al., 2017) y se ha demostrado que es necesaria para controlar algunas de las funciones de TRIP13. En este trabajo, quisimos analizar si la función ATPasa de TRIP13 era necesaria en la meiosis de ratón. Para ello, se generó el modelo murino *Trip13^{ATPasaDead}* mediante la sustitución del ácido glutámico por glutamina en la posición 253 de la proteína. Generar ratones genéticamente modificados es un proceso costoso, que requiere mucho tiempo, dinero y infraestructura para producirlo. La generación del alelo mutante tardó más de lo esperado, debido en parte a que y las transferencias embrionarias no fueron fructíferas. De los pocos animales resultantes (11 ratones nacieron de la última de la tres transferencias), se obtuvieron 3 ratones fundadores que presentaban la mutación deseada en heterocigosis, dos machos y una hembra. Cuando se cruzaron con ratones salvajes por más de 4 meses no se generó descendencia, por lo que se decidió analizar a los animales fundadores y su fenotipo. Uno de los machos fundadores murió antes de poder ser analizado. Por lo que los análisis llevados a cabo en este trabajo solo se pudieron realizar en los ratones que quedaron vivos, el macho y la hembra fundadores restantes, con las limitaciones que eso conlleva. La hembra fundadora mostró una depleción total de

fóliculos en los ovarios analizados, igual que las hembras mutantes de *Trip13^{sev/sev}* (Roig et al., 2010) y *Trip13^{-/-}* (**Figura 4-8**). Por lo que respecta al macho fundador, se extrajo ARN de los testículos del mutante, se clonaron los alelos de *Trip13* y mediante su secuenciación se observó que uno poseía la sustitución deseada de ácido glutámico por glutamina, mientras que el otro alelo poseía una delección de 3 nucleótidos. Los animales heterocigotos para el gen *Trip13* de nuestra colonia son fértiles, por lo que un solo alelo es capaz de generar proteína suficiente para asegurar la correcta función de TRIP13. El análisis de los testículos del macho fundador reveló que era estéril. El análisis citológico reveló que los espermatoцитos no progresaban más allá de paquiteno-like, por lo que el fenotipo observado en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}* posiblemente se deba a la pérdida de la actividad ATPasa de TRIP13. En estudios *in vitro*, *Trip13^{E253Q}* mantiene alta afinidad por la unión a nucleótidos, forma un anillo hexamérico estable y puede interactuar con sus sustratos (Ye et al., 2015). En nuestro mutante *Trip13^{ATPasaDead}* había expresión de TRIP13, aunque en menor cantidad, debido a que no se encontraban células postmeióticas (que también expresan TRIP13). El análisis citológico reveló que TRIP13 se localizó en los telómeros y en las porciones sinapsadas del SC, misma localización que en los espermatoцитos WT, por lo que parece que la estructura de la proteína sigue siendo estable. En *C. elegans* PCH-2^{E253Q} colocalizaba con el SC una vez había iniciado la sinapsis, y era retirada en paquiteno tardío de igual manera igual que la proteína nativa en la meiosis (Giacopazzi et al., 2020). En *S. cerevisiae*, la proteína Pch2-E399Q también se localizó igual que Pch2 en el ADNr (C. Chen et al., 2014; Herruzo et al., 2016). Por lo tanto, la mutación ATPasaDead no altera la localización de la proteína en los diferentes modelos estudiados.

Para complementar el estudio de la función ATPasa de TRIP13, se recurrió al uso de un inhibidor de TRIP13 (DCZ0415) recientemente creado (Y. Wang et al., 2020a). Primero se probó el inhibidor en ratones tratados *in vivo* durante 7 días. En un inicio, se hizo un tratamiento con una dosis 25 mg/kg de DCZ0415 en 3 ratones adultos y 3 ratones adultos fueron usados como control. La dosis usada fue la misma que se utilizó en el estudio en el que se describió el fármaco, en el que se generaron tumores en los ratones para posteriormente ser tratados con el inhibidor de TRIP13. El tratamiento con el inhibidor provocó un descenso en la

supervivencia celular de los tumores provocando su apoptosis. El inhibidor también inhibió la reparación por HR en las células (Y. Wang et al., 2020). En nuestro caso, después de los 7 días de tratamiento con DCZ0415, se analizó si la inhibición de TRIP13 produjo algún efecto en la espermatogénesis pero los resultados obtenidos no fueron concluyentes. Por ello, se llevó a cabo un tratamiento con una dosis de 50 mg/kg para comprobar si aumentando la dosis se producía un mayor efecto en la inhibición de TRIP13, pero el efecto fue equivalente entre ambas dosis. En los ratones tratados *in vivo* se vio un efecto en la depleción de HORMAD1 en cigoteno y en paquiteno temprano, ya que estos espermatoцитos presentaron persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados. También se vio un aumento de foci de RAD51 y RPA en cigoteno tardío y paquiteno temprano, junto a más acúmulos de γ H2AX en paquiteno temprano en los animales tratados. Estos resultados coinciden con el fenotipo observado en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*, lo que sugiere que la inhibición de la función ATPasa de TRIP13 se llevó a cabo en los animales.

Se comprobó la eficacia del inhibidor en cultivo *in vitro* de células de testículo de ratón adulto, las cuales se cultivaron durante 24h con las dosis del inhibidor a 15 μ M y 20 μ M y a la misma concentración de DMSO como control. En este caso, sí se vio un efecto en la progresión de la profase meiótica ya que a la concentración de 20 μ M se observó como algunos espermatoцитos presentaban bivalentes con asinapsis terminal con acumulación de HORMAD1 en las porciones asinapsadas. También hubo otro grupo espermatoцитos con persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados en cigoteno y paquiteno. También hubo un descenso de la población de espermatoцитos en diploteno, y una acumulación de espermatoцитos en estadio de paquiteno-like. Por falta de tiempo no se pudo estudiar en más profundidad el efecto del inhibidor *in vitro*. Para posteriores estudios, se deberá poner a punto la técnica y mejorar distintos parámetros, como el uso de un mejor medio de cultivo, poder incrementar el número de días de tratamiento y estandarizar un método de recolección de espermatoцитos que permita mejorar la calidad del cultivo. En estudios realizados por nuestro grupo de investigación con inhibidores de ATR *in vivo* e *in vitro* (Pacheco et al., 2018) sí que se obtuvieron resultados concluyentes, por lo que el uso de inhibidores promete ser una buena herramienta complementar el estudio de la función de las proteínas meióticas.

TRIP13 es necesaria para retirar las proteínas HORMAD de los ejes cromosómicos una vez se ha completado la sinapsis (Roig et al., 2010; Wojtasz et al., 2009) (**Figura 4-10**). Además, en estudios *in vitro* se ha comprobado que se requiere el extremo N-terminal de HORMAD1 para que se produzca la interacción entre TRIP13 y HORMAD1 y su depleción de los ejes sinapsados (Ye et al., 2017). Para estudiar qué parte del fenotipo de los mutantes de *Trip13* se debe a la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados, se obtuvieron muestras de testículo del modelo murino *Hormad1*^{3HA/3HA} en colaboración con el laboratorio del Dr. Attila Toth (TU Dresden). En este mutante, los espermatoцитos no pueden retirar HORMAD1 de los ejes sinapsados y también quedan bloqueados en un paquiteno-like, aunque los defectos de sinapsis observados en este mutante son más sutiles que en los mutantes *Trip13*^{-/-} y *Trip13*^{ATPasaDead}. Los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} presentaron defectos en la reparación de los DSBs en cigoteno tardío y paquiteno-like, pero no en los estadios iniciales.

Finalmente, se utilizaron ratones mutantes *Spo11*, *Dmc1* y *Dmc1 Chk2*, los cuales, mediante la depleción de *Trip13*, permiten estudiar la función de TRIP13 en los espermatoцитos en los que no se producen DSBs o la reparación por recombinación meiótica se encuentra alterada. También se usaron ratones mutantes de *53bp1*, deficientes de la vía de NHEJ, para estudiar si las fusiones teloméricas observadas eran dependientes de NHEJ.

5.2 Los mutantes de *Trip13* no pueden completar la recombinación meiótica

Como ya se había descrito anteriormente, TRIP13 es necesaria para completar la recombinación meiótica (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010). Los mutantes de *Trip13* muestran un defecto en la reparación de los DSBs ya que acumulan γ H2AX, RAD51 y RPA en los espermatoцитos tardíos. El mutante *Trip13*^{-/-} también presenta los mismos defectos en la reparación de los DSBs, ya que posee menos focos de RAD51 y RPA en leptoteno y cigoteno y persistencia de DSBs en paquiteno-like. En el caso de nuestro mutante *Trip13*^{ATPasaDead}, no observamos diferencias en la carga de RAD51 y RPA al principio de la profase meiótica en los espermatoцитos, pero sí se observó una acumulación de DSBs sin reparar en cigoteno tardío y

paquiteno-like. Estos resultados coinciden con el recuento de RAD51 y RPA en los individuos tratados *in vivo* con DCZ0415, en los que se observó un defecto en la reparación de los DSBs pero solo en cigoteno tardío y paquiteno temprano, indicando que la función ATPasa de TRIP13 no regula la carga inicial de estas proteínas *in vivo*. La reparación de los DSBs también se ve alterada en los espermatoцитos *Hormad1*^{3HA/3HA} en los que de igual manera, se observó un persistencia de DSBs sin reparar, pero solo en cigoteno tardío y paquiteno-like, ya que en los primeros estadios no se encontraron diferencias con los controles.

Si algo comparten los mutantes *Trip13*^{mod/mod}, *Trip13*^{sev/sev}, *Trip13*^{-/-}, *Trip13*^{ATPasaDead} y *Hormad1*^{3HA/3HA} es la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados de los cromosomas homólogos. Existe un *feedback* negativo que regula los DSBs: los DSBs promueven la formación del SC, lo que restringe la actividad de SPO11 a las áreas asinapsadas de los ejes cromosómicos para propiciar la búsqueda del homólogo (Daniel et al., 2011). Este mecanismo de regulación recae en HORMAD1, que estimula la formación de DSBs y la acumulación de los factores de recombinación en los ejes (Daniel et al., 2011). HORMAD1 se encuentra localizada a lo largo de los ejes asinapsados y allí recluta a la proteína IHO1 para promover la formación de DSBs en esa zona (Stanzione et al., 2016). La depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados promueve la inhibición de la actividad de SPO11 en las regiones sinapsadas, disminuyendo a su vez la actividad de IHO1 (Stanzione et al., 2016). De hecho, en un interesante trabajo (Dereli et al., 2021), se vio que, aunque TRIP13 no posee un rol en la depleción de IHO1 de los ejes asinapsados, sí participa en su depleción de los ejes sinapsados. Para el análisis utilizaron el mutante *Trip13*^{sev/sev}, y comprobaron que los espermatoцитos en paquiteno-like con abundante asinapsis acumulaban IHO1 tanto en regiones asinapsadas como sinapsadas. También destacaron que había espermatoцитos que conseguían una depleción completa de IHO1 de los ejes, y coincidían con que eran espermatoцитos que presentaban sinapsis completa en los autosomas (Dereli et al., 2021). Estos resultados indicaron que hay un mecanismo dependiente de TRIP13 que precisa de la depleción de HORMAD1 para controlar la supresión de los DSBs en las regiones sinapsadas, mecanismo el cual observamos en nuestros mutantes. Nuestros resultados indican que se necesita la actividad ATPasa de TRIP13 para retirar HORMAD1 de los ejes sinapsados, y también la interacción de TRIP13 con

HORMAD1 mediante el extremo N-terminal para causar la depleción de HORMAD1. En ambos mutantes se ha observado persistencia de foci de RAD51 y RPA solo en los espermatoцитos en cigoteno tardío y paquiteno-like, pero no en los primeros estadios de leptoteno y cigoteno como ocurre en los mutantes *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*. Estos resultados sugieren que si no se retira HORMAD1 de los ejes una vez se ha completado la sinapsis, se siguen produciendo DSBs que no pueden ser reparados. Por otro lado, los defectos en la carga de RAD51 y RPA del principio de la profase meiótica presente en los mutantes *Trip13^{mod/mod}*, *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}* es un indicativo de un mecanismo alterado independiente de la depleción de HORMAD1 del SC.

Un trabajo publicado recientemente relaciona TRIP13 con MRE11, componente del complejo MRN, el cual detecta el daño de los DSBs y activa ATM (Jeong et al., 2022). TRIP13 interacciona directamente con MRE11 y RAD50, pero no con NBS1, a partir de la inducción de daño en el ADN, por lo que podría existir un complejo conteniendo solo MRE11 y RAD50. Una vez se ha producido el daño en el ADN mediante radiación, TRIP13 es reclutada al lugar del daño inmediatamente. La depleción de TRIP13 redujo significativamente el reclutamiento de MDC1 al lugar del daño (Jeong et al., 2022). Las funciones de TRIP13 están relacionadas con la inducción de cambios conformacionales en sus sustratos (gracias a la unión y la hidrólisis del ATP) y la liberación de los sustratos de los complejos proteicos a los que pertenece. En el estudio, sugieren que TRIP13 promueve la interacción entre MRE11 y MDC1, interactuando directamente con MRE11. TRIP13 incrementa la resección del ADN y promueve la HR regulando la cascada de señalización de ATM (Jeong et al., 2022). Además, usaron ATPγS, un análogo del ATP no hidrolizable, y vieron que en su presencia, TRIP13 era reclutado al lugar del daño (Jeong et al., 2022). Estos hallazgos podrían explicar los defectos en la recombinación meiótica en los estadios iniciales presentes en los mutantes de *Trip13* y no en el *Trip13^{ATPasaDead}*, ya que la ausencia de la proteína TRIP13 podría causar una menor activación de la cascada de señalización de ATM al inicio de la detección de los DSBs, produciendo una menor resección de los DSBs, y una menor carga de RPA y RAD51. Esto sería independiente de la función ATPasa, la cual podría ser necesaria para causar la depleción de HORMAD1 de los ejes y reparación de los DSBs en paquiteno-like.

De manera interesante, de la lista de posibles proteínas interactoras de TRIP13 que se obtuvo a partir de la espectrometría de masas, se seleccionó la proteína HSPA2 para comprobar la validez fisiológica de los resultados (**ver apartado 4.5.2 y 5.6**). De la lista de posibles candidatas, dos proteínas interesantes quedaron en los puestos más altos. Estas fueron BOD1L y SFR1. Ambas participan en la estabilización de los filamentos de RAD51. BOD1L protege al genoma del estrés causado por una horquilla de replicación atascada. La pérdida de la proteína causa una hiperresección dependiente de DNA2 (Higgs et al., 2015; Higgs & Stewart, 2016). SFR1 también interactúa directamente con RAD51 y estimula su actividad durante la recombinación meiótica (Su et al., 2016). Si TRIP13 interactuara con estas proteínas, de algún modo se podría explicar su papel en la HR y la carga de RAD51, por lo que la espectrometría de masas es una herramienta útil y promete ayudar a encontrar nuevos actores en la reparación de los DSBs.

5.3 Función de TRIP13 en la elección de la vía de reparación de los DSBs

La elección entre la reparación de los DSBs por HR o NHEJ requiere el control de resección del ADN alrededor del daño (Symington & Gautier, 2011). Si se produce la resección, el mecanismo de NHEJ se verá inhibido. 53BP1 juega un papel fundamental inhibiendo la resección, mediante la competición con BRCA1 por unirse al ADN. BRCA1 en cambio promueve la resección desplazando a 53BP1 y Ku70/Ku80 de los DSBs para estimular la resección mediada por el complejo MRN (Chapman et al., 2012; Panier & Boulton, 2014). En meiosis, la regulación de la reparación de los DSBs favorece la reparación por recombinación meiótica, ya que se precisa de al menos un CO por bivalente para segregarse correctamente. Por ello, en espermatoцитos WT, los factores que participan en la vía de NHEJ se encuentran inhibidos durante la profase meiótica. 53BP1 y Ku70 aparecen en espermatoцитos tardíos, pero no en los espermatoцитos en estadios tempranos (Enguita-Marruedo et al., 2019). En los espermatoцитos tardíos, ya se han establecido los COs y los homólogos ya han sinapsado, por lo que la reparación IH-HR ya no es tan necesaria. En los espermatoцитos deficientes de *Trip13* encontramos una diferencia de señal entre los dos anticuerpos de 53BP1 que usamos para el análisis, lo cual

impide llegar a una conclusión clara. Para ello, se debería estandarizar el anticuerpo de 53BP1 a usar en posteriores análisis y estudiar su localización en más mutantes de *Trip13*. La señal que se encontró usando el anticuerpo de ratón sugiere que en los espermatoцитos *Trip13*^{-/-} hay una acumulación precoz de 53BP1 en la cromatina de leptoteno, cigoteno y paquiteno-like. Esta señal es parecida a la que aparece en espermatoцитos después de ser irradiados (Enguita-Marruedo et al., 2019). Esta acumulación de 53BP1 podría explicar también que se encuentren marcadores de HR disminuidos en los espermatoцитos mutantes de *Trip13*, en los que se podría estar produciendo una competición entre los factores que regulan la HR y la NHEJ. Ku70 también es otro factor relacionado con la NHEJ que mientras que en espermatoцитos WT solo aparece en estadios tardíos, en los espermatoцитos mutantes de *Trip13* también apareció en estadios tempranos. La presencia de 53BP1 y Ku70 en los espermatoцитos deficientes de *Trip13* en estadios tempranos sugiere que la vía de NHEJ podría estar activa en ausencia de TRIP13.

En trabajos realizados en nuestro grupo de investigación, se estudió si TRIP13 participaba en la eliminación de ovocitos como consecuencia de la activación del *checkpoint* de sinapsis. Para ello se analizaron dos modelos de ratones que tienen problemas de sinapsis, *Spo11*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-}, y se compararon los ovarios de estas hembras con los ovarios de las mutantes *Spo11*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} y *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} respectivamente (Martínez Marchal, 2019). La mutación de TRIP13 no produjo rescate en el número de ovocitos *Spo11*^{-/-} (Martínez Marchal, 2019), como ya se había descrito previamente (X. Li & Schimenti, 2007). Sin embargo, las hembras *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} sí mostraron un rescate en el número de folículos, reflejado por el incremento en el número de folículos primordiales y folículos primarios (Martínez-Marchal, 2019). Se postularon dos posibles hipótesis para explicar este rescate. La primera fue que TRIP13 participara en el *checkpoint* de sinapsis, pero solo en presencia de DSBs producidos por SPO11.

La segunda hipótesis fue que TRIP13 participa en la elección de la ruta de reparación de los DSBs, inhibiendo la reparación por NHEJ y promoviendo la reparación por HR, como pasa en células somáticas (Clairmont et al., 2020). Si TRIP13 participase en la elección de la ruta de reparación de los DSBs, en los

ovocitos *Dmc1*^{-/-} *Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} una parte de los DSBs, que no podrían ser reparados por HR, debido a la ausencia de DMC1, podrían ser reparados mediante NHEJ. En este trabajo hemos analizado la reparación de los DSBs en los espermatocitos de los mutantes *Dmc1*^{-/-}, *Dmc1*^{-/-}*Trip13*^{mod/mod}, *Dmc1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} y *Dmc1*^{-/-}*Chk2*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} con la inmunolocalización de γ H2AX, RAD51 y RPA. De manera interesante, en los espermatocitos en paquiteno-like de estos mutantes de *Trip13* se observó menor acumulación de γ H2AX, RAD51 y RPA por lo que son capaces de reparar una fracción de los DSBs en ausencia de *Trip13*. En células somáticas, TRIP13 interactúa con el complejo Shieldin, la función del cual es inhibir la resección de los DSBs, promoviendo su reparación por NHEJ y, por lo tanto, inhibiendo la reparación por HR (Clairmont et al., 2020). REV7 es una proteína con dominio HORMA que forma parte del complejo Shieldin, junto a SHLD1, SHLD2 y SHLD3. SHLD3 interacciona con REV7 mediante el dominio *safety belt* de REV7. TRIP13 tiene la capacidad de disociar el complejo REV7-SHLD3, lo cual causa el desensamblaje del complejo Shieldin (Clairmont et al., 2020). En células somáticas humanas *TRIP13*^{-/-} se observa un incremento del número foci de REV7 después de la inducción de DSBs con radiación ionizante (Clairmont et al., 2020). Además, en células *TRIP13*^{-/-} se observa una reducción en la resección de los DSBs y menor cantidad de pRPA (fosforilado en S33), marcador de ADN reseccionado (Shiotani & Zou, 2009). Por el contrario, en células *REV7*^{-/-} y células que sobreexpresan TRIP13 presentan hiperresección de los DSBs y un incremento en pRPA. En las mismas células *TRIP13*^{-/-} se observa una reducción de foci de RAD51, mientras que en células sobreexpresando TRIP13 y células *REV7*^{-/-} presentaban más RAD51 (Clairmont et al., 2020). Estos estudios en células somáticas indican que cuando se elimina TRIP13 los DSBs son reparados por NHEJ y cuando se sobreexpresa TRIP13, se reparan por HR, por lo tanto, TRIP13 regula la elección de la vía de reparación de los DSBs antagonizando la función de REV7 en las células.

El análisis de la presencia de REV7 en los espermatocitos de los distintos mutantes de *Trip13* reveló que, en efecto, hay mayor presencia de REV7 en ausencia de *Trip13*. Además, REV7 aparece en forma de foci intensos y discretos en los extremos de los fragmentos del SC en leptoteno y cigoteno de los mutantes. En los espermatocitos *Spo11*^{-/-}, al no producirse los DSBs, tampoco esperábamos encontrar REV7, ya que los DSBs no se deben reparar. Sorprendentemente, los

espermaticos de los mutantes de *Spo11^{-/-}* y *Spo11^{-/-} Trip13^{mod/mod}* también presentan la proteína en los extremos de los fragmentos de SC. Este hallazgo sugiere, por un lado, que REV7 se expresa de manera basal en todas las células, o por otro, que esos foci de los espermaticos *Spo11^{-/-}* son artefactuales. De cualquier manera, en los espermaticos *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}* los foci de REV7 fueron más abundantes que en los espermaticos WT. La mayor acumulación de REV7 en los mutantes *Dmc1^{-/-}* y *Dmc1^{-/-} Chk2^{-/-}* y que la depleción parcial de *Trip13* produzca que en estos mutantes haya menos DSBs sin reparar, y menor acumulación de RAD51 y RPA, se podría explicar si TRIP13 participase en la regulación de la vía de reparación de los DSBs durante la profase meiótica mediante el remodelado de REV7. Como en células somáticas TRIP13 desensambla el complejo Shieldin, se esperaría que si TRIP13 realiza la misma función en los espermaticos, hubiera más inhibición de la resección de los DSBs, que se traduciría en menos ssADN a los que RPA pudiera unirse, y menos RAD51 para reemplazar a RPA. Como hemos comprobado, en el mutante *Trip13^{ATPasaDead}*, la reparación de los DSBs no se encuentra alterada desde el principio de la profase meiótica, pero sí en cigoteno tardío y paquiteno-like, por lo que la función ATPasa no controlaría la reparación inicial de los DSBs. En los mutantes *Trip13^{mod/mod}* y *Trip13^{-/-}* en cambio, sí vemos un defecto en la reparación inicial de los DSBs, que podría explicarse por la reciente interacción entre TRIP13 y MRE11 (**ver apartado 5.2**).

Recientemente se ha descrito una nueva vía para controlar la ruta de reparación de los DSBs mediante la regulación del complejo Shieldin (F. Li et al., 2022). CHAMP1 se localiza en los cromosomas, recluta REV7 a los cinetocoros y la disrupción de la proteína genera problemas en el alineamiento de los cromosomas en la mitosis (Itoh et al., 2011). La mutación de CHAMP1 en células U2OS y células RPE produce una menor carga de RAD51 y RPA en los DSBs. CHAMP1 promueve la HR uniéndose directamente a REV7 y tiene como principal función la inactivación del complejo Shieldin para promover la HR (F. Li et al., 2022). TRIP13 junto a p31comet, cambia la conformación de REV7, disocia su complejo con SHLD3, inactivando el complejo Shieldin (Clairmont et al., 2020; Sarangi, Clairmont, & D'Andrea, 2020). CHAMP1 funciona uniéndose directamente a REV7 y compite con SHLD3, también inactivando el complejo Shieldin (F. Li et al., 2022). CHAMP1 se

expresa en testículo, en espermatogonias y espermatocitos tempranos pero no en espermatocitos en paquiteno, por lo que podría actuar sobre REV7 de manera conjunta con TRIP13 en los DSBs. REV7 puede interactuar con SHLD3, REV3 o CHAMP1, y estas interacciones podrían estar determinadas por la actividad de TRIP13 y su capacidad de desensamblar los complejos de REV7. La célula podría seleccionar el desensamblaje de un complejo u otro, dependiendo de qué ruta de reparación de los DSBs deba tomarse (F. Li et al., 2022). En espermatocitos WT, con niveles normales de TRIP13 y CHAMP1, la actividad del complejo Shieldin se ve inhibida y se promueve la reparación de los DSBs por HR. En ausencia de TRIP13, la disociación del complejo Shieldin por parte de TRIP13 no se lleva a cabo, lo que se traduce en una disminución de la resección de los DSBs. Como CHAMP1 sigue estando activa, puede seguir uniéndose a REV7, lo que inhibiría algunos complejos Shieldin. De manera interesante, CHAMP1 y TRIP13 no son proteínas epistáticas, ya que la mutación de TRIP13 en células CHAMP1 deficientes resulta en un descenso drástico de la HR (F. Li et al., 2022). La mayor acumulación de REV7 y la presencia de marcadores de NHEJ aumentados en los mutantes de *Trip13*, junto a marcadores reducidos de HR indican que TRIP13 es un regulador de la reparación de los DSBs, promoviendo la HR, y también de la elección de la ruta de reparación de los DSBs durante toda la profase meiótica.

5.4 Función de TRIP13 en los telómeros

El hallazgo de que TRIP13 se encuentra localizada en los telómeros durante la profase meiótica sugiere que podría estar participando en algunos eventos relacionados con el funcionamiento del telómero durante la meiosis. En levadura PCH2 evita la producción de DSBs en las secuencias repetitivas del ADN ribosomal (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999) y de las regiones próximas a los telómeros (Subramanian et al., 2019). Durante la meiosis, la formación de DSBs alrededor de secuencias repetitivas está bien controlada, ya que estas porciones son susceptibles de sufrir recombinación homóloga no alélica (NAHR), lo cual puede generar inestabilidad genómica, como por ejemplo translocaciones o fusiones cromosómicas. Una posible función de TRIP13 es que participara en la protección de los telómeros evitando la formación de DSBs, como realiza Pch2 en levadura. Si esta fuera una función de TRIP13, se esperaría que los mutantes de *Trip13*

tuvieran más telómeros con daño sin reparar, pero no es lo que observamos. El porcentaje de telómeros que presentaron γ H2AX en los espermatoцитos WT en paquiteno temprano y en paquiteno-like de los mutantes de *Trip13* fue muy similar, indicando que no se producen más DSBs en los telómeros cuando no hay TRIP13. Tampoco encontramos diferencias en el número de foci de RAD51 en estas regiones comparando los espermatoцитos WT y los espermatoцитos deficientes de *Trip13*. Por lo tanto, no parece que TRIP13 prevenga la formación de los DSBs en los telómeros. Esta función difiere de Pch2 en levadura, en la que Pch2 elimina Hop1 del ADNr y de los centrómeros para inhibir la producción de DSBs (Subramanian et al., 2019).

Por nuestras observaciones en cuanto a la presencia de DSBs en los telómeros, TRIP13 no parece tener una función en evitar los DSBs en esas zonas, ni su ausencia altera la presencia de marcadores de recombinación. En cambio, en los espermatoцитos deficientes de *Trip13* observamos un aumento en la frecuencia de cromosomas fusionados por los telómeros, defecto dependiente de TRIP13, ya que en los mutantes *Trip13*^{-/-} y *Trip13*^{sev/sev} fue más frecuente que en los mutantes *Trip13*^{mod/mod}. Además, la fusión de los telómeros es más frecuente en los extremos asinapsados de los mutantes *Trip13*^{sev/sev} y *Trip13*^{-/-}, por lo que TRIP13 sería necesaria para evitar la fusión de los telómeros que se encuentran asinapsados. El complejo Shelterin se une al ADN telomérico y los protege de ser reconocidos como daño. Cuando el complejo se inactiva o es deficiente, se activa la cascada de señalización de ATM, la acumulación de proteínas DDR en los telómeros y una ligación dependiente de NHEJ (Konishi & De Lange, 2008). La fusión telomérica desemboca en inestabilidad genómica (O'Sullivan & Karlseder, 2010). En estudios *in vitro* en células somáticas con telómeros disfuncionales, se ha visto que se promueve la fusión de telómeros mediante NHEJ, lo cual depende de 53BP1 y REV7 (Boersma et al., 2015). Una posible explicación a las fusiones que encontramos en los mutantes de *Trip13* es que durante la meiosis, el complejo Shelterin es reemplazado por el complejo TERB1/2-MAJIN, el cual permite que los telómeros se unan a membrana nuclear durante la meiosis (Shibuya et al., 2015). Es posible que durante el reemplazo, en ausencia de *Trip13* se promueva la fusión telomérica mediada por 53BP1 y REV7. El hallazgo de que en los espermatoцитos *53bp1*^{-/-} y *53bp1*^{-/-} *Trip13*^{mod/mod} las fusiones teloméricas se producen en la misma frecuencia

que en los espermatoцитos WT, sugieren que las fusiones que observamos en los mutantes de *Trip13* son dependientes de 53BP1, por lo que posiblemente se produzcan por NHEJ, y en ausencia de *Trip13* son más frecuentes. En los espermatoцитos deficientes de *Trip13*, REV7 es más abundante, y hemos observado como su localización se encuentra en los extremos de los ejes cromosómicos. También es cierto que, comparado con las fusiones masivas que ocurren cuando el complejo Shelterin se encuentra disfuncional (Boersma et al., 2015; Dimitrova et al., 2008), tanto el número de fusiones como la frecuencia de fusiones observada en los mutantes de *Trip13* es relativamente baja. Por lo que los mecanismos que regulan la protección de los telómeros podrían ser mucho más estrictos.

En los espermatoцитos *Spo11^{-/-}* también observamos una frecuencia elevada de fusiones y asociaciones de cromosomas por los telómeros. En espermatoцитos *Spo11^{-/-}* de *D. rerio* también se ha reportado un aumento en las asociaciones entre cromosomas que no se observa en los espermatoцитos WT (Blokhina et al., 2019). En los espermatoцитos *Spo11^{-/-} Trip13^{mod/mod}* las fusiones o asociaciones entre cromosomas fueron significativamente más frecuentes, lo que indica que TRIP13 evita que ocurran estos eventos incluso cuando no se producen los DSBs meióticos, aunque el mecanismo por el cual lo hace aún lo desconocemos. En cambio, cuando la reparación por HR se ve afectada (mutantes *Dmc1^{-/-}*) la depleción de *Trip13* no altera la frecuencia de fusiones en estos espermatoцитos. En estos espermatoцитos, vimos que la ausencia de *Trip13* provocaba una disminución de marcadores de HR y un aumento en la cantidad de REV7, sin embargo, no se observó un efecto en la fusión telomérica, por lo que las fusiones y asociaciones presentes en los mutantes de *Dmc1* son dependientes de la reparación por HR. Nuestros resultados sugieren que las fusiones teloméricas observadas en los mutantes de *Trip13* son dependientes de 53BP1 y de Dmc1, por lo que la reparación de los DSBs podría estar involucrada en la fusión telomérica observada.

5.5 Función de TRIP13 en la sinapsis de los cromosomas homólogos

La localización de TRIP13 en las porciones sinapsadas del SC en espermátocitos en cigoteno tardío y paquíteno temprano que hemos observado en nuestros ratones, se encuentra conservada en los distintos organismos estudiados y los homólogos de TRIP13. En *C. elegans*, PCH2 aparece en el SC en paquíteno y desaparece antes de que el SC desensamble. PCH2 actúa como un factor que desensambla los factores que participan en el apareamiento, la sinapsis y la recombinación y de esta manera los regula, para que estos eventos se coordinen y promover un control de calidad para asegurar que se producen los COs (Deshong et al., 2014). PCH-2^{E253Q} se encuentra localizado en el SC igual que la proteína WT y su fenotipo es muy parecido al de *pch-2Δ*, causando un retraso en el apareamiento, una aceleración de la sinapsis y produciendo una sinapsis no homóloga (Giacopazzi et al., 2020). CMT-1, el ortólogo de p31comet, participa en el *checkpoint* de sinapsis, y su delección provoca los mismos efectos que en los mutantes de *pch-2*^{E253Q}. CMT-1 no es necesario para la carga de PCH2 al SC, pero sí para promover la actividad ATPasa de PCH2 y poder remodelar sus sustratos (Giacopazzi et al., 2020). Esto es diferente en mitosis, ya que CMT-1/p31comet es esencial para que PCH2 se una a Mad2 (Défachelles et al., 2020; Nelson et al., 2015). En *O. sativa* (arroz), p31comet forma parte del SC, y su mutante es deficiente en la formación de DSBs. El homólogo de PCH2/TRIP13 en arroz, CRC1, también se localiza en la región central del SC. CRC1 y p31comet colocalizan además con ZEP1, componente lateral del SC (Ji et al., 2016; Miao et al., 2013). En *A. thaliana*, COMET y PCH2 se sitúan en las porciones sinapsadas del SC y promueven la depleción de ASY1 (ortólogo de HORMAD1) de las porciones sinapsadas para permitir la deposición de los filamentos transversales y así completar la formación del SC. En ausencia de COMET y de PCH2, la sinapsis no se completa y los meiocitos masculinos se bloquean en paquíteno-like (Balboni et al., 2020). En levadura, Pch2 se encuentra asociada con el SC. Pch2 es imprescindible para activar el *checkpoint* de recombinación en los mutantes *zip1*, promoviendo la carga de Hop1 a las porciones asinapsadas y fosforilando Hop1 para activar el *checkpoint* (Herruzo et al., 2016). En el mutante *zip1*, Pch2 no se asocia con el SC, si no que solo se encuentra en la región nucleolar (San-Segundo & Shirleen Roeder, 1999). De

hecho, la necesidad de SYCP1 para el reclutamiento de TRIP13/Pch2 a los ejes sinapsados ha sido descrita anteriormente en otros organismos. En *O. sativa*, CRC1 colocaliza con ZEP1, y ambas proteínas se necesitan mutuamente para esta localización (Miao et al., 2013). En levadura, también se necesita a Zip1 para reclutar Pch2 a los cromosomas sinapsados (Subramanian et al., 2016). Trabajos recientes en *A. thaliana* han mostrado que PCH2 necesita también a ZYP1 para ser reclutado a los ejes cromosómicos. En el mismo estudio han comprobado que TRIP13 puede unirse al extremo C-terminal de SYCP1 en ratón, lo que le permitía anclarse al SC (Yang et al., 2022). Por lo tanto, la localización de TRIP13 en el SC indica que es importante en la regulación de la formación del SC y por ello se encuentra conservada en los distintos organismos.

Como ya se describió previamente, TRIP13 es necesaria para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos (Roig et al., 2010). Los espermatocitos en paquiteno-like de los mutantes de *Trip13* presentan defectos en completar la sinapsis. Los defectos los clasificamos en dos tipos: la primera anomalía en la sinapsis fue una asinapsis terminal, por la que los autosomas que la presentan adoptaban la forma de la letra Y. Una minoría de bivalentes, sobre todo en los mutantes *Trip13^{sev/sev}* y *Trip13^{-/-}*, presentaron también porciones con asinapsis intersticial en forma de burbuja. Como ya se describió previamente, la mayoría de asinapsis se producía en el extremo centromérico, región en la que la sinapsis está muy bien regulada (Brown et al., 2005). La localización de TRIP13 en los telómeros podría indicar un rol en controlar la sinapsis en estas porciones del SC, ya que es donde los espermatocitos deficientes de *Trip13* presentan los defectos. Además, hemos observado que TRIP13 es un factor limitante en estos eventos, ya que los mutantes más severos de *Trip13* poseen más asinapsis, tanto terminal como intersticial. También hemos comprobado que en ausencia de la función ATPasa de TRIP13, los espermatocitos en paquiteno-like del mutante *Trip13^{ATPasaDead}* también presentan ambos tipos de defectos en una proporción similar a los espermatocitos del mutante *Trip13^{-/-}*. La depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados también es requerida para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos, ya que el mutante *Hormad1^{3HA/3HA}* también presenta burbujas y asinapsis intersticial, pero en una frecuencia parecida al *Trip13^{mod/mod}*. El aspecto de los espermatocitos en paquiteno-like del mutante *Hormad1^{3HA/3HA}* también era parecido a los

espermaticos *Trip13^{mod/mod}*, ya que la mayoría de bivalentes completaban la sinapsis, y solo algún bivalente poseía asinapsis terminal. Estos resultados indican que TRIP13 es necesario para completar la sinapsis, y que parte del fenotipo se debe a la persistencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados.

Como TRIP13 también se requiere para completar la recombinación meiótica (X. Li & Schimenti, 2007; Roig et al., 2010), quisimos estudiar si TRIP13 participaba en la sinapsis de los cromosomas en mutantes que no producen DSBs (mutantes *Spo11^{-/-}*) o cuando los DSBs no se pueden reparar eficientemente por recombinación meiótica (mutantes *Dmc1^{-/-}*). Ambas mutaciones producen un defecto en la sinapsis de los cromosomas homólogos, y el SC se forma entre porciones de cromosomas no homólogos (Baudat et al., 2000; Pittman et al., 1998; Romanienko & Camerini-Otero, 2000). Nuestra hipótesis era que si los defectos de sinapsis observados en los mutantes de *Trip13* son dependientes de los defectos en la recombinación meiótica, en los mutantes de *Spo11^{-/-}* y *Dmc1^{-/-}* la depleción de *Trip13* no tendría ningún efecto en la sinapsis. La sinapsis en los espermaticos de los mutantes *Spo11^{-/-}* y *Spo11^{-/-}Trip13^{mod/mod}* progresa con normalidad en leptoteno, y en cigoteno se forman pequeños fragmentos de SC. A partir de cigoteno, los espermaticos quedan bloqueados en un estadio en paquiteno-like y estos presentan una sinapsis aberrante. En los mutantes *Spo11* y *Dmc1* observamos muchos fragmentos de SC (marcados por el depósito de SYCP1) de distinta longitud. También se observaron muchos fragmentos pequeños, parecidos a foci de SYCP1, que fueron mucho más abundantes en los mutantes simples. La depleción de *Trip13* en estos mutantes causó que la mayoría de estos fragmentos pequeños de SYCP1 desaparecieran, y que solo quedaran fragmentos largos de SYCP1. Parece que la presencia de TRIP13 promueve la polimerización del SC, y en su ausencia, se ensamblan menos porciones de SC. Estos resultados también indican que la participación de TRIP13 en la sinapsis es independiente de su función en la recombinación meiótica.

5.6 TRIP13 evita la desinapsis prematura de los cromosomas homólogos

HSPA2 es una chaperona que regula el plegamiento de otras proteínas y permite también la formación y desensamblaje de determinados complejos proteicos. HSPA2 aparece en los espermatocitos en paquiteno (Dix et al., 1996). Sus mutantes son estériles y presentan apoptosis en los espermatocitos en paquiteno tardío. HSPA2 es necesaria para que se produzca el desensamblaje del SC (Dix et al., 1996, 1997). HSPA2 regula la actividad de CDK1 en los espermatocitos, y en su ausencia no se forma el complejo CDK1/Ciclina B, necesario para que se produzca la transición G2/M (Zhu et al., 1997). En nuestro análisis de la localización de HSPA2 en los espermatocitos WT pudimos localizarla en el SC y en los telómeros en paquiteno tardío y diploteno. De manera interesante, en los mutantes de *Trip13*, HSPA2 aparece desregulada y localizada en los espermatocitos de manera prematura. HSPA2 aparece en la cromatina a partir de cigoteno y sobre todo en paquiteno-like en forma de agregados. Una de las funciones que se le atribuyeron a HSPA2 era la regulación de la desinapsis y la transición de G2/M. Como además TRIP13 y HSPA2 interactúan y HSPA2 aparece desregulada en todos los mutantes de *Trip13*^{-/-}, planteamos la hipótesis de que el fenotipo de asinapsis de los mutantes de *Trip13* podría ser en realidad que en los espermatocitos deficientes de *Trip13* se estuviera produciendo una desinapsis prematura.

Para comprobar esta hipótesis, se analizó si se encontraban más factores que controlan la desinapsis desregulados en los mutantes de *Trip13* mediante la inmunolocalización de PLK1, otra proteína que tiene función en la desinapsis (Jordan et al., 2012). En un interesante trabajo sobre la transición de G2/M y las quinasas que lo regulan, se descubrió la implicación de PLK1 en la desinapsis de los cromosomas. En la caracterización de la localización de PLK1 en ese estudio, se indica que PLK1 aparece en la cromatina durante leptoteno y cigoteno, aunque no lo muestran. En otro estudio se caracterizó el mutante *Plk1 cKO*, el cual también muestra defectos en el desensamblaje del SC (Wellard et al., 2022). Nuestras observaciones corroboran esta localización, ya que hemos localizado PLK1 en forma de agregados por la cromatina en los espermatocitos en leptoteno y cigoteno tanto de ratones WT como de mutantes de *Trip13*. Esta localización en la

cromatina podría explicar el rol de PLK1 durante la recombinación meiótica, en la que es requerida para la correcta transición de la detección del daño en el ADN a la reparación del mismo (Wellard et al., 2022). A partir de paquiteno y hasta metafase, señalan que PLK1 aparece en el SC (Jordan et al., 2012). Nosotros también la hemos observado en el SC a partir de paquiteno tardío y diploteno en espermatoцитos WT. De manera interesante, en nuestros mutantes de *Trip13*, PLK1 colocalizó en el SC de manera prematura. En las porciones sinapsadas de cigoteno y sobre todo en paquiteno-like apareció una señal que colocalizaba con SYCP1, y no se localizaba ni en las porciones con asinapsis terminal ni en regiones con asinapsis intersticial. Además, esta localización es dependiente de la función ATPasa de TRIP13. En los mutantes *Hormad1*^{3HA/3HA} también se localizó en el SC, pero de manera más tenue y solo en algunos espermatoцитos en paquiteno-like. En los mutantes *Spo11* y *Dmc1*, la expresión de HSPA2 y PLK1 es muy similar, y la depleción de *Trip13* causa una mayor acumulación de los agregados de la cromatina de los espermatoцитos, por lo que la acumulación de ambas proteínas en la cromatina podría promover a su vez el desensamblaje de los fragmentos de SYCP1 en los espermatoцитos de estos mutantes. La desregulación de estos dos factores que controlan la desinapsis, unido a la abundante desinapsis presente en los mutantes en ausencia de *Trip13*, indican que TRIP13 podría participar en el remodelado de la arquitectura del SC por otras vías independientes a su acción en la depleción de las proteínas HORMAD de los ejes.

Una posible explicación del fenotipo de los mutantes de *Trip13* y a la presencia precoz de HSPA2 y PLK1 en el SC, podría ser que fosforilen prematuramente los componentes del CE y así promuevan la desinapsis. La fosforilación de los distintos componentes del SC es indispensable para promover el desensamblaje del SC y la desinapsis. SYCP1, TEX12, SYCE2, SYCP2 y HORMAD1/2 sufren fosforilaciones dependientes de PLK1 durante la transición G2/M1 (Jordan et al., 2012). *In vitro*, PLK1 puede fosforilar a SYCP1 y TEX12. SYCP1 posee un *Polo Binding Domain* (PBD) y este motivo puede ser fosforilado tanto por el complejo CDK1/Ciclina B o por PLK1 en sí misma. TEX12 no contiene un motivo PBD, pero es posible que una vez PLK1 se una al motivo de SYCP1, propicie la fosforilación de TEX12. La localización de PLK1 en el SC y su capacidad de fosforilar distintos componentes del SC durante la desinapsis sugieren que esta fosforilación sea necesaria para

promover la desinapsis (Jordan et al., 2012). Los defectos de sinapsis que observamos en los mutantes de *Trip13* podrían deberse a que CDK1 y PLK1 fosforilen los componentes del SC y estos desinapsen prematuramente. En los extremos asinapsados de los espermatoцитos deficientes de *Trip13* y en las burbujas hay ausencia de SYCP1, por lo en esos espermatoцитos podría estar ocurriendo un balance entre los factores que propician completar la sinapsis, y los factores que promueven la desinapsis.

Por ahora, los sustratos conocidos de TRIP13 son las proteínas con dominio HORMA, aunque la interacción de TRIP13 con HSPA2 podría indicar que TRIP13 es capaz de remodelar proteínas sin este dominio. Hasta este momento, se tiene conocimiento de que HSPA2 está regulada por distintos genes y proteínas. tNASP se une a HSPA2, y controla su capacidad de activar a CDK1 y la formación del complejo CDK1/Ciclina B (Alekseev et al., 2009). Bat3 regula la degradación de la proteína HSPA2 impidiendo su degradación por el complejo ubiquitin ligasa (Sasaki et al., 2008). HSPBP1 también previene su degradación de una manera similar a como lo hace Bat3 (Rogon et al., 2014). EIF4G3 controla la síntesis inicial de HSPA2 (F. Sun et al., 2010). TRIP13 podría controlar su localización espaciotemporal en los espermatoцитos de una manera por ahora desconocida. En *S. cerevisiae*, Pch2 interacciona con Xrs2 (ortólogo de NBS1), y la disrupción entre esta interacción causa un defecto en el *checkpoint* y en la recombinación similar al producido por la mutación de *Pch2* (Ho & Burgess, 2011). Pch2 también puede interactuar con Orc1, la cual promueve la localización de Pch2 en el ADNr (Da Silva et al., 2020). Recientemente, se ha relacionado directamente a TRIP13 con MRE11 (Jeong et al., 2022), lo que TRIP13 podría interactuar con otras proteínas independientemente de su rol en la regulación de las proteínas con dominio HORMA.

Recientemente, SKP1 apareció como otro factor que regula la transición PI/MI y es necesaria para producir la desinapsis (Guan et al., 2020). SKP1 pertenece al complejo SCF, una familia de E3 ubiquitin ligasas que permiten la degradación de proteínas. El mutante *Skp1^{ckO}* tiene varias similitudes con el mutante *Trip13^{-/-}*. SKP1 se expresa en espermatoцитos solo en las regiones sinapsadas de cigoteno, paquiteno y diploteno (Guan et al., 2020). TRIP13 se localiza en el SC en cigoteno tardío y paquiteno, también en las porciones sinapsadas, además de en los

telómeros. Los mutantes de *SKP1* son estériles, como los mutantes de *Trip13*. De manera interesante, los espermatoцитos *Skp1^{CKO}* presentan también espermatoцитos con asinapsis en el extremo centromérico y corresponden a espermatoцитos en paquiteno temprano (Guan et al., 2020). Además, los espermatoцитos *Skp1^{CKO}* tampoco deplecionan HORMAD1 de los ejes sinapsados. En los espermatoцитos *Trip13^{mod/mod}* pudieron localizar SKP1 y también observaron como la mutación de SKP1 también causaba la reducción de TRIP13. Los espermatoцитos en paquiteno-like *Skp1^{CKO}* también presentan defectos en la recombinación meiótica, con abundante γ H2AX en los espermatoцитos en paquiteno-like, así como persistencia de RPA2 en los ejes (Guan et al., 2020). Los espermatoцитos *Trip13^{-/-}* en paquiteno-like también presentan asinapsis, acumulan HORMAD1 en los ejes sinapsados y presentan defectos en la recombinación meiótica. El fenotipo del mutante *Skp1^{CKO}* es similar también al fenotipo de los mutantes *Hormad1^{3HA/3HA}* en cuanto a la persistencia de HORMAD1 en los ejes, la presencia de DSBs sin reparar en paquiteno, y la asinapsis terminal en algunos bivalentes, lo que sugiere que este fenotipo se debe a la presencia de HORMAD1 en los ejes sinapsados en los estadios tardíos.

Con todos estos datos, nosotros proponemos un modelo en el que TRIP13 previene la desinapsis prematura de los cromosomas, inhibiendo la acumulación prematura de HSPA2 y PLK1 en la cromatina y en el SC (**Figura 5.1**). En espermatoцитos WT, HSPA2 carga en la cromatina a partir de paquiteno tardío y promueve la actividad de CDK1, que posiblemente fosforile algunas proteínas del SC, como SYCP1. Esta primera fosforilación promovida por CDK1 permitiría la acción de PLK1, la cual carga en el SC en paquiteno tardío para promover la fosforilación de los distintos componentes del SC. De esta manera, se produce la desinapsis en diploteno para permitir la transición a metafase. En los espermatoцитos tempranos de ratones WT, desde leptoteno a paquiteno temprano, TRIP13 previene la acumulación de HSPA2. A partir de paquiteno tardío y en diploteno, HSPA2 se acumula en la cromatina de los espermatoцитos. PLK1 aparece en la cromatina durante toda la profase meiótica y también se localiza en el SC en paquiteno tardío y diploteno. En ausencia de *Trip13*, se desregula la localización espaciotemporal de ambas proteínas, por lo que se acumulan prematuramente en los espermatoцитos. De esta forma, en cigoteno tardío y paquiteno-like, CDK1 y PLK1 podrían fosforilar de manera

prematura los componentes del SC, como SYCP1, produciendo una desinapsis prematura de los autosomas y causando el fenotipo de asinapsis terminal y asinapsis intersticial de los mutantes de *Trip13*.

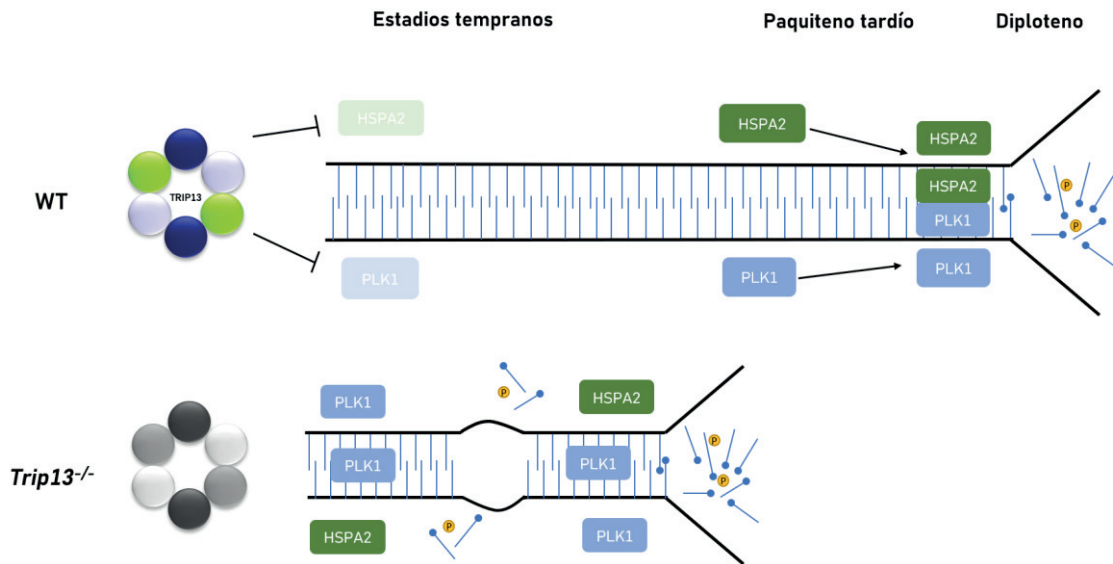


Figura 5-1. Función de TRIP13 en la prevención de la desinapsis prematura en los espermatocitos. En espermatocitos WT, HSPA2 se carga a partir de paquiteno tardío y diploteno en la cromatina y en el SC para promover la desinapsis mediante la fosforilación de los componentes del SC, lo que promovería a su vez la acción de PLK1. En los estadios tempranos, TRIP13 inhibe la acumulación de estas proteínas. En ausencia de TRIP13 y de su función ATPasa, HSPA2 y PLK1 se acumulan prematuramente en la cromatina y PLK1 también en el SC, promoviendo la desinapsis prematura de los cromosomas y causando el fenotipo de desinapsis que se observa en los mutantes de *Trip13*.

6. Conclusiones

1. TRIP13 se localiza en las porciones sinapsadas del SC en cigoteno y paquiteno temprano, localización conservada desde levadura hasta plantas. También se localiza preferentemente en los telómeros durante la profase meiótica, localización específica de mamíferos.
2. El mutante murino *Trip13*^{-/-} es un buen modelo para estudiar las funciones de TRIP13 durante la profase meiótica, incluyendo la reparación de los DSBs y la sinapsis de los cromosomas homólogos.
3. El mutante murino *Trip13*^{ATPasaDead} es un buen modelo para estudiar la función de la actividad ATPasa de TRIP13, y su implicación en la depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados y en la sinapsis de los cromosomas homólogos.
4. El uso del inhibidor de TRIP13 DCZ0415 *in vivo* y sobre todo *in vitro* es un buen método para estudiar la función de TRIP13 durante la profase meiótica.
5. TRIP13, su función ATPasa y la depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados son necesarias para completar la reparación de los DSBs en paquiteno.
6. La presencia de TRIP13, pero no su actividad ATPasa o la depleción de HORMAD1 del SC, es necesaria para iniciar correctamente la reparación de los DSBs en leptoteno y cigoteno temprano.
7. TRIP13 participa en la elección de la vía de reparación de los DSBs en los espermatocitos, favoreciendo su reparación por HR. En su ausencia, hay mayor acumulación de marcadores de NHEJ y menos DSBs no reparados.
8. TRIP13 no previene la formación de DSBs en los telómeros.
9. TRIP13 previene las fusiones teloméricas dependientes de 53BP1 durante la profase meiótica.
10. TRIP13, su función ATPasa y la depleción de HORMAD1 de los ejes sinapsados son necesarias para completar la sinapsis de los cromosomas homólogos.

11. La función de TRIP13 en la sinapsis es independiente de su rol en la recombinación meiótica.

12. TRIP13, su función ATPasa y en parte la depleción de HORMAD1 del SC, previene la acumulación prematura de HSPA2 y PLK1, dos factores que controlan la desinapsis, en los espermatocitos tempranos, y en su ausencia, se produce una desinapsis prematura de los cromosomas.

7. Referencias



- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., & Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes and Development*, *25*(8), 863–874. <https://doi.org/10.1101/gad.2016411>
- Abreu, C. M., Prakash, R., Romanienko, P. J., Roig, I., Keeney, S., & Jasin, M. (2018). Shu complex SWS1-SWSAP1 promotes early steps in mouse meiotic recombination. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06384-x>
- Agarwal, S., Afaq, F., Bajpai, P., Kim, H. G., Elkholy, A., Behring, M., Chandrashekar, D. S., Diffalha, S. al, Khushman, M., Sugandha, S. P., Varambally, S., & Manne, U. (2022). DCZ0415, a small-molecule inhibitor targeting TRIP13, inhibits EMT and metastasis via inactivation of the FGFR4/STAT3 axis and the Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer. *Molecular Oncology*, *16*(8), 1728–1745. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13201>
- Ahmed, E. A., & de Rooij, D. G. (2009). Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *En Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 558, pp. 263–277). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-103-5_16
- Ahmed, E. A., Sfeir, A., Takai, H., & Scherthan, H. (2013). Ku70 and non-homologous end joining protect testicular cells from dna damage. *Journal of Cell Science*, *126*(14), 3095–3104. <https://doi.org/10.1242/jcs.122788>
- Alekseev, O. M., Richardson, R. T., & O'Rand, M. G. (2009). Linker histones stimulate HSPA2 ATPase activity through NASP binding and inhibit CDC2/cyclin B1 complex formation during meiosis in the mouse. *Biology of Reproduction*, *81*(4), 739–748. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076497>
- Alfieri, C., Chang, L., & Barford, D. (2018). Mechanism for remodelling of the cell cycle checkpoint protein MAD2 by the ATPase TRIP13. *Nature*, *559*(7713), 274–278. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0281-1>
- Balboni, M., Yang, C., Komaki, S., Brun, J., & Schnittger, A. (2020). COMET Functions as a PCH2 Cofactor in Regulating the HORMA Domain Protein ASY1. *Current Biology*, *30*(21), 4113–4127.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.089>
- Banerjee, R., Russo, N., Liu, M., Basrur, V., Bellile, E., Palanisamy, N., Scanlon, C. S., van Tubergen, E., Inglehart, R. C., Metwally, T., Mani, R. S., Yocum, A., Nyati, M. K., Castilho, R. M., Varambally, S., Chinnaiyan, A. M., & D'Silva, N. J. (2014). TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5527>
- Barazas, M., Annunziato, S., Pettitt, S. J., de Krijger, I., Ghezraoui, H., Roobol, S. J., Lutz, C., Frankum, J., Song, F. F., Brough, R., Evers, B., Gogola, E., Bhin, J., van de Ven, M., van Gent, D. C., Jacobs, J. J. L., Chapman, R., Lord, C. J., Jonkers, J., & Rottenberg, S. (2018). The CST Complex Mediates End Protection at Double-Strand Breaks and Promotes PARP Inhibitor Sensitivity in BRCA1-Deficient Cells. *Cell Reports*, *23*(7), 2107–2118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.046>
- Barchi, M., Roig, I., di Giacomo, M., de Rooij, D. G., Keeney, S., & Jasin, M. (2008a). ATM promotes the obligate XY crossover and both crossover control and chromosome axis integrity on autosomes. *PLoS Genetics*, *4*(5), 1000076. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000076>
- Baudat, F., & de Massy, B. (2007). Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *En Chromosome Research* (Vol. 15, Issue 5, pp. 565–577). <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1140-3>
- Baudat, F., Imai, Y., & de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation. *Nature Reviews Genetics*, *14*(11), 794–806. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>

- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M., & Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell*, 6(5), 989–998. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00098-8)
- Bhalla, N., & Dernburg, A. F. (2005). Cell biology: A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 310(5754), 1683–1686. <https://doi.org/10.1126/science.1117468>
- Blokhina, Y. P., Nguyen, A. D., Draper, B. W., & Burgess, S. M. (2019). The telomere bouquet is a hub where meiotic double-strand breaks, synapsis, and stable homolog juxtaposition are coordinated in the zebrafish, *Danio rerio*. In *PLoS Genetics* (Vol. 15, Issue 1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007730>
- Boateng, K. A., Bellani, M. A., Gregoret, I. v., Pratto, F., & Camerini-Otero, R. D. (2013). Homologous Pairing Preceding SPO11-Mediated Double-Strand Breaks in Mice. *Developmental Cell*, 24(2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.002>
- Boersma, V., Moatti, N., Segura-Bayona, S., Peuscher, M. H., Van Der Torre, J., Wevers, B. A., Orthwein, A., Durocher, D., & Jacobs, J. J. L. (2015). MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. *Nature*, 521(7553), 537–540. <https://doi.org/10.1038/nature14216>
- Bolcun-Filas, E., & Schimenti, J. C. (2012). Genetics of Meiosis and Recombination in Mice. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 298). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00005-5>
- Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., de Rooij, D. G., & Cooke, H. J. (2007). SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *Journal of Cell Biology*, 176(6), 741–747. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610027>
- Brown, P. W., Judis, L. A., Chan, E. R., Schwartz, S., Seftel, A., Thomas, A., & Hassold, T. J. (2005). Meiotic synapsis proceeds from a limited number of subtelomeric sites in the human male. *American Journal of Human Genetics*, 77(4), 556–566. <https://doi.org/10.1086/468188>
- Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H. T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C. X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J. M., & Nussenzweig, A. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in *brca1*-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, 141(2), 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>
- Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., & Turner, J. M. A. (2009). The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics*, 10(3), 207–216. <https://doi.org/10.1038/nrg2505>
- Cahoon, C. K., & Hawley, R. S. (2016). Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(5), 369–377. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3208>
- Cardoso da Silva, R., & Vader, G. (2021). Getting there: understanding the chromosomal recruitment of the AAA+ ATPase Pch2/TRIP13 during meiosis. In *Current Genetics* (Vol. 67, Issue 4, pp. 553–565). <https://doi.org/10.1007/s00294-021-01166-3>
- Carofiglio, F., Sleddens-Linkels, E., Wassenaar, E., Inagaki, A., van Cappellen, W. A., Grootegoed, J. A., Toth, A., & Baarends, W. M. (2018). Repair of exogenous DNA double-strand breaks promotes chromosome synapsis in SPO11-mutant mouse meiocytes, and is altered in the absence of HORMAD1. *DNA Repair*, 63(January), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.01.007>

- Caryl, A. P., Armstrong, S. J., Jones, G. H., & Franklin, F. C. H. (2000). A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the Arabidopsis meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma*, *109*(1-2), 62-71. <https://doi.org/10.1007/s004120050413>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 495-506). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chapman, J. R., Barral, P., Vannier, J. B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A. A., Adams, I. R., Batista, F. D., & Boulton, S. J. (2013). RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Molecular Cell*, *49*(5), 858-871. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>
- Chapman, J. R., Sossick, A. J., Boulton, S. J., & Jackson, S. P. (2012). BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA: Damage sites underlies temporal control of DNA repair. *Journal of Cell Science*, *125*(15), 3529-3534. <https://doi.org/10.1242/jcs.105353>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, *6*(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>
- Chen, C., Jomaa, A., Ortega, J., & Alani, E. E. (2014). Pch2 is a hexameric ring ATPase that remodels the chromosome axis protein Hop1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.1310755111>
- Chen, Y., Chen, D., Qin, Y., Qiu, C., Zhou, Y., Dai, M., Li, L., Sun, Q., & Jiang, Y. (2022). TRIP13, identified as a hub gene of tumor progression, is the target of microRNA-4693-5p and a potential therapeutic target for colorectal cancer. *Cell Death Discovery*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00824-w>
- Clairmont, C. S., Sarangi, P., Ponnienvelan, K., Galli, L. D., Csete, I., Moreau, L., Adelmant, G., Chowdhury, D., Marto, J. A., & D'Andrea, A. D. (2020). TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change. *Nature Cell Biology*, *22*(1), 87-96. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0442-y>
- Clermont, Y., & Trott, M. (1969). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertility and Sterility*, *20*(5), 805-817. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)37153-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)37153-9)
- Cohen, P. E., Pollack, S. E., & Pollard, J. W. (2006). Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. En *Endocrine Reviews* (Vol. 27, Issue 4, pp. 398-426). <https://doi.org/10.1210/er.2005-0017>
- Cole, F., Kauppi, L., Lange, J., Roig, I., Wang, R., Keeney, S., & Jasin, M. (2012). Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nature Cell Biology*, *14*(4), 424-430. <https://doi.org/10.1038/ncb2451>
- Cool, J., & Capel, B. (2009). Mixed signals: Development of the testis. *Seminars in Reproductive Medicine*, *27*(1), 5-13. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1108005>
- Cooper, T. J., Wardell, K., Garcia, V., & Neale, M. J. (2014). Homeostatic regulation of meiotic DSB formation by ATM/ATR. En *Experimental Cell Research* (Vol. 329, Issue 1, pp. 124-131). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.016>
- Costa, Y., & Cooke, H. J. (2007). Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. En *Chromosome Research* (Vol. 15, Issue 5, pp. 579-589). <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1142-1>
- Da Silva, R. C., Villar-Fernández, M. A., & Vader, G. (2020). Active transcription and Orc1 drive chromatin association of the AAA+ ATPase Pch2 during meiotic G2/prophase. *PLoS*

- Genetics*, 16(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008905>
- Daniel, K., Lange, J., Hached, K., Fu, J., Anastassiadis, K., Roig, I., Cooke, H. J., Stewart, A. F., Wassmann, K., Jasin, M., Keeney, S., & Tóth, A. (2011). Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse *HORMAD1*. *Nature Cell Biology*, 13(5), 599–610. <https://doi.org/10.1038/ncb2213>
- Davies, O. R., Maman, J. D., & Pellegrini, L. (2012). Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biology*, 2(JULY). <https://doi.org/10.1098/rsob.120099>
- de Krijger, I., Föhr, B., Pérez, S. H., Vincendeau, E., Serrat, J., Thouin, A. M., Susvirkar, V., Lescale, C., Paniagua, I., Hoekman, L., Kaur, S., Altelaar, M., Deriano, L., Faesen, A. C., & Jacobs, J. J. L. (2021). MAD2L2 dimerization and TRIP13 control shieldin activity in DNA repair. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25724-y>
- De Lange, T. (2005). Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. In *Genes and Development* (Vol. 19, Issue 18, pp. 2100–2110). <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>
- de Rooij, D. G., & Grootegoed, J. A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6), 694–701. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80109-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80109-9)
- Défachelles, L., Russo, A. E., Nelson, C. R., & Bhalla, N. (2020). The conserved AAA-ATPase PCH-2/TRIP13 regulates spindle checkpoint strength. *Molecular Biology of the Cell*, 31(20), 2219–2233. <https://doi.org/10.1091/MBC.E20-05-0310>
- Dereli, I., Stanzione, M., Olmeda, F., Papanikos, F., Baumann, M., Demir, S., Carofiglio, F., Lange, J., De Massy, B., Baarends, W. M., Turner, J., Rulands, S., & Tóth, A. (2021). Four-pronged negative feedback of DSB machinery in meiotic DNA-break control in mice. *Nucleic Acids Research*, 49(5), 2609–2628. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab082>
- Deshong, A. J., Ye, A. L., Lamelza, P., & Bhalla, N. (2014). A Quality Control Mechanism Coordinates Meiotic Prophase Events to Promote Crossover Assurance. *PLoS Genetics*, 10(4), 1004291. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004291>
- di Carlo, A., Travia, G., & de Felici, M. (2000). The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP3 is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology*, 44(2), 241–244.
- Di Giacomo, M., Barchi, M., Baudat, F., Edelmann, W., Keeney, S., & Jasin, M. (2005). Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 737–742. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406212102>
- Dimitrova, N., Chen, Y. C. M., Spector, D. L., & De Lange, T. (2008b). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature*, 456(7221), 524–528. <https://doi.org/10.1038/nature07433>
- Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E. H., & Eddy, E. M. (1996). Targeted gene disruption of *Hsp70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3264–3268. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3264>
- Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D. R., Brown, P. R., Goulding, E. H., Strong, B. D., & Eddy, E. M. (1997). HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development*, 124(22), 4595–4603. <https://doi.org/10.1242/dev.124.22.4595>

- Dunce, J. M., Salmon, L. J., & Davies, O. R. (2021). Structural basis of meiotic chromosome synaptic elongation through hierarchical fibrous assembly of SYCE2-TEX12. *Nature Structural and Molecular Biology*, 28(8), 681-693. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00636-z>
- Enguita-Marruedo, A., Martín-Ruiz, M., García, E., Gil-Fernández, A., Parra, M. T., Viera, A., Rufas, J. S., & Page, J. (2019). Transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during the pachytene stage in mouse meiosis. In *PLoS Genetics* (Vol. 15, Issue 1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007439>
- Eytan, E., Wang, K., Miniowitz-Shemtov, S., Sitry-Shevah, D., Kaisari, S., Yen, T. J., Liu, S. T., & Hershko, A. (2014). Disassembly of mitotic checkpoint complexes by the joint action of the AAA-ATPase TRIP13 and p31comet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12019-12024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412901111>
- Fayomi, A. P., & Orwig, K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research*, 29, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>
- Feng, C. W., Bowles, J., & Koopman, P. (2014). Control of mammalian germ cell entry into meiosis. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 382, Issue 1, pp. 488-497). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.026>
- Ferdous, M., Higgins, J. D., Osman, K., Lambing, C., Roitinger, E., Mechtler, K., Armstrong, S. J., Perry, R., Pradillo, M., Cuñado, N., & Franklin, F. C. H. (2012). Inter-homolog crossing-over and synapsis in arabidopsis meiosis are dependent on the chromosome axis protein atasy3. *PLoS Genetics*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002507>
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1340-1346. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.018>
- Fritze, C. E., Verschueren, K., Strich, R., & Esposito, R. E. (1997). Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *EMBO Journal*, 16(21), 6495-6509. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6495>
- Fujiwara, Y., Horisawa-Takada, Y., Inoue, E., Tani, N., Shibuya, H., Fujimura, S., Kariyazono, R., Sakata, T., Ohta, K., Araki, K., Okada, Y., & Ishiguro, K. I. (2020). Meiotic cohesins mediate initial loading of HORMAD1 to the chromosomes and coordinate SC formation during meiotic prophase. *PLoS Genetics*, 16(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009048>
- Fukuda, T., Daniel, K., Wojtasz, L., Toth, A., & Höög, C. (2010). A novel mammalian HORMA domain-containing protein, HORMAD1, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes. *Experimental Cell Research*, 316(2), 158-171. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.08.007>
- Gao, S., Feng, S., Ning, S., Liu, J., Zhao, H., Xu, Y., Shang, J., Li, K., Li, Q., Guo, R., & Xu, D. (2018). An OB-fold complex controls the repair pathways for DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06407-7>
- Garcia, V., Gray, S., Allison, R. M., Cooper, T. J., & Neale, M. J. (2015). Tel1ATM-mediated interference suppresses clustered meiotic double-strand-break formation. *Nature*, 520(7545), 114-118. <https://doi.org/10.1038/nature13993>
- Giacopazzi, S., Vong, D., Devigne, A., & Bhalla, N. (2020). PCH-2 collaborates with CMT-1 to proofread meiotic homolog interactions. *PLoS Genetics*, 16(7), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008904>

- Ginsburg, M., Snow, M. H. L., & McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110(2), 521–528. <https://doi.org/10.1242/dev.110.2.521>
- Grishaeva, T. M., & Bogdanov, Y. F. (2014). Conservation and Variability of Synaptonemal Complex Proteins in Phylogenesis of Eukaryotes. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/856230>
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9(4), 411–416. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>
- Guan, Y., Adrian Leu, N., Ma, J., Chmátal, L., Ruthel, G., Bloom, J. C., Lampson, M. A., Schimenti, J. C., Luo, M., & Jeremy Wang, P. (2020). SKP1 drives the prophase I to metaphase I transition during male meiosis. *Science Advances*, 6(13), 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2129>
- Guo, R., Xu, Y., Leu, N. A., Zhang, L., Fuchs, S. Y., Ye, L., & Wang, P. J. (2021). The ssDNA-binding protein MEIOB acts as a dosage-sensitive regulator of meiotic recombination. *Nucleic Acids Research*, 48(21), 12219–12233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1016>
- Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., Typas, D., Lammers, M., Mailand, N., Nussenzweig, A., Lukas, J., & Choudhary, C. (2018). DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. *Cell*, 173(4), 972–988.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.050>
- Hale, D. W. (1996). Mammalian Spermatogenesis. *Advances in Genome Biology*, 4(C), 249–304. [https://doi.org/10.1016/S1067-5701\(96\)80011-8](https://doi.org/10.1016/S1067-5701(96)80011-8)
- Hamer, G., & de Rooij, D. G. (2018). Mutations causing specific arrests in the development of mouse primordial germ cells and gonocytes. *Biology of Reproduction*, 99(1), 75–86. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y075>
- Hao, H., & Starr, D. A. (2019). SUN/KASH interactions facilitate force transmission across the nuclear envelope. *Nucleus*, 10(1), 73–80. <https://doi.org/10.1080/19491034.2019.1595313>
- Hao, S. L., Ni, F. da, & Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201–210. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2019.05.027>
- Herruzo, E., Lago-Maciel, A., Baztan, S., Santos, B., Carballo, J. A., & San-Segundo, P. A. (2021). Pch2 orchestrates the meiotic recombination checkpoint from the cytoplasm. *En PLoS Genetics* (Vol. 17, Issue 7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009560>
- Herruzo, E., Ontoso, D., González-Arranz, S., Cavero, S., Lechuga, A., & San-Segundo, P. A. (2016). The Pch2 AAA+ ATPase promotes phosphorylation of the Hop1 meiotic checkpoint adaptor in response to synaptonemal complex defects. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7722–7741. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw506>
- Hess, R. A., & de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *En Annual Review of Genetics* (Vol. 44, pp. 113–139). <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>
- Higgs, M. R., & Stewart, G. S. (2016). Protection or resection: BOD1L as a novel replication fork protection factor. *Nucleus*, 7(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1143183>
- Higgs, M. R., Reynolds, J. J., Winczura, A., Blackford, A. N., Borel, V., Miller, E. S., Zlatanou, A.,

- Nieminuszczy, J., Ryan, E. L., Davies, N. J., Stankovic, T., Boulton, S. J., Niedzwiedz, W., & Stewart, G. S. (2015). BOD1L Is Required to Suppress Deleterious Resection of Stressed Replication Forks. *Molecular Cell*, 59(3), 462–477. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2015.06.007>
- Hinch, A. G., Becker, P. W., Li, T., Moralli, D., Zhang, G., Bycroft, C., Green, C., Keeney, S., Shi, Q., Davies, B., & Donnelly, P. (2020). The Configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates. *Molecular Cell*, 79(4), 689–701.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.015>
- Hirao, A., Cheung, A., Duncan, G., Girard, P.-M., Elia, A. J., Wakeham, A., Okada, H., Sarkissian, T., Wong, J. A., Sakai, T., de Stanchina, E., Bristow, R. G., Suda, T., Lowe, S. W., Jeggo, P. A., Elledge, S. J., & Mak, T. W. (2002). Chk2 Is a Tumor Suppressor That Regulates Apoptosis in both an Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)-Dependent and an ATM-Independent Manner. *Molecular and Cellular Biology*, 22(18), 6521–6532. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.18.6521-6532.2002>
- Ho, H. C., & Burgess, S. M. (2011). Pch2 acts through Xrs2 and Tel1/ATM to modulate interhomolog bias and checkpoint function during meiosis. *PLoS Genetics*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002351>
- Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. En *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Issue 1, pp. 1-24). <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>
- Ishiguro, K. ichiro. (2019). The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes to Cells*, 24(1), 6–30. <https://doi.org/10.1111/gtc.12652>
- Itoh, G., Kanno, S. I., Uchida, K. S. K., Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., & Tanaka, K. (2011). CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO Journal*, 30(1), 130–144. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.276>
- Jeong, H., Wie, M., Baek, I.-J., Sohn, G., Um, S.-H., Lee, S.-G., Seo, Y., Ra, J., Lee, E. A., Kim, S., Kim, B. G., Deshpande, R. A., Paull, T. T., Han, J. S., Kwon, T., & Myung, K. (2022). *TRIP13 Participates in Immediate-Early Sensing of DNA Strand Breaks and ATM Signaling Amplification through MRE11*. <https://doi.org/10.3390/cells11244095>
- Ji, J., Tang, D., Shen, Y., Xue, Z., Wang, H., Shi, W., Zhang, C., Du, G., Li, Y., & Cheng, Z. (2016). P31comet, a member of the synaptonemal complex, participates in meiotic DSB formation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(38), 10577–10582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607334113>
- Jordan, P. W., Karppinen, J., & Handel, M. A. (2012). Polo-like kinase is required for synaptonemal complex disassembly and phosphorylation in mouse spermatocytes. *Journal of Cell Science*, 125(21), 5061–5072. <https://doi.org/10.1242/jcs.105015>
- Joshi, N., Barot, A., Jamison, C., & Börner, G. V. (2009). Pch2 links chromosome axis remodeling at future crossover sites and crossover distribution during yeast meiosis. *PLoS Genetics*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000557>
- Joyce, E. F., & McKim, K. S. (2009). Drosophila PCH2 is required for a pachytene checkpoint that monitors double-strand-break-independent events leading to meiotic crossover formation. *Genetics*, 181(1), 39–51. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.093112>
- Kauppi, L., Barchi, M., Lange, J., Baudat, F., Jasin, M., & Keeney, S. (2013). Numerical constraints and feedback control of double-strand breaks in mouse meiosis. *Genes and Development*, 27(8), 873–886. <https://doi.org/10.1101/gad.213652.113>

- Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, *88*(3), 375-384. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81876-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81876-0)
- Kim, Y., Rosenberg, S. C., Kugel, C. L., Kostow, N., Rog, O., Davydov, V., Su, T. Y., Dernburg, A. F., & Corbett, K. D. (2014). The chromosome axis controls meiotic events through a hierarchical assembly of HORMA domain proteins. *Developmental Cell*, *31*(4), 487-502. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.013>
- Kleckner, N. (1996). Review Meiosis : How could it work ? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *93*(August), 8167-8174.
- Kogo, H., Tsutsumi, M., Ohye, T., Inagaki, H., Abe, T., & Kurahashi, H. (2012). HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. *Genes to Cells*, *17*(6), 439-454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01600.x>
- Konishi, A., & De Lange, T. (2008). Cell cycle control of telomere protection and NHEJ revealed by a ts mutation in the DNA-binding domain of TRF2. *Genes and Development*, *22*(9), 1221-1230. <https://doi.org/10.1101/gad.1634008>
- Kouznetsova, A., Novak, I., Jessberger, R., & Höög, C. (2005). SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *Journal of Cell Science*, *118*(10), 2271-2278. <https://doi.org/10.1242/jcs.02362>
- Lai, Y.-J., Lin, F.-M., Chuang, M.-J., Shen, H.-J., & Wang, T.-F. (2011). Genetic Requirements and Meiotic Function of Phosphorylation of the Yeast Axial Element Protein Red. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(5), 912-923. <https://doi.org/10.1128/mcb.00895-10>
- Lam, I., & Keeney, S. (2015). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016634>
- Lan, J., Huang, J., Tao, X., Gao, Y., Zhang, L., Huang, W., Luo, J., Liu, C., Deng, Y., Liu, L., & Liu, X. (2022). Evaluation of the TRIP13 level in breast cancer and insights into potential molecular pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *26*(9), 2673-2685. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17278>
- Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M. P., Jasin, M., & Keeney, S. (2011). ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature*, *479*(7372), 237-240. <https://doi.org/10.1038/nature10508>
- Le Guen, T., Ragu, S., Guirouilh-Barbat, J., & Lopez, B. S. (2015). Role of the double-strand break repair pathway in the maintenance of genomic stability. In *Molecular and Cellular Oncology* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.968020>
- Lee, C. Y., Horn, H. F., Stewart, C. L., Burke, B., Bolcun-Filas, E., Schimenti, J. C., Dresser, M. E., & Pezza, R. J. (2015). Mechanism and Regulation of Rapid Telomere Prophase Movements in Mouse Meiotic Chromosomes. *Cell Reports*, *11*(4), 551-563. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.045>
- Li, F., Sarangi, P., Iyer, D. R., Feng, H., Moreau, L., Nguyen, H., Clairmont, C., & D'Andrea, A. D. (2022). CHAMP1 binds to REV7/FANCV and promotes homologous recombination repair. *Cell Reports*, *40*(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111297>
- Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: Somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 141-152). <https://doi.org/10.1038/nrm3531>
- Li, X., & Schimenti, J. C. (2007). Mouse pachytene checkpoint 2 (Trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genetics*, *3*(8), 1365-1376. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030130>

- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., & Heyer, W. D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(10), 1260–1262. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>
- London, N., & Biggins, S. (2014). Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 11, pp. 735–747). <https://doi.org/10.1038/nrm3888>
- Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2016). TRIP13 Regulates Both the Activation and Inactivation of the Spindle-Assembly Checkpoint. *Cell Reports*, *14*(5), 1086–1099. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.001>
- Maatouk, D. M., Kellam, L. D., Mann, M. R. W., Lei, H., En, L., Bartolomei, M. S., & Resnick, J. L. (2006). DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development*, *133*(17), 3411–3418. <https://doi.org/10.1242/dev.02500>
- MacQueen, A. J., & Hochwagen, A. (2011). Checkpoint mechanisms: The puppet masters of meiotic prophase. *Trends in Cell Biology*, *21*(7), 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.004>
- Martínez Marchal, A. (2019). *Regulation of the oocyte pool in mammals*.
- Martínez-Marchal, A., Huang, Y., Guillot-Ferriols, M. T., Ferrer-Roda, M., Guixé, A., Garcia-Caldés, M., & Roig, I. (2020). The DNA damage response is required for oocyte cyst breakdown and follicle formation in mice. *PLoS Genetics*, *16*(11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009067>
- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *En Developmental Biology* (Vol. 262, Issue 1, pp. 1–15). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00214-8)
- McLean, D. J., Friel, P. J., Johnston, D. S., & Griswold, M. D. (2003). Characterization of Spermatogonial Stem Cell Maturation and Differentiation in Neonatal Mice. *Biology of Reproduction*, *69*(6), 2085–2091. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017020>
- McMullen, M., Karakasis, K., Madariaga, A., & Oza, A. M. (2020). Overcoming platinum and parp-inhibitor resistance in ovarian cancer. *In Cancers* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1–18). <https://doi.org/10.3390/cancers12061607>
- Miao, C., Tang, D., Zhang, H., Wang, M., Li, Y., Tang, S., Yu, H., Gu, M., & Cheng, Z. (2013). Central region component1, a novel synaptonemal complex component, is essential for meiotic recombination initiation in RiceC. *Plant Cell*, *25*(8), 2998–3009. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113175>
- Mirman, Z., Lotterberger, F., Takai, H., Kibe, T., Gong, Y., Takai, K., Bianchi, A., Zimmermann, M., Durocher, D., & de Lange, T. (2018). 53BP1–RIF1–shieldin counteracts DSB resection through CST- and Polα-dependent fill-in. *Nature*, *560*(7716), 112–116. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0324-7>
- Moens, P. B., Kolas, N. K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P. E., & Spyropoulos, B. (2002). 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*(8), 1611–1622. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.8.1611>
- Molyneaux, K. A., Stallock, J., Schaible, K., & Wylie, C. (2001). Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Developmental Biology*, *240*(2), 488–498. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0436>

- Morelli, M. A., & Cohen, P. E. (2005). Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*, *130*(6), 761–781. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00865>
- Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. En *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Issue 5, pp. 564–591). <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>
- Muñoz-Velasco, I., Ortíz, R., Echeverría, O. M., Escobar, M. L., & Vázquez-Nin, G. H. (2013). Characterization of the Pre-meiotic S Phase through Incorporation of BrdU during Spermatogenesis in the Rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *61*(9), 680–689. <https://doi.org/10.1369/0022155413496639>
- Nelson, C. R., Hwang, T., Chen, P. H., & Bhalla, N. (2015). TRIP13PCH-2 promotes Mad2 localization to unattached kinetochores in the spindle checkpoint response. *Journal of Cell Biology*, *211*(3), 503–516. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505114>
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *59*, 10–26. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.04.009>
- Niederberger, B. A., Cook, K., Baena, V., Serra, N. D., Velte, E. K., Agno, J. E., Litwa, K. A., Terasaki, M., Hermann, B. P., Matzuk, M. M., & Geyer, C. B. (2018). Dynamic cytoplasmic projections connect mammalian spermatogonia in vivo. *Development (Cambridge)*, *145*(15). <https://doi.org/10.1242/dev.161323>
- Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, *27*(18), R988–R994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>
- Noordermeer, S. M., Adam, S., Setiাপutra, D., Barazas, M., Pettitt, S. J., Ling, A. K., Olivieri, M., Álvarez-Quilón, A., Moatti, N., Zimmermann, M., Annunziato, S., Krastev, D. B., Song, F., Brandsma, I., Frankum, J., Brough, R., Sherker, A., Landry, S., Szilard, R. K., ... Durocher, D. (2018). The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature*, *560*(7716), 117–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0340-7>
- Ntostis, P., Iles, D., Kokkali, G., Vaxevanoglou, T., Kanavakis, E., Pantou, A., Huntriss, J., Pantos, K., & Picton, H. M. (2021). The impact of maternal age on gene expression during the GV to MII transition in euploid human oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *37*(1), 80–92. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab226>
- O'Connell, J. M., & Pepling, M. E. (2021). Primordial follicle formation – Some assembly required. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *18*, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.005>
- O'Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 171–181). <https://doi.org/10.1038/nrm2848>
- Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2012). The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Physiol Rev*, *92*, 577–595. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011.-This>
- Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., & Misrahi, M. (2021). The roles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312735>
- Ohinata, Y., Seki, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Surani, M. A., & Saitou, M. (2006). Germline recruitment in mice: a genetic program for epigenetic reprogramming. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, *60*, 143–174. https://doi.org/10.1007/3-540-31437-7_11

- Pacheco, S., Maldonado-Linares, A., Marcet-Ortega, M., Rojas, C., Martínez-Marchal, A., Fuentes-Lazaro, J., Lange, J., Jasin, M., Keeney, S., Fernández-Capetillo, O., Garcia-Caldés, M., & Roig, I. (2018). ATR is required to complete meiotic recombination in mice. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04851-z>
- Pacheco, S., Marcet-Ortega, M., Lange, J., Jasin, M., Keeney, S., & Roig, I. (2015). The ATM Signaling Cascade Promotes Recombination-Dependent Pachytene Arrest in Mouse Spermatocytes. *PLoS Genetics*, 11(3), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005017>
- Page, J., de la Fuente, R., Gómez, R., Calvente, A., Viera, A., Parra, M. T., Santos, J. L., Berríos, S., Fernández-Donoso, R., Suja, J. Á., & Rufas, J. S. (2006). Sex chromosomes, synapsis, and cohesins: A complex affair. *Chromosoma*, 115(3), 250–259. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0059-3>
- Page, J., De La Fuente, R., Manterola, M., Parra, M. T., Viera, A., Berríos, S., Fernández-Donoso, R., & Rufas, J. S. (2012). Inactivation or non-reactivation: What accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma*, 121(3), 307–326. <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0364-y>
- Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(3), 326–337. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60347-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60347-1)
- Panier, S., & Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Panizza, S., Mendoza, M. A., Berlinger, M., Huang, L., Nicolas, A., Shirahige, K., & Klein, F. (2011). Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. *Cell*, 146(3), 372–383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.003>
- Papanikos, F., Clément, J. A. J., Testa, E., Ravindranathan, R., Grey, C., Dereli, I., Bondarieva, A., Valerio-Cabrera, S., Stanzione, M., Schleiffer, A., Jansa, P., Lustyk, D., Fei, J. F., Adams, I. R., Forejt, J., Barchi, M., de Massy, B., & Toth, A. (2019). Mouse ANKRD31 Regulates Spatiotemporal Patterning of Meiotic Recombination Initiation and Ensures Recombination between X and Y Sex Chromosomes. *Molecular Cell*, 74(5), 1069–1085.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.022>
- Pedersen, T., & Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(3), 555–557. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555>
- Pepling, M. E. (2012). Follicular assembly: Mechanisms of action. *Reproduction*, 143(2), 139–149. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0299>
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, 125(17), 3323–3328. <https://doi.org/10.1242/dev.125.17.3323>
- Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Molecular Cell*, 1(5), 697–705. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80069-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80069-6)
- Puchades, C., Sandate, C. R., & Lander, G. C. (2020). The molecular principles governing the activity and functional diversity of AAA+ proteins. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 43–58). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0183-6>
- Qiao, H., Rao, H. B. D. P., Yun, Y., Sandhu, S., Fong, J. H., Sapre, M., Nguyen, M., Tham, A., Van, B. W., Chng, T. Y. H., Lee, A., & Hunter, N. (2018). Impeding DNA Break Repair Enables Oocyte Quality Control. *Molecular Cell*, 72(2), 211–221.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.031>

- Reece, C. S. (1996). All you wanted to know about dilapidations but were afraid to ask. *Structural Survey*, 14(3), 4-9. <https://doi.org/10.1108/02630809610129003>
- Ribeiro, J., Dupaigne, P., Petrillo, C., Ducrot, C., Duquenne, C., Veaute, X., Saintomé, C., Busso, D., Guerois, R., Martini, E., & Livera, G. (2021). The meiosis-specific MEIOB-SPATA22 complex cooperates with RPA to form a compacted mixed MEIOB/SPATA22/RPA/ssDNA complex. *DNA Repair*, 102, 103097. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103097>
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 37-49). <https://doi.org/10.1038/nrm2815>
- Rogon, C., Ulbricht, A., Hesse, M., Alberti, S., Vijayaraj, P., Best, D., Adams, I. R., Magin, T. M., Fleischmann, B. K., & Höhfeld, J. (2014). HSP70-binding protein HSPBP1 regulates chaperone expression at a posttranslational level and is essential for spermatogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 25(15), 2260-2271. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0742>
- Roig, I., Dowdle, J. A., Toth, A., de Rooij, D. G., Jasin, M., & Keeney, S. (2010). Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genetics*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001062>
- Romanienko, P. J., & Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell*, 6(5), 975-987. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00097-6)
- Romrell, L. J., Bellvé, A. R., & Fawcett, D. W. (1976). Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Developmental Biology*, 49(1), 119-131. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90262-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90262-1)
- Rosenberg, S. C., & Corbett, K. D. (2015). The multifaceted roles of the HOR MA domain in cellular signaling. *Journal of Cell Biology*, 211(4), 745-755. <https://doi.org/10.1083/jcb.201509076>
- Royo, H., Prosser, H., Ruzankina, Y., Mahadevaiah, S. K., Cloutier, J. M., Baumann, M., Fukuda, T., Höög, C., Tóth, A., de Rooij, D. G., Bradley, A., Brown, E. J., & Turner, J. M. A. (2013). ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes and Development*, 27(13), 1484-1494. <https://doi.org/10.1101/gad.219477.113>
- Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1896-1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Sánchez, H., Paul, M. W., Grosbart, M., Van Rossum-Fikkert, S. E., Lebbink, J. H. G., Kanaar, R., Houtsmuller, A. B., & Wyman, C. (2017). Architectural plasticity of human BRCA2-RAD51 complexes in DNA break repair. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 4507-4518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx084>
- San-Segundo, P. A., & Shirleen Roeder, G. (1999). Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell*, 97(3), 313-324. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80741-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80741-2)
- Sarangi, P., Clairmont, C. S., & D'Andrea, A. D. (2020). Disassembly of the Shieldin Complex by TRIP13. *Cell Cycle*, 19(13), 1565-1575. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1758435>
- Sarangi, P., Clairmont, C. S., Galli, L. D., Moreau, L. A., & D'Andrea, A. D. (2020). p31comet promotes homologous recombination by inactivating REV7 through the TRIP13 ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(43), 26795-26803. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008830117>
- Sasaki, T., Marcon, E., McQuire, T., Arai, Y., Moens, P. B., & Okada, H. (2008). Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *Journal of Cell Biology*, 182(3), 449-458. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802113>

- Sato-Carlton, A., Nakamura-Tabuchi, C., Li, X., Boog, H., Lehmer, M. K., Rosenberg, S. C., Barroso, C., Martinez-Perez, E., Corbett, K. D., & Carlton, P. M. (2020). Phosphoregulation of HORMA domain protein HIM-3 promotes asymmetric synaptonemal complex disassembly in meiotic prophase in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, *16*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008968>
- Schramm, S., Fraune, J., Naumann, R., Hernandez-Hernandez, A., Höög, C., Cooke, H. J., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2011). A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genetics*, *7*(5), 1002088. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002088>
- Schücker, K., Holm, T., Franke, C., Sauer, M., & Benavente, R. (2015). Elucidation of synaptonemal complex organization by super-resolution imaging with isotropic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(7), 2029–2033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414814112>
- Sekido, R. (2010). SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *42*(3), 417–420. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2009.12.005>
- Sekl, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., & Saitou, M. (2007). Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, *134*(14), 2627–2638. <https://doi.org/10.1242/dev.005611>
- Shibuya, H., Hernández-Hernández, A., Morimoto, A., Negishi, L., Höög, C., & Watanabe, Y. (2015). MAJIN Links Telomeric DNA to the Nuclear Membrane by Exchanging Telomere Cap. *Cell*, *163*(5), 1252–1266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.030>
- Shiotani, B., & Zou, L. (2009). Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks. *Molecular Cell*, *33*(5), 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.024>
- Singh, P., Pesenti, M. E., Maffini, S., Carmignani, S., Hedtfeld, M., Petrovic, A., Srinivasamani, A., Bange, T., & Musacchio, A. (2021). BUB1 and CENP-U, Primed by CDK1, Are the Main PLK1 Kinetochore Receptors in Mitosis. *Molecular Cell*, *81*(1), 67–87.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.040>
- Smith, A. V., & Roeder, G. S. (1997). The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes. *Journal of Cell Biology*, *136*(5), 957–967. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.957>
- Snider, J., Thibault, G., & Houry, W. A. (2008). The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biology*, *9*(4), 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-216>
- Solé, M., Blanco, J., Gil, D., Valero, O., Cárdenas, B., Fonseka, G., Anton, E., Pascual, Á., Frodsham, R., Vidal, F., & Sarrate, Z. (2022). Time to match; when do homologous chromosomes become closer? *Chromosoma*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s00412-022-00777-0>
- Stanzione, M., Baumann, M., Papanikos, F., Dereli, I., Lange, J., Ramlal, A., Tränkner, D., Shibuya, H., De Massy, B., Watanabe, Y., Jasin, M., Keeney, S., & Tóth, A. (2016). Meiotic DNA break formation requires the unsynapsed chromosome axis-binding protein IH01 (CCDC36) in mice. *NATURE CELL BIOLOGY*, *18*(11). <https://doi.org/10.1038/ncb3417>
- Su, G. C., Yeh, H. Y., Lin, S. W., Chung, C. I., Huang, Y. S., Liu, Y. C., Lyu, P. C., & Chi, P. (2016). Role of the RAD51-SWI5-SFR1 Ensemble in homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, *44*(13), 6242–6251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw375>
- Subramanian, V. V., MacQueen, A. J., Vader, G., Shinohara, M., Sanchez, A., Borde, V., Shinohara, A., & Hochwagen, A. (2016). Chromosome Synapsis Alleviates Mek1-Dependent Suppression of Meiotic DNA Repair. *PLoS Biology*, *14*(2), 1002369.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002369>

- Subramanian, V. V., Zhu, X., Markowitz, T. E., Vale-Silva, L. A., San-Segundo, P. A., Hollingsworth, N. M., Keeney, S., & Hochwagen, A. (2019). Persistent DNA-break potential near telomeres increases initiation of meiotic recombination on short chromosomes. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08875-x>
- Subramanian, V. v., & Hochwagen, A. (2014). The meiotic checkpoint network: Step-by-step through meiotic prophase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016675>
- Sun, F., & Handel, M. A. (2008). Regulation of the meiotic prophase I to metaphase I transition in mouse spermatocytes. *Chromosoma*, 117(5), 471–485. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0167-3>
- Sun, F., Palmer, K., & Handel, M. A. (2010). Mutation of Eif4g3, encoding a eukaryotic translation initiation factor, causes male infertility and meiotic arrest of mouse spermatocytes. *Development*, 137(10), 1699–1707. <https://doi.org/10.1242/dev.043125>
- Sun, X., Huang, L., Markowitz, T. E., Blitzblau, H. G., Chen, D., Klein, F., & Hochwagen, A. (2015). Transcription dynamically patterns the meiotic chromosome-axis interface. *ELife*, 4, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.07424>
- Suzuki, H., Kaizuka, T., Mizushima, N., & Noda, N. N. (2015). Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(7), 572–580. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3036>
- Sym, M., Engebrecht, J. A., & Roeder, G. S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell*, 72(3), 365–378. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90114-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90114-6)
- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics*, 45, 247–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Tajima, K., Orisaka, M., Yata, H., Goto, K., Hosokawa, K., & Kotsuji, F. (2006). Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation. *Microscopy Research and Technique*, 69(6), 450–458. <https://doi.org/10.1002/jemt.20304>
- Tipton, A. R., Wang, K., Oladimeji, P., Sufi, S., Gu, Z., & Liu, S. T. (2012). Identification of novel mitosis regulators through data mining with human centromere/kinetochore proteins as group queries. *BMC Cell Biology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-13-15>
- Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G. M., Kausche, A., Lolatgis, N., & Wood, C. (1998). Oocyte maturation. *Human Reproduction*, 13(SUPPL. 3), 52–62. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl.3.52>
- Tsvetkov, L., & Stern, D. F. (2005). Phosphorylation of Plk1 at S137 and T210 is inhibited in response to DNA damage. *Cell Cycle*, 4(1), 166–171. <https://doi.org/10.4161/cc.4.1.1348>
- Turathum, B., Gao, E. M., & Chian, R. C. (2021). The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *En Cells* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/cells10092292>
- Uyar, A., Torrealday, S., & Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 99(4), 979–997. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.129>
- Vader, G., Blitzblau, H. G., Tame, M. A., Falk, J. E., Curtin, L., & Hochwagen, A. (2011). Protection of repetitive DNA borders from self-induced meiotic instability. *Nature*, 477(7362), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nature10331>

- Walker, W. H. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 1(2), 116–120. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16956>
- Wang, K., Sturt-Gillespie, B., Hittle, J. C., Macdonald, D., Chan, G. K., Yen, T. J., & Liu, S. T. (2014). Thyroid hormone receptor interacting protein 13 (TRIP13) AAA-ATPase is a novel mitotic checkpoint-silencing protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23928–23937. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585315>
- Wang, X., & Pepling, M. E. (2021). Regulation of Meiotic Prophase One in Mammalian Oocytes. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667306>
- Wang, Y., Huang, J., Li, B., Xue, H., Tricot, G., Hu, L., Xu, Z., Sun, X., Chang, S., Gao, L., Tao, Y., Xu, H., Xie, Y., Xiao, W., Yu, D., Kong, Y., Chen, G., Sun, X., Lian, F., ... Shi, J. (2020). A Small-Molecule Inhibitor Targeting TRIP13 Suppresses Multiple Myeloma Progression. *Cancer Research*, 80(3), 536–548. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3987>
- Ward, I. M., Minn, K., Van Deursen, J., & Chen, J. (2003). p53 Binding Protein 53BP1 Is Required for DNA Damage Responses and Tumor Suppression in Mice. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 23(7), 2556–2563. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2556-2563.2003>
- Wellard, S. R., Skinner, M. W., Zhao, X., Shults, C., & Jordan, P. W. (2022). PLK1 depletion alters homologous recombination and synaptonemal complex disassembly events during mammalian spermatogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 33(5), ar37. <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-03-0115>
- Western, P. S., Miles, D. C., van den Bergen, J. A., Burton, M., & Sinclair, A. H. (2008). Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. *Stem Cells*, 26(2), 339–347. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>
- Widger, A., Mahadevaiah, S. K., Lange, J., Elinati, E., Zohren, J., Hirota, T., Pacheco, S., Maldonado-Linares, A., Stanzione, M., Ojarikre, O., Maciulyte, V., De Rooij, D. G., Tóth, A., Roig, I., Keeney, S., & Turner, J. M. A. (2018). ATR is a multifunctional regulator of male mouse meiosis. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04850-0>
- Wojtasz, L., Cloutier, J. M., Baumann, M., Daniel, K., Varga, J., Fu, J., Anastassiadis, K., Francis Stewart, A., Reményi, A., Turner, J. M. A., & Tóth, A. (2012). Meiotic DNA double-strand breaks and chromosome asynapsis in mice are monitored by distinct HORMAD2-independent and -dependent mechanisms. *Genes and Development*, 26(9), 958–973. <https://doi.org/10.1101/gad.187559.112>
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., Eckmann, C. R., Cooke, H. J., Jasin, M., Keeney, S., McKay, M. J., & Toth, A. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genetics*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000702>
- Xu, H., Ma, Z., Mo, X., Chen, X., Xu, F., Wu, F., Chen, H., Zhou, G., Xia, H., & Zhang, C. (2022). Inducing Synergistic DNA Damage by TRIP13 and PARP1 Inhibitors Provides a Potential Treatment for Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Cancer*, 13(7), 2226–2237. <https://doi.org/10.7150/jca.66020>
- Yang, C., Sofroni, K., Hamamura, Y., Hu, B., Elbasi, H. T., Balboni, M., Heese, M., & Schnittger, A. (2022). Bipartite recruitment of PCH2 and COMET to the synaptonemal complex drives chromosome axis reconstruction leading to crossover restriction. *BioRxiv*, 2022.03.23.485444. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.23.485444v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.23.485444v1.abstract>

- Yang, M., Li, B., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., & Luo, X. (2007). p31comet Blocks Mad2 Activation through Structural Mimicry. *Cell*, 131(4), 744-755. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.048>
- Ye, Q., Kim, D. H., Dereli, I., Rosenberg, S. C., Hagemann, G., Herzog, F., Tóth, A., Cleveland, D. W., & Corbett, K. D. (2017). The AAA + ATP ase TRIP 13 remodels HORMA domains through N-terminal engagement and unfolding . *The EMBO Journal*, 36(16), 2419-2434. <https://doi.org/10.15252/emj.201797291>
- Ye, Q., Rosenberg, S. C., Moeller, A., Speir, J. A., Su, T. Y., & Corbett, K. D. (2015). TRIP13 is a protein-remodeling AAA+ ATPase that catalyzes MAD2 conformation switching. *ELife*, 2015(4), 1-44. <https://doi.org/10.7554/eLife.07367>
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., & Morita, T. (1998). The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Molecular Cell*, 1(5), 707-718. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80070-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80070-2)
- Zhao, W., Steinfeld, J. B., Liang, F., Chen, X., Maranon, D. G., Jian Ma, C., Kwon, Y., Rao, T., Wang, W., Sheng, C., Song, X., Deng, Y., Jimenez-Sainz, J., Lu, L., Jensen, R. B., Xiong, Y., Kupfer, G. M., Wiese, C., Greene, E. C., & Sung, P. (2017). BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature*, 550(7676). <https://doi.org/10.1038/nature24060>
- Zhou, R., Wu, J., Liu, · Bang, Jiang, Y., Chen, · Wei, Li, J., Quanyuan He, ·, & He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 2681-2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>
- Zhu, D., Dix, D. J., & Eddy, E. M. (1997). Zhu 1997, HSPA70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. 3014, 3007-3014.
- Zickler, D., & Kleckner, N. (2015). of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1,2. <http://cshperspectives.cshlp.org/>